

平成21年 6月16日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19300234

研究課題名（和文） 笑いに対する感受性を既定する遺伝子の探索

研究課題名（英文） Discrimination of responsible gene for susceptibility to laughter

研究代表者

林 隆志 (HAYASHI TAKASHI)

(財)国際科学振興財団・バイオ研究所・研究員

研究者番号：80399328

研究成果の概要：

笑いやすい体質作りのためのトレーニング法を開発し、その効果を分子生物学的に検証した。トレーニング後のコミックビデオ鑑賞で脳波・ $\alpha 2$ 帯域成分(生命維持中枢部の活性を反映)が増加する被験者の笑い体験後で発現が変化している遺伝子を抽出しオンマトロジー解析した結果、発現増加している遺伝子は免疫系に関連し、発現減少している遺伝子は癌に関連する遺伝子であった。また、これらの被験者では、 $\alpha 2$ 帯域成分の増加を認めない被験者と比較して、平常時の同一カテゴリーに属する遺伝子の発現にも差を認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：笑い、遺伝子発現、トレーニング

## 1. 研究開始当初の背景

「笑い」が生体機能を適正化し、健康にプラスになることを論じた報告は多い。米国の Cousins の論文(N Engl J Med, 1976)に端を発し、「笑い」によってNK細胞活性が変化することやACTH、コルチゾール値の変化に関する2つの論文が Berk によって報告されている(Clin Res, 1989, Am J Med Sci, 1989)。我国では、アトピー性皮膚炎患者にコメディアーを鑑賞させアレルギー反応を抑制する(木俣肇：ストレスと臨床, 2001)、落

語」で関節リウマチ患者の痛みの原因となるインターロイキン6を抑制する(吉野慎一：心身医学, 1996)などの研究報告がある。

また、研究代表者らは、糖尿病患者の食後血糖値の上昇が「笑い」により著しく抑制されることを見出し(Diabetes Care, 2003)、その時の遺伝子発現変化をDNAチップ法により網羅的に解析した結果、特異的に発現変動する遺伝子が存在することを見出した(Psychother Psychosom, 2006)。その後、糖尿病合併症進展を抑制する遺伝子(J

Psychosom Res, 2007)や耐糖能の改善に関連する遺伝子(Biomed Res, 2007)の発現が「笑い」により調節されていることも明らかにし、これらの研究成果を、Life Sciences誌(2009)に総括した。

これら一連の研究において、被験者の「笑い」は笑い負荷資料(漫才、落語、コミックビデオ等)の内容や演者・役者への主観的感情の影響を受けるため、笑いの質や程度が異なり、その効果にも個人差が生じることが明らかになった。そこで、研究分担者(林啓子)は、笑いやすい体質作りのために、表情筋のリラクゼーション、腹式呼吸による副交感神経の活性化、快感情イメージ想起をガイドする笑いトレーニング用DVDを開発した。そして、その効果を実証するため脳波解析実験を行った結果、トレーニング後のコミックビデオ鑑賞で $\alpha 2$ 帯域成分(ストレスがない状態で現れ、脳深部の血流量を反映)の増加率が大きくなることを確認した(科学研究費補助金・基盤研究B、課題番号17390576)。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記DVDを使ったトレーニングを行なって笑いに対する感受性が増大(すなわち「笑いやすい体質」へと変化)した状態を作り、笑いに対する感受性が低い時との差を網羅的な遺伝子発現の差として明らかにする。

具体的には、被験者にDVDを使って笑いのトレーニングを1週間してもらい、笑いに対する感受性が高まったことを脳波解析により確認し、感受性が高い時と低い時のコミックビデオ鑑賞前後の遺伝子発現の差を解析し、差を認める遺伝子を抽出する。

そして、抽出されたこれらの遺伝子に関し、各被験者由来の試料毎に定量PCRを行い変化率を求め、脳波解析データと照合して、その関連性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 被験者

医学生被験者(男性6名、年齢 $25.7 \pm 4.6$ 歳、女性6名、年齢 $24.7 \pm 2.7$ 歳)を募集した。全ての被験者は、研究に参加する1週間前から研究終了後まで、服薬、サプリメントの摂取をやめてもらい、トレーニング期間前後のコミックビデオ鑑賞とデータ取得時は飲食を控えてもらった。本研究の実験プロトコルは筑波大学の医の倫理委員会の承認を受けた。研究に先立って、研究の目的、研究の危険性を被験者に丁寧に説明し、書面による同意を得た。

### (2) トレーニング方法

トレーニング用DVDのインストラクションに従い、1週間、毎日トレーニングを行っ

てもらった。呼吸法はゆっくりと息を吐いた後、横隔膜を使って吸気する腹式呼吸を採用し、息を吐くときに陽性イメージを想像してもらった。表情筋のストレッチは、自身の指で、眼輪筋と頬骨筋をほぐすように行ってもらった。日々のトレーニング時間は10分以上とした。

### (3) 実験デザイン

笑いを誘発する媒体として、Mr. Beanのコミックビデオ(ポリグラム株式会社)を用いた。

#### ①, 実験初日

脳波計を装着、リラックスした状態で椅子に腰掛けてもらいコミックビデオを30分間鑑賞してもらった。視聴中の脳波は、被験者の拘束感を低減するためテレメトリシステムを用いて遠隔記録し、遺伝子発現解析用の血液は鑑賞直前と鑑賞後1.5時間後に採取した。被験者には、初日の実験終了後、自宅での1週間のトレーニング方法を説明し、トレーニング用DVDを配布した。この際、空DVDを準備しトレーニング群と対照群を男女均等になるようにランダムに割り当てた。

#### ②, 1週間後

被験者には1週間後の同時間に再来場してもらい、初日同様にコミックビデオを30分間鑑賞してもらった。鑑賞中の脳波データおよび鑑賞直前と鑑賞後1.5時間目の遺伝子発現解析用血液も同様に取得した。

### (4) 脳波解析

WEE-6112 テレメトリックシステム(日本光電、東京、日本)を用いて記録した脳波はオフライン解析のため磁気テープに保存した。脳波導出用の電極は、国際10-20法に従い、頭皮上の12ポイント(Fp1、Fp2、F7、Fz、F8、C3、C4、T5、Pz、T6、O1、O2)に配置し、両耳朶を基準電極として電位変化を記録した。脳波計のフィルターは1-60Hz(-3dB)に設定した。記録された自発脳波の時間軸波形を2秒ごとに区切り高速フーリエ変換の後、各周波数成分のパワー分析を行った。10~13Hzの帯域のパワーを合算し、その平方根を $\alpha 2$ 帯域脳波の等価電位、すなわち $\alpha 2$ 帯域成分とした。被験者による $\alpha 2$ 波強度の個人差を除去するため、被験者ごとに、全ての解析区間、全ての電極、全ての条件を通して $\alpha 2$ 帯域成分を平均した値で標準化した。その後、先行研究により基幹脳神経ネットワークに血流量と統計的に有意な正の相関が認められている頭頂部から後頭部にかけての7つの電極(C3、C4、T5、Pz、T6、O1、O2)の $\alpha 2$ 帯域成分の平均を求めた。

### (5) DNAチップ解析

全 RNA は PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて血液試料から調製した。トレーニング後の笑い体験による  $\alpha 2$  帯域成分増減比率がトレーニング前のそれと比較して相対的に増加した被験者の笑い体験前後および減少した被験者の笑い体験前後で採取した血液から調製した全 RNA をそれぞれ別々に等量混合し、遺伝子発現量の変化を DNA チップ法により網羅的に解析した。非トレーニング群においても、同様な解析を行った。

各群の 250 ng の全 RNA 混合物を、Low RNA Fluorescent Linear Amplification Labeling kit Plus (Agilent Technology, Palo Alto, CA) を用いて増幅し、cyanine (Cy) 3 or Cy5 蛍光色素で標識した CTP を取り込ませた。蛍光標識した cRNA の濃度と純度は、Nanodrop ND-100 と Agilent 2100 Bioanalyzer で評価した。等量の Cy3 で標識した笑い体験前の cRNA と Cy5 で標識した笑い体験後の cRNA を混合し、Agilent 社製 DNA チップ (41,000 オリゴ DNA 搭載、Whole Human Genome Genome Microarray 4 × 44K slide formats) にアプライし、65°C、17 時間のハイブリダイゼーション反応の後、チップを洗浄し、共焦点レーザースキャナー (Agilent、G2565BA) を用いて各蛍光強度をスキャンした。スキャン画像の数値化は、Feature Extraction software Ver. 9.5.3 (Agilent) で行い、発現解析は Agilent GeneSpring で実施した。発現量の相対的变化が 1.5 倍以上、0.67 倍以下を示す遺伝子を抽出し、オントロジー解析を実施した。

#### (6) 遺伝子オントロジー解析

抽出された遺伝子を生物学的意味にもとづき解析した。遺伝子 ID とオントロジー・タームは Biological Network Gene Ontology tool を用いて照合し、各タームに関し DNA チップ上の全遺伝子が割り当てられる頻度と抽出された遺伝子が割り当てられる頻度を hypergeometric test により比較解析した。FDR(false discovery rate)が 0.05 未満で有意に割り当てられるタームを抽出遺伝子に特徴的なタームとした。

#### (7) リアルタイム PCR 解析

上記 DNA チップ解析結果より抽出された 18 遺伝子について、TaqMan® Gene Expression Assays によるリアルタイム定量 PCR 解析を実施した。初期 RNA 量の補正には、内在性コントロールとして DNA チップ解析で発現変動の少なかった PPIA (peptidylprolyl isomerase A) を用いた。検量線を用いた相対定量を行うために、3 種類の cDNA 反応溶液 (被験者サンプル、Standard: 検量線作成用 cDNA サンプルの希釈系列、Negative

Control: cDNA の代わりに水を使用) を使用した。PCR 反応溶液は TaqMan プローブとプライマーがセットになった反応液と cDNA 反応溶液を TaqMan Universal PCR Master Mix に加えて調製した。測定値は各サンプル (3 ウェル分) の蛍光シグナル強度を平均して求めた。PCR の反応は、50°C で 2 分間、95°C で 10 分間の前反応の後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分間のサイクルを 40 回繰り返して行った。上述の検量線作成用サンプルの希釈系列を用いて各遺伝子の検量線を作成し、各サンプルの定量値を得た。また、各遺伝子の発現データの補正は、被験者サンプルの内在性コントロール定量値の Standard サンプル定量値に対する比を乗じて行った。リアルタイム定量 PCR 反応の操作および解析は、ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System と付属のソフトウェアである SDS 2.2 を用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脳波解析による被験者の笑い感受性

笑いトレーニング群/非トレーニング群間において、トレーニング実施期間前のコミックビデオ鑑賞で変化する  $\alpha 2$  帯域成分パワーに差は認められなかったが、1 週間のトレーニング実施後のコミックビデオ鑑賞では、トレーニング群において  $\alpha 2$  帯域成分が増加する被験者群 (図 1 A) と増加しない被験者群 (図 1 B) に分かれた。ここで増加する群を笑いトレーニングの効果あり群、増加しない群を効果なし群として、以下の遺伝子発現解析実験をおこなった。また、非トレーニング群では  $\alpha 2$  帯域成分の増加は認められなかった (図 1 C)。トレーニング効果なし群と非トレーニング群において、コミックビデオ鑑賞後に  $\alpha 2$  帯域成分のパワーが減少するのは、同種の笑い供給源に対する馴化であると考えられるが、効果あり群では馴化は認められず、トレーニング効果が笑いによる  $\alpha 2$  帯域成分パワーの顕著な増強として現れた。

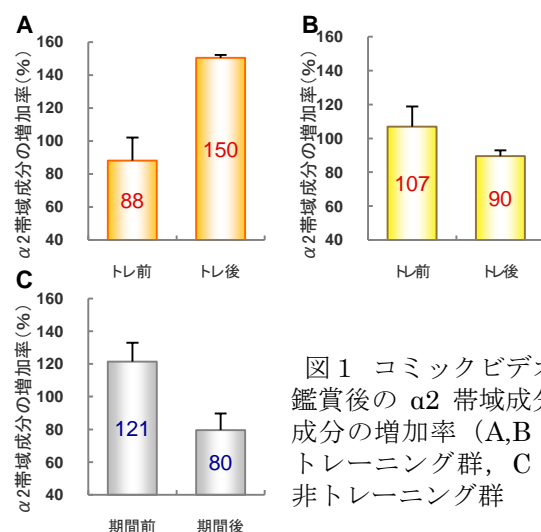


図 1 コミックビデオ鑑賞後の  $\alpha 2$  帯域成分の増加率 (A, B; トレーニング群, C; 非トレーニング群)

(2) 遺伝子発現解析

トレーニング効果あり群および効果なし群のトレーニング前後、非トレーニング群の期間前後におけるコミックビデオ鑑賞で 1.5 倍以上発現変化した遺伝子の数を表 1 に示す。いずれの場合も発現減少した遺伝子数が増加した遺伝子数を上回っていた。

表 1 コミックビデオ鑑賞で発現変化した遺伝子数(1.5 倍以上)

	Up (probes)	Down (probes)
効果なし群(トレ前)	276	540
効果なし群(トレ後)	318	413
効果あり群(トレ前)	299	610
効果あり群(トレ後)	267	389
非トレーニング群(前)	412	507
非トレーニング群(後)	356	434

トレーニング前後、あるいは非トレーニング期間前後のコミックビデオ鑑賞で相対的に発現変化した遺伝子数を表 2 に示すが、トレーニング群では効果の有無に関わらず、発現増加した遺伝子が多かったのに対し、非トレーニング群では発現減少した遺伝子が多かった。

表 2 コミックビデオ鑑賞で相対的に発現変化した遺伝子数(1.5 倍以上)

	Up (probes)	Down (probes)
効果なし群	611	553
効果あり群	599	495
非トレーニング群	618	1,053

(3) 遺伝子オントロジー解析

トレーニング後のコミックビデオ鑑賞で、 $\alpha 2$  帯域成分の相対的増加が認められた群(効果あり群)で発現が変化した遺伝子(相対的に Up ; 350 遺伝子、相対的に Down ; 264 遺伝子)が割り当てられた GO Term 数(Enrichment [P<0.01])を表 3 に示す。また、トレーニング後のコミックビデオ鑑賞で、 $\alpha 2$  帯域成分の相対的増加が認められた群(効果あり群)と相対的減少が認められた群(効果なし群)において、トレーニング開始前(平常時)の遺伝子の発現状態に 1.5 倍以上の差を認める遺伝子(効果あり群で ON ; 466 遺伝子、効果あり群で OFF ; 395 遺伝子)を抽出し、P<0.01 の有意差をもって割り当てられ

た GO Term 数を表 4 に示す。

さらに、効果群のトレーニング後のコミックビデオ鑑賞で有意に発現変化した遺伝子が割り当てられた各カテゴリー(Biological Process、Cellular Component、Molecular Function)に属する上位 3 位の Term 名を表 5 に、当 Term に割り当てられた遺伝子名を表 6 に示す。これら遺伝子を笑い易さを反映する遺伝子と称する。発現増加する遺伝子の多くは免疫関連の Term に割り当てられたのが特徴的であり、免疫グロブリン、NK 細胞活性の調節、免疫細胞の膜機能、マクロファージ活性に関与する遺伝子が含まれていた。対して、発現減少した遺伝子には、癌化や転移に関連する遺伝子が含まれていた。

効果群の平常時において、発現に差を認める遺伝子が割り当てられた各カテゴリーに属する上位 3 位の Term 名を表 7、当 Term に割り当てられた遺伝子名を表 8 に示す。これら遺伝子を笑い易さを既定する遺伝子と称する。同様に、発現量が多い遺伝子が免疫関連の Term に割り当てられたのが特徴的であり、免疫グロブリン、NK 細胞活性の調節、免疫細胞の膜機能、マクロファージ活性、HLA 抗原に関与する遺伝子が含まれていた。発現減少した遺伝子にも、癌化等に関連する遺伝子が含まれていた。

表 3 効果あり群で相対的に発現が Up/Down する遺伝子が割り当てられた GO Term 数

発現変化	Biological Process	Cellular Component	Molecular Function
Up	65 Terms	14 Terms	19 Terms
Down	6 Terms	4 Terms	10 Terms

表 4 効果あり群の平常時において発現に差がある遺伝子が割り当てられた GO Term 数

発現状態	Biological Process	Cellular Component	Molecular Function
ON	63 Terms	19 Terms	28 Terms
OFF	11 Terms	5 terms	7 Terms

表 5 効果あり群で相対的な発現変化を認めた遺伝子が割り当てられた GO Term

発現変化	Biological Process	Cellular Component	Molecular Function
Up	1.regulation of lymphocyte activation 2. immune system process 3.regulation of cell activation	1. plasma membrane 2. cyto-skeleton 3. cyclin dependent protein kinase holoenzyme complex	1. receptor activity 2. molecular transducer activity 3. signal transducer activity
Down	1. vesicle organization and biogenesis 2.inflammatory response 3.translation	1. ribosome 2.ribonucleo protein complex 3. ribosomal subunit	1. structural constituent of ribosome 2. carbonate dehydratase act. 3.hydrolyase activity

表 6 効果あり群で相対的に Up/Down する遺伝子 (笑い易さを反映する遺伝子)

	Gene Symbol
Up	IGHA1, IGHG1, IGHM KIR2DS1, KIR3DL1, CTSS BCAP31 LAX1 CIITA SPON2
Down	MALAT1 SLPI TRIAP1

表 7 効果あり群の平常時において発現に差を認めた遺伝子が割り当てられた GO Term

	Biological Process	Cellular Component	Molecular Function
ON	1. immune response 2. immune system process 3. cellular defense response	1. MHC protein complex 2.hemoglobin complex 3. MHC class II protein complex	1. receptor activity 2. MHC class I receptor activity 3. signal transducer activity
OFF	1. Wnt receptor signaling pathway 2. transepithelial chloride transport	1.hemoglobin complex 2. intrinsic to membrane 3. integral to membrane	1. calcium-dependent protein binding 2. oxygen transporter activity 3. MHC

3. antigen processing and presentation of peptide		class II receptor activity
---	--	----------------------------

表 8 効果あり群の平常時において発現に差を認めた遺伝子 (笑い易さを既定する遺伝子)

	Gene Symbol
ON	IGKC, IGKV1-5, IGJ, IGHA1, IGHG1, IGLL1 HLA-C, HLA-G, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, MICA KIR2DS1, KIR2DS2, KIR3DL1, CRTAM GZMA, CTSC, CTSW LILRA3 SPON2
OFF	DACT1 FRAT1 AXIN2 TCF7

#### (4) リアルタイム PCR 解析

効果あり群で相対的に Up/Down した笑い易さを反映する 9 遺伝子 (IGHA1、IGHG1、KIR3DL1、IGHM、CTSS、BCAP31、LAX1、MALAT1、SLPI) を各被験者由来の試料毎に定量 PCR 解析した結果を、遺伝子の発現比の平均として図 2 に、効果あり群と効果なし群で平常時に発現の差を認めた笑い易さを既定する 12 遺伝子 (IGHA1、IGHG1、KIR3DL1、IGKC、HLA-DQA1、HLA-DQB1、CRTAM、GZMA、CTSW、LILRA3、FRAT1、TCF7) の結果を図 3 に示した。各遺伝子の発現変動は DNA チップ解析と同様の傾向がみられ、特に TCF7 は平常時の値が効果あり群では効果なし群に比べて有意に発現減少していた。また、コミックビデオ鑑賞による  $\alpha 2$  帯域成分の変動と遺伝子の変化率の相関を分析した結果、かなり相関がある ( $|r|=0.7 \sim 0.4$ ,  $r$ ; Pearson の相関係数) 遺伝子として TCF7 ( $r=0.40$ ) が、やや相関がある ( $|r|=0.4 \sim 0.2$ ) 遺伝子として IGHM ( $r=0.29$ )、BCAP31 ( $r=0.28$ )、CTSW ( $r=0.27$ )、KIR3DL1 ( $r=0.24$ )、IGHH1 ( $r=0.23$ )、LAX1 ( $r=0.20$ ) が抽出された。更に群ごとに照合すると  $\alpha 2$  帯域成分の増加しない効果なし群と非トレーニング群では、 $\alpha 2$  帯域成分の変化と遺伝子の変化率に相関がみられなかったが、 $\alpha 2$  帯域成分が増加する効果あり群と各遺伝子の変化率は相関が認められた (図 4)。

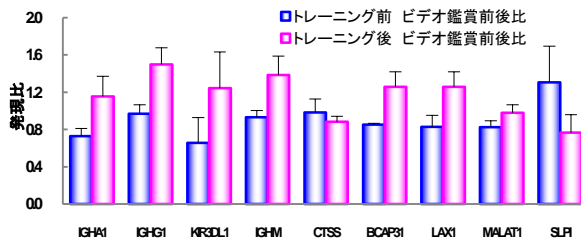


図2 笑い易さを反映する各遺伝子の発現変化

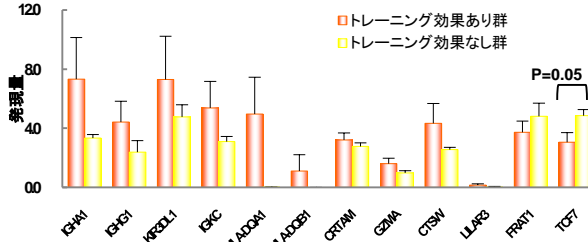


図3 笑い易さを既定する各遺伝子の発現変化

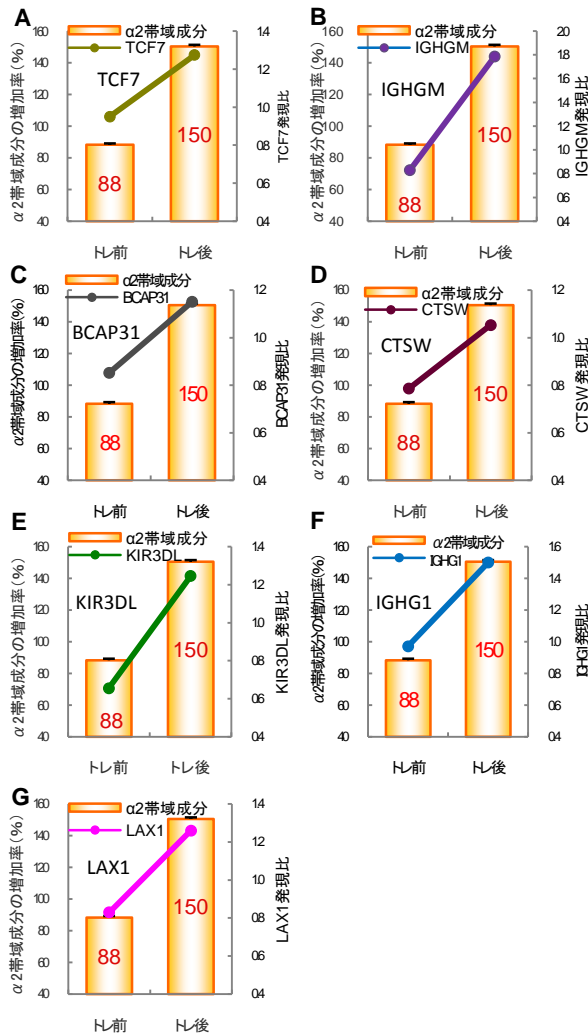


図4 効果あり群のコミックビデオ鑑賞後のα2帯域成分の増加率と遺伝子の発現比の相関図 (A:TCF7, B:IGMM, C:BCAP31, D:CTSW, E:KIR3DL1, F:IGHG1, G:LAX1)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

- ① Hayashi T, Murakami K: The effects of laughter on post-prandial glucose levels and gene expression in type 2 diabetic patients. Life Sciences, 査読有, in press, 2009

[学会発表] (計 2件)

- ① 林隆志、堀美代、河合徳枝、坂本成子、村上和雄、林啓子: 笑いやすさを既定する遺伝子と反映する遺伝子. 第7回心と遺伝子研究会, 2008年8月28日, 筑波大学

[図書] (計 1件)

- ① 林啓子、林隆志: 法研, 簡単にできる笑み筋体操, 2008, 181ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ

<http://mind-gene.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 隆志 (HAYASHI TAKASHI)

(財)国際科学振興財団・バイオ研究所・研究員

研究者番号: 80399329

### (2) 研究分担者

村上 和雄 (MURAKAMI KAZUO)

(財)国際科学振興財団・バイオ研究所・研究員

研究者番号: 70110517

林 啓子 (HAYASHI KEIKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 50156436

河合 徳枝 (KAWAI NORIE)

(財)国際科学振興財団・研究開発部・研究員

研究者番号: 50261128

### (3) 連携研究者