

第2章

細胞生物研究プロジェクト「ユビキチンリガーゼ Cbl-b による筋萎縮の新規メカニズム」平成18年度活動報告

二川 健*、東端 晃**、石岡 憲昭**

Annual Report of “Cbl-mediated ubiquitination downregulates the responsiveness of skeletal muscle cells to growth factors in space” in FY18

By

Takeshi NIKAWA*, Akira HIGASHIBATA**, Noriaki ISHIOKA**

Abstract: This study is designed to elucidate molecular mechanism of microgravity-induced muscle atrophy and develop the countermeasures. In 2006, we had examination to evaluate whether our plan was suitable for space experiment in the International Space Station (ISS) and passed it. Then, we made mockup of equipments, such as sample holders and reagent suppliers, which will be used in ISS. In ground-based experiments, we examined mechanism of microgravity-induced expression of an ubiquitin ligase Cbl-b, a main regulator of muscle atrophy.

Key words: ubiquitin ligase, muscle atrophy, Cbl-b

概 要

本研究では、これまで多く指摘されている宇宙空間での筋萎縮に注目し、微小重力による筋萎縮の新規メカニズムを実証し、その予防の可能性を探ることを目的としている。今年度は、ISSにおけるフライト実験実施に向けた実験計画のベースライン化審査会を開催し、実験供試体の開発フェーズへの移行が承認された。これを踏まえ、サンプルホルダーや固定前処理器具の検証モデルを製作した。また、地上予備実験として、フライト実験でターゲットとしているCbl-bに関連したユビキチン-プロテアソーム系の上流部分の探索や過重力に対する影響について検討を行った。

1. はじめに

1998年に打ち上げられたスペースシャトル (STS-90) による実験で、無重力により萎縮したネズミの骨格筋では特殊なタンパク質分解経路 (ユビキチン-プロテアソーム経路) だけが活性化することを見出した。このタ

* Department of Nutrition Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School

** JAXA

ンパク質分解経路は分解しようとするタンパク質をユビキチンというペプチドで標識する（ユビキチン化）という特徴があり、この宇宙フライトネズミの骨格筋でも多くのタンパク質がユビキチン化され分解されていることがわかった。この現象は、骨格筋において増殖因子、中でも IGF-1 に抵抗性を示し、その結果筋萎縮関連遺伝子（Atrogin-1 や Atrogenes）の発現が増大し、筋萎縮が誘導されると考えられてきた。しかしながら、どのような因子が IGF-1 の抵抗性を誘導するかは不明であった。地上予備実験により、Cbl-b というユビキチンリガーゼが IRS-1 をユビキチン化し分解を亢進することがその抵抗性の原因であることを明らかにした。平成18年度は Cbl-b の発現調節機構を解析し、Cbl-b は無重力のストレスを感知し、酸化ストレス（ROS）、Erk1/2Egr を介して発現が調節されていることを明らかにした。この上流には、Unloading Stress の感知に重要な分子が存在する可能性が大きい。フライト実験を通じて、微小重力によりユビキチン化されやすい情報伝達物質とその反応を誘導する酵素についても検討し、無重力による筋萎縮の新規メカニズムの全容を解明する予定である。

2. 成果の概要

2.1. 実験計画のベースライン化作業

本フライト実験候補テーマは、2000年にフライト候補テーマと選定されて以来、フライト実験に向けた実験計画の詳細化作業を行ってきた。第1章で述べたとおり、さまざまな確認事項や検討事項についての対処法を示し、実験計画書（ベースライン版）の案を作成した。本フライト候補テーマについても実験供試体への開発フェーズへの移行に関して平成18年7月28日に審査会を開催した。審査の結果、科学的・技術的実現性について十分検討されていると評価でき、問題なく開発フェーズに移行できることが確認された。

2.2. 地上予備実験の実施

フライトに向けた地上予備実験として、以下の項目について実施した。

2.2.1. 骨格筋における Unloading ストレス感知の分子機構

寝たきり患者や宇宙飛行士にとって、Unloading による骨格筋の萎縮は深刻な問題であり、そのメカニズムの解明と治療法の開発が急務である。一般的に筋萎縮はタンパク質合成と分解のインバランスにより起こると考えられている。私達は、骨格筋における3つの主要な分解系（ユビキチン-プロテアソーム系、カルシウム-カルパイン系、リソソーム系）の中でも、ユビキチン-プロテアソーム依存性筋タンパク質分解経路が、Unloading による筋萎縮で重要な働きをしているということを示してきた。

ユビキチン-プロテアソーム依存性タンパク質分解経路は、分子量8,600のペプチドであるユビキチンがユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）、ユビキチンリガーゼ（E3）を介し、基質分子に結合すること（ポリユビキチン化）から開始される。このシステムの律速酵素であるユビキチンリガーゼ群の中で、私達の研究グループは Cbl-b が廃用性筋萎縮の原因因子の1つであることを明らかにした（論文投稿中）。Cbl-b は、中央にユビキチンリガーゼとしての機能の特徴づける RING フィンガードメインを、N 末端にリン酸化したチロシンとの結合ドメインを有し、受容体型チロシンキナーゼシグナル伝達を負に調節する働きを持つことが知られている。Unloading 環境に曝露した骨格筋では、この Cbl-b の発現が上昇し、骨格筋の増殖分化を司る IGF-1 のシグナル分子 IRS-1 の分解を亢進した。その結果、骨格筋細胞は IGF-1 に抵抗性を示し、Unloading による筋萎縮が誘導された。

以上のように、Cbl-b の筋萎縮原因遺伝子としての機能が解明される一方、その発現調節機構については未だ不明のままである。どのように Unloading ストレスが Cbl-b 遺伝子の発現を上昇させるのかを解明することは、骨格筋がどのように機械的ストレスを感知しているかの解明につながるはずである。本研究では、骨格筋固有の機械的ストレス感知の分子機構の解明を目的とし、Cbl-b の Unloading ストレスによる発現調節機構について検討した。

2.2.2. 試料および方法

2.2.2.1. 活性酸素種の検出

ラット横紋筋芽細胞 L6 細胞を 37°C、5 %CO₂ の条件下で、増殖培地 (10%牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)) を用いて 24 時間培養した。培地を Hanks' Balanced Salt Solution (4 mM NaHCO₃, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 0.3 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM glucose, 0.4 mM KH₂PO₄, 1.26 mM CaCl₂; HBSS) に換え、10 μM の酸化ストレス検出薬 5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H₂ DCFDA) mixed isomers (Molecular Probes) と等量の DCFDA 排出阻害剤 Pluronic®F-127 (Invitrogen) を添加し、37°C、20 分間反応した。培地を HBSS に換え 3D-clinorotation (後述) 刺激後、蛍光顕微鏡で観察した。5mM *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC) は carboxy-H₂ DCFDA と同時期に添加し HBSS 交換時に新たなものに交換した。

2.2.2.2. プラスミド作成とルシフェラーゼアッセイ

ヒトゲノムライブラリよりプライマー 5'-CACCACCCTGGTTGTCCACAGG-3' と 5'-CTTTCGGCGCCGTAGCTGTCCA-3' を用いて Cbl-b 遺伝子の 上流 -2072 bp から +249 bp を pGL3-Basic Vector (Promega) に組み込みプラスミドを作成した。同様に 5'-CACCGAGCTCGGCATTGGCTCA -3' と 5'-CTTTCGGCGCCGTAGCTGTCCA -3' を用いて 上流 -111 bp から +249 bp までの cDNA を、5'-CACCGGTACCCTGGGTCCTGT -3' と 5'-CTTTCGGCGCCGTAGCTGTCCA -3' を用いて 上流 -59 bp から +249 bp までの cDNA を合成し、プラスミドに subclone 化した。制限酵素 Sma I / Xho I フラグメント (-292 bp から +249 bp までの cDNA) と、Mlu I / Xho I フラグメント (+217 bp から +249 bp までの cDNA) をそれぞれ pGL3-Basic Vector に組み込んだ。

赤毛ザル腎細胞 COS 7 細胞を 37°C、5 %CO₂ の条件下で、100 μg/ml ストレプトマイシン、100 IU/ml ペニシリン G を含む増殖培地を用いて 24 時間培養した。無血清の増殖培地に替え、FuGENE6 (Roche) を用いて上述のベクターをトランスフェクションした。4 時間後、10 μM 過酸化水素下で 24 時間培養し、lysis buffer (Promega) 200 μl で細胞を回収した。細胞破碎後、4 °C、12,000g、2 分間の条件で遠心した上清 10 μl と Luciferase Assay Reagent (Promega) 20 μl を混合し、ルミノメーターで測定した。

2.2.2.3. ゲルシフトアッセイ

COS7 細胞を 10 μM H₂O₂ または PBS で 3 時間処理し、130 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT を含む 10 mM Tris-HCl washing buffer) で細胞を回収した。遠心後、5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT を含む 20 mM HEPES-KOH (hypotonic buffer) で細胞を破碎した。さらに、遠心後の沈殿物を 500 mM NaOH, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA-NaOH, 25% Glycerol, 0.5 mM DTT を含む 20 mM HEPES-KOH (extraction buffer) で 4 °C、1 時間攪拌した。遠心後、上清を 0.5 mM EDTA-NaOH, 50 mM KCl, 10% Glycerol, 0.5 mM DTT を含む 20 mM HEPES-KOH (binding buffer) で透析し、核蛋白抽出液とした。75 pmol の合成 oligo nucleotide を T4 kinase (Nippon Gene) を用いて γ-[³²P]ATP (Amersham biosciences) で標識し、プローブを作成した。核タンパク抽出液とそれぞれの Probe を binding solution (5mM MgCl₂, 2.5% Glycerol, 1mg BSA, 1 % NP-40, 50mM KCl) 中で 30 分混和し、6 % アクリルアミドゲルで 140V、1.5 時間泳動した。ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィで解析を行った。

2.2.2.4. 3D-clinorotation (三次元培養法)

L6 細胞を 37°C、5 %CO₂ の条件下で、100 μg/ml ストレプトマイシン、100 IU/ml ペニシリン G を含む増殖培地を用いて、ほぼ 100% コンフルエントまで静地培養した。ウェル内を培地で満たし密閉後、小型クリノスタット PMS-VI の試料台に固定した。X 軸 11.0 rpm、Y 軸 13.0 rpm の条件で回転培養した。コントロールとして、他の条件はそのまま静地培養したものを用いた。一部の実験では 10 μM の mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路阻害剤 (Calbiochem) を 1 時間前処理した。

2.2.2.5. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

総 RNA に終濃度 $1 \mu\text{M}$ oligo-dT primer、 $10 \mu\text{M}$ random primer、 0.5mM dNTPs (Promega)、 100U MLV reverse transcriptase (Promega) を加え 42°C 、60分間、 95°C 、5分間逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA に Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) とプライマーを加え、PCR 反応を行った。内部標準として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。PCR 反応は、まず 50°C 、2分間プレヒートし、 95°C 、10分間でタックポリメラーゼを活性化させた。その後、 95°C 、15秒間の熱変性、 60°C 、1分間のプライマーとの結合、cDNA 伸長反応を40サイクル繰り返した。

2.2.2.6. ウェスタンブロット法

タンパク質 ($30 \mu\text{g}$) を SDS 化後、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲル中のタンパク質をセミドライプロット装置 (ATTO) を用いて Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写した。転写後、PVDF 膜を 4% 精製ミルクカゼインで 1時間ブロッキングし、0.05% Tween-20 を含む PBS (PBS-T) で洗浄した。次に、膜を一次抗体 (抗 Egr 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 Cbl-b 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 MAPK 抗体 (Cell Signaling)) と 37°C で 1時間反応させた。洗浄後、さらに二次抗体 [抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham)、または抗マウス IgG 抗体 (Amersham)] と 37°C で 1時間反応させた。洗浄後、Enhanced Chemiluminescence 検出システム (Amersham) を用いて抗体と反応したタンパク質を検出した。

7) RNA 干渉法による遺伝子のノックダウン

L6 細胞を 37°C 、5% CO_2 の条件下で、増殖培地を用いて 24時間培養した。培地を Opti-MEM (GIBCO) に替え、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて 100nM の合成 Egr-1、Egr-2、Egr-3 siRNA (B-Bridge International, Inc.) をトランスフェクションした。72時間後、示した時間 3D-clinorotation 培養した。その後グアニジンイソチアシン酸-フェノール-クロロホルム混合溶液 (Nippon Gene) により総 mRNA を抽出した。

2.2.3. 結果

2.2.3.1. 酸化ストレスによる Cbl-b 発現の誘導

酸化ストレスによる Cbl-b mRNA の発現量を検討した。L6 筋芽細胞において、 $100 \mu\text{M}$ と $250 \mu\text{M}$ の H_2O_2 処理をしたところ、それぞれ 6時間と 12時間をピークとする Cbl-b mRNA の増大を確認した。

2.2.3.2. 模擬微小重力 (3D-clinorotation) による酸化ストレスの誘導

酸化ストレス感知試薬 (carboxy- H_2 DCFDA) を前処理した L6 筋芽細胞を 3D-clinorotation に曝露させ、細胞内の蛍光強度を観察した。コントロール (Vehicle 処理) では蛍光を発する細胞は見られなかった。一方、3D-clinorotation に供した L6 細胞は、 H_2O_2 処理した細胞と同程度の酸化ストレスの蓄積が観察された。N-Acetyl-L-cysteine の前処理によりこの蛍光は消失した。

2.2.3.3. ヒト Cbl-b プロモーター解析

ヒト Cbl-b 遺伝子の酸化ストレス応答領域をルシフェラーゼアッセイにより解析した。Cbl-b 遺伝子の上流 -2072 bp を含むルシフェラーゼベクターは、 H_2O_2 処理に反応してルシフェラーゼ活性を増加させた。上流 -292 bp および -111 bp を含むルシフェラーゼベクターも同様に H_2O_2 に反応したが、上流 -59 bp および +217 bp を含むルシフェラーゼベクターは、 H_2O_2 に反応しなかった。この知見により、Cbl-b 上流遺伝子の酸化ストレス応答領域は上流 -111 bp から -60 bp に存在することがわかった。

そこでこの領域を 3つのプローブに分け、ゲルシフトアッセイを行った。 H_2O_2 処理後の L6 細胞の核抽出タンパク質に、Probe 1 および Probe 2 に結合するものはなかった。ところが、Probe 3 は H_2O_2 に反応する核タンパク質の結合をとらえることができた。さらに、Probe 3 の変異体 Mt 1 および Mt 2 のうち Mt 2 のみこの核タンパク質と結合しなかった。この結果より、未同定の転写調節因子は、Egr-1 や Sp1 のコンセンサス配列に結合することが示唆された。

最後に、これらの転写調節因子に対する抗体を用いてスーパーシフトアッセイを行った結果、Egr-1、Egr-2、Egr-3 の抗体は、Probe 3 と結合する核タンパク質の量を有意に減少させた。一方、Sp1 の抗体は Probe 3 と核タ

ンパク質との結合に影響を与えなかった。以上の所見より、Cbl-b 遺伝子の主要な転写調節因子は Egr であることがわかった。

2.2.3.4. Unloading ストレスによる Egr および Cbl-b の発現

L6 筋芽細胞の 3D-clinorotation による Egr および Cbl-b mRNA の発現パターンを検討した。興味深いことに、3D-clinorotation 後1.5時間で Egr の発現量がピークに達し、そのさらに1.5時間後に Cbl-b mRNA の発現量が増大した。これらの 3D-clinorotation による誘導はタンパク質レベルでも確認できた。さらに、L6 筋管細胞を 3D-clinorotation に曝露した場合でも、L6 筋芽細胞を H₂O₂処理した場合でも、Egr と Cbl-b mRNA の反応は同じであったことから、筋芽細胞も筋管細胞も Unloading ストレスに対する応答機構はほぼ同じであると考えられた。

2.2.3.5. Unloading ストレスによる Egr 発現誘導シグナル経路の特定

Unloading ストレスがどのようなシグナル経路を介して Egr 発現を誘導しているかについて、Egr の発現に重要である MAP キナーゼ経路を中心に検討した。3D-clinorotation に曝露後、約30分で MAP キナーゼ ERK、JNK、p38のすべてがリン酸化したので、MAP キナーゼシグナルのそれぞれの経路に特異的な阻害剤を用いて、Egr 発現に参与する主要な MAP キナーゼ経路を特定した。Egr mRNA の発現は ERK 経路の阻害剤によってのみ有意に抑制された。これらの所見から、Unloading ストレスによる Egr の発現は、MAP キナーゼ ERK シグナル経路を介していることが示された。

2.2.3.6. Egr 遺伝子ノックダウンによる Cbl-b mRNA 発現への影響

Unloading ストレスにより活性化する Egr 群のうち、どの Egr が最も重要な働きをしているのかを検討するため、Egr-1、Egr-2、Egr-3 の siRNA を用いて Cbl-b mRNA 発現に対する影響を解析した。まず初めに、それぞれの siRNA の特異性を確認した。それぞれの siRNA は標的遺伝子の発現量を特異的に約30%まで抑制した。しかしながら、Egr-1、Egr-2、Egr-3 それぞれの siRNA 処理では 3D-clinorotation による Cbl-b mRNA の発現上昇を抑制できなかった。次に、すべての siRNA を同時に処理すると Cbl-b mRNA の発現上昇が著明に抑制された。以上の結果から、Egr-1、Egr-2、Egr-3 は Unloading ストレスによる Cbl-b 発現の主要な転写調節因子であり、それぞれは互いに代償できることが示唆された。

2.3. 課題とその対策

地上予備実験を含め現時点で行える準備は着々と進んでいる。今後は、実験供試体を利用した実験試料の適合性試験等を行い、フライトに向けた準備を進めていく予定である。以下は、地上研究で得られた結果に対する考察である。

今年度の地上研究により、微小重力モデルである 3D-clinorotation により H₂O₂処理と同程度の酸化ストレスが L6 筋芽細胞内に蓄積することを証明した。ヒト Cbl-b 遺伝子の転写開始点から上流-70 bp 付近に酸化ストレス応答領域が存在することを明らかにした。さらに、その酸化ストレス応答領域には転写調節因子 Egr-1、Egr-2、Egr-3 が結合することから、これら Egr 群が Unloading ストレスの重要な感知分子の一つであることが示唆された。

L6 筋管細胞を 3D-clinorotation に曝露した場合でも、L6 筋芽細胞を H₂O₂処理した場合でも、Egr と Cbl-b mRNA の反応は同じであった。これにより、筋芽細胞や筋管細胞の Unloading に対する感知機構はほぼ同じであり、Egr 群が重要な働きをしていることが示唆された。

本研究において、Egr-1、Egr-2、Egr-3 それぞれの siRNA 処理では 3D-clinorotation による Cbl-b mRNA の発現上昇を抑制しなかった。しかしながら、すべての siRNA を同時に処理すると Cbl-b mRNA の発現上昇が著明に抑制された。このことから、Egr-1、Egr-2、Egr-3 は Unloading ストレスによる Cbl-b 発現の主要な転写調節因子であり、それぞれは互いに代償できることが示唆された。

今回の実験結果から、3D-clinorotation 刺激が細胞内に酸化ストレスを発生させ、それに引き続いて MAPK 経路が活性化していると考えられた。さらに阻害剤の添加実験により、Unloading による Egr の発現が、ERK シグ

ナル経路を介していることを明らかにした。しかしながら、Unloading ストレスがどのように酸化ストレスを誘導するのかは不明である。近年、TGF- β 刺激が培養細胞内に H₂O₂ を発生させることが報告されており、筋膜上の受容体が酸化ストレス誘導に関与しているのかもしれない。今後、細胞内酸化ストレス発生機序についてさらなる検討が必要である。

本研究により、酸化ストレス、ERK 経路に続く転写調節因子 Egr の活性化が Unloading ストレス感知の重要な経路であることが明らかとなった。機械的刺激をシグナル伝達分子に変換し、遺伝子発現を制御するこの経路は、廃用性筋萎縮の治療法を開発するための新規の分子ターゲットとなりうると考えた。また、この経路の解明により、骨格筋における再生の活性化や障害の抑制を目的とする薬剤の開発や、効果的な運動トレーニング法の確立につながると確信している。今後は、機械的ストレス感受性を持つ受容体や、受容体直下ではたらくシグナル伝達因子の検索、細胞内酸化ストレスの発生機序の解明などを中心に検討し、Unloading ストレス感知の分子機構の全貌を明らかにしたい。

3. まとめ

本フライト実験候補テーマは、2009年初頭のフライト実験実施を目指して準備を進めており、今年度は実験計画のベースライン化が承認され、開発フェーズに移行した。また、地上実験で得られた結果も、フライト実験の価値を高めるための予備データとして蓄積されてきている。

平成19年度は、今年度制作した実験供試体の検証モデルを用いて各種適合性試験（用いる培養細胞と細胞培養容器の適合性、培地や固定液の交換効率の確認）や実験手順の詳細化作業を行う予定である。また、地上予備実験として、(1) 疑似微小重力環境を用いて、フライト実験で予定している手順をシミュレートし実験的に検証、(2) Cbl-b 調節機構のさらに上流の分子（真の Unloading Stress の受容体）の探索を行う予定である。

4. 成果発表

- [1] Suzue N., Nikawa T., Onishi Y., Yamada C., Hirasaka K., Ogawa T., Furochi H., Kosaka H., Ishidoh K., Gu H., Takeda S., Ishimaru N., Hayashi Y., Yamamoto H., Kishi K., Yasui N., "Ubiquitin ligase Cbl-b downregulates bone formation through suppression of IGF-I signaling in osteoblasts during denervation", *J. Bone Miner. Res.*, **21**, 722-734, 2006.
- [2] Sato T., Yamamoto H., Sawada N., Nashiki K., Tsuji M., Nikawa T., Arai H., Morita K., Taketani Y., Takeda E., "Immobilization decreases duodenal calcium absorption through a 1,25-dihydroxyvitamin D-dependent pathway" *J. Bone Miner. Metab.*, **24**, 291-299, 2006.
- [3] Ogawa T., Furochi H., Mameoka M., Hirasaka K., Onishi Y., Suzue N., Oarada M., Akamatsu M., Akima H., Fukunaga T., Kishi K., Yasui N., Ishidoh K., Fukuoka H., Nikawa T., "Ubiquitin ligase gene expression in healthy volunteers with 20-day bedrest", *Muscle Nerve*, **34**, 463-469, 2006.
- [4] Shimooka R., Yasuhiro K., Chiba N., Tanaka J., Rokutan K., Furochi H., Hirasaka K., Nikawa T., Kishi K., "Soy protein diet prevents hypermethioninemia caused by portacaval shunt in rats", *J. Med. Invest.*, **53**, 255-263, 2006.
- [5] Sato T., Yamamoto H., Sawada N., Nashiki K., Tsuji M., Muto K., Kume H., Sasaki H., Arai H., Nikawa T., Taketani Y., Takeda E., "Restraint stress alters the duodenal expression of genes important for lipid metabolism in rat", *Toxicology*, **227**, 248-261, 2006.
- [6] Nikawa T., Nakao R., Asanoma Y., Hayashi R., Furochi H., Hirasaka K., Kishi K., "A skeletal muscle-derived secretory protein, attractin, upregulates UCP-2 expression in mouse 3T3-L1 adipocytes", *Biol. Sci. Space*, **20**, 33-39,

2006.

- [7] Furochi H., Nikawa T., Hirasaka K., Suzue N., Ishidoh K., Onishi Y., Ogawa T., Yamada C., Suzuki H., Higashibata A., Oarada M., Kishi K., Yasui N., “Distinct gene expression profiles in the femora of rats exposed to spaceflight, tail-suspension and denervation”, *Biol. Sci. Space*, **20**, 80–91, 2006.
- [8] Oarada M., Gono T., Tsuzuki T., Igarashi M., Hirasaka K., Nikawa T., Onishi Y., Toyotome T., Kamei K., Miyazawa T., Nakagawa K., Kashima M., Kurita N., “Effect of dietary oils on lymphocyte immunological activity in psychologically stressed mice”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 174–182, 2007.
- [9] Nakano S., Mishiro T., Takahara S., Yokoi H., Hamada D., Yukata K., Takata Y., Goto T., Egawa H., Yasuoka S., Furochi H., Hirasaka K., Nikawa T., Yasui N., “Distinct expression of mast cell tryptase and protease activated receptor-2 in synovia of rheumatoid arthritis and osteoarthritis”, *Clin. Rheumatol.*, 2007 (Epub ahead of print).
- [10] Takahashi H., Nakao R., Hirasaka K., Kishi K., Nikawa T. “Effects of Single Administration of Rokumi-gan (TJ-87) on Serum Amino Acid Concentration of 6 Healthy Japanese Male Volunteers” *J. Med. Invest.*, in press.