

## 重症心不全の新たな治療戦略

所属機関 久留米大学医学部  
研究者名 今泉 勉

## 《研究の概要》

心血管疾患による死亡はガンをしのいで現在本邦における死亡原因の第一位である。心疾患の終末像は原疾患にいかんに関わらず、心室拡張・心収縮力低下・液性因子活性化などの共通した特徴をそなえた心不全症候群を呈する。重症心不全のわが国での罹病率は100万人程度で新たな患者発生は10-20万人と想像され、高齢化の進行によりさらに増加するものと考えられる。心不全の基本病態は不明であり、近年の薬物治療などの進歩にもかかわらず、重症心不全の予後はきわめて不良である。これは現在の心不全治療が対症療法にとどまっているためと考えられる。

したがって、重症心不全の分子機序を明らかとし、心不全の原因となる遺伝子をターゲットとした根本的な予防法・治療法を開発することが急務である。そのためには、不全心における遺伝子発現プロファイルを明らかとし、心不全の原因遺伝子・進展促進遺伝子などを同定すること、それらの遺伝子をターゲットとした遺伝子治療を開発すること、さらに遺伝子治療と再生医療を併用することにより正常化させた心筋（前駆）細胞移植療法を開発する必要がある。また、臨床の場合においては、個々の症例で治療薬に対する反応性が異なるため、これを予知し症例毎に病態に応じた最適な治療を選択・施行することが必須である。

そこで、代表研究者今泉らは、圧負荷肥大心、容量負荷肥大心における遺伝子発現を網羅的に解析し、負荷に対する代償性心リモデリング、心不全化の分子メカニズムを解析した。その結果、圧負荷肥大心において、アンジオテンシン系活性化を介する、ICAM-1・MCP-1といった炎症関連遺伝子発現が心筋線維化を引き起こし拡張障害の原因であることを見いだした。さらにジーンチップ解析の結果有意な変化を示した遺伝子群についてその生理的・病態生理的意義を逐一解析し検討を押しすすめている。共同研究者の豊岡らは、自らが見いだした先天性心筋症ハムスターモデルの心不全原因欠損遺伝子ディストロフィンの異常が、後天的な心不全においても病態に関与することを明らかにした。さらに、先天性心筋症ハムスターモデルに欠損遺伝子を rAAV ベクターを用いて導入することで心不全をレスキューしうることを確認した上で、霊長類への応用を準備している。現在、頻脈刺激心不全サルモデルを開発し、解析中である。東丸らは個々の心不全患者における病態把握、治療効果確認の手段としての心臓内視鏡検査法を確立し、拡張性心筋症、冠レン縮性狭心症、および右心不全における有用性を確認した。河田らは、心筋への効率のよい遺伝子導入法の開発を行い、rAAV ベクターの心筋への遺伝子導入における有用性を明らかにすると、とくに異なった血清型 rAAV ベクターを用いることで繰り返し投与が可能になることを見いだした。

豊岡照彦	東京大学医学部 器官制御内科・健康センター・教授	心筋症ハムスターモデルへの再生療法
東丸貴信	東邦大学佐倉病院 臨床生理機能学・教授	心臓内視鏡による心不全の診断と治療
河田登美枝	新潟大学医学部 薬剤部・助教授	遺伝子治療に用いる新規ベクター開発

## 研究報告

### I 研究の目的

本研究は、(1) 心不全進展の分子機序を明らかにし心不全進展の予防的治療法を開発すること、(2) 不全心筋の機能を改善する新たな治療法としての遺伝子治療および遺伝子治療と再生療法の併用療法を開発すること、(3) 個々の重症心不全症例の心不全治療薬に対する反応性を予知することによる心不全のテーラーメイド医療を開発することを目的として、重症心不全の新たな治療戦略の道を探求した。

具体的には、以下の4つの研究テーマを分担して遂行した。

1. 圧負荷肥大心の不全化に関連する遺伝子群の解明と新規関連遺伝子のクローニング (今泉) : 今泉らが開発した圧負荷ラット肥大心モデルにおいて、代償機転が破綻し、拡張障害から収縮障害へと移行する課程における遺伝子発現変化を網羅的に明らかにし、新規関連遺伝子のクローニングを行う。さらに肥大心の心不全化に関連する遺伝子をターゲットとした遺伝子改変マウスを作製し、不全心化の機序を解析する。
2. 遺伝子群の解明と新規関連遺伝子のクローニング (豊岡) : 豊岡らが原因欠失遺伝子を明らかとした先天性心筋症ハムスターモデルを用いて、欠損遺伝子を導入した骨髄細胞を心筋に移植する新たな遺伝子療法と再生療法の併用法を開発する。
3. 心臓内視鏡による心不全の診断と治療 (東丸) : 心臓内視鏡により心不全症例の心臓内部の観察評価と心筋生検を行う心不全治療薬に対する反応性の予知法を開発する。
4. 遺伝子治療に用いる新規ベクター開発 (河田) : 心不全化の原因遺伝子および心筋症ハムスターモデルの欠損遺伝子をそれぞれのモデルに経冠動脈的に遺伝子導入し、心不全進展を予防するあるいは心機能を改善する新たな遺伝子治療を開発する。

以下、研究計画から考察までを各研究テーマごとにまとめて記載する。

### 1. 圧負荷肥大心の不全化に関連する遺伝子群の解明と新規関連遺伝子のクローニング (担当：今泉)

#### II 研究計画および材料と方法

今泉らの開発したラット大動脈高度狭窄モデルは、1ヶ月で形成高度の心筋線維化と拡張障害を呈する肥大心を形成し3ヶ月後には収縮不全をきたす。このモデルの圧負荷直後、拡張障害期、収縮能低下進展期、収縮不全期における遺伝子・EST (未知の遺伝子の核酸配列) 発現変化をジーンチップを用いて網羅的にスクリーニングする。既知の遺伝子についてはリアルタイム RT-PCR 法、免疫組織化学により発現の有意性を確認する。有意な変化を

示す新規遺伝子のクローニングを行い、培養細胞系への導入実験、トランスジェニックマウス・ノックアウトマウス作成をおこない、新規関連遺伝子の生理的・病態生理学的意義を検討する。

### III 研究成果

圧負荷肥大心において単球マクロファージ走化性因子である MCP-1 や炎症細胞 transmigration に重要な接着因子 ICAM-1 が早期に発現し心筋内血管周囲にマクロファージ浸潤を引き起こすこと、MCP-1 や ICAM-1 機能のブロックによりマクロファージ浸潤を阻害することによって、心筋線維化と拡張障害進展を予防しうることを見いだした。さらに、圧負荷肥大心において組織アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性が早期に更新し、それに一致して単球マクロファージ走化性因子 MCP-1 や心筋線維化と拡張障害進展の key factor である TGF- $\beta$  発現が引き起こされることを見いだした。非降圧量のアンジオテンシン受容体拮抗薬投与により、MCP-1・TGF- $\beta$  発現が有意に抑制されその結果マクロファージ浸潤・線維芽細胞活性化そして心筋線維化が特異的に抑制された。

圧負荷肥大心と容量負荷肥大心（ともに負荷 28 日後）における mRNA 変化を gene chip を用いて網羅的に解析した。圧負荷・容量負荷においてともに発現が亢進した遺伝子を 33、圧負荷で増加し容量負荷で低下した遺伝子を 5、容量負荷で増加し圧負荷で低下した遺伝子を 11 みいだした。両負荷に共通して発現亢進したものにおいて、gene chip 解析および real-time RT-PCR 法にて最も大きく変化していた遺伝子は ANP、BNP、metallothionein-1 であった。

Metallothionein-1 遺伝子を培養心筋細胞に過剰発現したところ、抗アポトーシス作用が認められた。Metallothionein-1 の抗酸化作用によって肥大心における酸化ストレスを軽減している可能性示唆された。次に両負荷で LOX1 発現の亢進が見られたが、間質マトリクス関連酵素 LOX1 の培養心筋細胞過剰発現により心筋肥大が認められた。

### IV 考察

圧負荷肥大心において、リモデリングに先立ち局所アンジオテンシン系活性化を介する血管周囲に炎症プロセスが活性することが明らかとなった。この炎症プロセスによって心筋線維化が引き起こされ、その結果として拡張障害が進展することが示唆された。したがって、拡張障害を予防するためには、炎症プロセスをブロックする降圧治療が考慮されるべきである。今後、圧負荷によりアンジオテンシン系など向炎症機転が活性化されるメカニズムを解明していく予定である。

一方、圧負荷と容量負荷により、ともに発現が亢進する遺伝子群、一方に特異的に亢進する遺伝子群があることが明らかとなり、今後、個々の遺伝子の生理的・病態生理学的意義を検討していき、両肥大心において、代償機転、非代償化に関与する分子メカニズムを明らかにしていきたい。この課程で、両肥大心に共通して抗酸化作用を有する metallothionein-1、間質マトリクス関連酵素 LOX1 が発現亢進していたことは代償性肥大心のメカニズムを解明する上で大変示唆に富む知見が得られた。

## 2. 心筋症ハムスターモデルへの再生療法（担当：豊岡）

### II 研究計画および材料と方法

①拡張型心筋症が重症化する過程を明らかにする事は心不全の新たな治療戦略を開発する上で極めて重要である。分担研究者らがクローニングした責任遺伝子を小型モデル動物に投与して rescue した成果を踏まえ、サルで前臨床試験を始める為に国立感染症研究所、霊長類共同利用施設に申請した。serotype の異なる 1~5 型の rAAV を骨格筋および心筋に投与して発現効率を比較した。細胞移植の予備検討として正常動物の骨格筋芽細胞を単離して培養・増幅後に心筋に投与し、生着する事を確認した。ヒト型拡張型心筋症モデルをサルで作成する為に、RNAi 法による遺伝子発現抑制実験を開始した。

②当初の研究計画に従って、ヒト心筋症の遺伝子診断による広域疫学調査をおこない、また、先天性心筋症ハムスターを用いて、不可逆的心筋変化が起きた後の治療として、同一動物の骨髄細胞に正常遺伝子を導入後、正常心筋細胞に改変させて細胞移植する遺伝子治療+再生医療の開発研究を推進した。

③今後遺伝子治療や再生医療を実現するにはヒトに近いモデルを用いて再現性の良い心不全状態を作成する必要がある。人工ペースメーカーを用いた頻脈刺激によりサルにおいても心不全状態を作製可能か検討した。開胸術により特注のリード線とジェネレーターを皮下に包埋し、手術一週間後から刺激心拍数を徐々に増加させた。1週間おきに心エコー検査を追跡した。心不全の指標として胸部 X 線撮影、と血液・生化学検査値を用いた。刺激開始後 4 週目に一部の動物に %FS の低下、左室 EDP と BNP の上昇を認めた。

### III 研究成果

①我々がクローニングした変異遺伝子ジストロフィンの正常配列の責任遺伝子を先天性心筋症ハムスターに投与して rescue に成功した。また先天性の遺伝子変異による拡張型心筋症の他に、後天性にイソプロテレノール負荷による心不全状態でも先天性の場合と同様に、細胞膜の脆弱性とジストロフィンの分解と細胞膜から細胞質へのトランスロケーションを認めた。

②既に我々がクローニングした数種類のミトコンドリア変異遺伝子の頻度を厚生省特発性心筋症研究班で調査することを起案し、実際、同遺伝子変異と D-loop の強い相関が認められた。DCM の小型動物モデルによる遺伝子治療の実績を踏まえ、サルで前臨床試験を開始した。serotype の異なる 1~5 型の rAAV を骨格筋および心筋に投与して発現効率を比較した。臨床例では患者は心筋変性後に治療を求める事を考慮して ex vivo で遺伝子治療を加えた細胞の移植計画を立てた。その予備検討として同系の正常動物から骨格筋芽細胞を単離して培養・増幅後に心筋に投与し生着を確認した。ヒト型拡張型心筋症モデルをサルで作成するために RNAi 法による遺伝子発現抑制実験を開始した。

③人工ペースメーカーを用いた頻脈刺激により心不全サルの状態剖検所見では胸水と腹水の貯留、ジストロフィンの免疫染色と EB の蛍光二重染色の結果、細胞内に EB が取り込まれ、その細胞でジストロフィンの崩壊と細胞膜の *in situ* 透過性の亢進が観察された。

### IV 考察

先天性心筋症モデルの責任遺伝子ジストロフィンが、イソプロテレノール負荷による心

不全においても共通の病態発生機構である可能性が示された。

頻脈刺激によるサル心不全モデルで既に筆者らが報告したヒトや他動物の DCM 症例でジストロフィンの崩壊 (Toyo-oka *et al.*, PNAS 2004) が同様に観察され、ヒトの心不全モデルの解析に有用と考えられた。今回の結果は「ジストロフィンが崩壊することにより心不全が重症化する」筆者らの仮説を支持し、ジストロフィン及びジストロフィン関連蛋白質の発現と重症心不全の病態解析に極めて有用である。

### 3. 心臓内視鏡による心不全の診断と治療 (担当: 東丸)

#### II 研究計画および材料と方法

①比較的症状の安定した拡張型心筋症例と虚血性心疾患例で心臓内視鏡による病態の研究を行った。1.8mm 径の血管内視鏡を 9F の先端バルーン付の特殊ガイディングカテーテルを介して左心室内に挿入した。バルーンを心室壁に密着させた状態で生理食塩水をカテーテル内に注入し血液排除下で左心室内壁を観察し、白色、混合、褐色の色調に分類した。更に、7F バルーン特殊ガイディングカテーテルを開発し、虚血性心疾患例で 1.4mm 径の血管内視鏡を用い心臓内視鏡検査を施行した。

②冠攣縮狭心症例における心臓鏡による心内膜障害の評価とその予後に及ぼす影響について検討した。

40 症例中、大多数は EF > 50%、LVDd < 55

ECG では 2 誘導以上の Q 波なし。しかし心機能低下例 (EF < 45%) が 3 例あり全例に多枝スパズムが認められた。

③心臓鏡を用いて右心不全の原因疾患の研究を行った。肺動脈血栓塞栓症 (PTE) 単独で右心不全が生じた 18 例で、Swan-Ganz カテーテルを施行する時に心臓内視鏡を試みた。

#### III 研究成果

①拡張型心筋症 20 例で心不全治療開始直後に心臓内視鏡による心臓内部の観察評価と心筋生検を行った。心筋内膜色調に基づく分類を行い、色調により白色 (8 例)、混合 (7 例)、褐色 (1 例) に分類され、心筋組織生検により白色は高度虚血や線維化を反映していることが確認された。一部症例でエバンスブルーにより心臓内膜を染色した結果、心臓内膜の障害やフィブリンの付着がみられた。左心室内が白色の症例では平均 BNP 値が 25pg/ml とほぼ正常にもかかわらず、1 年の経過で左心室径が増加してゆく傾向があった。一方、混合や褐色の症例では平均 BNP 値は白色とほぼ同じであったが、左心室径と壁運動が改善するものもあった。心電図変化では Q 波が白色の 3 例 (38%) にみられたが、混合色では 1 例 (14%) にとどまった。

②心臓鏡検査上心内膜変化が認められる冠攣縮性狭心症例では心機能障害が進み拡張型心筋症様になるものが見られた。

③PTE では右心不全が単独で生じる。右心不全は原因が不明とされる場合も多いが、PTE の確定診断には塞栓子の証明が必須である。右心不全の診断において、CT や血管造影法では塊状の大きな血栓しか描出できず、PTE の確定診断には心臓血管内視鏡が有用と思われる。急性発症例では新鮮血栓は赤色調を示す傾向にあるが、血小板やフィブリン主体の白色の物も見られる。また、網状や壁在性の白色病変は器質化された血栓と考えられる。

#### IV 考察

拡張型心筋症による心不全患者において心臓内視鏡による左室自由壁の白色化所見は予後悪化の指標として有用である可能性がある。冠攣縮性狭心症例において心臓鏡検査上の心内膜変化は心機能障害が進み拡張型心筋症様に進展する危険因子であることが考えられた。心臓内視鏡は右心不全の原因を調べるのに極めて有用であることが示唆された。

#### 4. 遺伝子治療に用いる新規ベクター開発 (担当: 河田)

##### II 研究計画および材料と方法

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは生体に無害で、効率が良く、発現期間が長いため、遺伝子導入に適する。我々は 2 型 rAAV ベクターにより拡張型心筋症の遺伝子治療や病態解析に多くの成果を得た (Kawada *et al.*, *BBRC* 2001; *PNAS* 2002; Toyooka *et al.*, *PNAS* 2004)。現在 AAV は II 型以外に数種の血清型が分離されている。各血清型 (1、2、3 および 5 型) rAAV ベクターによる遺伝子治療の有効性を検討する目的でハムスターの心筋と骨格筋およびラット心筋における rAAV の発現効率を比較した。さらに各血清型間の免疫交叉性の検討を行う。又、ヒト心筋症の臨床治療を目的として経冠動脈法による心筋へのベクター導入を検討した。

##### ①各種血清型 rAAV の遺伝子発現

Lac Z を組み込んだ各血清型の rAAV ベクターを作製する。ハムスターあるいはラットをネンブタール麻酔し、人工呼吸下にて開胸する。 $3 \times 10^{10}$  copies/ml の rAAV を左室心筋内に  $30 \mu\text{l}$  投与する。麻酔下のハムスターあるいはラットの骨格筋 (前頸骨筋) にも同様の力価のベクター投与する。5 週後に心筋及び骨格筋を摘出し、組織を  $\beta$ -Gal の抗体にて免疫染色を行い、発現効力を比較検討した。ハムスター骨格筋にて各血清型間での免疫交叉性の検討も行った。

##### ②経冠動脈法による心筋へのベクター導入

ネンブタールおよび脳循環改善薬の ifenprodil を投与後、人工呼吸下にてハムスターを開胸し、プレコンディショニング状態を作る。その後、大動脈と肺動脈をクランプし、papaverine / histamin 混合液で希釈した Lac Z-2 型 rAAV ベクター (0.5ml/100g) を左室腔内あるいは大動脈に投与する。直後にエレクトロポレーションを実施し、3 分後にクランプを解除した。5 週後に臓を摘出し、免疫染色を行い、 $\beta$ -Gal 発現を観察した。

#### III 研究成果

##### ①各種血清型 rAAV の遺伝子発現

ハムスター心筋では血清型の差による  $\beta$ -Gal の発現効力は  $1 \geq 5 > 2 > 3$  型の順、骨格筋では  $1 > 5 > 2$  型の順となり、1 及び 5 型は 2 型より有意に強かった。心筋では 3 型はほとんど発現しなかった。ラット心筋ではどの型においても発現効力はハムスターに比べ、極度に弱く、種差が認められた。

2 型同士では免疫交叉性が認められたが、2 と 5 型間では認められなかった。

##### ②経冠動脈法による心筋へのベクター導入

ベクターの大動脈投与では心外膜側に、心腔内投与では心内膜側に  $\beta$ -Gal の発現が認め

られた。しかし、発現程度は我々が従来行っている心筋内直接投与に及ばなかった。

#### IV 考察

我々はすでに心筋症ハムスターの欠損遺伝子を 2 型 rAAV ベクターを用いて発現させ、心機能と予後を改善させる事に成功している。近年、骨格筋においては 2 型より発現効力強い血清型 rAAV ベクターが報告されており、心筋においても発現効率の増加が期待される。1 および 5 型 rAAV ベクターはハムスターの骨格筋および心筋にて 2 型より顕著に高い発現効力があった。又、種差も認められた。臨床応用の際には臓器に適した血清型の rAAV ベクターの選択が必要である。異なった血清型では免疫交叉性がなく繰り返し投与の可能性が示唆された。経冠動脈法によるベクター導入では従来 of 心筋直接投与より高い発現効力は認められず、今後の検討が必要である。

#### V 研究成果の発表

発表論文（英文論文のみ掲載した）

1. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Tahara N, Niiyama H, Nagata T, Imaizumi T. Hypoxia-inducible factor/vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension* 39: 46-50, 2002
2. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Tahara N, Niiyama H, Nagata T, Shibata R, Kusaba K, Imaizumi T. Coexistence of hypercholesterolemia and hypertension impairs adventitial vascularization. *Hypertension* 39: 455-459, 2002
3. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. TGF- $\beta$  function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106: 130-135, 2002
4. Adachi H, Hirai Y, Fujiura Y, Matsuoka H, Satoh A, Imaizumi T. Plasma homocysteine levels and atherosclerosis in Japan: Epidemiological study by use of carotid ultrasonography. *Stroke* 33: 2177-2181, 2002
5. Kamido H, Eguchi H, Ikeda H, Imaizumi T, Yamana K, Hartvigsen K, Ravandi A, Kuksis A. Core aldehydes of alkyl glycerophosphocholines accumulate in atheroma, induce platelet aggregation via the PAF receptor, and inhibit endothelium-dependent arterial relaxation. *J Lipid Res* 43: 158-166, 2002
6. Sasaki K, Murohara T, Ikeda H, Shintani S, Shimada T, Imaizumi T. Evidence for the importance of the angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 109: 603-611, 2002
7. Hamada T, Hiraki T, Ikeda H, Kubara I, Yoshida T, Ohga M, Imaizumi T. Mechanisms for atrial fibrillation in patients with Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 223-229, 2002
8. Katoh A, Ikeda H, Takajo Y, Haramaki N, Murohara T, Shintani S, Kanaya S, Yokoyama S, Ueno T, Honma T, Imaizumi T. Co-existence of impairments of endothelium-derived nitric oxide and platelet-derived nitric oxide in



- patients with coronary risk factors. *Circ J* 66: 837-840, 2002
9. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T, for the Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-435, 2002
  10. Hiraki T, Ikeda H, Yoshida T, Inage T, Ohe M, Ohtsubo H, Matsumoto M, Hamada T, Kubara I, Imaizumi T. P wave signal-averaged electrocardiography predicts recurrence of paroxysmal atrial fibrillation in patients with Wolff-Parkinson-White syndrome who underwent successful catheter ablation a prospective study. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 1003-1008, 2002
  11. Aoyama N, Izumi T, Hiramori K, Isobe M, Kawana M, Hiroe M, Hishida H, Kitaura Y, Imaizumi T, and Japanese Investigators of Fulminant Myocarditis. National survey of fulminant myocarditis in Japan-Therapeutic guidelines and long-term prognosis of using percutaneous cardiopulmonary support for fulminant myocarditis (Special report from a scientific committee) -*Circ J* 66: 133-144, 2002
  12. Matsuzaki M, Hiramori K, Imaizumi T, Kitabatake A, Hishida H, Nomura M, Fujii T, Sakuma I, Fukami K, Honda T, Ogawa H, Yamagishi M. Intravascular ultrasound evaluation of coronary plaque regression by low density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia. The low density lipoprotein-apheresis coronary morphology and reserve trial (LACMART). *J Am Coll Cardiol* 40: 220-227, 2002
  13. Murohara T, Ikeda H, Katoh A, Takajo Y, Otsuka Y, Haramaki N, Imaizumi T. Vitamin E inhibits lysophosphatidylcholine-induced endothelial dysfunction and platelet activation. *Antioxidants Redox Signal* 4: 4791-478, 2002
  14. Nakamura T, Adachi H, Hirai Y, Satoh A, Ohuchida M, Imaizumi T. Association of plasminogen activator inhibitor-1 with insulin resistance in Japan where obesity is rare. *Metabolism* 52: 226-229, 2002
  15. Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, Yamazaki K, Shimamoto R, Urabe M, Nakata J, Hemmi C, Masui F, Nakajima T, Suzuki J, Monahan J, Sato H, Takeo S, Ozawa K and Toyo-oka T. Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 901-906, 2002
  16. Toyo-oka T, Kawada T, Nakazawa M, Yoshida H, Xi H, Masui F, Hemmi C, Urabe M, Ozawa K. Gene therapy of advanced heart failure secondary to disruption of dystrophin-related proteins. (A review) *Heart, Lung & Circ*. 11: 174-181, 2002
  17. Terasawa K, Nakajima T, Iida H, Iwasawa K, Oonuma H, Jo T, Morita T, Nakamura F, Fujimori Y, Toyo-oka T, Nagai R. Nonselective cation currents regulate membrane potential of rabbit coronary arterial cell: modulation by

- lysophosphatidylcholine. *Circulation* 106: 3111-3119, 2002
18. Tsuji T, Suzuki J-I, Shimamoto R, Yamazaki K, Nakajima T, Nagai R, Komatsu S, Ohtomo K, Toyo-oka T, Omata M. Vector analysis of the wall shear rate at the human aortoiliac bifurcation using cine MR velocity mapping. *Am. J. Roentgenol.* 178: 995-999, 2002
  19. Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Haebara T, Negoro H, Toyo-oka T. The relationship between changes in normal-range systolic blood pressure and cognitive function in middle-aged healthy women. *Hypertens Res.* 25: 565-569, 2002
  20. Negoro H, Soo Shin W, Hakamada-Taguchi R, Eguchi N, Urade Y, Goto A, Toyo-Oka T, Fujita T, Omata M, Uehara Y. Endogenous prostaglandin D2 synthesis reduces an increase in plasminogen activator inhibitor-1 following interleukin stimulation in bovine endothelial cells. *J. Hypertens.* 20: 1347-1354, 2002
  21. Tomaru T, Kanai M, Sugiyama Y. New Diagnostic Methods for Heart Diseases. *Advances in Heart Failure* 467-470, 2002
  22. Nakamura T, Adachi H, Hirai Y, Satoh S, Ohuchida M, Imaizumi T. Association of plasminogen activator inhibitor-1 with insulin resistance in Japan where obesity is rare. *Metabolism* 52: 226-229, 2003
  23. Akita T, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shimada T, Egami K, Imaizumi T. Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab Invest* 83: 65-73, 2003
  24. Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, Imaizumi T. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 92: 226-233, 2003
  25. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Niiyama H, Tahara N, Kusaba K, Takemiya K, Jalalidin A, Koga M, Nagata T, Shibata R, Imaizumi T. Roles of intercellular adhesion molecule-1 in hypertensive cardiac remodeling. *Hypertension* 41: 819-823, 2003
  26. Nagata T, Kai H, Shibata R, Koga M, Yoshimura A, Imaizumi T. Oncostatin M, an interleukin-6 family cytokine, upregulates matrix metalloproteinase-9 through the mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway in cultured smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 588-593, 2003
  27. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Wada Y, Hanakawa Y, Hashimoto K, Yoshimura A, Imaizumi T. Inhibition of STAT3 prevents neointima formation by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Human Gene Therapy* 14: 601-610, 2003
  28. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Transforming Growth Factor- $\beta$  function blocking already effective as

- therapeutic strategy. Reply. *Circulation* 107: e37, 2003
29. Sasaki K, Duan J, Murohara T, Ikeda H, Shintani S, Shimada T, Akita T, Egami K, Imaizumi T. Rescue of hypercholesterolemia-related impairment of angiogenesis by oral folate supplementation. *J Am Coll Cardiol*. 42: 364-372, 2003
  30. Egami K, Murohara T, Ikeda H, Shimada T, Sasaki K, Sugaya T, Ishii M, Akagi T, Matsuishi T, Imaizumi T. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 112: 67-75, 2003
  31. Koga A, Oka N, Kikuchi T, Miyazaki H, Kato S, Imaizumi T. Adenovirus-mediated overexpression of caveolin-3 inhibits rat cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 42: 213-219, 2003
  32. Tokunou T, Shibata R, Kai H, Ichiki T, Morisaki T, Fukuyama K, Ono H, Iino N, Masuda S, Shimokawa H, Egashira K, Imaizumi T, Takeshita A. Apoptosis induced by inhibition of cyclic AMP responsive element-binding protein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 108: 1246-1252, 2003
  33. Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, Imaizumi T. Sub-depressor dose of angiotensin type-1 receptor blocker inhibits Transforming Growth Factor- $\beta$ -mediated perivascular fibrosis in hypertensive rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42 (suppl 1): s61-s65, 2003
  34. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kusaba K, Takemiya K, Koga M, Jalalidin A, Tokuda K, Tahara N, Niiyama H, Nagata T, Kuwahara F, Imaizumi T. Rho-kinase inhibition reduces neointima formation after vascular injury by enhancing bax expression and apoptosis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42 (suppl 1): s43-s47, 2003
  35. Koizumi T, Hikiji H, Takato T, Fukuda S, Abe T, Koshikiya N, Iwasawa K, Toyo-oka T. Cell density and growth-dependent down-regulation of both intracellular calcium responses to agonist stimuli and expression of smooth-surfaced endoplasmic reticulum in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J. Biol. Chem.* 278: 6433-6439, 2003
  36. Numabe A, Ara N, Hakamada-Taguchi R, Suzuki N, Hirawa N, Kawabata Y, Negoro T, Nagata T, Goto A, Toyo-oka T, Fujita T, Uehara Y. Effects of the anti-platelet aggregation drug dilazep on cognitive function in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens. Res.* 26: 185-191, 2003
  37. Toyo-oka T, Kawada T. Gene-based therapy of advanced heart failure secondary to the disruption of dystrophin-related proteom. *Signal transduction and cardiac hypertrophy*, Eds. Dhalla NS, Hryshiko L, Kardami E, Singal PK. Kluwer Acad Publ. (Boston, Dordrecht, London), 449-459, 2003
  38. Kawada T, Hemmi C, Fukuda S, Tezuka A, Iwasawa K, Nakazawa M, Sato H, Toyo-oka T. Sarcolemmal fragility secondary to the degradation of dystrophin in dilated cardiomyopathy, as estimated by electron microscopy. *Exp. Clin. Cardiol.* 8: 67-70, 2003

39. Takeuchi T, Adachi H, Ohuchida M, Nakamura T, Satoh A, Jacobs D R Jr, Imaizumi T. Factors associated with aortic dissection-A case of control approach- *J Clin Epidemiol* 57: 386-381, 2004
40. Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, Yasukawa H, Tahara N, Kudo H, Takemiya K, Koga M, Yamamoto T, Imaizumi T. Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension* 43: 499-503, 2004
41. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Takeya M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction -Another model of inflammation-. *Hypertension* 43: 739-745, 2004
42. Niiyama H, Kai H, Yamamoto T, Shimada T, Sasaki K, Murohara T, Egashira K, Imaizumi T. Roles of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 in ischemia-induced neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 44: 661-666, 2004
43. Tahara N, Kai H, Niiyama H, Mori T, Sugi Y, Takayama N, Yasukawa H, Numaguchi Y, Matsui H, Okamura K, Imaizumi T. Repeated gene transfers of naked prostacyclin synthase plasmid into skeletal muscles attenuate monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolong survival in rats. *Human Gene Ther* 15: 1270-1278, 2004
44. Toyo-Oka T, Kawada T, Nakata J, Xie H, Urabe M, Masui F, Ebisawa T, Tezuka A, Iwasawa K, Nakajima T, Uehara Y, Kumagai H, Kostin S, Schaper J, Nakazawa M, Ozawa K. Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 7381-7385, 2004
45. Takahashi M, Tanonaka K, Yoshida H, Oikawa R, Koshimizu M, Daicho T, Toyo-Oka T, Takeo S. Effects of ACE inhibitor and AT1 blocker on dystrophin-related proteins and calpain in failing heart. *Cardiovasc Res*. 65: 356-365, 2005
46. Kawada T, Masui F, Kumagai H, Koshimizu M, Nakazawa M, Toyo-Oka T. A novel paradigm for the therapeutic basis of advanced heart failure-Assessment by gene therapy-. *Pharmacol. & Therap.*, 107: 31-43, 2005
47. Kawada T, Masui F, Tezuka A, Ebisawa T, Kumagai H, Koshimizu M, Nakazawa M, Toyo-Oka T. Mini rreview-A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta* (in press)