

心不全の成因と治療に関する分子生理学的研究

《研究の概要》

細胞内Ca動態を中心とした興奮-収縮連関が心筋収縮調節に主要な役割を果たしているが、心不全では、興奮-収縮連関に関する種々の要因の障害によって心収縮力が抑制されている。細胞膜興奮からL型Caチャネルを介して細胞外よりCaが流入し、このCaが筋小胞体Ca放出チャネルであるリアノジン受容体からのCa放出を誘発し、上昇した細胞内Caが収縮蛋白上のトロポニンCに結合して、トロポニン複合体及びトロポミオシンを介したアクチン-ミオシン相互作用抑制を解除し、心筋収縮が生じることが明らかとなっている。心不全では、これら個々の主要な因子が修飾されることで、心不全の病態が形成され、維持されていると理解される。本研究では、各々の調節系が病態下でどのような修飾を受けるかを検討し、心不全の成因解明と治療法の検討を行うことを目的とした。L型Caチャネルに関しては、これまで β 受容体刺激による調節については種々報告されているが、 α 受容体刺激を介する調節については今回新たな情報伝達系の関与が明らかにされ、また β 受容体刺激とのクロストークについても、新知見が得られた。筋小胞体機能については、リアノジン受容体と共に筋小胞体Ca調節に重要であるCa取り込みポンプ(SERCA)機能につき、遺伝子改変動物を用いて解析した。正常状態でのSERCA機能亢進による心機能亢進及び心機能低下状態での代償効果についても確認がいき、またSERCA機能調節蛋白質サルコリピンについては、これまでに明らかにされてきたフォスフォランバンと同様の修飾機序が明らかとなり、生体内での心機能修飾に寄与している可能性が考えられた。リアノジン受容体については、結合蛋白質の一つであるソルシンの機能につき解析を行ったが、ロックアウトマウスによる検討では、細胞内Ca動態及び心機能に対して顕著な影響を与えないことが明らかとなった。一方で、蛋白キナーゼAを介するリアノジン受容体のリン酸化については、これまでFKBP12.6の解離を介した筋小胞体からのCaリークが報告されていたが、今回の研究でリン酸化を介してCaリークは増大するものの、FKBP12.6の解離を伴わないことが明らかとなった。収縮蛋白系についての検討では、収縮調節蛋白であるトロポニンT遺伝子変異が、収縮蛋白系Ca感受性変化を介して直接拡張型心筋症を発症していることが明らかとなった。また、このモデルを用いた薬物投与実験より、既存の心不全治療薬と共に新規薬剤の検討も行い、有用な結果を得つつある。

本研究により、心不全の成因としての細胞内Ca動態の重要性が改めて証明され、今後更に新たな治療ターゲットが解明されることが期待される。

共同研究者

大津 欣也 大阪大学大学院
医学系研究科循環器内科学 准教授

森本 幸生 九州大学大学院
医学研究院臨床薬理学分野 准教授

栗原 敏 東京慈恵会医科大学
細胞生理学講座 教授

研究報告

I 研究目的

心不全は種々の要因により心収縮調節機能が破綻し、心機能低下をきたして致死的経過をとり得る疾患で、本邦においても死亡原因として重要な位置を占めている。心収縮調節において、細胞内 Ca 動態を中心とした興奮-収縮連関は主要な役割を果たしており、心不全の病態形成にも重要である。これまで我々のグループではこの細胞内 Ca 動態につき生理学的・分子生物学的手法を用いて検討を行い、興奮-収縮連関に関する細胞内 Ca 調節蛋白質及び収縮調節蛋白質の機能を明らかにし、病態との関連についても検討を行ってきた。本研究ではこれまでに明らかになってきた興奮-収縮連関調節蛋白質の機能と心不全の関係を総合的に捕らえ、分子生理学的見地より詳細な考察を加えることにより、心不全の成因の解明ならびに治療への応用を目指すものである。

II 研究計画および材料と方法

サポニン処理スキンド標本による筋小胞体機能測定

マウス左室乳頭筋または肉柱標本を摘出し、界面活性剤であるサポニンで標本を処理することにより、細胞表層膜のみを選択的に除去したサポニン処理スキンド標本を作成した。サポニン処理スキンド標本を用いて、種々の条件下で筋小胞体に直接 Ca を取り込ませ、Ca 負荷後に高濃度のカフェインにより全ての Ca を筋小胞体より放出させ、この Ca を蛍光指示薬により同定した。

細胞内 Ca 測定法

細胞内 Ca 測定には、以下の二つの方法を用いた。マウス左室乳頭筋標本の表層細胞内に Ca 感受性発光蛋白エクオリンを導入し、電気刺激に伴うエクオリンの光信号（細胞内 Ca 濃度変化）と等尺性収縮張力を同時測定した。一方で、マウス単離心室筋細胞を作成し、蛍光色素 fura-2 を AM 体により細胞内に導入し、細胞内 Ca 濃度変化と細胞長を同時測定した。

穿孔パッチクランプ法による細胞膜電流の測定

酵素処理により単離したラット心室筋細胞を用い、細胞内環境をより生理的に近い状態で実験を行うため、細胞膜電流系測定法としてアンフォテリシン B を用いた穿孔パッチクランプ法を確立した。

筋小胞体関連蛋白質機能改変マウスの作成

心筋特異的 promoter である α myosin heavy chain promoter を用いて、心筋特異的に筋小胞体 Ca ポンプ蛋白質 (SERCA) を過剰発現させたトランスジェニックマウス (SERCA-TG) と、SERCA 機能抑制蛋白質であるサルコリピンを過剰発現させたトランスジェニックマウス (SLN-TG) を作成した。また、筋小胞体機能を修飾する新規 Ca 調節蛋白質として、心筋の T 管と筋小胞体膜間に存在するソルシンの機能評価のため、Cre-loxP システムを使ってノックアウトマウスを作成した。

トロポニン T 遺伝子変異による拡張型心筋症マウスの作成

ヒトの拡張型心筋症で報告されている突然変異を心筋トロポニン T 遺伝子に導入したノックインマウスを Cre-loxP システムを使って作成した。loxP で挟んだ Neo 遺伝子の直後に突然変異を導入することによってまず心筋トロポニン T 遺伝子を破壊したヘテロ接合体を作製し、Cre-マウスとの交配によりノックインマウスを誕生させた。

III 研究成果

心筋筋小胞体機能解析法の開発 (本郷)

今回我々は、マウス心筋において筋小胞体機能を詳細に検討する実験法を開発した。マウス左室筋サポニン処理スキンド標本を作成し、実験系の有効性に関する検討をまず初めに行った。Western Immunoblotting により膜蛋白質について検討したところ、サポニン処理により主要な筋小胞体膜蛋白質である Ca 放出チャネル (リアノジン受容体、RyR)、Ca 取り込みポンプ (SERCA) 及び SERCA 調節蛋白質フォスフォランバン (PLN) はスキンド処理前と比較して著変なく保たれていることが明らかとなった。また電子顕微鏡を用いた形態学的検討により、サポニン処理後も筋小胞体膜及び T 管構造は良く保たれていることが明らかとなり、筋小胞体機能を検討する上で有用な方法であることが確認された。本方法により、筋小胞体への Ca 取り込み、筋小胞体からの Ca 放出及び Ca リークについて個々に詳細な検討をすることが出来るようになった。特に Ca リークに関しては、近年種々の測定法が報告されているが、本方法を用いることにより、同一の筋小胞体内 Ca 貯蔵条件からの Ca リークを直接比較・検討することが可能となった。

筋小胞体 Ca リークに対する交感神経 β 受容体刺激の効果 (本郷)

サポニン処理スキンド標本を用いた実験系により、心不全時に重要な関与が示唆されている筋小胞体よりの Ca リークについて、交感神経 β 受容体刺激の効果につき検討

を行った。マウス左室肉柱標本に生筋状態で β 受容体刺激薬による前処置を行い、その後脱リン酸化酵素存在下でスキンド処理を行った。筋小胞体 Ca ポンプ調節蛋白質フォスフォランパン (PLN) 及び筋小胞体 Ca 放出チャネル (RyR) に対する特異的リン酸化抗体を用いた Western Immunoblotting により、蛋白キナーゼ A (PKA) 及びカルシウム/カルモデュリンキナーゼ II (CaMK II) 依存性リン酸化につき検討を行った。 β 受容体刺激により、PLN では PKA 及び CaMK II 依存性リン酸化が亢進していたのに対して、RyR においては PKA 依存性リン酸化の亢進を認めたと、CaMK II 依存性リン酸化には明らかな変化は認められなかった。PLN のリン酸化に伴い、 β 受容体刺激により筋小胞体への Ca 取り込み速度は促進されていたが、筋小胞体内の最大 Ca 貯蔵量には β 受容体刺激前に比べて有意な変化は認めなかった。上記条件下で、 β 受容体刺激による筋小胞体よりの Ca リークにつき検討したところ、Ca リークは明らかに増大しており、この β 受容体刺激による効果は PKA 阻害薬存在下で消失したが、CaMK II 阻害薬によっては影響を受けなかった。以上の結果より、同一の最大 Ca 貯蔵量において、筋小胞体よりの Ca リークは β 受容体刺激により増大し、これは RyR の PKA 依存性リン酸化によることが明らかとなった。また、同時に検討した RyR リン酸化のターゲットとされる FK506 結合蛋白質 (FKBP12.6) については変化していないことが明らかとなった。

筋小胞体 Ca ポンプ機能改変マウスの機能解析 (栗原)

筋小胞体機能改変マウスとして、上記 SERCA 及び SLN のトランジェニックマウスを用いた。細胞内 Ca 濃度変化 (CaT) と収縮張力の同時測定にはエクオリン法を用いた。SERCA を過剰発現させた SERCA-TG 心筋においては、細胞内 Ca 動態の亢進に基づき CaT 及び収縮張力の増大が認められ、また両者の時間経過の短縮が観察された。一方、SLN を過剰発現させた SLN-TG 心筋では、CaT 及び収縮張力の減少が認められ、両者の時間経過は有意に延長していた。次に SERCA-TG 心筋及び SLN-TG 心筋における筋小胞体機能につき、サポニン処理スキンド標本を用いて検討した。SERCA-TG 心筋では短時間での筋小胞体 Ca 取り込み能は有意に亢進していたが、筋小胞体内最大 Ca 含量及び筋小胞体よりの Ca リークについては対照群と比較して有意な差は認められなかった。SLN-TG 心筋においては短時間での Ca 取り込み能は有意に低下していたが、最大 Ca 含量及び筋小胞体よりの Ca リークについては SERCA-TG の場合と同様に有意な差は認めなかった。また、アシドーシスによる収縮抑制に関して、SERCA-TG 心筋では著明な改善効果を認めた。

電位依存性 L 型 Ca 電流の調節系に関する研究 (栗原)

アンフォテリシン B を用いた穿孔パッチクランプ法を単離ラット心室筋細胞に適用し、L 型 Ca 電流に対する交感神経 $\alpha 1$ 受容体刺激による調節系につき検討を行った。 $\alpha 1$ 受容体刺激により L 型 Ca 電流は一過性の減少 (negative phase) の後に増大 (positive phase) を生じる二相性の変化を示すことが明らかとなり、この二相性の変化が異なる受容体サブタイプ及び細胞内情報伝達機構を介して生じているとの仮説のもと実験を行った。これまで心室筋には $\alpha 1A$ 受容体と $\alpha 1B$ 受容体の二つのサブタイプが存在する

ことが報告されていたが、各々の特異的抗体を用いた免疫組織学的手法及び Western Immunoblotting により、ラット心室筋細胞では両受容体が特に T 管に多く局在していることが示された。次にサブタイプ特異的的刺激薬または特異的遮断薬を用いた実験より、positive phase は $\alpha 1A$ 受容体を介して、negative phase は $\alpha 1B$ 受容体を介して生じていることが明らかとなった。細胞内情報伝達系に関して更に検討したところ、positive phase は $\alpha 1A$ 受容体刺激より $G_q \rightarrow$ フォスホリパーゼ C (PLC) \rightarrow 蛋白キナーゼ C (PKC) \rightarrow CaMK II を介して効果が発現されているのに対して、negative phase は $\alpha 1B$ 受容体刺激から G_o の $\beta \gamma$ サブユニットを介する直接作用により効果が発現していることが明らかになった。

心不全状態においては、交感神経 β 受容体刺激が亢進状態となっていることが明らかとなっており、この β 受容体刺激下での $\alpha 1$ 受容体刺激の影響も重要と考えられる。L 型 Ca 電流に対する β 受容体刺激による増大効果を確認後、 β 受容体刺激下において、 $\alpha 1$ 受容体刺激の効果について検討した。 β 受容体刺激下では、 $\alpha 1$ 受容体刺激により L 型 Ca 電流は有意に抑制され、この効果は $\alpha 1A$ 受容体特異的拮抗薬にて遮断されたが、 $\alpha 1B$ 受容体特異的拮抗薬では遮断されなかった。この $\alpha 1A$ 受容体を介する効果は、 β 受容体非刺激下の Ca 電流増大効果とは対照的であり、また細胞内情報伝達系に関して、 β 受容体刺激下と非刺激下で異なる可能性が考えられた。

交感神経系と共に心不全の発症・維持に重要な体液性因子の効果についても検討が必要と考え、L 型 Ca 電流に対するエンドセリン-1 (ET-1) の効果について実験を行った。ET-1 刺激により L 型 Ca 電流は单相性に増大し、 $\alpha 1$ 受容体刺激とは異なる反応を示した。ET-1 刺激の効果は、ETA 受容体拮抗薬で遮断されたが、ETB 拮抗薬では遮断されず、また CaMK II 阻害薬によっても抑制された。Western Immunoblotting により、ラット心室筋細胞膜には ETA 受容体の存在は確認できたが、ETB 受容体については確認出来なかった。

拡張型心筋症モデルマウスの作成と解析 (森本)

拡張型心筋症は、心室内腔拡張、心拡大と収縮機能障害を特徴とし、高頻度の突然死と重症心不全をもたらす。拡張型心筋症の 20-30% は家族性であり、サルコメアおよび細胞骨格蛋白質の遺伝子に原因となる多数の突然変異が見つかっている。しかしながら、原因となる遺伝子の突然変異が明らかにされたにもかかわらず、心筋症を引き起こす分子病態発現メカニズムは明らかにされていない。我々は、ジーンターゲットング技術をもちいて拡張型心筋症を引き起こす 1 アミノ酸欠失突然変異 (delta K210) を心筋トロポニン T ゲノム遺伝子中に導入したノックインマウスの作成を行い、その分子病態発現メカニズムの解明を試みた。このマウス心筋の詳細な解析によって、トロポニン T の機能変化によって心筋ミオフィラメント・Ca 感受性の低下が生じており、その結果もたらされるグローバルな心機能の低下が代償的心筋細胞肥大及び病的心臓リモデリングの引き金となって拡張型心筋症になることが証明された。すなわち、この心筋トロポニン T 突然変異による遺伝性拡張型心筋症の最初の原因は、“心筋ミオフィラメント・Ca 感受性の低下” であることが示された。このマウスの心筋細胞で

はそれを代償するために細胞内 Ca 濃度変化 (CaT) 振幅の著明な増強が生じていたが、その結果もたらされる心臓の電気生理学的不安定性が致死的不整脈による突然死の頻発に強く関与している可能性が示唆された。

上記の拡張型心筋症モデルマウスでは、病態発生における最初の原因が“心筋ミオフィラメント・Ca 感受性の低下”であることが強く示唆されたため、Ca 感受性増強薬ピモベンダンの長期経口投与による治療効果を、モデルマウスを用いて検討した。予想された様に、ピモベンダンはこの拡張型心筋症モデルマウスの心室内腔拡張を伴う著明な心拡大、心筋層線維化及び高頻度の突然死を劇的に抑制し、生命予後を有意に改善した。一方で、強力な抗酸化剤であるプロピルガレートが、心筋収縮力を増加させる Ca センシタイザーであることを見出し、これが心不全の原因の多くを占めている拡張型心筋症の治療に有効であることを動物モデルに対する経口投与実験で確認した。心不全の形成には活性酸素の生成が関与していると考えられているが、重症心不全の治療に用いられることのあるピモベンダンには抗酸化作用はなく、それを有するプロピルガレートは心不全治療により適した物質であると考えられる。

また、これまで心不全治療薬として確立している β 受容体遮断薬及びレニン・アンジオテンシン系阻害薬の効果についても検討しており、有用な効果が得られつつある。

個体発生における心臓形成におけるトロポニン T の役割 (森本)

心筋トロポニン T ノックアウトマウスを作成したところ、胎生致死の表現型を示すことが明らかになった。このことから、心筋トロポニン T が個体発生において極めて重要な役割を果たしていると考えられた。このマウス心筋を詳細に解析した結果、心筋筋原線維の形成不全により心臓の拍動が開始されないため胎生 10.5 日において死亡することが明らかになった。心筋筋原線維形成における Ca による収縮調節機構の存在の重要性が示唆された。また、細胞内 Ca の周期的変動は正常に形成されていたことから、心臓における興奮-収縮連関の興奮と収縮に関わるシステムは個体発生においてそれぞれ独立して形成されていることが明らかになった。

虚血-再灌流によって心筋細胞から放出される生存因子の同定と生理学的活性 (森本)

培養心筋細胞を用いて虚血-再灌流刺激によって心筋細胞から放出される生存因子のスクリーニングを行った結果、乳酸脱水素酵素 (M-LDH) が虚血-再灌流障害から心筋細胞を保護する新たな因子として同定された。M-LDH はナノモルレベルの非常に低い濃度で作用を発揮することから、狭心症や心筋梗塞における虚血-再灌流障害を緩和し心不全への移行を遅らせる治療薬として有益である可能性が高いと考えられる。

リアノジン受容体の調整蛋白質として知られるソルシンの機能解析 (大津)

ソルシンは Penta-EF-hand を持つ Ca 結合蛋白質で、心筋では T 管と SR の結合部位に存在する。In vitro ではソルシンはリアノジン受容体 (RyR) のチャネル活性を抑制することが知られている。しかし、トランスジェニックマウスなどを用いソルシンを心筋に過剰発現した検討では、ソルシンが心機能に抑制的に働くという報告と、促進

的に働くという報告があり、ソルシンの生体内での働きは未だ明らかでない。そこで、我々はソルシンのノックアウトマウス(SOKO)を作成し、その検討を行った。SOKOはメンデルの法則に従い誕生し、正常に発育し、外見上は大きな異常は認めなかった。Western Immunoblotting法でソルシンがノックアウトされている事が確認されたが、RyR、SERCA、フォスホランバン(PLN)の蛋白質発現、PLNのリン酸化の程度に差を認めなかった。Hematoxylin-Eosin染色やAzan-Mallory染色を用いた組織学的検討では線維化を含め異常は認めなかった。心筋横断面積は野生型マウスと同等であり、心筋細胞肥大は認めなかった。また、体重で補正した心重量、左室重量は両群で差を認めなかった。これらの事より、ソルシンのノックダウンは心肥大や心筋の線維化には影響を与えない事が明らかとなった。心臓超音波法を用いた検討では、左室拡張末期径、収縮末期径、左室短縮率、左室壁厚に両群で差を認めなかった。心機能を更に検討するため、観血的に左室内の圧を計測した。左室収縮期圧、左室拡張末期圧、収縮能の指標である $dp/dt \max$ 、拡張の指標である $dp/dt \min$ のいずれの指標も両群間で差を認めなかった。次に、SOKOの単離心筋細胞を用い、心筋のCa動態の検討を行った。最大細胞内Ca濃度変化(CaT)とCaTがpeakの3/4から1/4に達する時間であるdecay timeに両群で有意差は認めなかった。以上より、ソルシンのノックダウンはマウスの定常状態における心機能、Ca動態には大きな影響を与えていないことが明らかとなった。

IV 考察

筋小胞体Caリークに関する実験では、交感神経系を介したリアノジン受容体リン酸化からCaリーク増大を来す機序につき、新たな方法で検討した結果、PKA依存性リン酸化による直接作用によりCaリークが亢進していること、またCaMKII依存性リン酸化やFKBP12.6の解離は伴っていないことが明らかとなった。筋小胞体Caポンプ(SERCA)機能についての解析では、SERCA発現亢進の有用性及び心機能低下におけるSERCA機能の役割が明らかとなり、治療ターゲットとしての有用性が改めて証明された。L型Ca電流の調節系に関しては、これまでのPKAやPKCに加えて、CaMKIIを介した新たなリン酸化による調節機構が明らかとなったことは、心不全時にはCaMKIIが活性化されることが示唆されていることより、新たな治療候補となりうると考える。また、交感神経系 α 受容体と β 受容体のクロストークに関しては、心不全時に重要な役割を果たしていることが示唆された。トロポニンT遺伝子変異に関しては、ヒトで同定された遺伝子変異が直接細胞内Ca動態を介して病態形成に関与していることが示された点で非常に重要であると考えられる。このモデルを用いた治療薬の開発などが今後期待される。新規筋小胞体機能修飾蛋白質に関する研究では、ソルシン以外にも種々の蛋白質がT管と筋小胞体膜間に存在していることが明らかとなっており、今後の研究により新たな細胞内Ca動態調節機構及び治療ターゲットの開発につながるものと考えられる。

V 研究成果の発表

1. Kusakari Y, Hongo K, Kawai M, Konishi M, Kurihara S. Use of the Ca-shortening curve to estimate the myofilament responsiveness to Ca^{2+} in tetanized rat ventricular myocytes. *J Physiol Sci* 56:219-226, 2006.
2. Hirano S, Kusakari Y, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Kurihara S. Intracellular mechanism of the negative inotropic effect induced by α 1-adrenoceptor stimulation in mouse myocardium. *J Physiol Sci* 56:297-304, 2006.
3. Ishikawa T, Mochizuki S, Kurihara S. Cross-bridge-dependent change in Ca^{2+} sensitivity is involved in the negative inotropic effect of nifedipine in aequorin-injected ferret ventricular muscles. *Circ J* 70:489-494, 2006.
4. Ishikawa T, Mochizuki S, Kurihara S. Cross-bridge-dependent change of the Ca^{2+} sensitivity during relaxation in aequorin-injected tetanized ferret papillary muscles. *Circ J* 70:913-918, 2006.
5. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H, Kahn RC, Otsu K, Shirasawa T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 281:33789-33801, 2006.
6. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential role of MDA5 and RIG-I in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441:101-105, 2006.
7. Mizuno J, Otsuji M, Takeda K, Yamada Y, Arita H, Hanaoka K, Hirano S, Kusakari Y, Kurihara S. Superior logistic model for decay of Ca^{2+} transient and isometric relaxation force curve in rabbit and mouse papillary muscles. *Int Heart J* 48:215-232, 2007.
8. Mizuno J, Otsuji M, Arita H, Hanaoka K, Morita S, Akins R, Hirano S, Kusakari Y, Kurihara S. Characterization of intracellular Ca^{2+} transient by the hybrid logistic function in aequorin-injected rabbit and mouse papillary muscles. *J Physiol Sci* 57:349-359, 2007.
9. Morimoto S. Molecular pathogenic mechanisms of cardiomyopathies caused by mutations in cardiac troponin T. *Adv Exp Med Biol* 592:227-239, 2007.
10. Du C-K, Morimoto S, Nishii K, Minakami R, Ohta M, Tadano N, Lu Q-W, Wang Y-Y, Zhan D-Y, Mochizuki M, Kita S, Miwa Y, Takahashi-Yanaga F, Iwamoto T, Ohtsuki I, Sasaguri T. Knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation. *Circ Res* 101:185-194, 2007.
11. Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu M, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T, Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, Mochizuki N. Gab family proteins are essential for

- postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling. *J Clin Invest* 117:1771-1781, 2007.
12. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature Medicine* 13:619-624, 2007.
 13. Hikoso S, Ikeda Y, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hirotsu S, Kashiwase K, Yamada M, Asahi M, Matsumura Y, Nishida K, Matsuzaki M, Hori M, Otsu K. Progression of heart failure was suppressed by inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) via transcatheter gene transfer. *J Am Coll Cardiol* 50:453-462, 2007.
 14. O-Uchi J, Sasaki H, Morimoto S, Kusakari Y, Shinji H, Obata T, Hongo K, Komukai K, Kurihara S. Interaction of alpha1-adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type Ca²⁺ channel. *Circ Res* 102:1378-1388, 2008.
 15. Komukai K, Ogawa T, Yagi H, Date T, Sakamoto H, Kanzaki Y, Shibayama K, Hashimoto K, Inada K, Minai K, Ogawa K, Kosuga T, Kawai M, Hongo K, Taniguchi I, Yoshimura M. Decreased renal function as an independent predictor of re-hospitalization for congestive heart failure. *Circ J* 72:1152-1157, 2008.
 16. Komukai K, Yagi H, Ogawa T, Date T, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Taniguchi I, Yoshimura M. Inhibition of the renin-angiotensin system prevents re-hospitalization of heart failure patients with preserved ejection fraction. *Circ J* 72:2004-2008, 2008.
 17. Udaka J, Ohmori S, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization. *J Gen Physiol* 131:33-41, 2008.
 18. Terui T, Sodnomtseren M, Matsuba D, Udaka J, Ishiwata S, Ohtsuki I, Kurihara S, Fukuda N. Troponin and titin coordinately regulate length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle. *J Gen Physiol* 131:275-283, 2008.
 19. Fukuda N, Granzier HL, Ishiwata S, Kurihara S. Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *J Physiol Sci* 58:151-159, 2008.
 20. Toshima H, Sugihara H, Hamano H, Sato M, Yamamoto M, Yamazaki S, Yamada Y, Taki M, Izumi S, Hoshi K, Fusegawa Y, Satoh K, Ozaki Y, Kurihara S. Spontaneous platelet aggregation in normal subject assessed by a laser light scattering method: an attempt at standardization. *Platelets* 19:293-299, 2008.
 21. Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* 77:659-666, 2008.

22. Ohtsuki I, Morimoto S. Troponin: Regulatory function and disorders. *Biochem Biophys Res Commun* 369:62-73, 2008.
23. Mizukami Y, Ono K, Du C-K, Aki T, Hatano N, Okamoto Y, Ikeda Y, Ito H, Hamano K, Morimoto S. Identification and physiological activity of survival factor released from cardiomyocytes during ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 79:589-599, 2008.
24. Nishii K, Morimoto S, Minakami R, Miyano Y, Hashizume K, Ohta M, Zhan D-Y, Lu Q-W, Shibata Y. Targeted disruption of the cardiac troponin T gene causes sarcomere disassembly and defects in heartbeat within the early mouse embryo. *Develop Biol* 322:65-73, 2008.
25. Taniike M, Yamaguchi O, Tsujimoto I, Hikoso S, Takeda T, Nakai A, Omiya S, Mizote I, Nakano Y, Higuchi Y, Matsumura Y, Nishida K, Ichijo H, Hori M, Otsu K. Apoptosis signal-regulating kinase 1/p38 signaling pathway negatively regulates physiological hypertrophy. *Circulation* 11:545-552, 2008.
26. Watanabe T, Takeda T, Omiya S, Hikoso S, Yamaguchi O, Nakano Y, Higuchi Y, Nakai A, Abe Y, Aki-Jin Y, Taniike M, Mizote I, Matsumura Y, Shimizu T, Nishida K, Imai K, Hori M, Shirasawa T, Otsu K. Reduction in hemoglobin-oxygen affinity results in the improvement of exercise capacity in mice with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 52:779-786, 2008.
27. Kim C, Sano Y, Todorova K, Carlson BA, Arpa L, Celada A, Lawrence T, Otsu K, Brissette JL, Arthur JS, Park JM. p38alpha MAP kinase serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nat Immunol* 9:1019-1027, 2008.
28. Matsuba D, Terui T, O-Uchi J, Tanaka H, Ojima T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Protein kinase A-dependent modulation of Ca²⁺ sensitivity in cardiac and fast skeletal muscles after reconstitution with cardiac troponin. *J Gen Physiol* 133:571-581, 2009.
29. Tadano N, Morimoto S, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Ohtsuki I, Sasaguri T. Propyl gallate, a strong antioxidant, increases the Ca²⁺ sensitivity of cardiac myofilament. *J Pharmacol Sci* 109:456-458, 2009.
30. Kawai M, Hongo K, Komukai K, Morimoto S, Nagai M, Seki S, Taniguchi I, Mochizuki S, Yoshimura M. Telmisartan predominantly suppresses cardiac fibrosis, rather than hypertrophy, in renovascular hypertensive rats. *Hypertens Res*, in press.
31. Zhan D-Y, Morimoto S, Du C-K, Wang Y-Y, Lu Q-W, Tanaka A, Ide T, Miwa Y, Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. Therapeutic effect of β -adrenoceptor blockers using a mouse model of dilated cardiomyopathy with a troponin mutation. *Cardiovas Res*, in press.