

心血管病における TRP チャネル群の分子病態学的意義の解明
と創薬への応用

《研究の概要》

TRP (transient receptor potential) チャネルは数種のサブファミリーから構成される Ca^{2+} 透過型陽イオンチャネル群であり、受容体・機械・温度・侵害刺激などによって活性化され、多彩な生理応答の制御に関わると考えられている。近年、TRP チャネル群の分子実体や活性化機構に関する研究が急速に進歩し、各 TRP チャネルやサブファミリーが持つ特徴的な性質や基本機能が明らかになってきた。しかしながら、TRP チャネル各々の生理学的役割や分子病態学的意義、更には、多様な分子種の機能連関に関しては未だ不明な点が多い。本研究では、細動脈、動脈管、血管内皮、心臓、ネフロン、マクロファージなどの TRP チャネルの生理機能及び分子病態学的意義を明らかにするため、共同研究者が各々得意な先端技術を駆使し、また相互に連携しながら、多角的な基礎研究を実施した。

本研究により、以下の研究成果を得た。1) TRPC3 チャネル及び NCX1 輸送体に対する遺伝子改変マウス及び薬理学的ツールを用いて、血管平滑筋細胞における TRPC3/NCX1 機能連関が交感神経系を介した血圧調節及び冠動脈スパズム誘発に重要な役割を果すことを示した。2) 心血管機能の短長期的制御に密接に関わる TRPC6- Ca^{2+} 流入チャネルの受容体刺激・機械刺激による協働的活性化機構が PKG リン酸化によって選択的に減弱することを明らかにした。3) ANP や PDE5 阻害薬による TRPC3/TRPC6 の Ca^{2+} チャネル活性の抑制が心肥大形成を有意に抑制することを見出した。4) 新生仔心筋細胞を用い、TRPC1-STIM1 系が心筋細胞肥大の形成過程に決定的な役割を果すことを明らかにした。5) TRPC6 の SRF 結合部位を介した発現調節には elk1 と SRF の協調作用が重要であり、SRF が病的な心筋における TRPC6 の発現亢進に関与する可能性を示した。6) 洞房結節の遺伝子発現解析により、HCN1、HCN4、CACNA1G などの既知のイオンチャネル以外に、CACNA1D 及び TRPV4 が高発現していることを見出した。7) LPS 刺激によるマクロファージの炎症性サイトカイン産生には TRPV2 チャネルを介した Ca^{2+} 流入が関与することを明らかにした。8) 出生後の血清浸透圧の低下により、TRPM3 チャネルを介した Ca^{2+} 流入が生後の動脈管閉鎖に関与することを初めて示した。

このように、本研究では、血圧調節、心血管機能、心肥大、動脈管閉鎖、炎症反応などに関わる TRP チャネル分子種を同定し、それらの新たな生理機能及び分子病態機序を多角的手法を用いて明らかにした。今後、これらの TRP チャネル分子種を標的とした心血管病の創薬開発が期待される。

岩本 隆宏	福岡大学医学部 薬理学教授	TRPC3/NCX1 機能連関の分子機序の解明 と心血管病治療への応用
井上 隆司	福岡大学医学部 生理学教授	TRPC6 を介した短長期的心血管機能制御 機構の解明
尾野 恭一	秋田大学医学部 細胞生理学教授	TRPC1-STIM1 の機能連関と異所性自動 能発現への TRP の関与
桑原宏一郎	京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科学講師	心肥大・心不全における TRPC の役割の 解明と治療標的としての可能性の検討
鷹野 誠	久留米大学医学部 生理学教授	ペースメーカー細胞背景 Na 電流における TRPV の役割の解明
古川 哲史	東京医科歯科大学 難治疾患研究所教授	マクロファージ TRPV と炎症反応：メタボ リックシンドロームへの関与の検討
南沢 享	早稲田大学理工学術院 循環制御医科学教授	動脈管閉鎖における TRP チャネルの役割の 解明

研究報告

I 研究目的

TRP (transient receptor potential) チャネルは多様な Ca^{2+} 透過型陽イオンチャネル群であり、TRPC、TRPM、TRPV、TRPML、TRPP、TRPA の 6 つのサブファミリーから構成される。TRP チャネルは受容体・機械・温度・侵害刺激などによって活性化され、様々な生理応答の制御に関わる“多様なセンサー分子”と考えられるが、TRP チャネル個々の生理学的役割や分子病態学的意義、更には、多様な分子種の発現・活性制御機構や機能連関に関しては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、細動脈、動脈管、血管内皮、心臓、マクロファージなどの TRP チャネルの生理機能及び分子病態学的意義について、共同研究者がそれぞれ得意な最先端技術を駆使し、また相互に連携・協力しながら、多角的な基盤研究を推進する。最終的な目標として、高血圧、血管攣縮、動脈硬化、心不全、心血管リモデリング、メタボリックシンドロームなどの発症・進展に関わる TRP チャネル分子種を同定し、その分子病態機序を解明するとともに、それを分子標的とした新しい循環器系治療薬の開発を目指す。TRP チャネルを分子標的とした創薬開発は全く未開拓の領域であり、有効な治療法のない疾患に対する画期的な治療薬が創生できる可能性を秘めている。

II 研究計画及び材料と方法

1. TRPC3/NCX1 機能連関の分子機序の解明と心血管病治療への応用 (岩本)

遺伝子改変マウス及び薬理学的ツールを駆使して、血管平滑筋細胞における TRP チャネルと 1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX1) の機能協関の分子機構及び生理的役割を検討した。具体的には、NCX1、TRPC3、TRPC6 の血管特異的高発現マウス及びノックダウンマウス、更には、これら相互の二重遺伝子改変マウスを作製した。これらマウスに種々受容体作動薬を投与し、心血管機能を解析した。また、作動薬誘発の冠動脈攣縮に対する NCX 阻害薬 (SEA0400、YM-244769) 及び TRPC 阻害薬の治療効果を調べた。また、摘出灌流腸間膜細動脈に fluo-4/AM を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて受容体作動薬及び阻害薬処置時の血管径と細胞内 Ca^{2+} 濃度を同時測定した (一部、井上と共同)。更に、遺

伝子改変マウスの大動脈及び腸間膜動脈を材料とし、NCX1 抗体、各種 TRPC チャネル抗体を用いて免疫組織学的解析及び免疫沈降実験を行い、NCX1 と TRPC の局在を調べた。

2. TRPC6 を介した短長期的心血管機能制御機構の解明 (井上)

高血圧症の重要な増悪因子である腎動脈硬化及び心肥大進行過程における機械刺激—RAS の機能的協関を解明しその制御薬を探索するため、以下の実験を実施した。高血圧モデル動物及び TRP チャネルの遺伝子改変マウス (一部、岩本と共同) を用いて、圧負荷時に TRPC 蛋白質の発現・局在・機能と心筋細胞、腎動脈平滑筋細胞の増殖性シグナル伝達系の間に生じる構造的・機能的改変について、分子生物・生化学的、免疫組織化学的、電気生理・光学的諸手法を用いて解析した。更に、細胞骨格ダイナミクスやカルモジュリンを介した PKG による TRPC6 の活性化モード変換機構について、変異体・欠失体・置換体を用いた分子生物・電気生理学実験、yeast two hybrid 法による網羅的検索、共焦点レーザー顕微鏡による免疫細胞化学的検討、FRET によるチャネル—細胞骨格、カルモジュリン相互作用の検討を実施した。

3. TRPC1-STIM1 の機能連関と異所性自動能発現への TRP の関与 (尾野)

心自動能と TRP チャネルとの関わり及び心肥大・不全における TRPC1-STIM1 系の関与の 2 点に重点を置いて研究を実施した。前者においてはラット肺静脈心筋細胞の自動能における TRP チャネル、とりわけ TRPM4 の関与を電気生理学的に解析した。また、ラットにおいて急速ペーシング法による心房細動モデルを作製し、心房筋細胞の電氣的リモデリングにおける TRP チャネルの発現変化を解析した。また、後者においては STIM1 の遺伝子改変マウスを用い、各種肥大刺激の効果を検討した。

4. 心肥大・心不全における TRPC の役割の解明と治療標的としての可能性の検討 (桑原)

動物心肥大・心不全モデル及びヒト不全心における TRP チャネル群 (特に、TRPC) の発現について検討し、その発現制御機構に関して詳細な解析を実施した (一部、井上・鷹野と共同)。またそれら TRP チャネルの心肥大・心不全発症・進展における病態生理学的意義を解明するために遺伝子改変マウスを用いて解析し、更に心臓病治療標的としての可能性を探るために、各種心肥大・心不全モデル動物に選択的阻害薬を投与し、その治療的効果を検討した。

5. ペースメーカー細胞背景 Na 電流における TRPV の役割の解明 (鷹野)

HDAC4 及び NFAT と蛍光蛋白質 GFP との融合蛋白質を心臓特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、転写因子を活性化する細胞内 Ca^{2+} 変動の局在と時間変動について解析した (予想外の結果により方向転換)。次に、洞房結節細胞の背景 Na^{+} 電流の伸展刺激感受性、温度感受性、薬理的性質を検討し、すでに作製済みの TRPV4 ノックアウトマウスの洞房結節細胞と比較検討した (一部、桑原と共同)。

6. マクロファージ TRPV と炎症反応: メタボリックシンドロームへの関与の検討 (古川)

マクロファージで lipopolysaccharide (LPS) 刺激による炎症性サイトカイン $TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 産生を Real time PCR 法・Western blot 法を用いて RNA レベル・タンパクレベルで測定し、これに対する薬物・siRNA による TRP チャネルや種々のシグナル分子の抑制の影響を検討した。担当 TRP チャネルが特定されたらノックアウトマウスあるいは薬理的手法を用いて、TRP チャネルの抑制が炎症関連循環器系疾患、たとえば動脈硬化などにおける役割を in vivo で検討する。

7. 動脈管閉鎖における TRP チャンネルの役割の解明 (南沢)

各発達段階での動脈管における TRP チャンネル群 (TRPC、TRPM、TRPV) の発現及び機能的役割を検討した。具体的には、1) ラット動脈管平滑筋培養細胞を用いて、各 TRP チャンネル特異的な刺激薬・阻害薬や siRNA の細胞遊走能、細胞増殖能などに対する影響を調べた。2) ラット動脈管器官培養法を用いて、各 TRP チャンネル特異的な刺激薬・阻害薬が内膜肥厚に及ぼす影響を調べた。3) 新生仔ラット生体に各 TRP チャンネル特異的な刺激薬・阻害薬を投与し、急速凍結法にて動脈管の開口度を調べた。以上より、動脈管の解剖学的機能的閉鎖における TRP チャンネル、特に TRPM3 の役割を解析した。

III 研究成果

1. TRPC3/NCX1 機能連関の分子機序の解明と心血管病治療への応用 (岩本)

遺伝子改変マウスおよび薬理的ツールを開発応用することにより、血管平滑筋細胞において NCX1 輸送体が TRPC3 チャンネルと機能連関し (複合体形成)、Ca²⁺流入増幅系として働くことにより、 $\alpha 1$ 受容体刺激時の血管収縮 (血管スパズム) やストレス性高血圧の発症に重要な役割を果たすことを明らかにした。具体的には、血管平滑筋特異的 NCX1 高発現マウスを用いて、 $\alpha 1$ 受容体刺激による血管収縮反応 (細胞内 Ca²⁺シグナル) に NCX1 が関与する実験的証拠を得た。この機序を解析する目的で、血管平滑筋細胞を用いた免疫沈降実験、免疫染色実験及びシヨ糖密度勾配分離実験を行ったところ、NCX1 は TRPC3 と相互作用しカベオラ分画に共存することが示唆された。そこで、血管平滑筋特異的 TRPC3 高発現マウスを作製したところ、 $\alpha 1$ 受容体刺激時の血管収縮反応 (細胞内 Ca²⁺シグナル) 及び昇圧反応が顕著に増大することを観察した。一方、NCX1 ヘテロ欠損マウス及び抑制型 TRPC3 高発現マウス (ドミナントネガティブ変異体) では、同刺激の血管収縮反応及び昇圧反応が有意に減弱していた。また、NCX1 及び TRPC3 の高発現マウスに高濃度のノルエピネフリンを静脈内投与すると、冠動脈スパズムに起因する心電図 ST 上昇及び AV ブロックが誘発された。この冠動脈スパズムは NCX 阻害薬及び TRPC3 阻害薬により抑制可能であった。これらの結果から、血管平滑筋細胞における NCX1/TRPC3 機能連関は、交感神経系を介した血圧調節 (ストレス性高血圧誘発) 及び冠動脈スパズム誘発に重要な役割を果たすものと考えられた。

2. TRPC6 を介した短長期的心血管機能制御機構の解明 (井上)

心血管機能の短長期的制御において重要な役割を果たしていると推測されている TRPC6-Ca²⁺流入チャンネルの活性が、神経体液因子 (自律神経伝達物質、心血管作動因子) 及び機械刺激 (血圧等) の協働によって効果的な増幅を受け、それには2つの膜脂質分解酵素である phospholipase C 系 (diacylglycerol を産生) と phospholipase A2/ ω -hydroxylase 系 (20-HETE を産生) のシナジーが密接に関わっていることを明らかにした。また、変異体・欠失体・置換体を用いた分子生物・電気生理学実験を遂行し、血管内皮依存性弛緩因子である一酸化窒素や心房性利尿ペプチドが、Thr69 番目の PKG によるリン酸化を介して上記の受容体・機械刺激による増幅機構を選択的に減弱させ、血管の収縮性応答 (すなわち昇圧反応) を著しく抑制する可能性を見出した。また、このリン酸化がアクチン細胞骨格との相互作用を減弱させ機械刺激伝達変換の効率を低下させていること、Thr69 の近傍にある家族性巣状糸球体硬化症の遺伝子変異 (P112Q、M132T、T143S)

においても、同様の機械刺激伝達効率の劇的な変化が生じていることを見出した。また最近、細胞内 Ca^{2+} 濃度と FRET による蛋白質相互作用の準同時的定量的測定法を確立し、TRPC6 チャンネルを始めとする種々のイオンチャンネルが、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によってカルモジュリンによる複雑な制御を受けていることを明らかにした。現在この方法を応用して、TRPC6 チャンネルの受容体刺激・機械刺激による活性化過程における、アクチン細胞骨格やカルモジュリンとの動的相互作用の役割と、それに対する PKG リン酸化の抑制効果の分子機構を検討中である。

3. TRPC1-STIM1 の機能連関と異所性自動能発現への TRP の関与 (尾野)

心自動能と TRP チャンネルとの関わり及び心肥大・不全における TRPC1-STIM1 系の関与の2点に重点を置いて研究を実施した。1) 異所性自動能発現への TRP チャンネルの関与：心房細動の原因を探索する目的でラット肺静脈心筋細胞を単離しその電気生理学的及び形態学的特性を解析した。その結果、肺静脈心筋細胞は心房筋と異なり横行小管系が発達しており、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵庫からの Ca^{2+} 放出が自動能発現に深く関与していることがわかった。 Ca^{2+} 放出は細胞膜の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を介して内向き電流を発生し、自動能を惹起することが示唆された。TRPM4 は心房筋において多く発現し、心房の進展負荷に伴い発現が増加することが報告されているものの、肺静脈においては本チャンネルが自動能を誘発している可能性は低いと考えられた。現在、ラット大動脈縮窄モデルを作製し、心房筋の電気的リモデリングと TRPM4 チャンネルの downregulation について解析中である。2) TRPC1-STIM1 の機能連関：心筋細胞肥大の形成過程において、TRPC1-STIM1 系は決定的な働きをしていることを、新生仔ラット心筋細胞を用いた実験で明らかにした。現在、STIM1 の遺伝子改変マウスを入手し、その表現型解析を進めている。その他：TRP チャンネルの研究に際し、病態モデルラットや遺伝子改変マウス等小動物の心機能を in vivo 実験で解析する目的で、ピエゾセンサーを用いた非侵襲心拍測定システムを開発した。

4. 心肥大・心不全における TRPC の役割の解明と治療標的としての可能性の検討 (桑原)

TRPC6 の心臓過剰発現マウスでは NFAT の活性化とその下流遺伝子の発現増強を示し、加齢に伴う心不全を発症したことから、TRPC6 遺伝子の発現増加が心不全発症過程における calcineurin-NFAT 経路の正の制御機構として働いていることを明らかにした。更に、TRPC6 の 5'隣接領域 (発現制御領域) に 3 ヶ所の CArG box 類似配列を見出し、SRF はそれら部位にはほぼ同等に作用し、TRPC6 promoter を活性化することを確認した。SRF の cofactor である myocardin は TRPC6 promoter に対しその転写活性増強作用を示さなかったが、elk1 (myocardin と競合) は SRF と協調的に TRPC6 promoter の活性を亢進させ、複数の elk1 結合部位が CArG box 周囲に存在することが確認された。これらの結果から、TRPC6 の SRF 結合部位を介した発現調節には elk1 と SRF の協調作用が重要であることが示され、SRF が病的心筋や血管平滑筋における TRPC6 の発現亢進に関与する可能性が示唆された。また GC-A ノックアウトマウスにおいて TRPC6 の発現および活性が亢進していることを確認し、TRPC 阻害薬である BTP2 が同マウスの心肥大を有意に改善することを見出した。本結果は TRPC 阻害が新規の心肥大、心不全の予防・治療薬となりうる可能性を示唆するものであり、今後さらに複数の心不全モデルにおいて BTP2 の効果を検討する予定である。

5. ペースメーカー細胞背景 Na 電流における TRPV の役割の解明 (鷹野)

心臓ペースメーカー細胞は、心房筋や心室筋細胞に比べて背景 Na コンダクタンスが高いことが知られている。これは電位依存性に活性化される持続生内向き電流 (I_{st}) と、電位依存性がない背景非選択性陽イオン電流 ($I_{background}$) が存在することが原因と推定される。しかし、これらの電流系の分子実体は未だに不明である。そこで、C57BL6 マウスから洞房結節ならびに右心耳を切除し、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの比較を実施した。その結果、HCN1、HCN4、CACNA1G 等の既に知られている洞房結節特異的なイオンチャネル遺伝子の外に、CACNA1D と TRPV4 が洞房結節において有意に発現量が高いことを見出した。現在、TRPV4^{-/-}マウスの洞房結節からペースメーカー細胞を単離して、TRPV4 が $I_{background}$ の分子実体である可能性について検討中である。

6. マクロファージ TRPV と炎症反応：メタボリックシンドロームへの関与の検討 (古川)

In vitro 実験により、炎症性細胞であるマクロファージから LPS 刺激により炎症性サイトカイン ($TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ など) が産生され、これには TRPV2 チャンネルを介する Ca^{2+} 流入が関与することを明らかにした。更に、 Ca^{2+} 指示薬を用いて、LPS 刺激によりマクロファージで本当に Ca^{2+} 濃度の上昇が起こること、この Ca^{2+} 上昇が TRPV2 チャンネル阻害薬、siRNA による TRPV2 のノックダウンにより抑制されることを明らかにした。次に、TRPV2 のマクロファージ特異的ノックアウトの作製を予定していたが、同マウスの入手に時間がかかることが判明し、別の方法を模索することとした。既存の TRPV2 チャンネル阻害薬を構造展開し、in vivo で使用可能な薬物の探索を行った。新たに合成した化合物について、まずは in vitro で LPS 刺激による Ca^{2+} 動員、ならびに $TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 産生に対する作用を検討した。LPS による Ca^{2+} 動員、 $TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 産生に対して抑制作用は見られたが、その程度は軽微であったことから、今後さらに高力価の化合物の合成、解析を行う予定である。

7. 動脈管閉鎖における TRP チャンネルの役割の解明 (南沢)

ラット動脈管での TRPM チャンネルの発現を調べたところ、動脈管では TRPM3 の発現が大動脈に比べて有意に高く、TRPM3 は動脈管内膜肥厚部に強く発現することがわかった。TRPM3 は浸透圧感受性チャンネルと考えられていることから、出生前後での浸透圧変化が TRPM3 を介して、動脈管閉鎖に影響を及ぼすのと仮説をたて、その検証実験を行った。

1) 血清浸透圧をラットおよびヒト新生児 (在胎 24-35 週) で測定した。ラット、ヒトともに生後の血清浸透圧は胎生末期に比べ有意に低下していた。2) pregnenolone sulfate (TRPM3 刺激薬) を経子宮壁的に胎生 21 日目 (成熟段階) 胎仔に皮下注射し、動脈管を観察したところ、pregnenolone sulfate (0.1mg/体重 g) は有意に動脈管を収縮させた。3) 低浸透圧刺激による細胞内カルシウム濃度 [Ca^{2+}]_i の変化をラット平滑筋細胞で測定した。低浸透圧刺激によりラット動脈管平滑筋細胞では [Ca^{2+}]_i は有意に上昇したが、大動脈平滑筋細胞では変化しなかった。siRNA を用いて TRPM3 の発現を抑制すると低浸透圧刺激による動脈管平滑筋細胞の [Ca^{2+}]_i の上昇は抑制された。4) 浸透圧を 300mOsm/kg から 220mOsm/kg に段階的に低下させたときのラット動脈管と大動脈の血管張力の変化を wire myograph system を使用して測定した。低浸透圧刺激は動脈管の張力を増加し、収縮が確認された。大動脈では低浸透圧刺激により張力は上昇しなかった。これらの結果から、出生後の血清浸透圧の低下により TRPM3 チャンネルを介した Ca^{2+} 流入が生後の動脈管閉鎖に関与することを初めて明らかにした。以上のことより、生後動脈管閉鎖には血清浸

透圧管理も重要であると考えられた。

IV 考察

本研究では、細動脈、動脈管、血管内皮、心臓、ネフロン、マクロファージなどの TRP チャンネル群の生理機能及び分子病態学的意義を明らかにするため、共同研究者らが相互に連携しながら多角的な基礎研究を実施した。主な研究成果として、交感神経系を介した血圧調節及び冠動脈スパズム誘発における TRPC3/NCX1 機能連関の役割、心血管機能の短長期的制御に関わる TRPC6 の活性化機構、心肥大形成における TRPC3/TRPC6 及び TRPC1-STIM1 系の役割、TRPC6 の心筋発現調節機構、洞房結節における TRPV4 の重要性、マクロファージ機能における TRPV2 の役割、動脈管閉鎖における TRPM3 の役割など、多数の新知見を得た。特に注目すべき成果は、ストレス性高血圧、冠動脈スパズム、心血管リモデリング、動脈管閉鎖、マクロファージ炎症反応に関わる TRP チャンネル分子種を同定し、標的 TRP チャンネルに対する阻害薬（修飾薬）が治療効果を発揮することを実験的に示した点である。今後、これらの研究を発展させることにより、新しい心血管病治療薬の開発に繋がることが期待される。

TRP チャンネル群は、種々病態因子を初期に感受する“細胞センサー分子”としての病態学的側面を有しており、恰好の創薬標的分子であると言える。今後、多彩な TRP チャンネル群の各分子種の構造と機能が詳細に解明され、更に、各分子種に対する特異的阻害薬（修飾薬）が開発され、本領域の創薬研究が活発になることを期待している。本研究事業がその布石になれば幸いである。

最後に、本研究事業に貴重なご支援を賜りました、財団法人車両競技公益資金記念財団に対して深謝申し上げます。

V 研究成果の発表

1. Mima M, Kawai C, Paku K, Tomoo K, Ishida T, Sugiyama S, Matsumura H, Kitatani T, Yoshikawa HY, Maki S, Adachi H, Takano K, Murakami S, Inoue T, Mori Y, Kita S, **Iwamoto T**. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Ca²⁺-free primary Ca²⁺-sensor of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, 64:1125-1127, 2008.
2. Kita S, Iyoda T, **Iwamoto T**. Cardiovascular Na⁺/Ca²⁺ exchanger: Pathophysiologic roles and therapeutic potentials. **Med Bull Fukuoka Univ**, 35:211-218, 2008.
3. Zhang H, **Inoue R**, Shi J, Li YQ, Jin XH. Synergistic actions of diacylglycerol and inositol 1,4,5 trisphosphate for Ca²⁺-dependent inactivation of TRPC7 channel. **Acta Pharmacologica Sinica**, 29:90-97, 2008.
4. Takahashi S, Lin H, Geshi N, Mori Y, Kawarabayashi Y, Takami N, Mori MX, Honda A, **Inoue R**. Nitric oxide/cGMP/protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. **J Physiol**, 586:4209-4233, 2008.
5. Jensen LJ, **Inoue R**, Oike M, Holstein-Rathlou N-H, Ito Y. The role of L- and

- T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. **J Vasc Res**, 46(2):138-151, 2008.
6. **Inoue R**, Hai L, Honda A. Pathophysiological implications of transient receptor potential (TRP) channels in vascular function. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 17:193-198, 2008.
 7. Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Radovanovic M, Iino K, Ishida M, Tosa S, **Ono K**, Ito H. Amlodipine inhibits cell proliferation via PKD1-related pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, 369:376-381, 2008.
 8. Murakami M, Ohba T, Xu F, Satoh E, Miyoshi I, Suzuki T, Takahashi Y, Takahashi E, Watanabe H, **Ono K**, Sasano H, Kasai N, Ito H, Iijima T. Modified sympathetic nerve system activity with overexpression of the voltage-dependent calcium channel beta3 subunit. **J Biol Chem**, 283:24554-24560, 2008.
 9. Koyama T, **Ono K**, Watanabe W, Ohba T, Murakami M, Iino K, Ito H. Molecular and electrical remodeling of L- and T- type Ca²⁺ channels in rat right atrium with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Circ J**, 73:256-263, 2008.
 10. Kurokawa J, Tamagawa M, Harada N, Honda S, Bai CX, Nakaya H, **Furukawa T**. Acute effects of estrogen on the guinea pig and human IKr and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. **J Physiol**, 586:2961-2973, 2008.
 11. Kaihara A, Umezawa Y, **Furukawa T**. Bioluminescent indicators for Ca²⁺ based split Renilla Luciferase complementation in living cells. **Analyt Sci**, 24:1405-1408, 2008.
 12. **Furukawa T**, Kurokawa J. Non-genomic regulation of cardiac ion channels by sex hormones. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, 8:245-251, 2008.
 13. Shimura M, **Minamisawa S**, Takeshima H, Jiao Q, Bai Y, Umemura S, Ishikawa Y. Sarcalumenin alleviates stress-induced cardiac dysfunction by improving Ca²⁺ handling of the sarcoplasmic reticulum. **Cardiovasc Res**, 77:362-370, 2008.
 14. Yokoyama U, **Minamisawa S**, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, Ishikawa Y. PGE2-activated Epac promotes neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA. **J Biol Chem**, 283:28702-28709, 2008.
 15. Misra S, Obeid LM, Hannun YA, **Minamisawa S**, Berger FG, Markwald RR, Toole BP, Ghatak S. Hyaluronan constitutively regulates activation of COX-2-mediated cell survival activity in intestinal epithelial and colon carcinoma cells. **J Biol Chem**, 283:14335-14344, 2008.
 16. Sakamoto K, Owada Y, Shikama Y, Wada I, Waguri S, **Iwamoto T**, Kimura J. Involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in migration and contraction of rat cultured tendon fibroblasts. **J Physiol**, 587:5345-5359, 2009.
 17. Inokuchi Y, Shimazawa M, Nakajima Y, Komuro I, Matsuda T, Baba A, Araie M, Kita S, **Iwamoto T**, Hara H. A Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoform, NCX1, is involved in retinal cell death after N-methyl-D-aspartate injection and ischemia-reperfusion. **J**

- Neurosci Res**, 87:906-917. 2009.
18. Maeda S, Sakamoto K, Matsuoka I, **Iwamoto T**, Kimura J. Lysophosphatidylcholine increases $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger expression via RhoB-geranylgeranylation in H9c2 cells. **J Pharmacol Sci**, 109:565-572, 2009.
 19. Saito R, Kaneko E, Tanaka Y, Honda K, Matsuda T, Baba A, Komuro I, Kita S, **Iwamoto T**, Takano Y. Involvement of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in pentylenetetrazol-induced convulsion by use of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger knockout mice. **Biol Pharm Bull**, 32:1928-1930, 2009.
 20. Blaustein MP, Zhang J, Chen L, Song H, Raina H, Kinsey SP, Izuka M, **Iwamoto T**, Kotlikoff MI, Lingrel JB, Philipson KD, Wier WG, Hamlyn JM. The Pump, the exchanger and endogenous ouabain: Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension. **Hypertension**, 53:291-298, 2009.
 21. **Inoue R**, Jensen LJ, Jian Z, Shi J, Hai L, Lurie AI, Henriksen FH, Salomonsson M, Morita H, Kawarabayashi Y, Mori MX, Mori Y, Ito Y. Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via PLC/diacylglycerol and PLA2/ ω -hydroxylase/20-HETE pathways. **Circ Res**, 104:1399-1409, 2009.
 22. **Inoue R**, Jian Z, Kawarabayashi Y. Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. **Pharmacol Therapeut**, 123:371-385, 2009.
 23. Hatae J, Takami N, Lin H, Honda A, **Inoue R**. 17β -estradiol-induced enhancement of estrogen receptor biosynthesis via MAPK pathway in mouse skeletal muscle myoblasts. **J Physiol Sci**, 59(3):181-90, 2009.
 24. Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Sato T, **Ono K**, Ito H. Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy. **Biochem Biophys Res Commun**, 389:172-176, 2009.
 25. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, **Ono K**, Ito H. The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. **Circ J**, 73:419-427, 2009.
 26. Nakagawa Y, **Kuwahara K**, Takemura G, Akao M, Kato M, Arai Y, Takano M, Harada M, Murakami M, Nakanishi M, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Fujiwara M, Ueshima K, Nakao K. p300 plays a critical role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts. **Circ Res**, 105:746-754. 2009.
 27. Kinoshita H, **Kuwahara K**, Takano M, Arai Y, Kuwabara Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Nakanishi M, Harada M, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Nakao K. T-type Ca^{2+} channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure. **Circulation**, 120:743-752. 2009.
 28. Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Hideo H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, **Takano M**, Kondo Y, Inoue N. Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. **PLoS One**, 4:e6318, 2009.
 29. Kuratomi K, Ohmori Y, Shimazaki K, Muramatsu S, Mizukami H, Uosaki H,

- Yamashita JK, Arai Y, Kuwahara K, **Takano M**. The cardiac pacemaker specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. **Cardiovasc Res**, 83:682-687, 2009.
30. Kurokawa J, Bankston JR, Kaihara A, Chen L, **Furukawa T**, Kass RS. KCNE variants reveal a critical role of the beta subunit carboxyl terminus in PKA-dependent regulation of the IKs potassium channel. **Channels**, 3:16-24, 2009.
31. Asada K, Kurokawa J, **Furukawa T**. Redox- and calmodulin-dependent S-nitrosylation of the KCNQ1 channel. **J Biol Chem**, 284:6014-6020, 2009.
32. Kaihara A, Sunami A, Kurokawa J, **Furukawa T**. A genetically encoded bioluminescent indicator for the sodium channel activity in living cells. **J Am Soc**, 131:4188-4189, 2009.
33. Sato M, Jiao Q, Honda T, Kurotani R, Toyota E, Okumura S, Takeya T, **Minamisawa S**, Lanier SM, Ishikawa Y. Activator of G protein signaling 8 (AGS8) is required for hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes: role of G betagamma and connexin 43 (CX43). **J Biol Chem**, 284:31431-31440, 2009.
34. Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, Iwamoto M, Nishimaki S, Sato M, Yokota S, Kamiya Y, Adachi-Akahane S, Ishikawa Y, **Minamisawa S**. T-type Ca²⁺ channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. **J Biol Chem**, 284:24025-24034, 2009.
35. Jiao Q, Bai Y, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y, **Minamisawa S**. Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 297:H576-H582, 2009.
36. Zhang J, Chen L, Lingrel JB, Philipson KD, **Iwamoto T**, Blaustein MP. Knockout of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in smooth muscle attenuates vasoconstriction and L-type Ca²⁺ channel current and lowers blood pressure. **Am J Physiol**, 298:H1472-H1483, 2010.
37. Murata H, Hotta S, Sawada E, Yamamura H, Ohya S, Kita S, **Iwamoto T**, Imaizumi Y. Cellular Ca²⁺ dynamics in urinary bladder smooth muscle from transgenic mice overexpressing Na⁺-Ca²⁺ exchanger. **J Pharmacol Sci**, 112:373-377, 2010.
38. Ichishima K, Yamamoto S, **Iwamoto T**, Ehara T. α 1-Adrenoceptor-mediated PIP2 depletion inhibits activation of volume-regulated anion channels in mouse ventricular myocytes. **Br J Pharmacol**, 61:193-206, 2010.
39. **Inoue R**, Shi J, Jian Z, Imai Y. Regulation of cardiovascular TRP channel functions along the NO-cGMP-PKG axis. **Expert Rev Clin Pharmacol**, 3:347-360, 2010.
40. Nishida M, Watanabe K, Satob Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, **Inoue R**, Kurose H. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. **J Biol Chem**, 285:13244-13253, 2010.
41. Numaga T, Nishida M, Kiyonaka S, Kato K, Katano M, Mori E, Kurosaki T, **Inoue R**, Hikida M, Putney JW, Mori Y. Ca²⁺ Influx and protein scaffolding via TRPC3 sustain PKC β and ERK activation in B cells. **J Cell Sci**, 123:927-938, 2010.

42. **Ono K**, Iijima T. Cardiac T-type Ca²⁺ channels in the heart. **J Mol Cell Cardiol**, 48:65-70, 2010.
43. Sato S, Ishida-Nakajima W, Ishida A, Kawamura M, Miura S, **Ono K**, Takada G, Takahashi T. Assessment of a new piezoelectric transducer sensor for noninvasive cardiorespiratory monitoring of newborn infants in the NICU. **Neonatology**, 98:179-190, 2010.
44. **Takano M**, Kinoshita H, Shioya T, Itoh M, Nakao K, **Kuwahara K**. Pathophysiological remodeling of mouse cardiac myocytes expressing dominant negative mutant of neuron restrictive silencing factor. **Circ J**, 74:2712-2719, 2010.
45. **Kuwahara K**, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Usami S, Minami T, Yamada Y, Fujiwara M, Nakao K. Myocardin-related transcription factor A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of BNP gene expression. **Mol Cell Biol**, 30:4134-4148, 2010.
46. **Kuwahara K**, Nakao K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. **Endocr J**, 57:555-565, 2010.
47. Small EM, Thatcher JE, Sutherland LB, Kinoshita H, Gerard RD, Richardson JA, Dimairo JM, Sadek H, **Kuwahara K**, Olson EN. Myocardin-Related Transcription Factor-A Controls Myofibroblast Activation and Fibrosis in Response to Myocardial Infarction. **Circ Res**, 107:294-304, 2010.
48. Kinoshita H, **Kuwahara K**, Nishida M, Jiang Z, Rong X, Kiyonaka S, Kuwabara Y, Kurose H, **Inoue R**, Mori Y, Li Y, Nakagawa Y, Usami S, Fujiwara M, Yamada Y, Minami T, Ueshima K, Nakao K. Inhibition of TRPC6 Channel Activity Contributes to the Anti-hypertrophic Effects of Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling in the Heart. **Circ Res**, 106:1849-1860, 2010.
49. Kimura M, Murakami T, Kondoh SK, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, **Takano M**, Kario K, Shimada K, Kobayashi E. Functional molecular imaging of ILK-mediated Akt/PKB signaling cascades and the associated role of beta parvin. **J Cell Sci**, 123:747-755, 2010.
50. Yamashiro K, Sasano T, Tojo K, Namekata I, Kurokawa J, Sawada N, Suganami T, Kamei Y, Tanaka H, Tajima N, Utsunomiya K, Ogawa Y, **Furukawa T**. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, 398:284-289, 2010.
51. Yang PC, Kurokawa J, **Furukawa T**, Clancy CE. Acute effects of sex steroid hormones on susceptibility to cardiac arrhythmias: a simulation study. **PLoS Comput Biol**, 6:e1000658, 2010.
52. Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S, **Minamisawa S**, Okumura S, Ishikawa Y. Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice. **Am J Physiol Cell Physiol**, 298:C450-C456, 2010.

53. Wakui H, Tamura K, Tanaka Y, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Masuda SI, Shigenaga AI, Maeda A, Mogi M, Ichihara N, Kobayashi Y, Hirawa N, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Horiuchi M, **Minamisawa S**, Umemura S. Cardiac-specific activation of angiotensin II type 1 receptor-associated protein completely suppresses cardiac hypertrophy in chronic angiotensin II-infused mice. **Hypertension**, 55:1157-1164, 2010.
54. Yokoyama U, **Minamisawa S**, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa Y. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. **Circ Res**, 106:1882-1892, 2010.
55. Yokoyama U, **Minamisawa S**, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. **J Smooth Muscle Res**, 46:77-87, 2010.
56. Secondo A, Molinaro P, Pannaccione A, Esposito A, Cantile M, Lippiello P, Sirabella R, **Iwamoto T**, Renzo GD, Annunziato L. Nitric oxide stimulates NCX1 and NCX2 but inhibits NCX3 isoform by three distinct molecular determinants. **Mol Pharmacol**, 71:558-568, 2011.
57. Mori MX, Imai Y, Itsuki K, **Inoue R**. Quantitative measurement of intracellular Ca²⁺ and calmodulin binding to target molecules using Fura-2 and CFP/YFP based FRET imaging in living cells. **Biochemistry**, 50:4685-4696, 2011.
58. Sugihara M, Morita H, Matsuda M, Umebayashi H, Kajioka S, Ito S, Nishida M, **Inoue R**, Futatsuki T, Yamazaki J, Mori Y, Inoue R, Ito Y, Abe K, Hirata M. Dual signaling pathways of arterial constriction by extracellular UTP in the rat. **J Pharmacol Sci**, 115:293-308, 2011.
59. **Inoue R**, Shi J. TRP channels and blood pressure regulation. In: TRP channel in health and disease: Implications for Diagnosis and Therapy. ed., A. Szallasi., Nova Science Publishers, 2011, pp.171-196.
60. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, **Kuwahara K**, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A. **PLoS One**. 6:e16734, 2011.
61. Hata L, Murakami M, **Kuwahara K**, Nakagawa Y, Kinoshita H, Usami S, Yasuno S, Fujiwara M, Kuwabara Y, Minami T, Yamada Y, Yamada Y, Nakao K, Ueshima K, Nishikimi T, Nakao K. Zinc-finger protein 90 negatively regulates neuron-restrictive silencer factor-mediated transcriptional repression of fetal cardiac genes. **J Mol Cell Cardiol**, 50:972-981, 2011.
62. Sugiyama H, Nakamura K, Morita H, Akagi S, Tani Y, Kagtayama Y, Nishii N, Miyoshi T, Nagase S, Kohno K, Kusano FK, Ohe T, Kurokawa J, **Furukawa T**, Ito H. Circulating KCNH2 current-activating factor in patients with heart failure and

- ventricular tachyarrhythmia. **PLoS One**, 6:e20470, 2011.
63. Nakano H, Williams E, Hoshijima M, Sasaki M, **Minamisawa S**, Chien KR, Nakano A. Cardiac origin of smooth muscle cells in the inflow tract. **J Mol Cell Cardiol**, 50:337-345, 2011.
64. Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, Shioda A, Jiao Q, Ishikawa Y, **Minamisawa S**. DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. **J Physiol Sci**, 61:167-179, 2011.
65. Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, **Iwamoto T**, Hirano K, **Inoue R**, Kurose H. Cilostazol Suppresses Angiotensin II-induced Vasoconstriction via Protein Kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channel. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. (in press)
66. Yamazaki D, Tabara Y, Kita S, Hanada H, Komazaki S, Naitou D, Mishima A, Yamamura H, Yamamoto S, Kakizawa S, Miyachi H, Yamamoto S, Miyata T, Kawano Y, Kamide K, Imaizumi Y, Miki T, **Iwamoto T**, Takeshima H. Vascular tone and TRIC-A channels: hypertension in Tric-a-knockout mice and TRIC-A genetic polymorphisms associated with essential hypertension. **Cell Metab**. (in press)
67. Hai L, Kawarabayashi Y, Imai Y, Honda A, **Inoue R**. Counteracting effect of TRPC1-associated Ca^{2+} influx on $TNF\alpha$ induced COX-2-dependent prostaglandin E2 production in human colonic myofibroblasts. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. (in press)
68. Nishikimi T, **Kuwahara K**, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. **J Cardiol**. (in press)
69. Kita S, Iyoda T, Arai Y, **Inoue R**, **Iwamoto T**. $\alpha 1$ -agonist-induced vasoconstriction and blood pressure elevation are reduced in vascular smooth muscle-specific expression of dominant negative TRPC3/6 channels in mice. (submitted)
70. Kawarabayashi Y, Hai L, Honda A, Horiuchi S, Tsujioka H, Ichikawa J, **Inoue R**. Critical Role of TRPC1-mediated Ca^{2+} entry in Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells. (submitted)
71. Okamoto Y, **Takano M**, Ohba T, **Ono K**. Arrhythmogenic coupling between Na^{+} - Ca^{2+} exchanger and inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat pulmonary vein cardiomyocytes. (submitted)
72. Shibata S, Okamoto Y, Endo S, **Ono K**. Direct effects of esmolol and landiolol, ultra-short-acting beta-blockers, on cardiac function, ion channels, and coronary arteries in guinea-pig. (submitted)