

心不全・心筋症の免疫学的発症機構の解明とその臨床応用

所属機関 北里大学医学部
研究者名 猪又孝元

<<研究の概要>>

心不全は、高齢化に伴い患者数が増加し、家族と社会へ多大な負担を強いる。しかし、検体採取や診断法の限界からヒト臨床例へのトランスレーションが困難なため、免疫の観点から心不全病態の解析が進まない。それには、自己免疫応答異常による心不全の重症化機構やホストの心筋での要因を動物レベルで検証し、マイクロアレイ等の網羅的解析法により標的遺伝子を限局させる必要がある。

ラット自己免疫性心筋炎は、反復免疫で拡張型心筋症化するが、心筋炎惹起 T 細胞 (MIT) の体内動態は不明である。そこで、Lew-Tg (CAG-EGFP) 1Ys ラットをミオシン抗原で感作させ、所属リンパ節細胞を CM2 刺激で繰り返すことで、GFP を発現した MIT (GFP-Tg MIT) を樹立した。GFP-Tg MIT の心臓内への浸潤は第 7 病日をピークに減少に転ずるが、心筋組織内の炎症細胞浸潤は持続し、構成の主体は GFP 陰性の CD4 陽性 T リンパ球へと移行した。すなわち、当初は GFP-Tg MIT による液性免疫に伴う心筋傷害であるが、ホスト由来のリンパ球が最終的なエフェクター細胞となった。炎症持続の機序解明へ導く動物モデルが完成した。

心筋障害のメカニズムとして、ヒト心筋症サンプルから期待した免疫関連の遺伝子異常の吊り上げは困難だった。そこで、複数の遺伝子の相互作用で発症へと至るゲノム全体の関連解析 (GWAS) を用い、核遺伝子および心機能に影響の強いミトコンドリアゲノム解析を進めている。

一方、標的因子たる心筋においては、心臓の老化とエネルギー代謝を検討した。心臓特異的に抑制型 PI3K 発現マウスでは、加齢に伴う心機能低下と細胞内封入体の増加が予防された。老齢の野生型マウスに PI3K の下流にあるラパマイシン標的分子阻害薬を投与するとリポフスチンが減少し、リソゾーム阻害薬を投与することによりオートファジーを抑制するとリポフスチンが増加した。また、SIRT1 発現量に応じて心機能は低下し、高発現マウスは心不全にて死亡した。

上記 3 プロジェクトより、免疫などの攻撃因子とホストたる心筋の要因を網羅的に検討することが心不全病態研究には重要であり、さらなるヒトへの応用には遺伝子解析法の充実が求められることが明らかとなった。

猪又 孝元	北里大学医学部 循環器内科学講師	ヒト・動物での心筋炎惹起クローンの解析
豊岡 照彦	北里大学大学院 客員教授	マイクロアレイ法によるヒト標的遺伝子の抽出
塩井 哲雄	京都大学大学院 循環器内科学講師	老化とエネルギー代謝からみた心筋障害

研究報告

I 研究目的

心不全は人口の高齢化に伴いその患者数が増加し、家族と社会へ多大な負担を強いる。その代表疾患が、拡張型心筋症 (DCM) である。

DCM は、感染と免疫という炎症の観点から病態形成が論ぜられてきた。しかし、検体採取や診断法の限界からヒト臨床例への展開 (トランスレーション) が困難とされた。しかし、マイクロアレイやプロテオーム等の網羅的・総合的な解析法の登場により、患者の血液や少量の検体から膨大な情報を把握し、標的とすべき免疫応答関連遺伝子を限局して、動物モデルで実証する逆トランスレーションが可能となった。

そこで、自己免疫応答異常による心不全の重症化機構を動物レベルで検証し、最終的にヒトへの応用・展開に特化させる礎とする。さらには、ホスト要因である心筋、とくにそのエネルギー代謝と心臓老化の観点から検討を加える。その上で、増悪因子を制御する方策を開発し、最終的に臨床現場にフィードバックさせるための総合・共同研究を企画した。

【研究の背景—過去の研究実績を踏まえて】

1. 実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) の病態解析

DCM 心筋での炎症持続の病態として、ウイルス感染を契機とし分子相同性を介した自己免疫機序が有望視されている。猪又らは、ミオシンの感作にてラット重症心筋炎を惹起させ、反復感作により DCM を作成した。さらに、心筋炎惹起性 T 細胞株 (MIT) の樹立に成功し、*in vitro* 手法をヒトの病態解析に応用する素地ができた。

2. 患者検体を用いた関連遺伝子の吊り上げ

豊岡らは、Post-genome project (理化学研究所 中村祐輔教授) の一環として、心不全関連遺伝子研究に参画した。しかし、90 万以上の SNP を搭載した米国製ジーンチップを用いても、日本人試料での変異同定率は極めて低かった。着目すべき免疫学的分子の抽出が可能とはならなかった。その原因は既成のチップでは人種差をカバーできないため、わが国独自の解析用チップの開発が求められた。そこで、次のステップが必要とされた。

①人種間の SNP の相違を厳密に検討する。すなわち、日本人に合わせて完成した約 4,000 の心不全関連ゲノムのデータベースと NIH や EMBLE の公開 SNP 情報を融合させ、新たな多因子解析用アルゴリズムを基礎に、国内外の心不全患者を GWAS で漏れなく解析する。②前記の GWAS は正確だが、一挙に 1 人当たり 150 万の遺伝子変異を解析する技術は通常のパソコン操作では対処しきれない。この研究室レベルでのみ使用可能な array を改善して、診断精度を向上・効率化させる。すなわち、上記結果を high-throughput screening 技術を用い、民間の病院検査室レベルで使用可能な、日本人に特化した正確かつ廉価なマイクロアレイを製作する。

3. 心臓老化とエネルギー代謝からみた心不全の病像

組織障害は、攻撃因子と標的因子のバランスで決定される。心筋を攻撃する免疫系の検討とともに、標的因子たる心筋の評価が求められる。

心不全は、典型的な加齢関連疾患である。危険因子や生理的な加齢の問題のみならず、心臓老化の仕組み自体が心不全発症に関連すると考えられてきている。インスリン/インスリン様増殖因子 (IGF) -1 シグナルは、寿命調節に大切であり、心臓特異的にインスリン/IGF-1 シグナルを抑制したショウジョウバエでは、加齢による心機能低下が予防された。しかし、長寿遺伝子であるサーチュイン遺伝子 (SIRT1) とともに、その調節機構や臓器特異性には不明な点が多い。

II 研究計画および材料と方法

【研究 1】心筋炎惹起性自己抗原特異的 T 細胞クローンの同定と病態解析(猪又担当)】

病変惹起細胞の体内動態を追跡する目的で、電気穿孔法や遺伝子銃、さらには導入効率が高いとされるレトロウイルスベクターを用い、MIT 細胞への遺伝子導入、なかでも green fluorescent protein (GFP) 遺伝子の導入を試みてきた。しかしながら、生体から取り出す浮遊性の非腫瘍細胞のためか、これまで技術的に成功へ導けずにきた。事実、非腫瘍性 T 細胞への遺伝子導入に関する報告は極めて乏しく、再現性が確認できるような手法は僅少である。

そこで、これまでに確立し報告をしてきた培養手法を応用し、LEW-Tg(CAG-EGFP)1Ys にミオシン CM2 ペプチドを感作させた。その後に腋窩リンパ節および膝窩リンパ節から作成したリンパ節細胞浮遊液に、ナイーヴ・ルイ

ス・ラットの胸腺細胞を抗原提示細胞として、CM2による抗原刺激を繰り返しながら、インターロイキン2添加培養液下で継代培養した。³Hサイミジン取り込み能にて抗原特異性を確認した。また、樹立したGFP発現心筋炎惹起性Tリンパ球株（GFP-Tg MTL）をナイーヴ・ルイス・ラットの尾静脈より細胞移注し、tEAMの惹起能を確認した。ナイーヴ・ルイス・ラットへのGFP-MTL細胞移注後、経時的に心臓を含む各臓器を摘出した。励起灯によるマクロ観察および共焦点レーザースキャン顕微鏡・画像解析ソフトを用いたミクロ観察を行った。その際、GFP発光に加え、蛍光免疫染色による各細胞表面抗原での細胞同定を行い、心筋組織内での心筋炎発症様式を追跡した。

【研究2】マイクロアレイ解析法を用いたヒト心筋症・心不全の遺伝子解析（豊岡担当）

近年の循環器領域の遺伝子解析では、単一遺伝子性変異から、複数の遺伝子の相互作用で発症へと至るゲノム全体の関連解析（Genome-Wide Association study; GWAS）に移行しつつある。そこで、対象ゲノムとして、核遺伝子および心機能に影響の強いミトコンドリア遺伝子の両ゲノム解析を行った。

GWAS解析の優れた点として、以下の5点が挙げられる。①従来の単発的な症例報告にかかわらず、全遺伝子を網羅して複数遺伝子の同時解析が可能となる。②責任遺伝子の他に、病態の増悪・改善に関係する修飾遺伝子の同定できる。③細胞内信号伝達関連遺伝子を加えれば細胞内の複雑な遺伝子ネットワーク解析が可能となり、遺伝子間の相互機能が同定される。④薬物治療についての現況の思考錯誤的手法から、代謝酵素の機能解析に基づく治療薬の選択と至適量予測へと応用を広げ、個別医療の具体策として安全かつ効率的な医療に貢献する。⑤ミトコンドリア遺伝子の搭載でhaplogroup解析が容易となり、責任遺伝子の他に民族間の差異を考慮した疾患に対する感受性など、国際社会を考慮した厚生行政に貢献する。

学内倫理委員会の承認後に、日本人患者と共同研究先のドイツ・Max-Planck研究所の心臓移植症例の手術材料から精製して、全ゲノムの検討を開始した。これまでに疾患関連遺伝子として蓄積した約4,000のSNP、米国のNIHや欧州のEMBL等の公開SNPとAffymetrix社製のGenome-Wide Human SNP Array 6.0を用いた。ミトコンドリアゲノム解析では、人類の進化過程でミトコンドリア-核遺伝子間の移動（NUMT現象）による誤診を防ぐ目的で、同社のGeneChip CustomSeq Resequencing Arrayで全配列を決定した。

【研究3】心筋症・心不全における心臓老化とエネルギー代謝の検討（塩井担当）

1. 心臓老化におけるインスリン・シグナルの役割の検討

加齢に伴う心臓の変化を解析するため、3ヶ月齢(若齢)と20ヶ月齢(老齢)の野生型マウスの心臓を比較した。さらに加齢に伴う心臓の変化におけるインスリン/IGF-1シグナルの役割を検討した。PI3キナーゼ(PI3K)はインスリン/IGF-1シグナルの情報伝達に大切な脂質リン酸化酵素であり、細胞の増殖・分化・代謝・遊走などに大切である。心臓特異的に抑制型PI3K(dominant-negative PI3K; dnPI3K)を若齢より恒常的に発現させたマウスを3ヶ月齢と20ヶ月齢で比較した。

2. 心臓のエネルギー代謝における長寿遺伝子 SIRT1 の役割

SIRT1は酵母Sir2のホモログであり、NAD⁺依存性脱アセチル化酵素である。Sir2は酵母で長寿遺伝子として知られている。哺乳類ではSIRT1は細胞エネルギー代謝調節に重要な役割を果たしていることが知られている。我々は、心筋エネルギー代謝におけるSIRT1の役割を検討するため、SIRT1を心臓特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスを作成しSIRT1の心臓エネルギー代謝における役割を検討した。

III 研究成果

【研究1】心筋炎惹起性自己抗原特異的T細胞クローンの同定と病態解析

GFPトランスジェニックラットを用いGFPのMTLへのラベル化に成功した。GFP-Tg MTLは、99%のGFP発現および99%のCD4陽性を呈しており、ミオシン抗原CM2に特異的な抗原特異性を有していた。GFP-Tg MTLのサイトカイン発現について、PCRでは、IFN- γ およびTNF- α のメッセージ発現は見られたが、IL-10の発現はなかった。一方、培養上清を用いたELISAでは、INF- γ を産生するも、IL-4は産生しなかった。以上より、Th1プロファイルの細胞特性を有していることが考えられた。一方、共培養による上清にはIL-17も産生しており、培養中にはTh17産生細胞も含まれていることが判明した。

次に、MTL移注後の体内動態や心臓局所での病態形成を解析した。同細胞株を用いた移注EAM(tEAM)は、control MTLを移注した従来tEAMと比して、臨床像の差異はなかった。GFP-Tg MTLは細胞移注後一定のタイムラグをおいて心臓への浸潤をきたした。しかし、GFP-Tg MTLの心臓内への浸潤は第7病日をピークに減少に転ずるものの心筋組織そのものの炎症細胞浸潤は増悪を続け、その構成の主体はGFP陰性のCD4陽性Tリンパ球(ホストのnaïveルイスラット由来細胞)に移行した。すなわち、心筋炎症は当初はGFP-Tg MTLによる液性免疫

に伴う心筋傷害であるが、ホスト由来のリンパ球が心筋炎症の発現による心筋逸脱蛋白の流出による心筋ミオシン等の抗原刺激に応答し、活性化し最終的なエフェクター細胞となり心筋への炎症の主体となることがはじめて確認された。

【研究 2】 マイクロアレイ解析法を用いたヒト心筋症・心不全の遺伝子解析

心不全一般と DCM の発症頻度と重症度に関して、人種間の相違に遺伝学的な背景が影響すると予想された。実際、わが国に固有の遺伝子も多数認められた。未だ 100 人強の試料であり、慎重な検証が必要であるが、非常に興味深い変異配列が散見された。なかでも、今回加えたミトコンドリアゲノム変異は心筋細胞に必須な ATP 合成や細胞のアポトーシスに直結し、心機能に強く影響する。これは活性酸素による後天的な遺伝子変異、老化、エネルギー代謝の変化による糖尿病など、経時的な長いスパンの生命現象と関わりと想定された。

さらに、最近同定したある種のミトコンドリア遺伝子変異は、高血圧や脂質代謝、肥満等の代謝症候群の結果として心不全を発生するのではなく、心不全の発症を直接制御するマスターキーの役割を果たすことを示した（投稿中のため、詳細な結果公表は遠慮することをお許しいただきたい）。

【研究 3】

1. 心臓老化におけるインスリン・シグナルの役割の検討

加齢に伴う心臓の変化を解析するため、3 ヶ月齢(若齢)と 20 ヶ月齢(老齢)の野生型マウスの心臓を比較した。DNA チップにより網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、protein folding、ユビキチン・プロテアソーム系などタンパク質品質管理に関する遺伝子の発現が減少していた。

また、心筋細胞内に細胞内封入体であるリポフスチン封入体の出現を多数認めた。リポフスチンは加齢に伴い神経細胞、心筋細胞、肝細胞などで蓄積してくる自家蛍光を発する難溶性の物質と定義され種々の細胞内構成成分がその起源とする。一方で酸化ストレス、DNA 損傷、細胞死に関連する分子については加齢による変化が少なく、タンパク質品質管理の異常が心臓老化の大きな特徴であることがわかった。

心臓特異的に抑制型 PI3K (dnPI3K) を若齢より恒常的に発現させたマウスでは、加齢に伴う心機能低下と細胞内封入体の増加が予防された。インスリン

/IGF-1 シグナルはタンパク質品質管理に大切であるオートファジーを負に制御することが知られているが、dnPI3K マウスでは若齢よりオートファジーの亢進がみられた。さらに老齢の野生型マウスに PI3K の下流にあるラパマイシン標的分子 (Target of Rapamycin: TOR) の阻害薬であるラパマイシンを投与するとリポフスチンが減少し、リソゾーム阻害薬を投与することによりオートファジーを抑制するとリポフスチンが増加した。よって、リポフスチンの形成にオートファジーが関与しオートファジーの亢進が異常タンパク質蓄積を除去し老化を予防したと思われた。

2. 心臓のエネルギー代謝における長寿遺伝子 SIRT1 の役割

生体における SIRT1 の心筋エネルギー代謝における役割を検討するため SIRT1 を心臓特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスを作製し、心臓の代謝プロファイルを検討した。SIRT1 蛋白の発現量の異なる 3 つのトランスジェニックラインが得られた。SIRT1 発現量に応じて心機能は低下し、SIRT1 を高発現させたマウスでは心不全を呈し 3 ヶ月で死亡した。脂肪酸の取り込みは SIRT1 発現量に応じて低下し、電子顕微鏡での観察では変性ミトコンドリア数が SIRT1 発現量に応じて増加していた。心不全を来さない SIRT1 の中等度発現マウスよりミトコンドリアを単離し呼吸能を測定したところ、ミトコンドリア呼吸能は野生型マウスと比較して 75% 減少していた。ミトコンドリア機能とミトコンドリア形態の変化は脂肪酸代謝 (nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase (MCAD)) やミトコンドリア機能 (NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 9 (alpha-s9), succinate dehydrogenase complex subunit B (SDHB), and cytochrome c oxidase VIIa1 (Cox7a1)) に関連する遺伝子の減少と関連があった。意外なことに、酸化ストレスは SIRT1 マウスで低下していた。

IV 考察

DCM の免疫応答は、T 細胞による細胞性免疫が主体と考えられてきた、しかし、

その病態解析はあくまで病態の終焉像としての心筋障害を観察するにとどまっていた。その限界を生じしめる理由のひとつに、エフェクター細胞の同定と追跡が困難だったことが挙げられる。今回のプロジェクトでの大きな成果は、ラット自己免疫性心筋炎モデル (EAM) における特異的 T リンパ球株 (MTL) の挙動を探索するために、GFP トランスジェニックラットを用い GFP の MTL へのラベル化に成功したことである。我々が樹立した GFP-Tg MTL は 99% の GFP 発現および 99% の CD4 陽性を呈しており、ミオシン抗原 CM2 に特異的な抗原特異性を有していた。同細胞株を用いた移注 EAM (tEAM) は、control MTL を移注した従来 tEAM と比して、臨床像の差異はなかった。GFP-Tg MTL は細胞移注後一定のタイムラグをおいて心臓への浸潤をきたした。しかし、GFP-Tg MTL の心臓内への浸潤は第 7 病日をピークに減少に転ずるものの心筋組織そのものの炎症細胞浸潤は増悪を続け、その構成の主体は GFP 陰性の CD4 陽性 T リンパ球 (ホストの naïve ルイスラット由来細胞) に移行した。すなわち、心筋炎症は当初は GFP-Tg MTL による液性免疫に伴う心筋傷害であるが、ホスト由来のリンパ球が心筋炎症の発現による心筋逸脱蛋白の流出による心筋ミオシン等の抗原刺激に応答し、活性化し最終的なエフェクター細胞となり心筋への炎症の主体となることがはじめて確認された。また、その際に、心臓内への抗原提示細胞 (OX62) の出現がおこり、GFP-MTL と隣接する。OX62 陽性細胞が持続的な抗原提示を担い、炎症の持続の主軸を担っていることが予想された。

ところで、心筋障害のメカニズムとして、マイクロアレイ法では期待した免疫関連の遺伝子異常の吊り上げは困難だった。そこで、標的を拡げて検索を深めた。核遺伝子の解析は末梢血でも心筋でも差はなく、ミトコンドリア遺伝子は心筋細胞内で後天的にも変異し得ることから、核遺伝子の解析は末梢血でも心筋でも差はないと予想する。ミトコンドリア遺伝子は心筋細胞内で後天的にも変異し得る。正確な診断には白人と同様、日本人患者に関しても心筋由来の試料が必要である。さらに、心停止症例からの蘇生可否を決定する遺伝的背景にも応用を予定している。

さらに試料数を増やし、診断精度を向上させれば、個々の患者の遺伝子情報に基づく治療戦略の具体化と予後と治療内容による層別化が図れる。医療の効率化を図るには、国産マイクロアレイの開発が必須である。研究手段としては、膨大な遺伝子解析と高性能の演算素子に頼る愚直かつ力任せの面が強いが、現在考え得る手法として最も確実な戦略とも言える。

一方、標的組織たる心臓の組織障害に関しては、最近になりタンパク質品質管理の異常が心不全の発症に関与することが示されている。特に、オートファジーは心不全の組織で亢進しており、恒常的オートファジーの低下は心不全を悪化させる。加齢に伴うタンパク質品質管理の異常は心臓老化が高齢者の心不全発症の分子基盤である可能性を示唆する。オートファジーはミトコンドリア

機能の維持に大切であることもわかっており、タンパク質ホメオスタシスの低下がミトコンドリア機能を低下させ、加齢に伴う心機能低下に関与する可能性も考えられる。

インスリン・シグナルは全身および細胞の代謝調節に極めて大切な役割を果たすが、心臓の老化においても重要であった。また、長寿遺伝子 SIRT1 が心臓エネルギー代謝を調節していた。これらの結果は、老化において代謝調節が重要であることを意味するものであり、高齢者に心不全が多い原因として加齢に伴い心臓のエネルギー代謝異常が存在する可能性を示唆する。

今後は高齢者の心不全に伴う心臓のエネルギー代謝にたいして栄養管理、リハビリテーション、代謝調節薬などによる包括的な介入が、1つの心不全治療の形として検討されるべきであると考えられる。この場合、ハードルとなりうるのは、代謝ネットワークの頑強さ (robustness) である。これについては標的分子のさらなる選定や多剤介入に必要性が検討されるべきである。また、ダイナミックに変化する心臓の代謝状態を評価するための手法 (画像診断やバイオマーカーなど) が開発される必要がある。

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深く感謝申し上げます。

V 研究成果の発表

論文・書籍

1. Inuzuka Y, Okuda J, Kawashima T, Kato T, Niizuma S, Tamaki Y, Iwanaga Y, Yoshida Y, Kosugi R, Watanabe-Maeda K, Machida Y, Tsuji S, Aburatani H, Izumi T, Kita T, **Shioi T**. Suppression of Phosphoinositide 3-kinase Prevents Cardiac Aging in Mice. **Circulation** 120: 1695-1703; 2009.
2. Honda M, Hosoda M, Kanzawa N, Tsuchiya T, **Toyo-oka T**. Specific knockdown of δ -sarcoglycan gene in C₂C₁₂ *in vitro* causes post-translational loss of

other sarcoglycans without mechanical stress. **Mol Cell Biochem** 323; 149–159, 2009.

3. Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Tamaki Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Soga T, Kita T, Kimura T, **Shioi T**. Analysis of Metabolic Remodeling in Compensated Left Ventricular Hypertrophy and Heart Failure. **Circ Heart Fail** 3: 420–30; 2010.

4. Takeuchi I, Imaki R, **Inomata T**, Soma K, Izumi T. MRI Is Useful for Diagnosis of H1N1 Fulminant Myocarditis. **Circ J** 74: 2758–2759, 2010.

5. Kawashima T, Inuzuka Y, Okuda J, Kato T, Niizuma S, Tamaki Y, Iwanaga Y, Kawamoto A, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Takemura G, Kita T, Kimura T, **Shioi T**. Constitutive SIRT1 overexpression impairs mitochondria and reduces cardiac function in mice. **J Mol Cell Cardiol** 51, 1026–1036, 2011.

6. **Inomata T**. Cardiac-Troponin-Guided Heart Failure Management-Is It Possible in Clinical Practice?- **Circ J** 75: 542–543, 2011.

7. Yanagisawa T, **Inomata T**, Watanabe I, et al. Clinical significance of corticosteroid therapy for eosinophilic myocarditis. **Int Heart J** 52: 110–113, 2011.

8. **Toyo-oka T**, Tanaka T, Toyo-oka L, Tokunaga K. A novel algorithm from personal genome to the pathogenic mutant causing mitochondrial cardiomyopathy. Ostadal et al., in „**Genes and cardiovascular function**“, Springer Verlag, pp85–92, 2011.

9. Niizuma S, Inuzuka Y, Okuda J, Kato T, Kawashima T, Tamaki Y, Iwanaga Y, Yoshida Y, Kosugi R, Watanabe-Maeda K, Machida Y, Tsuji S, Aburatani H, Izumi T, Kita T, Kimura T, **Shioi T**. Effect of persistent activation of phosphoinositide 3-kinase on heart. **Life Sci**, (in press).

10. Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Kawamoto A, Tamaki Y, Iwanaga Y, Soga T, Kita T, Kimura T, **Shioi T**. Analysis of liver metabolism in a rat model of heart failure. **Int J Cardiol** (in press).

11. Mizutani T, **Inomata T**, Watanabe I, Maekawa E, Yanagisawa Y, Koitabashi

T, Takeuchi I, Niwano H, Izumi T. Immunomodulatory Effects of Amiodarone to Ameliorate Rat Autoimmune Myocarditis. (submitted)

12. Yanagisawa Y, **Inomata T**, Mizutani T, Watanabe I, Maekawa E, Koitabashi T, Takeuchi I, Izumi T. Green fluorescent protein expressing T cells inducing experimental autoimmune myocarditis. (submitted)

13. Ishikawa S, Niwano S, Imaki R, Takeuchi I, Irie W, **Toyo-oka T**, Soma K, Kurihata K, Izumi T. Usefulness of a simple prognostication score in prediction of the prognoses of patients with out-of-hospital cardiac arrests. (submitted).

知的財産権登録

1. 猪又孝元、柳澤智義. 「蛍光ラベル化した心筋炎惹起性細胞株の樹立および自己免疫性心筋炎の病態解明への応用」特願 2010-022369.