

心不全における Ca^{2+} 過負荷の分子病態学的意義と
その内在的防御因子の解明に関する研究

<<研究の概要>>

心不全は様々な原因で発症し、その進展の過程に細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度の過負荷が深く関わることは知られている。しかし、その病態の発症と抑制に関わるメカニズムは十分には解明されていない。そこで、本研究事業では独自の研究ツールを有する3つのグループが相互連携し、心不全の病態、治療に関する基礎研究を多角的に行った。

本研究の結果以下の知見を得た。1. 心不全の発症・進展における虚血あるいは低酸素負荷の影響（間歇的低酸素負荷と心不全）：間歇的な低酸素負荷を与えると、心筋症ハムスターでは正常ハムスターに比べて拡張能のみならず収縮能の有意な低下が認められた。組織学的評価からは、間歇的低酸素負荷群で心筋細胞断面積、間質の線維化率ならびに TUNEL 陽性心筋細胞が増加し、一部に contraction band 様の変性所見が認められた。電顕所見では、ミトコンドリアの変性、筋原線維の融解ならびに Z 帯の streaming など多彩な病変が出現した。さらに、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) タンパク質およびスーパーオキシド産生量、c-fos、c-jun、aldose reductase-like gene mRNA 発現量が間歇的低酸素負荷により増大した。2. Ca^{2+} 過負荷による心筋症の新しい進展機構（ATP 産生酵素関連分子 DAPIT と心不全）：HCM 患者で同定した MYBPC3 遺伝子変異を導入したゼブラフィッシュ HCM モデルを作成した。正常群および MYBPC3 群の受精卵に DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) に対するアンチセンス・モルフォリーノオリゴを導入し、心室サイズや心収縮能を3群間（MYBPC3 群・WT-DAPIT 群・MYBPC3-DAPIT 群）で比較した。MYBPC3 群および WT-DAPIT 群と比較し、MYBPC3-DAPIT 群では著明な心嚢液貯留を呈した。また、MYBPC3-DAPIT 群は心室径が小さく small heart を呈した。DAPIT 蛋白はミトコンドリアにおける ATP 産生酵素近傍の F0 領域に位置することが知られており、培養細胞における DAPIT のノックダウンにより細胞内 ATP の産生が有意に低下することが最近示された。以上より、MYBPC3 変異ゼブラフィッシュにおける DAPIT ノックダウンは、心筋での ATP 産生の低下を来し、small heart および cardiac edema の出現を招くものと推察された。3. Ca^{2+} 過負荷の新しい発症及び防御機構（心筋症ハムスターの遺伝子解析）：心筋症ハムスターには症状の異なる様々な亜系統が存在するが、その共通の遺伝的原因がジストロフィン結合タンパク質の一つであるデルタ-サルコグリカン遺伝子の欠損である。本研究では、心筋変性が顕著な T0-2 ハムスターと心肥大が著明な BI014.6 ハムスターに注目し、その第二原因遺伝子の同定を試みた。その結果、T0-2 ハムスターには中間径フィラメント分子であるデスミンに点突然変異を見出した。さらに BI014.6 では、水晶体タンパク質として知られるベータ B1-クリスタリンの心筋における発現が遺伝的に欠損することも見出した。

本研究の成果が、心不全の診断・治療法の開発へつながっていくことを期待したい。

田中一彦	大阪薬科大学薬学部 客員研究員	研究の統括、心不全の発症・進展における虚血あるいは低酸素負荷の影響
林 哲也	大阪薬科大学薬学部 循環病態治療学研究室・教授	心不全の発症・進展における虚血あるいは低酸素負荷の影響
山岸正和	金沢大学大学院医学系研究科 臓器機能制御学・教授	Ca ²⁺ 過負荷による心筋症の新しい進展機構
今野哲雄	金沢大学大学院医学系研究科 臓器機能制御学・助教	Ca ²⁺ 過負荷による心筋症の新しい進展機構
阪本英二	国立循環器病研究センター 研究所血管機能研究室・室長	Ca ²⁺ 過負荷の新しい発症及び防御機構

研究報告

I 研究目的

心不全は先天性ならびに後天性の様々な原因で発症し、その進展の過程に細胞内の遊離Ca²⁺濃度の過負荷 (Ca²⁺-overload) が深く関わることは知られている。しかし、その病態の発症と抑制に関わるメカニズムは十分には解明されていない。こうした問題を克服するためには、ユニークなアプローチが重要である。そこで、本研究事業では、心不全・心筋症に関する独自の実験系あるいはモデル動物を有する3つの研究グループが、それぞれの強みを生かし、以下のような取り組みを行った。

1. 心不全の発症・進展における虚血あるいは低酸素負荷の影響（間歇的低酸素負荷と心不全）（田中、林）

現在までに我々は、正常マウスおよびラットに低酸素負荷を与えることで、心筋断面積の増加、血管周囲間質の線維化率の増加、TUNEL陽性心筋細胞の増加など心筋リモデリングを引き起こすことを報告している。しかし、病態下での詳細は依然不明である。本研究では、心筋症の代表的モデル動物であるBI014.6心筋症ハムスターに間歇的低酸素負荷を行い、その影響について、機能形態学的、分子生物学的検討を行う。さらに、心エコーを用いた評価を行い、心機能へ及ぼす影響についても詳細に検討も行う。

2. Ca²⁺過負荷による心筋症の新しい進展機構 (ATP産生酵素関連分子 DAPIT と心不全) (山岸、今野)

心肥大における心筋細胞内のCa²⁺濃度の上昇は、カルシニューリン-CaMK-MEF2経路を含む各種細胞内伝達経路を活性化し、病的リモデリングを引き起こす。この病的リモデリングの進展過程においてミトコンドリア機能異常が認められることは知られていたが、その調節機構に関しては明らかでない。以前に我々は、心筋細胞内Ca²⁺過負荷を来す代表的な心筋疾患である肥大型心筋症 (Hypertrophic cardiomyopathy; HCM) においてDSAGE解析を施行し、新規の分子 (USMG5: Up-regulated during Skeletal Muscle Growth 5 homolog) の発現が肥大心筋において亢進していることを明らかにした。USMG5遺伝子はミトコンドリア膜に存在するDAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) 蛋

白をコードし、心臓を含む全身に広く発現する。しかしながらその機能に関しては未知な点が多く、また心肥大や心不全の発症進展における関与も不明である。本研究の目的は、HCM患者で同定したサルコメア遺伝子変異を導入したゼブラフィッシュ HCM モデルを作成し、*in vivo* 機能解析により HCM の発症進展における DAPIT の役割を明らかにすることである。

3. Ca²⁺過負荷の新しい発症及び防御機構（心筋症ハムスターの遺伝子解析）（阪本）

疾患の分子病態を解明するアプローチのひとつとして、実験動物モデルの活用が挙げられる。ノックアウトマウスは、特定遺伝子の生体内における機能を解析する上で極めて有用である。それに対し、なんらかの原因で遺伝子変異が偶然に起きた突然変異動物は、意外な生体調節機構の発見をもたらすことがある。例えば、体節を調節するホメオボックス遺伝子は、ショウジョウバエの突然変異体の解析によって発見された。近年、この古典的とも言える突然変異動物の有用性が再認識され、ニトロソウレアを用いた突然変異マウス作成の国家的プロジェクトが推進されつつある。心不全・心筋症の突然変異モデル動物として、心筋症ハムスターがよく知られている。興味深いことに、心筋症ハムスターには症状の異なる様々な亜系統が存在する（図 1）。

例えば、T0-2 では心筋変性が顕著であり、BI014.6 では著明な心肥大を伴う。我々は先に、その共通の遺伝的原因がジストロフィン結合タンパク質の一つであるデルター-サルコグリカン遺伝子の欠損であることを明らかにした。本研究では、これら T0-2 と BI014.6 ハムスターには第二の遺伝子異常が存在するのではないかと仮定し、その同定から心不全の発症と進展に関わる新たな分子機構を探索する。

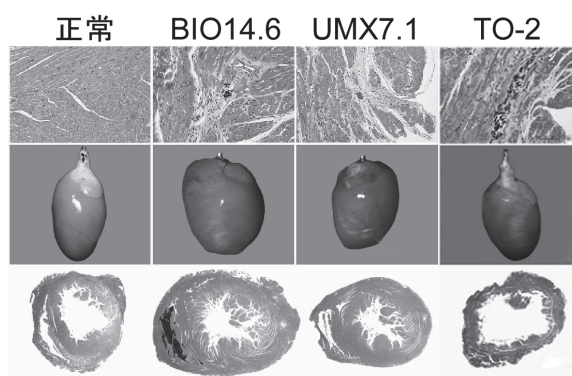


図1. 様々な心筋症ハムスター：上段から、病理、全体、断面像。T0-2は心室壁が菲薄化し、BIO14.6では心肥大が顕著。

BI014.6 は著明な心肥大に加え白内障様の眼症状を伴うことをわれわれは独自に見出しているが、遺伝性疾患では単一遺伝子の異常が様々な臓器で表現型の異なる症状を呈することがある。例えば、マルファン症候群では、フィブリリン遺伝子の異常が水晶体脱臼と解離性大動脈という一見関係のない症状を同時に引き起こす。こうした事実を踏まえ、ユニークだがゲノム情報に乏しいハムスターの突然変異体に独自の視点からアプローチする。

以上のように本研究では、独自の実験系あるいはモデル動物を駆使し、心不全の治療に新たな地平を切り開きうる新知見の獲得を目指す。

II 研究計画及び材料と方法

1. 心不全の発症・進展における虚血あるいは低酸素負荷の影響（間歇的低酸素負荷と心不全）

雄性 Bio 14.6 ハムスター 20-24 週齢を間歇的低酸素下（日中 8 時間に 5%酸素濃度 1.5 分、21%酸素濃度 5 分を反復）および通常酸素下で 14 日間飼育した。さらに間歇的低酸素

負荷時に水素ガス (3.05%) 吸入を行った。ハムスターにペントバルビタール麻酔を行った後、心臓血行動態および心筋組織の動きを心エコーにて測定し、評価を行った。その後、心臓を摘出し、光学顕微鏡・電子顕微鏡ならびに免疫組織学的検索を行い、左室心筋の組織学的評価を行った。光学顕微鏡的検索では HE 染色、sirius red 染色にて血管周囲線維化の定量的評価、免疫組織化学的検索では、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) タンパクの評価を行った。また、摘出心筋を液体窒素にて急速冷却し、そのサンプルから total RNA の抽出を行った。抽出した total RNA サンプル中の RNA 濃度を測定し、cDNA の作成を行った。得られた cDNA を用いて、real-time RT-PCR により c-fos、c-jun および aldose reductase-like gene の mRNA 発現量の測定を行った。

2. Ca²⁺過負荷による心筋症の新しい進展機構 (ATP 産生酵素関連分子 DAPIT と心不全)

はじめに HCM 患者 450 名において原因遺伝子の変異を直接塩基配列決定法によりスクリーニングし、同定された変異 (ミオシン結合蛋白 C 遺伝子: *MYBPC* 遺伝子 Int21DSG+1A 変異) を導入した動物モデルの作成を行った。動物モデルとして、遺伝子操作が簡便で心臓表現型を呈するまでの時間が短い (遺伝子操作から 72 時間) ゼブラフィッシュを選択した。*MYBPC3* 変異のゼブラフィッシュ受精卵への導入は、*MYBPC3* に対するアンチセンス・モルフォリーノオリゴをマイクロインジェクションすることで行った。次に、HCM 発症進展における DAPIT の役割を明らかにする目的で、WT 群 および *MYBPC3* 群の受精卵に *USMG5* に対するアンチセンス・モルフォリーノオリゴを導入し、*USMG5* ノックダウンによる心室サイズや心収縮能・心嚢液量を 3 群間 (*MYBPC3* 群・WT-*USMG5* 群・*MYBPC3-USMG5* 群) で比較した。心室サイズおよび心機能測定は、ゼブラフィッシュ用に開発された M モード心エコー図法にて行った。心嚢液量の測定は光学顕微鏡下にデジタル撮影した画像を Image J ソフトウェアにより定量した。

3. Ca²⁺過負荷の新しい発症及び防御機構 (心筋症ハムスターの遺伝子解析)

以下 2 種類の心筋症ハムスターを対象に用いた。

[1] 心筋症ハムスター T0-2 を用いた探索: ハムスターの心室筋微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。筋原線維の Z 線に結合するタンパク質であるアルファ-アクチニンならびにデスミンの発現量をイムノブロットで解析した。正常と T0-2 のデスミン cDNA を単離し、塩基配列を決定した。中間径フィラメント分子であるデスミンは、ヘッド、コイル-1、コイル-2、テイルの 4 つのドメインからなるが、デスミン分子のホモダイマー形成に重要なコイル-1 ドメインの融合タンパク質を作成し、その結合能を pull-down 法で解析した。また、デスミン分子全体による線維形成能は、デスミンの発現プラスミドを中間径フィラメントの発現していない SW13 細胞にトランスフェクトした後、免疫染色法で解析した。心室筋におけるデルタ-サルコグリカンとデスミンの局在を、単独ならびに二重免疫蛍光染色法で解析した。

[2] BI014.6 ハムスターを用いた探索: ハムスターの眼球からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE で解析した。BI014.6 で欠損する正常なタンパク質をゲルから抽出し、リジルエンドペプチダーゼで断片化し、それらペプチドをエドマン分解で解析した。同定されたアミノ酸配列から対応する cDNA を単離し、その塩基配列を決定した。ベータ B1-クリスタリンの遺伝子発現を RNA ブロットとイムノブロットで解析した。ベータ B1-クリスタリンの異常転写産物に対応する cDNA を RACE 法で単離し、その塩基配列を決定した。耳介から抽

出したゲノム DNA を用い、PCR でベータ B1-クリスタリンの遺伝子型を診断できるシステムを構築した。BI014.6 と正常ハムスターを交配させ、デルタ-サルコグリカンあるいはベータ B1-クリスタリンを単独あるいは同時に欠損する新しいハムスターの系統を作出した。この新たな 3 系統ならびに正常ハムスターを対象とし、各系統における心重量の体重に対する比を比較した。

III 研究成果

1. 心不全の発症・進展における虚血あるいは低酸素負荷の影響（間歇的低酸素負荷と心不全）

心エコーを用いた検討では、心筋症ハムスター（CM）においては正常ハムスター（Syrian）と比較して、低酸素負荷により拡張能および収縮能の有意な低下が認められた（図 2）。それら影響は、水素ガスの吸入により改善された。また、光学顕微鏡的検索の結果、CM の間歇的低酸素負荷群（CM hypoxia）で心筋細胞断面積の増加、血管周囲間質の線維化率の増加、TUNEL 陽性

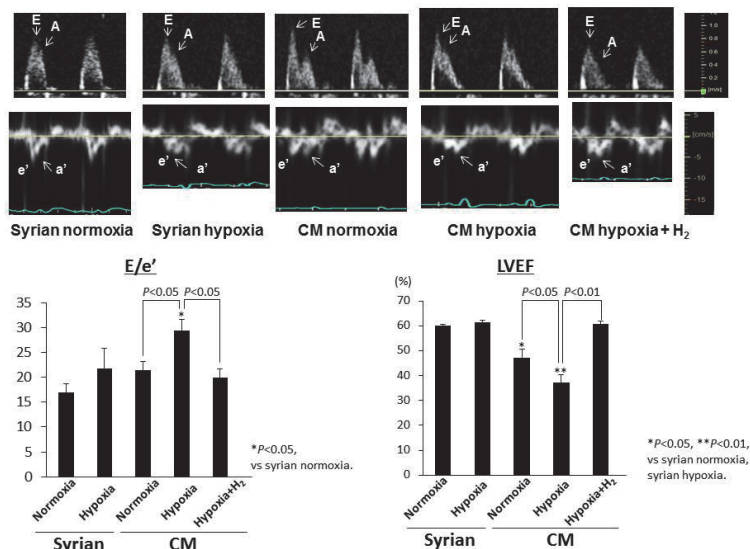


図 2. 心エコーを用いた心機能評価

心筋細胞の増加が認められた。電子顕微鏡所見では、CM の間歇的低酸素負荷群で筋原線維の融解と Z 帯の streaming が顕著に認められ、免疫組織化学的検索の結果からは、4-hydroxy-2-nonenal タンパク質の産生量が間歇的低酸素負荷により増大した。水素ガスの吸入により、それら増加が抑制された。mRNA 発現量の検討においては、CM の間歇的低酸素負荷群で心筋リモデリングと関連していると報告されている embryonic gene である c-fos および c-jun mRNA 発現量も増加していた。さらに CM の間歇的低酸素負荷群で aldose reductase-like gene の mRNA 発現量が有意に増加していた。水素ガス吸入は、c-fos、c-jun、aldose reductase-like gene の mRNA 発現量ならびに酸化ストレスの上昇を抑制し、間歇的低酸素負荷に伴う心筋リモデリングを軽減した。

2. Ca²⁺過負荷による心筋症の新しい進展機構（ATP 産生酵素関連分子 DAPIT と心不全）

[1] HCM 患者における原因遺伝子変異解析の結果：

心筋サルコメア構成蛋白をコードする遺伝子の変異が約 3 割の心肥大患者で同定されることを明らかにした。また、心筋サルコメア変異による心肥大は、他の原因による心肥大と比較して心血管イベント発症頻度が高いことを明らかにした。

[2] ゼブラフィッシュ HCM モデルの作成：

HCM 患者で同定された MYBPC 遺伝子 Int21DSG+1A 変異をゼブラフィッシュに導入した結果、MYBPC 遺伝子変異単独では明らかな心肥大や心機能低下は認められなかった。

[3] DAPIT 機能に関する *in vitro* 機能解析

ゼブラフィッシュにおいて、*MYBPC* 遺伝子単独ノックダウン群 (図 3 左パネル) および DAPT 単独ノックダウン群 (図 3 中パネル) と比較して、*MYBPC* 遺伝子および DAPT とのダブルノックダウン群 (図 3 右パネル) では著明な心嚢液貯留を呈することが明らかとなった。また、M モード心エコー図法により、*MYBPC* 遺伝子および DAPT とのダブルノックダウン群は心室径が小さく small heart を呈することも明らかとなった (*MYBPC* 群 vs. WT-*USMG5* 群, $151 \pm 10.0 \mu\text{m}$ vs. $161.3 \pm 9.0 \mu\text{m}$, $p = \text{N.S.}$; *MYBPC3* 群 vs. *MYBPC3-USMG5* 群, $151 \pm 10.0 \mu\text{m}$ vs. $141 \pm 5.5 \mu\text{m}$, $P < 0.05$)。



図 3. ゼブラフィッシュにおける *MYBPC3* と *DAPT* 遺伝子のノックダウン効果: 矢印は心臓を指す。

3. Ca^{2+} 過負荷の新しい発症及び防御機構 (心筋症ハムスターの遺伝子解析)

[1] 心筋症ハムスター T0-2 を用いた探索

T0-2 の心室筋では筋原線維の Z 線に崩壊像が散見され、アルファ-アクチニンは保持されていたがデスミンは週令と共に激減していた。正常と BI014.6 のデスミン cDNA は共に 469 残基のアミノ酸からなるポリペプチドをコードしていたが、T0-2 のデスミン cDNA には 191 番目のアミノ酸をアラニンからスレオニンに変える塩基置換を認めた。このアミノ酸置換 (Ala191Thr) はコイル-1 ドメイン内に存在した。次に、Ala191Thr がデスミンの機能へ及ぼす影響を解析すると、Ala191Thr を有するコイル-1 の自己結合能には有意な差は認められなかったが、Ala191Thr を有するデスミン分子全体では、線維形成自体は認めたが正常に比べてやや細く、まばらであった。一方、デスミンとデルタ-サルコグリカンが正常の心室筋では筋筋質膜直下で共局在していた。また、デスミンは正常だがデルタ-サルコグリカンは欠損している BI014.6 においては、デスミンは若週令では Z 線に保持されていたが高週令になると減少していた。

[2] BI014.6 ハムスターを用いた探索

BI014.6 ハムスターの眼球では分子量 25kDa のタンパク質が欠損し、それはアミノ酸配列からベータ B1-クリスタリンであることが分かった。BI014.6 の眼球では、0.7kb と正常より小さいベータ B1-クリスタリンの転写産物が存在し、それは第一エクソンが第 4 エクソンとスプライスして正常なタンパク質をコードしていなかった。次に、ベータ B1-クリスタリンの心臓における発現を検討したところ、正常では存在したが BI014.6 では欠損していた。体重に対する心重量比は、 β B1-クリスタリン単独欠損ハムスターでは正常と有意差は無いが ($0.301 \pm 0.019\%$ vs $0.282 \pm 0.018\%$, $P > 0.05$)、ダブル欠損ではデルタ-サルコグリカン単独欠損に比べ有意に増加していた ($0.431 \pm 0.082\%$ vs $0.356 \pm 0.062\%$, $P < 0.05$)。

以上から、心筋におけるベータ B1-クリスタリンは、心筋症に伴う心肥大を有意に抑制することが分かった。

IV 考察

以下、各研究グループの成果に対して考察したい。

1. 心不全の発症・進展における虚血あるいは低酸素負荷の影響（間歇的低酸素負荷と心不全）

間歇的低酸素負荷により心筋症ハムスターで、拡張能および収縮能の有意な低下が認められ、心不全患者における周期的無呼吸の合併が心機能を悪化させることが示唆された。さらに、間歇的低酸素負荷により心筋リモデリングの促進が認められ、その原因として酸化ストレスの増大や c-fos、c-jun および aldose reductase-like gene の発現亢進が関与していると考えられた。本研究で検討を行った c-fos および c-jun は、activator protein 1 (AP-1) の構成因子であり、AP-1 の活性化で aldose reductase-like gene が活性化されることが報告されている。さらに、aldose reductase-like gene は sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 (SERCA2) の発現を抑制する PGF2 α の産生に関与することが報告されており、この一連の流れが心不全進展の原因の一つと考えられる。本研究結果から、c-fos、c-jun および aldose reductase-like gene の発現が亢進していたため、上記機序により SERCA2 の活性が低下することで、心不全が進展したものと考えられた。また、水素ガスの吸入はヒドロキシラジカルを消去し、酸化ストレスの軽減および心筋リモデリングの抑制に効果的であることは既に報告した (Am J Physiol Heart Circ Physiol 301: H1062-1069, 2011)。よって、心不全に伴う周期性無呼吸の治療に用いられる adaptive servo ventilator 使用時に、水素ガス吸入を併用させることで、心不全進展に対する効果的な対策と成り得る可能性が考えられる。

2. Ca^{2+} 過負荷による心筋症の新しい進展機構（ATP 産生酵素関連分子 DAPIT と心不全）

臨床面における本研究の成果として、心筋サルコメア変異が同定された HCM 患者は他の原因による心肥大と比較して心血管イベント発症頻度が高いことが判明し、 Ca^{2+} 過負荷の臨床的インパクトが明らかとなった。さらに、ゼブラフィッシュモデルを用いた *in vivo* 機能解析では、新規の分子 DAPIT のノックダウンによって HCM ゼブラフィッシュが高度な cardiac edema を呈することが明らかとなった。DAPIT 蛋白はミトコンドリアにおける ATP 産生酵素近傍の F0 領域に位置することが知られており、培養細胞 (C2C12) における DAPIT のノックダウンにより細胞内 ATP の産生が有意に低下することが最近示された。以上より、*MYBPC3* 変異ゼブラフィッシュにおける DAPIT ノックダウンは、心筋での ATP 産生の低下を来し、small heart および cardiac edema の出現を招くものと推察された。今後、新生仔マウス心組織において DAPIT のノックダウンを行い、心筋細胞形態や細胞内 ATP 動態に関する追加解析を行う予定であるが、本研究により世界に先駆けて DAPIT が HCM の発症進展に関与することが強く示唆された。

3. Ca^{2+} 過負荷の新しい発症及び防御機構（心筋症ハムスターの遺伝子解析）

このアプローチにより、2つの新しい知見を得ることができた。まず、T0-2 ハムスター

の解析において、その心筋症が重症化する原因としてデスミンに点突然変異 Ala191Thr を認めた。また、正常心室筋ではデルタ-サルコグリカンがデスミンを物理的に支持し、それが欠損する BI014.6 では高週令になるとデスミンが脱落することも分かった。一方、デスミンの局在する Z 線には筋原線維の収縮による機械的負荷が集積することが知られている。以上のことから、Ala191Thr 自体がデスミンの線維形成に及ぼす影響は軽微であるが、デルタ-サルコグリカンが欠損する T0-2 においては機械的負荷の影響を受けやすく、その脱落から心筋変性が進行しやすくなると考えられた。こうした細胞骨格ネットワークの崩壊は、Ca²⁺制御関連分子の調節異常も引き起こすことが予測される。次に、BI014.6 ハムスターの解析では、従来は遺伝性白内障の原因遺伝子と考えられていたベータ B1-クリスタリンが心筋にも発現し、その欠損は心肥大を増悪させることが分かった。これは、BI014.6 が白内障様の眼症状を伴うことに着目し、これと一見無関係に思える著明な心肥大が同一遺伝子異常に起因するのではないかと仮説を立て、その可能性を深く追求することで得られた成果である。ベータ B1-クリスタリンは、Ca²⁺結合能を有するとの報告があり、心不全における Ca²⁺-overload に対する内在的防御機構として機能することが推測される。その欠損は、Ca²⁺-overload については心肥大の増悪を招くものと考えられる。今後は、ベータ B1-クリスタリンを心不全に対する新たな創薬のターゲット分子とすべく研究を展開させたい。

以上の研究成果が心不全の診断法あるいは治療法の開発へつながっていくことを期待したい。

最後に、本研究事業の遂行に当たり多大なるご支援を賜りました公益財団法人車両競技公益資金記念財団に深謝申し上げます。

V 研究成果の発表

- [1] Mukai T, Nagao Y, Nishioka S, **Hayashi T**, Shimizu S, Ono A, Sakagami Y, Watanabe S, Ueda Y, Hara M, Tokudome K, Kato R, Matsumura Y, Ohno Y. Preferential suppression of limbic Fos expression by intermittent hypoxia in obese diabetic mice. **Neurosci Res** 77, 202-207, 2013.
- [2] Nishioka S, Yoshioka T, Nomura A, Kato R, Miyamura M, Okada Y, Ishizaka N, Matsumura Y, **Hayashi T**. Celiprolol Reduces Oxidative Stress and Attenuates Left Ventricular Remodeling Induced by Hypoxic Stress in Mice. **Hypertens Res** 36, 934-939, 2013.
- [3] Kato R, Nomura A, Sakamoto A, Yasuda Y, Amatani K, Nagai S, Sen Y, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, **Tanaka K, Hayashi T**. Intermittent hypoxia relevant to sleep apnea increases oxidative stress and accelerates left ventricular systolic dysfunction in cardiomyopathic hamsters. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** (in revision)

- [4] **Konno T**, Hayashi K, Fujino N, Nagata Y, Hodatsu A, Masuta E, Sakata K, Nakamura H, Kawashiri MA, **Yamagishi M**. High sensitivity of late gadolinium enhancement for predicting microscopic myocardial scarring in biopsied specimens in hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2014 (in press)
- [5] Kawashiri MA, Hayashi K, **Konno T**, Fujino N, Ino H, **Yamagishi M**. Current perspectives in genetic cardiovascular disorders: from basic to clinical aspects. *Heart Vessels* 29, 129-141, 2014.
- [6] Hodatsu A, **Konno T**, Hayashi K, Funada A, Fujita T, Nagata Y, Fujino N, Kawashiri MA, **Yamagishi M**. Compound Heterozygosity Deteriorates Phenotypes of Hypertrophic Cardiomyopathy with Founder Mutation Carriers of Myosin Binding Protein C Gene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (in revision)
- [7] Nomura A, **Konno T**, Hayashi K, Fujino N, Nagata Y, Hodatsu A, Sakata K, Kawashiri MA, **Yamagishi M**. Fragmented QRS predicts cardiac events in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc* (in submission)
- [8] Wang F, Demura M, Cheng Y, Zhu A, Karashima S, Yoneda T, Demura Y, Maeda Y, Namiki M, Ono K, Nakamura Y, Sasano H, Akagi T, **Yamagishi M**, Saijoh K, Takeda Y. Dynamic CCAAT/enhancer binding protein-associated changes of DNA methylation in the angiotensinogen gene. *Hypertension* 63, 281-288, 2014.
- [9] Fujita T, Fujino N, Anan R, Tei C, Kubo T, Doi Y, Kinugawa S, Tsutsui H, Kobayashi S, Yano M, Asakura M, Kitakaze M, Komuro I, **Konno T**, Hayashi K, Kawashiri MA, Ino H, **Yamagishi M**. Sarcomere gene mutations are associated with increased cardiovascular events in left ventricular hypertrophy: results from multicenter registration in Japan. *JACC Heart Fail* 1, 459-466, 2013.
- [10] Fujino N, **Konno T**, Hayashi K, Hodatsu A, Fujita T, Tsuda T, Nagata Y, Kawashiri MA, Ino H, **Yamagishi M**. Impact of systolic dysfunction in genotyped hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 36, 160-165, 2013.
- [11] Liu L, Hayashi K, Kaneda T, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, **Konno T**, Tsuda T, Kawashiri MA, Ueda K, Higashikata T, Shuai W, Kupershmidt S, Higashida H, **Yamagishi M**. A novel mutation in the transmembrane nonpore region of the KCNH2 gene causes severe clinical manifestations of long QT syndrome. *Heart Rhythm* 10, 61-67, 2013.
- [12] Tada H, Kawashiri MA, Tanaka A, Nakano T, Nakajima K, Inoue T, Noguchi T, Nakanishi C, **Konno T**, Hayashi K, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, **Yamagishi M**. Post-prandial remnant lipoprotein metabolism in autosomal recessive hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 42, 1094-1099, 2012.
- [13] Yoshida S, Miwa K, Matsubara T, Yasuda T, Inoue M, Teramoto R, Okada H, Kanaya H, Hayashi K, **Konno T**, Kawashiri MA, **Yamagishi M**. Stress-induced takotsubo cardiomyopathy complicated with wall rupture and thrombus formation. *Int J Cardiol* 161, e18-20, 2012.

- [14] Yu M, Ishibashi-Ueda H, Ohta-Ogo K, Gabbiani G, **Yamagishi M**, Hayashi K, Hirota S, Bochaton-Piallat ML, Hao H: Transient expression of cellular retinol-binding protein-1 during cardiac repair after myocardial infarction. **Pathol Int** 62, 246-253, 2012.
- [15] Tada H, Kawashiri MA, Ikewaki K, Terao Y, Noguchi T, Nakanishi C, Tsuchida M, Takata M, Miwa K, **Konno T**, Hayashi K, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, **Yamagishi M**. Altered metabolism of low-density lipoprotein and very-low-density lipoprotein remnant in autosomal recessive hypercholesterolemia: results from stable isotope kinetic study in vivo. **Circ Cardiovasc Genet** 5, 35-41, 2012.
- [16] Nakanishi C, Nagaya N, Ohnishi S, Yamahara K, Takabatake S, **Konno T**, Hayashi K, Kawashiri MA, Tsubokawa T, **Yamagishi M**. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. **Circ J** 75, 2260-2268, 2011.
- [17] Demura M, Wang F, Yoneda T, Karashima S, Mori S, Oe M, Kometani M, Sawamura T, Cheng Y, Maeda Y, Namiki M, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Tsubokawa T, **Yamagishi M**, Nakamura Y, Ono K, Sasano H, Demura Y, Takeda Y. Multiple noncoding exons 1 of nuclear receptors NR4A family (nerve growth factor-induced clone B, Nur-related factor 1 and neuron-derived orphan receptor 1) and NR5A1 (steroidogenic factor 1) in human cardiovascular and adrenal tissues. **J Hypertens** 29, 1185-1195, 2011.
- [18] **Sakamoto A**, Ono K. Missense Ala191Thr mutation of desmin aggravates delta-sarcoglycan-deficient cardiomyopathy in T0-2 hamster due to its slight defect in filament formation. (in preparation)
- [19] **Sakamoto A**. Crystallin beta-B1 alleviates cardiac hypertrophy in delta-sarcoglycan deficient cardiomyopathy in hamster. (in preparation)