

200938128A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

患者由来細胞の iPS 細胞化による心筋症の  
新しい診断法開発を目指した生体試料の収集

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北風政史

( 国立循環器病センター )

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

患者由来細胞の iPS 細胞化による心筋症の  
新しい診断法開発を目指した生体試料の収集

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北風政史

( 国立循環器病センター )

平成22(2010)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

患者由来細胞の iPS 細胞化による心筋症の 新しい診断法開発を目指した生体試料の収集.....	1
北風 政史	

### II. 分担研究報告

患者由来細胞の iPS 細胞化による心筋症の 新しい診断法開発を目指した生体試料の収集.....	5
橋村 一彦 ・ 神崎 秀明	

患者由来細胞の iPS 細胞化による心筋症の 新しい診断法開発を目指した生体試料の収集.....	8
朝倉 正紀	

### III. 研究成果の刊行物・別刷

Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium.....	11
Biochemical and Biophysical Research Communications 2010,393,55-60	

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

総括研究報告書

患者由来細胞の iPS 細胞化による心筋症の新しい診断法開発を目指した生体試料の収集

研究代表者 北風政史 国立循環器病センター 部長

研究要旨

本研究は、未だ原因が解明されていない難治性疾患である特発性心筋症の新しい診断法を開発することを最終目標とし、患者由来の生体試料を収集することを目的とする。その白眉は、実際のヒト特発性心筋症例から生体試料を収集し、患者ゲノムを保持した iPS 細胞を樹立することにより、遺伝的背景を保持した疾患 iPS 細胞を用いた解析を可能とするところにある。本年度は、このような研究の特質から本研究の遂行に必須である十分な倫理的妥当性の検討と確認、また適切な試料の取り扱い方法、情報および試料の管理方法などについての詳細な検討とシステムティックな管理体制の確立を目指した。今後これらの体制が十分に整い次第、生体試料の収集と引き続き疾患解析を予定している。

研究分担者

橋村一彦  
国立循環器病センター  
医長

神崎秀明  
国立循環器病センター  
医長

朝倉正紀  
国立循環器病センター  
医長

## A. 研究目的

難治性疾患である特発性心筋症の病因は未だ解明されておらず、移植の他に根治的な治療法がない。よって早期診断法の確立や治療法の開発が急務である。本研究は実際のヒト症例における臨床データおよび生体試料の収集を行い、iPS 細胞樹立と心筋細胞誘導を用いた解析などの独自の手法を用いることで、疾患ゲノムを保持した細胞株を用いた病因・病態解明や新たな早期診断法・治療法の開発に資することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1) 倫理面の検討

#### 2) 研究試料および情報管理体制の確立

本研究は、収集した生体試料の解析のみにとどまらず、採取した皮膚組織から新たに iPS 細胞を作成することによって病態の本質に迫る点で真に独創的であり新たな研究成果を实らせるものである。しかしながら革新技術を用いる点や、多能性幹細胞を誘導し保存するといった必要性から、高度な倫理的配慮と研究遂行段階の監視確認システムが重要である。特に実際に疾病に罹患した患者からの生体試料を得、iPS 細胞を誘導するといった点から、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」「厚生労働省の所管する実施期間における動物実験等の実施に関する基本指針」等を順守する必要がある。ゆえに我々はまず国立循環器病センター施設内における倫理委員会ならびに高度先駆的医療・研究専門委員会の承認を得て研究の基盤を構築する。

#### 3) 生体試料の採取・iPS 細胞樹立

山中らにより報告された iPS 細胞の樹立方法はすでに公開されており、今日では様々な改良法も報告されている。本研究で用いる皮膚線維芽細胞からの iPS 樹立は既に確立した技術として広く知られている。

#### 4) 生体試料の評価

iPS 細胞は多能性を有しており、ES 細胞類似の誘導方法により自律拍動する心筋細胞へと分化誘導が可能である。本研究では特発性心筋症患者の遺伝的背景を保持した疾患 iPS 細胞を株化し、従来不可能であった大量の細胞数を要する解析を予定している。具体的には各種細胞実験やプロ

テオーム解析、マイクロアレイ解析などを予定している。また得られた結果はカルテより収集した臨床データとの相関も解析し、臨床像との関連を明確化することで早期診断法や治療法の効率的開発を目指す。

### (倫理面への配慮)

本研究は、生体試料採取・保存する研究であり、生体試料の保存、個人情報保護に関しては、最大限の注意を払う体制が必要である。生体試料の保存に関しては、独立した鍵付きの冷凍庫を用意し、冷凍庫へのアクセスを厳密に制限する。また、個人情報保護に関しては、対象症例の臨床データを含む個人情報は厳重な匿名化の下に管理する。生体試料も同様に匿名化の下に管理し、症例と個人情報の照合は個人情報管理者のみが行えるものとし、照合に必要な書類や機材は施錠可能な施設において厳重に管理する。介入により予想される危険および不利益については、同意取得時に、被験者に十分な説明を行う。パンチ生検による皮膚組織の採取はベッドサイドで施行可能な広く普及した安全な方法であるが、生検時の疼痛、創傷感染などのリスクがある。局所麻酔を十分行うこと、清潔手技の徹底、抗生剤含有軟膏の使用、局所の消毒処置の徹底などで、これらのリスクをも極力回避する。また美容上の問題にも配慮し、着衣部位など目立たない部位を選択するよう配慮する。被験者由来細胞から樹立された iPS 細胞の取扱いについては、厚生労働省指針を厳守する。

## C. 研究結果

### 1) 倫理面の検討

#### 2) 研究試料および情報管理体制の確立

今年度は本研究遂行にあたって必須である倫理的検討および試料・情報管理体制の確立のための研究体制構築を行った。関連する各種指針の確認を行い、実際に研究の行われる国立循環器病センターにおける倫理委員会ならびに高度先駆的医療・研究専門委員会への承認申請に向けた対応を行っている。

#### 3) 生体試料の採取・iPS 細胞樹立

上記申請に対する認可が得られ次第、生体試料の収集にあたる。具体的には国立循環器病センターにて治療中の特発性心筋症患者に対し、定められたインフォームド・コンセントを行い書面による合意を得、血液・皮膚・手術時もしくは心筋生検時

に得られる心筋組織などの収集を行う。皮膚からは線維芽細胞を分離し、iPS 細胞を樹立し適切に保管する。症例数は 20 例程度を目標としている。理委員会の承認を得て、患者情報の取得と平行して、心不全患者、心筋梗塞患者の血清を採取中である。

#### 4) 生体試料の評価

本年度は試料が得られた後の試料評価方法について事前の検討を行った。研究代表者は臨床データとの相関を用いて疾患関連遺伝子の抽出に成功しており、その成果を報告している。本研究では臨床データを生体試料と並行して収集する予定であり、同様の手法を用いて臨床像と密接に関連した病態・病因解析が可能と考えている。またプロテオーム解析も用いることで、より詳細な検討が可能と考えている。

#### D. 考察

特発性心筋症の病因・病態が未だ解明されない大きな要因に、疾患モデル動物がないことと、得られる生体試料(罹患心筋組織)が微量で、かつ非増殖組織であることから大量の試料を用いた解析が不可能であったことがあげられる。本研究では患者組織由来の iPS 細胞を樹立しこれを心筋細胞へと分化させることで、こうした障壁を克服する画期的研究である。

また本邦発の技術である iPS 細胞を用い画期的な成果を上げることで社会的貢献も大きいと期待される。

一方で患者由来の組織を用いることや、その遺伝的背景の解析にあたること、幹細胞を用いることなどから高度に倫理的配慮が必要であり、細心の注意のとに盤石な研究体制の確立をすることが必要である。

#### E. 結論

未だ心移植以外の根治的治療法を持たない特発性心筋症の病因・病態の解明、ならびに早期診断法・治療法の開発は急務である。本研究はヒト特発性心筋症症例の遺伝背景を保持した iPS 細胞を樹立することで、これまで困難であった大量の罹患心筋細胞を得ることを可能にし、当該分野における研究を加速するものと期待される。本年度は倫理的検討および研究体制の確認を行い、倫

理委員会ならびに高度先駆的医療・研究委員会への申請を行った。承認が得られ次第、生体試料の収集を開始し、解析を行っていく予定である。

#### F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Liao Y, Xuan W, Zhao J, Bin J, Zhao H, Asakura M, Funahashi T, Takashima S, Kitakaze M. Antihypertrophic effects of adiponectin on cardiomyocytes are associated with the inhibition of heparin-binding epidermal growth factor signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393(3):519-25.

Tsukamoto O, Fujita M, Kato M, Yamazaki S, Asano Y, Ogai A, Okazaki H, Asai M, Nagamachi Y, Maeda N, Shintani Y, Minamino T, Asakura M, Kishimoto I, Funahashi T, Tomoike H, Kitakaze M. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:2070-7.

Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, Takahama H, Wakeno M, Ito S, Ogai A, Asakura M, Kim J, Minamino T, Takashima S, Sanada S, Sugimachi M, Komamura K, Mochizuki N, Kitakaze M. Metformin Prevents Progression of Heart Failure in Dogs; Roles of AMP-activated Protein Kinase. *Circulation.* 2009;119:2568-77.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許出願・取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

分担研究報告書

患者由来細胞の iPS 細胞化による心筋症の新しい診断法開発を目指した生体試料の収集

研究分担者 橋村一彦 国立循環器病センター 医長

研究分担者 神崎秀明 国立循環器病センター 医長

研究要旨

分担研究者らは、国立循環器病センターにおいて多くの特発性心筋症患者の診療に従事してきた。当該疾患についてはアンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬、スピロラクトンや $\beta$ 受容体拮抗薬の再発見などにより大きな治療上の進歩があり、予後の改善に寄与してきた。しかしながらその病因の多くは未だ不明であり、心移植の他根治療法を持たず、また左室補助循環装置を要する重症例は増加している。本研究は、多様な疾患背景を持つと考えられている特発性心筋症症例から皮膚線維芽細胞を単離することにより、症例由来の iPS 細胞を得て必要量の分化心筋細胞を得ることにより各種解析を可能とする画期的研究である。その大きな特徴の一つに臨床データとの相関解析があり、早期診断法の解析などに大きく貢献できる可能性がある。一方で、難治性疾患である特発性心筋症の遺伝情報を扱うこと、また幹細胞を誘導し保存することなど、高度な倫理的配慮を要求される。研究分担者らはこうした研究体制の構築を目指した。

A. 研究目的

特発性心筋症は難治性疾患に指定されており、未だに心移植以外の根治療法を持たない。その大きな理由は、病因の大半が未解明である点にある。臨床的には、最近の内科的治療の進歩により予後の改善は得られたものの、病因に応じたよりよい治療や根治療法の開発が切望されている。また心筋症の病因解明を難しくしている要因に、各々の特発性心筋症、特に拡張型心筋症においては、これが単一の疾患群ではなく複数ある病因の共通した終末臨床像であると考えられていることがあげられる。本研究においては、複数の実症例から遺伝的背景を維持した疾患 iPS 細胞を樹立し株化して保存する計画であり、その比較解析によってこうした種々の病因解明につながる可能性がある。また本研究のもうひとつの期待される特色として、臨床データと基礎医学的知見との相関解析があげられる。健常群対疾患群の単純な二群間比較ではなく重症度を加味した検討により、早期診断法の確立に寄与できる可能性がある。

一方で、実症例から得た組織から幹細胞を樹立するという特質上、高度に倫理的な配慮が求められる。特に研究対象が未だ根治療法の無い難治性疾患であることや、得られる iPS 細胞が多能性幹細胞であることから、十分な倫理的検討と情報管理体制の構築が必須である。研究分担者らはこうした研究体制の検討と構築を目指した。

B. 研究方法

本研究では、特発性心筋症と診断された患者に対し、書面を用いたインフォームドコンセントを十分に行い、文書による同意を得たのち、臨床データの収集、皮膚組織の採取を行う。得られた皮膚組織からは皮膚線維芽細胞の分離培養、さらに iPS 細胞の樹立が行われ、皮膚線維芽細胞と iPS 細胞については一部が凍結保存される。すべての個人情報ならびに研究データは厳重かつ慎重に管理される。こうした研究計画の全体は倫理委員会ならびに高度先駆的医療・研究委員会により承認を受けたのちに行われる。本年度はこうした倫

理的検討を慎重に重ねると同時に両委員会への研究承認の申請準備を行った。また実際の研究体制の構築準備を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、実症例の臨床データと生体試料を同時に収集し採取・保存する研究であり、情報および試料の管理、保存に対して十分な注意を払うべきである。研究が施行されるにあたって、特に疾患由来の幹細胞を樹立する点や、当該疾患である特発性心筋症に根治療法が確立されていない点を考えるに、高度に倫理的な配慮が必要であり、また実際のデータ・試料の収集開始前に、十分な配慮がなされているか吟味・検討されるべきである。しかるに関係各部署や院内での検討を重ね、慎重に研究遂行体制の吟味を重ねた。実際の研究計画については、実施施設である国立循環器病センターの倫理委員会ならびに高度先駆的医療・研究委員会に承認申請をし、承認を得たのちに研究開始することとした。

### C. 研究結果

#### 1) 対象となる症例の検討

本研究の対象は特発性心筋症である。すなわち拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症がこれに含まれる。本研究においては重症度との相関解析を着目点の一つとしていることから、重症度のみによらずに選択すべきと考えられた。反対に重症度を表す臨床データに欠損値がなるべく生じないよう、BNP 値をはじめとする血液検査データ、心エコー所見、心カテテル所見、投薬歴などの臨床情報が十分に収集されている症例の選択がのぞまれた。かかる症例については順次インフォームドコンセントを行い、同意を得られた症例を集めるべきと考えられ得た。また症例数は 20 症例を目標とし解析することとした。

#### 2) 皮膚組織採取方法の検討

本研究に参加するにあたり新たに加わる唯一の侵襲的手技は皮膚組織の採取である。血液採取は一般採血時に同時に採取され、心筋組織については、一般診療上心筋生検や心筋切除術が不可欠となった症例についてのみ、得られた組織の一部を用いて行う予定あり、本研究のために検体採取量が増やされることはない。

皮膚組織採取方法には1)心カテテル施行時、ペ

ースメーカーや ICD 埋込時、手術時などの消毒・麻酔を伴う手技時に穿刺部・切開部の皮膚を一部採取する方法、2)パンチ生検を用いる方法、の 2 種類を用いるのが適当であり、1)、2)の順に優先すべきと考えた。1)を優先するのは患者の新たな疼痛の負担や感染のリスクを回避するためである。1)が行われない症例においては2)の方法を用いるが、パンチ生検はベッドサイドにて局所麻酔を用いて安全に施行可能な皮膚組織採取法として広く行われており、特に血行動態や心筋症の病態に影響するものと考えられておらず、採取方法として適当であると考えられた。

#### 3) 臨床データの収集ならびに個人情報管理・試料ならびに試料保管方法の検討

本研究に用いられる臨床データ(血液データ、心エコー所見、心カテテル所見など)は、一般診療上で必要とされたものを二次的に用いることを原則とし、研究のために新たに検査がなされることのないようにすべきであると考えられた。これらのデータは匿名化されたIDのもとで管理され、コンピューター端末に保管される際には独立した端末を用い施設可能な設備に保管すべきとされた。同様に得られた生体試料についても、独立した ID のもとでのみ厳重に管理されるべきと考えられた。IDと症例との照合は定められた責任者のみが可能であるようにすべきと考えた。

#### 4) 各種する指針などの確認

本研究の遂行にあたり、特に順守すべき指針として、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「厚生労働省の所管する実施期間における動物実験等の実施に関する基本指針」が該当すると考えられ、これらを確認した。

#### 5) 倫理委員会ならびに高度先駆的医療・研究委員会への承認申請

以上の倫理的考察ならびに研究遂行のための体制に加え、得られた生体試料の解析方法等をまとめ、本研究実施施設である国立循環器病センターにおける倫理委員会、高度先駆的医療・研究委員会に対して研究の承認申請に向けた対応を行っている。



#### D. 考察

本研究は、実際の特発性心筋症患者由来の iPS 細胞を樹立を核としているが、それゆえに高度な倫理的配慮が要求されている。臨床データの収集、皮膚組織採取、その後の生体試料の管理の全過程にわたり十分な倫理的考察と遺漏なき情報管理体制の構築に、十分な事前検討が要求される。現在、倫理委員会ならびに高度先駆的医療・研究委員会に承認申請中であるが、十分な討議のもと申請を続け、承認された研究計画を順守して最大限の研究成果を上げることにより患者はもとより社会に資することを目標とする。

#### E. 結論

本研究は iPS 細胞を用いた全く新たなアプローチにより、これまで不可能であった様々な研究・検討を可能にする画期的研究であり、その成果が期待されている。こうした成果を得るにあたっては、当然必要となる高度な倫理的検討を尽くし、同時に緻密な個人情報管理体制を盤石とすることが不可欠である。現在こうした検討に基づいて倫理委員会ならびに高度先駆的医療・研究委員会に承認申請準備を行っており、承認が得られ次第、これを順守しつつ円滑に研究を開始する予定である。

#### F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakao K, Noguchi T, Kim J, Fukushima K, Kiso K, Ohara T, Kanzaki H, Hashimura K, Yamada N, Ishida Y, Kitakaze M. Transient constrictive pericarditis diagnosed by cardiac magnetic resonance, <sup>67</sup>Ga scintigraphy, and positron emission tomography. *Int J Cardiol.* 2009 Nov 12;137(3):e70-2.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許出願・取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

分担研究報告書

患者由来細胞の iPS 細胞化による心筋症の新しい診断法開発を目指した生体試料の収集

研究分担者 朝倉正紀 国立循環器病センター 医長

研究要旨

分担研究者は、分子細胞生物学やバイオインフォマティクスを用いた基礎医学的検討に習熟しており、本研究においては生体試料の解析方法の検討を行った。本研究は実臨床において様々な重症度を持つ特発性心筋症患者から皮膚組織を採取し、ここから iPS 細胞の樹立し様々な解析を行う非常に独創的な研究である。得られた iPS 細胞の解析には様々な方法による多角的アプローチが必要である。特に注目すべきは、得られる一連の iPS 細胞は異なるゲノムに由来すると同時に、異なる重症度に由来する点であり、臨床データとの相関も同時に解析しうる点で、DNA マイクロアレイ法、プロテオーム解析等を駆使した解析を予定している。

A. 研究目的

特発性心筋症の病因の多くは未だに解明されていない。一部に遺伝子変異を認めるとの報告が見られるものの、未解明の病因が多く残されている。特発性心筋症の研究が難しいことの最たる原因の一つに、適切な疾患動物モデルが確立されていないことと、心臓という臓器の特性から、ヒト症例から採取可能な生体試料がごく少量に限られていることがあげられる。本研究では、ヒト症例から得られた、すなわち遺伝的背景を維持した疾患 iPS 細胞を用いて、疾患臓器の特性を模した心筋細胞を培養することでこれまで不可能であった種々の解析を可能とするものと期待される。研究分担者は得られた生体試料からの iPS 細胞樹立とその解析について検討を行った。

B. 研究方法

得られた皮膚組織は適切な個人情報管理のもとで扱い、各々から皮膚線維芽細胞を分離培養する。分離培養された皮膚線維芽細胞は一部を凍結保存する。皮膚線維芽細胞はさらに既に公開されている方法を用いて iPS 細胞樹立に用いられる。樹立された iPS 細胞は一部を凍結保存し、その他

を解析に用いるものとする。

さらに iPS 細胞から種々の培養条件を調整し自律拍動する心筋細胞へと分化させ、疾患 iPS 細胞由来のものとは非疾患 iPS 細胞由来のものとは比較することで、新たな病因の解析ならびに早期診断法の確立を目指す。

(倫理面への配慮)

得られる生体試料とそこから分離される皮膚線維芽細胞ならびに iPS 細胞、iPS 細胞由来の心筋細胞のいずれについても、ヒト症例由来のものであり、個人情報への厳重な管理のもとに扱うこととする。特に、本研究においては臨床データとの相関解析も行われるため、定められた方法により適切に対処する。また iPS 細胞は多能性幹細胞であり、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準拠した取り扱いを順守する。

C. 研究結果

1) iPS 細胞の樹立、心筋細胞への分化培養  
得られたヒト患者由来の皮膚組織からは皮膚線維芽細胞を分離培養する。培養皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞樹立方法は既に山中らにより確立され公表されている。今日では原法から派生した様々な方法が開発されている。本研究の目的は

疾患 iPS 細胞を用いた諸解析であるため、樹立の方法に依存する点は少ないと思われ、原法を用いた樹立を予定している。しかしながら、c-Myc 導入による腫瘍原性獲得や、feeder 細胞として用いられるマウス細胞からの影響が研究結果に影響を与える可能性が生じると判断された際には、各種変法を用いることを考慮する。今日では iPS 細胞樹立法も次々に報告されており、本研究においては生体試料由来の iPS 細胞作製時点における最良の方法を採用する予定である。また iPS 細胞からの心筋細胞の樹立についても種々の報告がある。iPS細胞はその特性においてES細胞との共通性がいわれており、ES細胞で用いられる Hanging drop 法を用いて自律拍動する心筋細胞が得られる。一方福田らによる Noggin を用いた効率的な分化誘導法なども報告されており、同時に検討する。また家族歴を有する特発性心筋症症例由来の iPS 細胞からは、心筋分化誘導時の効率の変化が認められる可能性もあり、注意深く検討を行う予定である。

## 2) ゲノム解析

特に家族内発症をみとめる症例から得られた試料については抽出したゲノムから変異遺伝子の解析を行う予定である。具體的には、ポジショナルクローニング等の方法で疾患遺伝子の同定を目指す予定である。

## 3) DNA マイクロアレイ法を用いた解析

本研究で得られる生体試料は、心筋組織(生検もしくは手術時に同意のものと)の検体が収集できたものに限る)、血液(血中の白血球)、皮膚線維芽細胞である。これに加え、皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞と分化した心筋細胞があげられる。この各々における遺伝子発現の差異を観察することにより、新たな病因の解析が可能となると期待される。特に、既に罹患している心筋組織と、iPS 細胞由来の心筋細胞の遺伝子発現解析は、特発性心筋症における経時的遺伝子発現変化の観察を可能とするものと期待される。また特徴的な解析結果が期待される手法の一つに、臨床データとの相関解析があげられる。研究分担者は、これまでも重症心不全患者の BNP 値や肺動脈圧といった心不全重症度の指標と遺伝子発現量の相関解析から新たな心不全関連遺伝子の同定に成功しており、かかる手法に精通している。遺伝子発現については限られた候補のみではなく、DNA マイクロアレイ法を用いた網羅的解析を行う。

## 4) プロテオーム解析

近年開発が急速に進むプロテオーム解析も同時に進行する予定である。特発性心筋症におけるプロテオーム解析の困難さは、解析に必要なタンパク質の総量確保の難しさにある。本研究では培養増殖可能な iPS 細胞を介することで、プロテオーム解析に必要なタンパク質に応じて必要量の分化心筋細胞を準備可能であり、新たな解析を精力的に行うことが可能となる。

## 5) その他

DNA マイクロアレイ法やプロテオーム解析などを経て得られた知見は、iPS 細胞や iPS 細胞由来の分化心筋細胞を用いた細胞生物学的実験や生化学的解析を行う。また遺伝的背景との関連が示唆される結果については、疫学研究等への発展も模索する。

## D. 考察

本研究の特徴は、ヒト症例由来の iPS 細胞を複数株樹立することにより今後の諸研究に資する貴重な生体試料を収集管理することにある。さらに注目すべきは、培養増殖可能な iPS 細胞を介して、患者の遺伝的背景を維持した分化心筋細胞を必要量に応じて得ることができる点である。特に一定の生体試料が要求されるプロテオーム解析や、培養細胞を用いた各種解析が可能となる点は革新的で、様々な新知見が得られるものと期待される。倫理委員会ならびに高度先駆的医療・研究委員会の承認が得られた後、すみやかにこうした解析に移行する予定である。

## E. 結論

従来不可能であった大量の罹患心筋細胞を用いた特発性心筋症の各種解析は、iPS 細胞の登場によって実現可能なものとなりつつある。本研究は、多くの特発性心筋症患者の診療にあたりと同時に循環器疾患の研究を行う当施設の使命に適合するものであり、特発性心筋症の新規治療法や早期診断法の開発につながるものと期待する。

## F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

Min KD, Asakura M, Liao Y, Nakamaru K, Okazaki H, Takahashi T, Fujimoto K, Ito S, Takahashi A, Asanuma H, Yamasaki S, Minamino T, Sanada S, Seguchi O, Nakano A, Ando Y, Otsuka T, Furukawa H, Isomura T, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Identification of Genes related to Heart Failure Using Global Gene Expression Profiling of Human Failing Myocardium. Biochem Biophys Res Commun. 2010;393(1):55-60.

Asakura M, Kitakaze M. Global gene expression profiling in the failing myocardium. Circ J. 2009;73:1568-76.

### 2.学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

### 1. 特許出願・取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium

Kyung-Duk Min<sup>a</sup>, Masanori Asakura<sup>a,\*</sup>, Yulin Liao<sup>c</sup>, Kenji Nakamaru<sup>d</sup>, Hidetoshi Okazaki<sup>a</sup>, Tomoko Takahashi<sup>d</sup>, Kazunori Fujimoto<sup>d</sup>, Shin Ito<sup>a</sup>, Ayako Takahashi<sup>a</sup>, Hiroshi Asanuma<sup>e</sup>, Satoru Yamazaki<sup>b</sup>, Tetsuo Minamino<sup>g</sup>, Shoji Sanada<sup>a</sup>, Osamu Seguchi<sup>a</sup>, Atsushi Nakano<sup>a</sup>, Yosuke Ando<sup>d</sup>, Toshiaki Otsuka<sup>d</sup>, Hidehiko Furukawa<sup>d</sup>, Tadashi Isomura<sup>f</sup>, Seiji Takashima<sup>g</sup>, Naoki Mochizuki<sup>b</sup>, Masafumi Kitakaze<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Osaka, Japan

<sup>b</sup>Research Institute, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

<sup>c</sup>Department of Pathophysiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

<sup>d</sup>R&D Division, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

<sup>e</sup>Department of Emergency Room Medicine, Kinki University School of Medicine, Sayama, Osaka, Japan

<sup>f</sup>Hayama Heart Center, Hayama, Kanagawa, Japan

<sup>g</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 January 2010

Available online 25 January 2010

#### Keywords:

Gene expression  
cDNA microarray  
Heart failure  
Clinical parameter

### ABSTRACT

Although various management methods have been developed for heart failure, it is necessary to investigate the diagnostic or therapeutic targets of heart failure. Accordingly, we have developed different approaches for managing heart failure by using conventional microarray analyses. We analyzed gene expression profiles of myocardial samples from 12 patients with heart failure and constructed datasets of heart failure-associated genes using clinical parameters such as pulmonary artery pressure (PAP) and ejection fraction (EF). From these 12 genes, we selected four genes with high expression levels in the heart, and examined their novelty by performing a literature-based search. In addition, we included four G-protein-coupled receptor (GPCR)-encoding genes, three enzyme-encoding genes, and one ion-channel protein-encoding gene to identify a drug target for heart failure using *in silico* microarray database. After the *in vitro* functional screening using adenovirus transfections of 12 genes into rat cardiomyocytes, we generated gene-targeting mice of five candidate genes, namely, *MYLK3*, *GPR37L1*, *GPR35*, *MMP23*, and *NBC1*. The results revealed that systolic blood pressure differed significantly between *GPR35*-KO and *GPR35*-WT mice as well as between *GPR37L1*-Tg and *GPR37L1*-KO mice. Further, the heart weight/body weight ratio between *MYLK3*-Tg and *MYLK3*-WT mice and between *GPR37L1*-Tg and *GPR37L1*-KO mice differed significantly. Hence, microarray analysis combined with clinical parameters can be an effective method to identify novel therapeutic targets for the prevention or management of heart failure.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Heart failure is a multi-factorial condition with increasing prevalence worldwide; further, a significant increase has been observed in the mortality rate and economic impact associated with this condition. In the last 20 years, substantial development of treatment for heart failure, including angiotensin-converting-enzyme inhibitors [1] and beta-blockers [2,3], has greatly improved the

prognosis of the patients with heart failure. However, despite these rapid advancements in the management of heart failure, effective treatment of end-stage heart failure without providing ventricular assistance or heart transplantation is still difficult. Investigation of new and unexplored targets for the prevention or treatment of heart failure is warranted. Global gene expression analysis using microarray technique has been used in the last decade to identify biomarkers or drug targets for heart failure [4–10]. Several gene expression signatures of heart failure have been identified by analyzing independent microarray datasets [11,12]. However, most of these analyses did not consider the severity of heart failure. Because the severity of heart failure may quantitatively reflect the expression levels of genes such as the natriuretic

\* Corresponding author. Address: Department of Research and Development of Clinical Research, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan.

E-mail address: [masakura@hsp.ncvc.go.jp](mailto:masakura@hsp.ncvc.go.jp) (M. Asakura).

peptide-encoding gene, expression analysis combined with the severity of heart failure could be an appropriate method to identify heart failure-related genes. However, microarray analysis of genes expressed in failing myocardium while considering the severity of heart failure has not yet been reported.

Hence, we investigated the genes whose expression level correlated with clinical parameters such as pulmonary artery pressure (PAP), left ventricular ejection fraction (EF), and brain natriuretic peptide (BNP) mRNA level. Using this approach, we identified cardiac myosin light chain kinase as a novel heart failure-related gene [13]. Here, we describe newly identified several genes whose expression correlated with clinical parameters and additional genes encoding G-protein-coupled receptor genes (GPCRs), other enzymes and ion-channel proteins, and performed the functional analysis of these heart failure-related genes. This novel strategy involving the use of clinical parameters might find potential applications for the identification of disease-associated genes that could not be detected using conventional microarray techniques.

## Materials and methods

**Patient characteristics.** We recruited 12 patients (11 males and 1 female) with heart failure and obtained written informed consent from them. The patients were diagnosed with severe chronic heart failure due to various cardiac diseases such as dilated cardiomyopathy and myocardial infarction [13]. The average age of patients was  $55 \pm 13$  years. The plasma level of BNP, which is the best marker for the severity of heart failure, ranged from 80 to 2710 pg/ml. The mean PAP measured using a Swan-Ganz catheter 1–4 weeks before the operation varied between 16 and 59 mmHg. The average of EF determined by echocardiography on the day before the operation was  $32.5\% \pm 12.4\%$ .

**Microarray analysis and subsequent in silico functional analysis.** RNA was extracted from myocardium samples of 12 heart failure patients who had undergone either Batista or Dor surgeries. RNA samples of non-failing hearts were purchased from Biochain, Inc. Complementary RNA (cRNA) was prepared from RNA samples and hybridized to HG-U95 Affymetrix GeneChip (Affymetrix, US). The expression data were analyzed using Microarray Analysis Suite version 5.0 software. Among all the genes detected on the microarray, we selected the genes whose expression was significantly different in the failing and non-failing myocardial samples ( $p < 0.005$ ). From these genes, we selected genes whose expression was correlated with PAP, EF, and BNP mRNA level, with 0.7 being the cutoff value of the correlation coefficient. The values of PAP, EF, and BNP mRNA level used for the correlation analysis were normalized to their median during the measurements. Subsequently, the functional analysis of datasets was performed using Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems; www.ingenuity.com), and the biological functions most significant to the dataset were identified.

**Cell culture.** Cardiomyocytes were harvested before the experiments from 2- to 3-day-old neonatal rats and cultured as described in previous studies [14]. Briefly, primary cardiomyocytes isolated from neonatal rats were grown in Dulbecco's modified Eagle medium/F12 (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum for 72 h, and then cultured in a serum-free condition for 24 h.

**Adenovirus generation and transfection.** Adenovirus constructs encoding the genes of interest were generated using the ViraPower Adenoviral Expression System (Invitrogen, US) according to the manufacturer's method. Adenovirus vectors were transfected to cultured cardiomyocytes for 12 h according to the published protocol.

**In vitro functional analysis of genes.** Cultured rat cardiomyocytes were infected by adenovirus vectors. After 24 h, hypertrophic

reaction, cell viability, and cellular morphology were assessed. Hypertrophic reaction was determined by estimating the incorporation of [<sup>3</sup>H]phenylalanine. In brief, [<sup>3</sup>H]phenylalanine was added to the culture medium at the final concentration of 0.1  $\mu$ Ci/ml, and the cells were incubated for an additional 24 h. Then, the incorporation of [<sup>3</sup>H]phenylalanine was determined by counting the radioactivity of each sample with a liquid scintillation counter. The viability of cardiomyocytes was evaluated by the Alamar blue assay according to the manufacturer's method. The morphology of cardiomyocytes was evaluated 24 h after adenovirus transfections.

**Generation of transgenic and knockout mice.** To generate transgenic mice, open reading frame of each gene, namely, *Mylk3*, *Gpr3711*, or *Nbc1* was amplified from mouse cDNA by PCR, with Sal I site linker on each end, and cloned into Sal I site of alpha-MHC clone 26 vector. Then the DNAs used in the microinjections were released from the vector by digestion with NotI and were microinjected into fertilized eggs of mouse. Founder mice were identified by PCR analysis with appropriate primers. To develop *Gpr3711* knockout mice, the targeting vector was assembled to replace the exon 1 and 2 by neomycin selection cassette resulting in the absence of *Gpr3711* protein. W9.5 ES cells were electroporated with linearized targeting vector. ES cell clones with successful homologous recombination was determined by the PCR and subsequent direct sequence. From these targeted ES cells, the chimera mice were bred to C57 BL/6 females to generate F1 and F2 offsprings were obtained. The *Gpr3711* null mice were determined by PCR genotyping of F2 offsprings. The knockout mice of *Gpr35* and *Mmp23* (the mouse ortholog of MMP23B) were purchased from Deltagen, Inc. (California, US).

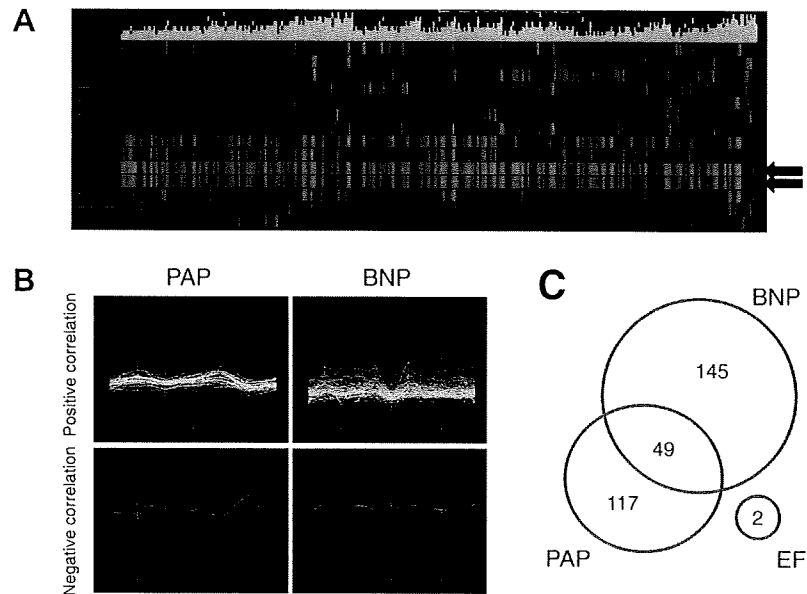
**Invasive blood pressure measurement.** The phenotype of the gene-targeted mice was examined. Before sacrificing the mice, their hemodynamic parameters were evaluated. The mice were anesthetized and ventilated, and a Millar catheter was inserted via right carotid artery. The left-ventricular systolic and end-diastolic pressures were measured. Then, the mice were sacrificed and the weight of the whole body and heart was determined.

**Statistical analysis.** Unpaired Student's *t*-test was used for comparing the two groups. Results are expressed as means  $\pm$  SEM, and *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Identification of heart failure-related genes by expression analysis using clinical parameters

We performed microarray analysis of the genes expressed in failing myocardium obtained from 12 patients with heart failure and the genes expressed in non-failing myocardium from two normal objects whose characteristics were reported in the previous study [13]. Although all patients were diagnosed with chronic heart failure, the plasma BNP level, which is an index of the severity of heart failure, ranged from 80 to 2710 pg/ml, suggesting that the severity of heart failure varied extensively among the patients. This marked difference in the severity of heart failure reflects the fact that the gene expression patterns in the 12 patients were not uniform, as shown in Fig. 1A. Thus, we analyzed gene expression profiles of failing myocardium using clinical parameters representing the severity of heart failure. We identified 166 and 194 genes whose expressions were correlated with PAP and BNP mRNA level, respectively (Fig. 1B and Supplementary Tables S1, S2). Among these, 49 genes correlated with both PAP and BNP mRNA level (Fig. 1C). The expression of only two genes, namely, *FMO2* and *LMAN1L*, correlated with the EF. We investigated the functional categories of these genes by performing Ingenuity Pathway Analysis. The number of genes in each group, functional categories, and



**Fig. 1.** The gene expression profile of human failing or non-failing myocardium. Gene expression levels of myocardial samples from 12 patients with severe heart failure and from two normals were analyzed using microarray. (A) Heat maps showing the genes with differential expression between the 12 failing myocardial samples and the two non-failing myocardial samples. Red color indicates upregulated gene expression. Green color indicates downregulated gene expression. Arrows indicate non-failing samples. (B) Expression profile of positively or negatively correlated genes to pulmonary artery pressure (PAP) or brain natriuretic peptide (BNP) mRNA level ( $r > 0.7$ ). (C) Venn diagram of genes correlated with PAP, BNP, and ejection fraction.

**Table 1**  
Datasets of genes whose expressions were correlated to clinical parameters.

	PAP	EF	BNP mRNA level
<i>Positive correlation</i>			
Number	124	1	175
Function	Cardiovascular system development and function Cell death	–	Cardiovascular system development and function Cell cycle
Representative genes	<i>ARNT, MYOCD, SMARCA4</i> <i>BGN, CFLAR, EEF2, MTPN</i>	<i>LMAN1L</i>	<i>BTG1, NPPA, NPPB, SERPINF1</i> <i>CKS1B, DDR2, FCCR2B, FN1</i>
<i>Negative correlation</i>			
Number	42	1	19
Function	Skeletal and muscular system development and function Cellular assembly and organization	–	Skeletal and muscular system development and function Cellular assembly and organization
Representative genes	<i>PIK3R1, PRKAR1A, SLMAP</i> <i>C19ORF20, RAB9A, SYNGAP1, TTN</i>	<i>FMO2</i>	<i>ACTC1, RBBP4, TTN</i>

The function of gene sets was analyzed by Ingenuity Pathway Analysis.

PAP, pulmonary artery pressure; EF, ejection fraction; BNP, brain natriuretic peptide.

representative genes are shown in Table 1. Interestingly, both gene sets correlated positively with PAP and BNP mRNA level were most associated with the same functional category of “cardiovascular system development and function”, although the included genes were different. Similarly, the gene sets correlated negatively with both PAP and BNP mRNA level had most association with common functional categories of “skeletal and muscular system development and function” and “cellular assembly and organization”.

#### Selection of 12 genes for *in vitro* screening

Among the genes selected using clinical parameters, we selected those genes that showed high expression levels in the heart by performing microarray analysis. On the basis of their novelty determined by a literature-based search, we selected four genes for further investigation (Table 2). Concurrently, to identify possible drug targets, we included four orphan GPCRs and four additional genes (three enzyme-encoding genes and one ion-channel protein-encoding gene) in the further analysis. The *RHOQ* and

*STK38* genes were selected based on their correlation with BNP mRNA level and PAP, respectively. *GPR161* and *NBC1* were selected owing to their high expression level in the heart. *GPR37L1*, *GPR35*, *F2RL2*, and *MMP23B* were selected because of their high expression level in the heart, and their association with the cardiac diseases-related genes listed in the database was determined by *in silico* analysis.

#### Functional analysis of genes on the basis of adenovirus-mediated overexpression of proteins in neonatal rat cardiomyocytes

To determine which of the selected genes were associated with the physiological functions of the heart, we first generated adenovirus vectors for each gene listed in Table 2 and transfected these vectors into neonatal rat cardiomyocytes. Next, we evaluated the hypertrophic reaction, viability, and morphology of the transfected cardiomyocytes. Among the 12 selected genes, three adenovirus-mediated genes decreased the incorporation of [ $^3$ H]phenylalanine in neonatal rat cardiomyocytes (Table 2); the expression of one

**Table 2**  
*In vitro* functional screening of the 12 candidate genes.

Probe set ID	Gene symbol	Gene name	Criteria for selection	<i>p</i> value	[ <sup>3</sup> H]PA intake	Fluorescence of Alamar blue	Cellular morphology
<i>Genes relevant to clinical parameters</i>							
75678_at	MYLK3	Myosin light chain kinase 3	Correlation with PAP ( <i>r</i> = 0.792)	0.00262	No change	No change	Spiking
49333_at	XPR1	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor	Correlation with PAP ( <i>r</i> = 0.765), GPCR, change in CHF	0.00045	No change	No change	No change
38435_at	PRDX4	Peroxiredoxin 4	Correlation with BNP ( <i>r</i> = 0.863)	0.00024	Increased	Decreased	No change
45314_at	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	Correlation with both PAP and BNP ( <i>r</i> = 0.715 and 0.758, respectively)	0.00444	No change	No change	No change
<i>Genes encoding orphan GPCRs</i>							
35544_at	GPR37L1	G-protein-coupled receptor 37 like 1	Orphan GPCR, downregulated in CVD	>0.005	Decreased	Decreased	Apoptosis
31700_at	GPR35	G-protein-coupled receptor 35	Orphan GPCR, upregulated in MI	0.00216	Decreased	Decreased	Hypertrophy
45204_at	F2RL2	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	GPCR, change in CVD	>0.005	Increased	No change	No change
40299_at	GPR161	G-protein-coupled receptor 161	GPCR, expression in heart	>0.005	Decreased	Decreased	No change
<i>Genes encoding interesting enzymes or ion-channels</i>							
38950_at	MMP23B	Matrix metalloproteinase 23B	Family of MMP, change in CHF	>0.005	No change	Decreased	No change
35285_at	NBC1	Na <sup>+</sup> -HCO <sup>3-</sup> cotransporter 1	Expression in heart	>0.005	No change	Decreased	No change
87788_at	RHOQ	Ras homolog gene family, member Q	Expression in DCM, correlation with BNP ( <i>r</i> = 0.711)	>0.005	No change	No change	No change
78801_at	STK38	Serine/threonine kinase 38	Kinase activity, correlation with PAP ( <i>r</i> = 0.736)	>0.005	No change	No change	No change

PAP, pulmonary artery pressure; GPCR, G-protein-coupled receptor; CHF, congestive heart failure; BNP, brain natriuretic peptide; CVD, cardiovascular disease; MI, myocardial infarction; DCM, dilated cardiomyopathy; PA, phenylalanine. *p* value indicates the significance of the difference between the gene expression level of failing and non-failing myocardium.

gene promoted [<sup>3</sup>H]phenylalanine incorporation; and the overexpression of six genes lowered the viability of cardiomyocytes, which was evaluated by Alamar blue assay. We also evaluated the phenotype of transfected cardiomyocytes. Unlike control cells, MYLK3-adenovirus-transfected cardiomyocytes were spike shaped. The overexpression of GPR37L1 induced apoptosis of cardiomyocytes. The transfection of NBC1-adenoviral vectors modified the beating rate of cardiomyocytes (data not shown). Then, we analyzed each gene that encoded a distinct cardiomyocyte phenotype by developing gene-targeted mouse models.

#### *In vivo* analysis using transgenic and knockout mice

To study the *in vivo* role of the selected genes, we developed genetically modified mice: three transgenic (Tg) mice for *Mylk3*, *Gpr37l1*, or *Nbc1* and three knockout (KO) mice for *Gpr37l1*, *Gpr35*, or *Mmp23*. We estimated hemodynamic parameters using Miller catheter and the heart weight (HW)/body weight (BW). As shown in Fig. 2A, we found that the blood pressure of *Gpr37l1*-KO mice was significantly higher than that of *Gpr37l1*-Tg mice by 61.7 mmHg (*p* < 0.01). Further, the blood pressure of *Gpr35*-KO mice was higher than that of wild type (WT) littermate by 37.5 mmHg (*p* < 0.01). Overexpression with or knockout of *Mylk3*, *Mmp23*, or *Nbc1* did not result in a significant change in the systolic blood pressure. The HW/BW of *Mylk3*-Tg mice was lower than that of *Mylk3*-WT mice (Fig. 2B). The HW/BW was higher in *Gpr37l1*-KO mice than in *Gpr37l1*-Tg mice. The HW/BW in mice with *Nbc1*, *Gpr35*, or *Mmp23* manipulations did not show any difference. These data showed that modification of *Gpr37l1*, *Gpr35*, or *Mylk3* can produce a distinct cardiovascular phenotype *in vivo*.

#### Discussion

The present study identified heart failure-related genes using a novel strategy that was different from the conventional microarray analysis approach. Firstly, we constructed global gene expression profiles to analyze the gene expression in 12 human samples of failing myocardium and two samples of non-failing myocardium. Secondly, we prepared datasets of heart failure-related genes asso-

ciated with the severity of heart failure; this approach is unique to our study and has not been published before. Thirdly, we selected four genes from these datasets by microarray analysis and a literature-based search. We also included four orphan GPCR genes and four other genes with high expression in the heart as possible drug targets for heart failure treatment. Fourthly, we screened the *in vitro* functions of these 12 genes by achieving adenovirus-mediated overexpression of these genes in rat cardiomyocytes. Finally, we generated gene-targeted mouse models of the five selected genes and screened the *in vivo* functions of these genes. Our novel strategy using a microarray analysis revealed three potential targets, namely, MYLK3, GPR37L1, and GPR35 for diagnosing and managing heart failure.

End-stage heart failure caused by a variety of cardiovascular diseases including hypertension, cardiomyopathy, and ischemic heart disease features a common phenotype of reduced cardiac function and dilated cardiac chamber. This result strongly suggested the existence of common genes during the development of heart failure, including the genes encoding natriuretic peptides. To identify novel diagnostic or therapeutic targets for heart failure, such as natriuretic peptides, several microarray analyses of genes expressed in failing myocardium have been performed in the last decade by comparing the gene expression levels between different pairs of samples, such as non-failing versus failing hearts [4–6], failing hearts before versus after placement of left-ventricular assisting device [7,8], hypertrophic versus failing hearts [9], ischemic versus non-ischemic hearts [10]. However, the severity of heart failure is not fixed, but varies from mild to severe heart failure in these studies. To identify the therapeutic targets for heart failure effectively, we believe that it is important to consider the severity of heart failure with microarray data analysis. In this study, we prepared new datasets of heart failure-associated genes that were selected from gene expression profiles of 12 human failing myocardial samples using clinical parameters. A number of genes were associated with PAP, which is an index for the severity of heart failure, whereas only two genes correlated with EF, which is an index for cardiac contractility. This result implies that the stress caused to the heart, and not the ability of cardiac contraction, regulates gene expression in heart failure. We also selected heart failure-related genes whose expression correlated to



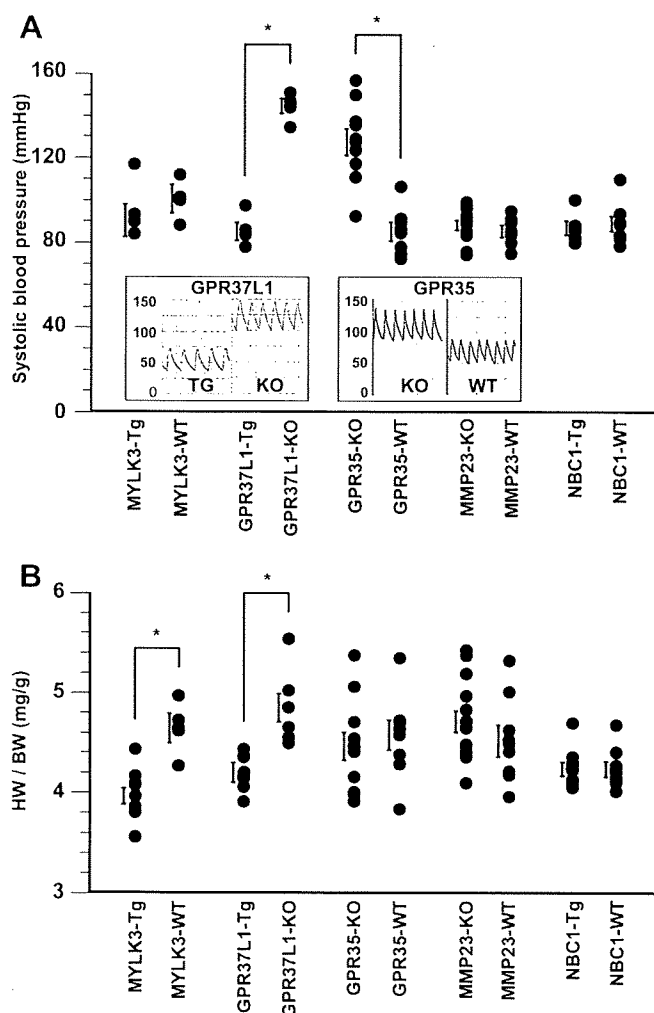


Fig. 2. *In vivo* functional analysis using gene-targeting mice of the *Mylk3*, *Gpr37l1*, *Gpr35*, *Mmp23*, and *Nbc1* genes. Blood pressure and heart weight (HW)/body weight (BW) of transgenic (Tg), knockout (KO) and their wild type (WT) littermate mice of each gene were investigated. Values are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.01$ . (A) Systolic blood pressure measured using Millar catheter inserted via right carotid artery. The monitoring chart shows representative data of *Gpr37l1*- and *Gpr35*-manipulated mice. (B) HW/BW ratio of each gene-targeting mouse.

the BNP mRNA level, which is the best known indicator of heart failure. The approach used in our study can help in efficient identification of the diagnostic or therapeutic targets for heart failure rather than only comparing two types of samples such as failing versus non-failing myocardium. Among the genes from these new datasets, we focused on the genes exhibiting high expression in heart tissues and finally selected four genes for performing the screening of functional analysis *in vitro*. The expression level of *MYLK3* gene was highly correlated to PAP, and this gene was detected only in the heart tissue. Recently, we reported that *MYLK3* plays a crucial role in sarcomere assembly via phosphorylation of myosin regulatory light chain 2V (MLC2v) [13]. We also showed that the knockdown of *MYLK3* by using a morpholino oligo caused immature sarcomere formation leading to ventricular dilation in zebrafish. These results indicate that *MYLK3* is strongly associated with the pathophysiology of heart failure. Chan et al. also reported that *MYLK3* phosphorylates MLC2v and regulates sarcomere organization [15]. These reports affirm the reliability of our original strategy that involves the microarray analysis of failing myocardium. Among these genes, most genes including *XPR1*, *PRDX4*, and *SMOC2* have not been reported to link with cardiovascular

phenotypes and were not included in many gene expression profiles published previously.

Next, we performed *in vivo* functional analysis of five selected genes, and we found that gene-targeted mouse models of *Mylk3*, *Gpr37l1*, or *Gpr35* showed the cardiovascular phenotype. As described above, *Mylk3* plays a crucial role in failing heart. In this study, we identified two GPCRs, namely, *Gpr37l1* and *Gpr35*, whose modification affects systolic blood pressure or HW/BW. To our knowledge, this is the first report about the role of these genes in cardiovascular system.

GPCRs constitute one of the largest protein families, but many GPCRs remain to be orphaned. GPR35 is now known to have some ligands such as kynurenic acid (KYNA) [16], zaprinast [17], and 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid [18]. These agonists mobilize intracellular calcium concentration. Therefore, lowering systolic blood pressure in *Gpr35*-KO mice can be induced by modulating calcium release from calcium-storing organelles. Among the three agonists, only KYNA is produced endogenously as a metabolite of tryptophan. Although GPR35 gene expression is supposed to be specific to immune cells and gastrointestinal tract, we found that GPR35 gene expression increased in failing myocardium. In an inflammatory state, interferon  $\gamma$  induces indoleamine 2,3-dioxygenase, a rate-limiting enzyme involved in tryptophan degradation, resulting in a substantial increase in KYNA. Inflammation is thought to be involved in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy as well as myocardial infarction. Hence there is a possibility that a KYNA-GPR35 signaling plays a role in the pathogenesis of cardiovascular diseases.

Unlike GPR35, GPR37L1 is still orphaned. However, we found that *Gpr37l1*-KO mice showed significant high blood pressure and high HW/BW as compared to Tg mice, which implies the existence of cardiovascular-related function of *Gpr37l1*. Identification of the ligand and the function of this orphan receptor are awaited.

Although no significant phenotype was observed in *Mmp23* and *Nbc1*-Tg mice, we have been investigating their cardiac function in pathological condition such as myocardial infarction or hypertension and determined their detrimental effect on heart failure (data not shown).

In the present study, we determined 12 novel heart failure-related genes by integrating an original method with parameters that indicated disease severity. Further, we assessed these possible targets of drug discovery. *MYLK3*, *GPR37L1*, and *GPR35* were the newly identified targets that play an interesting role in the cardiovascular system.

## Acknowledgments

This study was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (C) in Japan Society for the Promotion of Science; a grant from Human Genome Tissue Engineering and Food Biotechnology in Health and Labor Science Research from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan; and a grant from Japan Cardiovascular Research Foundation.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2010.01.076.

## References

- [1] Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators, *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 293–302.
- [2] Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: metoprolol CR/XL randomised intervention trial in congestive heart failure (MERIT-HF), *Lancet* 353 (1999) 2001–2007.

- [3] M. Packer, M.R. Bristow, J.N. Cohn, W.S. Colucci, M.B. Fowler, E.M. Gilbert, N.H. Shusterman, The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group, *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 1349–1355.
- [4] J. Yang, C.S. Moravec, M.A. Sussman, N.R. DiPaola, D. Fu, L. Hawthorn, C.A. Mitchell, J.B. Young, G.S. Francis, P.M. McCarthy, M. Bond, Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays, *Circulation* 102 (2000) 3046–3052.
- [5] J.D. Barrans, P.D. Allen, D. Stamatiou, V.J. Dzau, C.C. Liew, Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 2035–2043.
- [6] F.L. Tan, C.S. Moravec, J. Li, C. Apperson-Hansen, P.M. McCarthy, J.B. Young, M. Bond, The gene expression fingerprint of human heart failure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11387–11392.
- [7] B.C. Blaxall, B.M. Tschannen-Moran, C.A. Milano, W.J. Koch, Differential gene expression and genomic patient stratification following left ventricular assist device support, *J. Am. Coll. Cardiol.* 41 (2003) 1096–1106.
- [8] J.L. Hall, E.J. Birks, S. Grindle, M.E. Cullen, P.J. Barton, J.E. Rider, S. Lee, S. Harwalker, A. Mariash, N. Adhikari, N.J. Charles, L.E. Felkin, S. Polster, R.S. George, L.W. Miller, M.H. Yacoub, Molecular signature of recovery following combination left ventricular assist device (LVAD) support and pharmacologic therapy, *Eur. Heart J.* 28 (2007) 613–627.
- [9] J. Rysa, H. Leskinen, M. Ilves, H. Ruskoaho, Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure, *Hypertension* 45 (2005) 927–933.
- [10] M.M. Kittleson, S.Q. Ye, R.A. Irizarry, K.M. Minhas, G. Edness, J.V. Conte, G. Parmigiani, L.W. Miller, Y. Chen, J.L. Hall, J.G. Garcia, J.M. Hare, Identification of a gene expression profile that differentiates between ischemic and nonischemic cardiomyopathy, *Circulation* 110 (2004) 3444–3451.
- [11] A.S. Barth, R. Kuner, A. Bunes, M. Ruschhaupt, S. Merk, L. Zwermann, S. Kaab, E. Kreuzer, G. Steinbeck, U. Mansmann, A. Poustka, M. Nabauer, H. Sultmann, Identification of a common gene expression signature in dilated cardiomyopathy across independent microarray studies, *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006) 1610–1617.
- [12] M. Asakura, M. Kitakaze, Global gene expression profiling in the failing myocardium, *Circ. J.* 73 (2009) 1568–1576.
- [13] O. Seguchi, S. Takashima, S. Yamazaki, M. Asakura, Y. Asano, Y. Shintani, M. Wakeno, T. Minamino, H. Kondo, H. Furukawa, K. Nakamaru, A. Naito, T. Takahashi, T. Ohtsuka, K. Kawakami, T. Isomura, S. Kitamura, H. Tomoike, N. Mochizuki, M. Kitakaze, A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2812–2824.
- [14] M. Asakura, M. Kitakaze, S. Takashima, Y. Liao, F. Ishikura, T. Yoshinaka, H. Ohmoto, K. Node, K. Yoshino, H. Ishiguro, H. Asanuma, S. Sanada, Y. Matsumura, H. Takeda, S. Beppu, M. Tada, M. Hori, S. Higashiyama, Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy, *Nat. Med.* 8 (2002) 35–40.
- [15] J.Y. Chan, M. Takeda, L.E. Briggs, M.L. Graham, J.T. Lu, N. Horikoshi, E.O. Weinberg, H. Aoki, N. Sato, K.R. Chien, H. Kasahara, Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase, *Circ. Res.* 102 (2008) 571–580.
- [16] J. Wang, N. Simonavicius, X. Wu, G. Swaminath, J. Reagan, H. Tian, L. Ling, Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 22021–22028.
- [17] Y. Taniguchi, H. Tonai-Kachi, K. Shinjo, Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35, *FEBS Lett.* 580 (2006) 5003–5008.
- [18] Y. Taniguchi, H. Tonai-Kachi, K. Shinjo, 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid is a GPR35 agonist, *Pharmacology* 82 (2008) 245–249.

