

200936144A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

重症特発性心筋症患者の生体資料の収集および新規予後規定因子の

検索・解析

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高島 成二

(大阪大学医学系研究科)

平成22(2010)年 3月

平成22年(2010)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 重症特発性心筋症患者の生体資料の収集および新規予後規定因子の検索・解析…… 1  
高島 成二

### II. 分担研究報告

- 重症特発性心筋症患者の生体資料の収集および新規予後規定因子の検索・解析…… 5  
南野 哲男

- 重症特発性心筋症患者の生体資料の収集および新規予後規定因子の検索・解析…… 7  
朝野 仁裕

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

研究課題:重症特発性心筋症患者の生体資料の収集および新規予後規定因子の検索・解析

研究代表者 高島 成二

大阪大学大学院医学系研究科

准教授

研究要旨

難治性疾患である特発性心筋症の病態解明・新たな診断法・治療法の確立を目的として、肥大型心筋症・拡張型心筋症・拘束型心筋症の患者生体資料の収集を行う。これらの生体資料を独自の手法で患者臨床データと併せて解析する。特発性心筋症の病態解明、新たな診断法の確立は、これらの難治性疾患の診断・治療に資するのみならず、高齢化社会の進行に伴い急速に増加する心不全症例全般の予防、治療法の改善につながると考えられ、保健行政上も重要である。本研究は従来の血液サンプルの採取のみにとどまらず、人工心臓挿入時、心臓移植時等に得られる比較的量の多い生体資料収集が可能である。かかる資料を研究代表者らが見出した新規の心不全関連蛋白の解析や世界に先駆けて行っている生体内での遺伝子修飾解析など独自の解析技術を用いて解析することが独創的な点である。心臓移植施設として多くの心不全患者を管理しながら、同時に生体資料の分子生物学的解析を行う。そのため解析結果を直接患者の臨床データと相互に観察することが可能である。これにより、重症心不全の患者の臨床状態に直結した新たな診療手段を生み出す研究成果が得られると期待できる。

研究分担者

南野 哲男

大阪大学大学院医学系研究科

助教

朝野 仁裕

大阪大学大学院医学系研究科

助教

## A, 研究目的

難治性疾患である特発性心筋症の病態解明・新たな診断法・治療法の確立を目的として、肥大型心筋症・拡張型心筋症・拘束型心筋症の患者生体資料の収集を行う。これらの生体資料を独自の手法で患者臨床データと併せて解析する。

## B, 研究方法

### 1) 生体資料の収集を行う対象症例

#### ① 孤発例

特発性心筋症のうち重症の心不全をきたし、従来の投薬等により心機能を維持不可能な重症心不全症例を主な対象とする。当施設においては、かかる症例に人工心臓を導入あるいは心臓移植を施行する。その際、心尖部等より心臓組織を採取する。心臓サンプル採取時の患者情報を心臓移植登録用のデータシートに基づいて記載し同時に保存する。また治療経過において心筋をカテーテル下に採取した際には上記とあわせて解析を行う。

#### ② 家族発症症例

上記疾患が家族性に発症している場合には、その遺伝解析より病因遺伝子を明確にでき、病態の解明、診断につながる可能性が高い。そこでこれら家族発症例については承諾が得られる最大の家族構成員より採血を行い遺伝子背景の解析を行う。また上記の孤発例と同様、重症心不全にて人工心臓の挿入、心臓移植を施行した際等には心臓自体の組織採取および解析を行う。

### 2) 目標症例数

現在までの移植登録症例などの総数から予想できる目標症例数は、孤発例20例、家族発症症例5家系である。資料数は同一症例で複数回採取する例が存在すると考え30検体前後を目標とする。

### 3) 生体資料の評価方法

人工心臓挿入時および心臓移植時には比較的量の多い新鮮な生体資料を採取することが可能なため以下に掲げるすべての解

析・評価を行う。なおカテーテル下採取の場合は、採取した診断に必要な生体資料の中から実行できる解析のみ行う。

#### ① 遺伝子発現解析・遺伝背景解析

生体資料を RNAase 不活性化剤に投入し、RNA を採取する。採取した RNA はその発現量解析のため DNA チップで解析し、症例データなどとあわせて相互解析を行う。遺伝背景解析は白血球ゲノムを用いて行う。

#### ② 組織学的解析

採取した組織の一部は通常の固定組織標本に加え、免疫組織用に数種の固定法で採取する。我々は、重症心不全においては心筋細胞核内の超微小構造が変化することを見出している。そこで、これらの生体資料を電子顕微鏡下で観察し、細胞核の形態を観察することにより、治療に対する反応性や病態の可逆性の指標に使用できるかを検討する。

#### ③ 遺伝子修飾の解析

申請者らはマウス心不全モデルを使用した実験により、慢性心不全により誘導される ANP、BNP 遺伝子上流においてクロマチン構造変化が生じ、急性の発現誘導とは異なる慢性疾患独自の遺伝子発現調整が行われることを明らかにした。これらの遺伝子は心不全の病態との密接な相関が知られており、その発現誘導は特発性心筋症の病態を考える上で重要である。転写因子の上昇を伴わない発現誘導は慢性疾患特有のものと考えられる。本研究ではこれらの実験系で開発した生体内クロマチン沈降法を用いることによりヒトの慢性心不全でも同様のメカニズムによる遺伝子誘導が起こるかを検討する。

#### (倫理面への配慮)

生体資料サンプルの採取を伴う研究であるので、倫理面への配慮においては、以下の点に留意する。本研究プロトコルは、施設の倫理委員会の承認内容に基づいておこなった。

#### 1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保

護：診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報等生態資料から得られる情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれが生じた場合の措置：血液試料採取時に注射針を刺す痛みはあるが、一般の血液検査の痛みと同じく、危険や不利益はないと考える。また心筋そのものの採取に際しては診断に必要なときのみ最低限の量で行う。殆どの場合で人工心臓挿入時あるいは移植時に廃棄される予定の心筋であるため、患者への身体的不利益はない。ただし遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益を被る可能性が考えられる。これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

### C. 研究結果及び考察

#### 1) 生体資料収集

本研究開始後より、現在21年11月末までに採取された心筋サンプルは11症例。そのうち人工心臓挿入時のものが10例、心臓移植時の症例が1例であった。家族症例は疑い例が存在したものの確定診断にはいたらず、家族の資料サンプルに及んだ例は今のところ存在しない。

#### 2) 生体資料解析

得られた資料は手術場で直接、mRNA、蛋白、DNA解析用、組織解析用に分類し、それぞれの解析に十分量の資料が得られている。特に細胞内超微細構造の解析に関しては病態に並行した変化が見られた。この変化は治療に抵抗性を示した症例と治療に成功した例では異なり、今後治療効果の予測に役立つと期待される。この成果は現在、論文投稿中である。

mRAN、DNA、組織を含めた検討、エピジェネティック遺伝子解析は現在解析準備中である。得られたデータの一部は厚生労働省・特発性心筋症に関する調査研究(H20-難治-一般-022)の研究班に提供している。

#### 3) バンク事業への提供

医薬基盤研究所 生物資源研究部と連絡を取り、倫理委員会への申請手続き中である。当初、基盤研究所がバンクとして倫理委員会の承認が得られず、現在継続審議中である。今年度中には、特定の疾患(糖原病)に付随した心筋症に関しては承認が得られ、資料提供予定である。

### D. 考察

#### 1) 達成度

11月になり臓器移植法改定後初めての臓器移植症例が出たため、今後の移植症例数、及び人工心臓待機患者数を考慮すると目標の30検体の採取は可能と思われる。また超微細構造など資料解析による成果も得られ、論文化しており現時点で目標は達成されている。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

重症心不全の人工心臓装着時、長期の待機後の心臓移植時と連続した長い経過の資料が得られるのは、移植症例が極めて少ないわが国の特徴である。治療に関しては望ましいことではないが、世界でも類を見ない貴重な生体資料となるとと思われる。今後も継続して資料を収集する必要性は高いと思われる。

これらの解析は病態の早期診断、予後の予測、新しい心不全治療標的の検索に使用できると考えられる。高齢化社会の進展と共に急速に増加しつつある心不全患者の治療に役立つと考えられ保健行政上も意義深い。

#### 3) 今後の展望

上記したように本研究で採取した資料は極めて希少性が高く、貴重である。今後新しいマーカ一分子や、治療標的の発現解析等にも広く使用できると期待される。

また、今回の解析で明らかになった心筋超微細構造の変化が心機能の可逆性の指標になると考えられ、今後、診断的意義を検討する。

さらに継続して生体資料の採取と採取時期の詳細な患者情報の集約を並行しておこない資料の価値を高める。

#### 4) 研究内容の効率性について

心筋症はさまざまな病態の集合体として考えられる一面もある。そのため、ただ資料を集めて均一な解析をせず、病態に応じて生体資料採取の方法を変えて効率化をおこなった。

たとえば微細構造の変化や、発現遺伝子の網羅的解析は全例で行う必要があると考え解析用の資料を採取した。一方、糖原病や脂質代謝異常などに伴うものはさらなる遺伝子解析が必要と考え、特殊検査、血液DNAサンプルの同時採取などを行い、解析の幅を広げた。

バンク事業との連携は上記の医薬基盤研究所ともさまざまな討論をおこなったが、はっきりした方針が示されないまま、説明時にも患者の理解が得られない場合に多く遭遇した。倫理委員会の承認も難航している。連結不可能資料を集めることの意味も含めさらなら連携と討論が必要と考えられた。今後は、バンク事業の目的に合った資料採取・提供をおこない効率化をすすめる。

#### E. 結論

難治性疾患である特発性心筋症の生体資料の収集及び解析をおこなった。また研究班へのデータ供与をおこなった。解析に関しては心筋核内微細構造の変化が重症心不全の治療抵抗性の指標になることを明らかにした。わが国以外では得にくい貴重な生体資料であり今後も継続していく予定である。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

##### 1, Asano Y, Takashima S, Liao Y et al.

Reactivation of fetal gene program by epigenetic memory during the development of chronic heart failure. *Circulariton* in revision

2, Min KD, Asakura M, Liao Y, Nakamaru K, Okazaki H, Takahashi T, Fujimoto K, Ito S, Takahashi A, Asanuma H, Yamazaki S, Minamino T, Sanada S, Seguchi O, Nakano A, Ando Y, Otsuka T, Furukawa H, Isomura T, Takashima S et al. 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. 2010

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1)特許取得

なし

##### 2)実用新案登録

なし

##### 3)その他

なし

総括研究報告書

研究課題:重症特発性心筋症患者の生体資料の収集および新規予後規定因子の検索・解析

研究分担者 南野 哲男

大阪大学大学院医学系研究科・助教

研究要旨

難治性疾患である特発性心筋症の病態解明・新たな診断法・治療法の確立を目的として、肥大型心筋症・拡張型心筋症・拘束型心筋症の患者生体資料の収集を行う。研究代表者に協力して資料収集をおこなった。

A. 研究目的

難治性疾患である特発性心筋症の病態解明・新たな診断法・治療法の確立を目的として、肥大型心筋症・拡張型心筋症・拘束型心筋症の患者生体資料の収集を行う。これらの生体資料を独自の手法で患者臨床データと併せて解析する。

人工心臓の挿入、心臓移植を施行した際等には心臓自体の組織採取および解析を行う。

2) 目標症例数

現在までの移植登録症例などの総数から予想できる目標症例数は、弧発例20例、家族発症症例5家系である。資料数は同一症例で複数回採取する例が存在すると考え30検体前後を目標とする。

B. 研究方法

1) 生体資料の収集を行う対象症例

① 弧発例

特発性心筋症のうち重症の心不全をきたし、従来の投薬等により心機能を維持不可能な重症心不全症例を主な対象とする。当施設においては、かかる症例に人工心臓を導入あるいは心臓移植を施行する。その際、心尖部等より心臓組織を採取する。心臓サンプル採取時の患者情報を心臓移植登録用のデータシートに基づいて記載し同時に保存する。また治療経過において心筋をカテーテル下に採取した際には上記とあわせて解析を行う。

(倫理面への配慮)

生体資料サンプルの採取を伴う研究であるので、倫理面への配慮においては、以下の点に留意する。本研究プロトコルは、施設の倫理委員会の承認内容に基づいておこなった。

② 家族発症症例

上記疾患が家族性に発症している場合には、その遺伝解析より病因遺伝子を明確にでき、病態の解明、診断につながる可能性が高い。そこでこれら家族発症例については承諾が得られる最大の家族構成員より採血を行い遺伝子背景の解析を行う。また上記の弧発例と同様、重症心不全にて

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報等生態資料から得られる情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 血液試料採取時に注射針を刺す痛みはあるが、一般の血液検査の痛みと同じく、危険や不利益はないと考える。また心筋そのものの採取に際しては診断に必要なときのみ最低限

の量で行う。殆どの場合で人工心臓挿入時あるいは移植時に廃棄される予定の心筋であるため、患者への身体的不利益はない。ただし遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益を被る可能性が考えられる。これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

### C, 研究結果及び考察

#### 生体資料収集

本研究開始後より、現在21年11月末までに採取された心筋サンプルは11症例。そのうち人工心臓挿入時のものが10例、心臓移植時の症例が1例であった。家族症例は疑い例が存在したものの確定診断にはいたらず、家族の資料サンプルに及んだ例は今のところ存在しない。本分担者は研究代表者と協力して資料収集をおこなった。

#### D, 考察

11月になり臓器移植法改定後初めての臓器移植症例が出たため、今後の移植症例数、及び人工心臓待機患者数を考慮すると目標の30検体の採取は可能と思われる。また超微細構造など資料解析による成果も得られ、論文化しており現時点で目標は達成されている。今後も協力していく予定である。

#### E, 結論

難治性疾患である特発性心筋症の生体資料の収集及び解析をおこなった。また研究班へのデータ供与

をおこなった。解析に関しては心筋核内微細構造の変化が重症心不全の治療抵抗性の指標になることを明らかにした。わが国以外では得にくい貴重な生体資料であり今後も継続していく予定である。

### F, 研究発表

#### 論文発表

1, Asano Y, Takashima S, Liao Y et al. Reactivation of fetal gene program by epigenetic memory during the development of chronic heart failure. *Circulariton* in revision

2, Min KD, Asakura M, Liao Y, Nakamaru K, Okazaki H, Takahashi T, Fujimoto K, Ito S, Takahashi A, Asanuma H, Yamazaki S, Minamino T, et al 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. 2010

### G, 知的財産権の出願・登録状況

#### 1)特許取得

なし

#### 2)実用新案登録

なし

#### 3)その他

なし



総括研究報告書

研究課題:重症特発性心筋症患者の生体資料の収集および新規予後規定因子の検索・解析

研究分担者 朝野 仁裕

大阪大学大学院医学系研究科・助教

研究要旨

難治性疾患である特発性心筋症の病態解明・新たな診断法・治療法の確立を目的として、肥大型心筋症・拡張型心筋症・拘束型心筋症の患者生体資料の収集を行う。当分担者は病棟主任として重症心不全患者の説明および実際のサンプル採取、およびその組織学的解析に研究代表者として協力して従事した。

A. 研究目的

難治性疾患である特発性心筋症の病態解明・新たな診断法・治療法の確立を目的として、肥大型心筋症・拡張型心筋症・拘束型心筋症の患者生体資料の収集を行う。これらの生体資料を独自の手法で患者臨床データと併せて解析する。

人工心臓の挿入、心臓移植を施行した際等には心臓自体の組織採取および解析を行う。

2) 目標症例数

現在までの移植登録症例などの総数から予想できる目標症例数は、弧発例20例、家族発症症例5家系である。資料数は同一症例で複数回採取する例が存在すると考え30検体前後を目標とする。

B. 研究方法

1) 生体資料の収集を行う対象症例

① 弧発例

特発性心筋症のうち重症の心不全をきたし、従来の投薬等により心機能を維持不可能な重症心不全症例を主な対象とする。当施設においては、かかる症例に人工心臓を導入あるいは心臓移植を施行する。その際、心尖部等より心臓組織を採取する。心臓サンプル採取時の患者情報を心臓移植登録用のデータシートに基づいて記載し同時に保存する。また治療経過において心筋をカテーテル下に採取した際には上記とあわせて解析を行う。

3) 生体資料の評価方法

人工心臓挿入時および心臓移植時には比較的量の多い新鮮な生体資料を採取することが可能なため以下に掲げるすべての解析・評価を行う。なおカテーテル下採取の場合は、採取した診断に必要な生体資料の中から実行できる解析のみ行う。

② 家族発症症例

上記疾患が家族性に発症している場合には、その遺伝解析より病因遺伝子を明確にでき、病態の解明、診断につながる可能性が高い。そこでこれら家族発症例については承諾が得られる最大の家族構成員より採血を行い遺伝子背景の解析を行う。また上記の弧発例と同様、重症心不全にて

① 遺伝子発現解析・遺伝背景解析

生体資料を RNAase 不活性化剤に投入し、RNAを採取する。採取した RNA はその発現量解析のため DNA チップで解析し、症例データなどとあわせて相互解析を行う。遺伝背景解析は白血球ゲノムを用いて行う。

② 組織学的解析

採取した組織の一部は通常の固定組織標本に加え、免疫組織用に数種の固定法で採取する。

我々は、重症心不全においては心筋細胞核内の超微小構造が変化することを見出している。そこで、これらの生体資料を電子顕微鏡下で観察し、細胞核の形態を観察することにより、治療に対する反応性や病態の可逆性の指標に使用できるかを検討する。

#### (倫理面への配慮)

生体資料サンプルの採取を伴う研究であるので、倫理面への配慮においては、以下の点に留意する。本研究プロトコルは、施設の倫理委員会の承認内容に基づいておこなった。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報等生態資料から得られる情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 血液試料採取時に注射針を刺す痛みはあるが、一般の血液検査の痛みと同じく、危険や不利益はないと考える。また心筋そのものの採取に際しては診断に必要なときのみ最低限の量で行う。殆どの場合で人工心臓挿入時あるいは移植時に廃棄される予定の心筋であるため、患者への身体的不利益はない。ただし遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益を被る可能性が考えられる。これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

#### C. 研究結果及び考察

##### 1) 生体資料収集

本研究開始後より、現在21年11月末までに採取された心筋サンプルは11症例。そのうち人工心臓挿入時のものが10例、心臓移植時の症例が1例であった。家族症例は疑い例が存在したものの確定診断にはいたらず、家族の資料サンプルに及んだ例は今のところ存在しない。

##### 2) 生体資料解析

得られた資料は手術場で直接、mRNA、蛋白、DNA解析用、組織解析用に分類し、それぞれの解析に十

分量の資料が得られている。特に細胞内超微細構造の解析に関しては病態に並行した変化が見られた。この変化は治療に抵抗性を示した症例と治療に成功した例では異なり、今後治療効果の予測に役立つと期待される。この成果は現在、論文投稿中である。

mRAN、DNA、組織を含めた検討、エピジェネティック遺伝子解析は現在解析準備中である。得られたデータの一部は厚生労働省・特発性心筋症に関する調査研究(H20-難治-一般-022)の研究班に提供している。

#### D. 考察

上記したように本研究で採取した資料は極めて希少性が高く、貴重である。今後新しいマーカー分子や、治療標的の発現解析等にも広く使用できると期待される。

また、今回の解析で明らかになった心筋超微細構造の変化が心機能の可逆性の指標になると考えられ、今後、診断的意義を検討する。

#### E. 結論

難治性疾患である特発性心筋症の生体資料の収集及び解析をおこなった。また研究班へのデータ供与をおこなった。解析に関しては心筋核内微細構造の変化が重症心不全の治療抵抗性の指標になることを明らかにした。わが国以外では得にくい貴重な生体資料であり今後も継続していく予定である。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

Asano Y, Takashima S, Liao Y et al.

Reactivation of fetal gene program by epigenetic memory during the development of chronic heart failure. *Circulariton* in revision

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1) 特許取得

なし

##### 2) 実用新案登録

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

(代表及び研究分担者の業績一覧)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sawada T. et al.	X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes.	Journal of molecular and cellular cardiology.	in press		2010
Yamamoto M et. al	A single polymorphic amino acid on Toxoplasma gondii kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3.	J Exp Med.	206(12)	2747-2760	2009
Shintani Y, et al	Extracellular protein kinase CK2 is a novel associating protein of neuropilin-1.	Biochemical and biophysical research communications.	385(4)	618-623	2009
Sasaki H, et al.	Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase.	Circulation.	119(19)	2568-2577	2009
Takahama H, et al.	Prolonged targeting of ischemic reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats.	Journal of the American College of Cardiology.	53(8)	709-717.	2009



## 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 [ $^3$ H]phenylalanine. In brief, [ $^3$ 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 [ $^3$ 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*, *Gpr37l1*, 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 *Gpr37l1* knockout mice, the targeting vector was assembled to replace the exon 1 and 2 by neomycin selection cassette resulting in the absence of *Gpr37l1* 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 *Gpr37l1* 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).

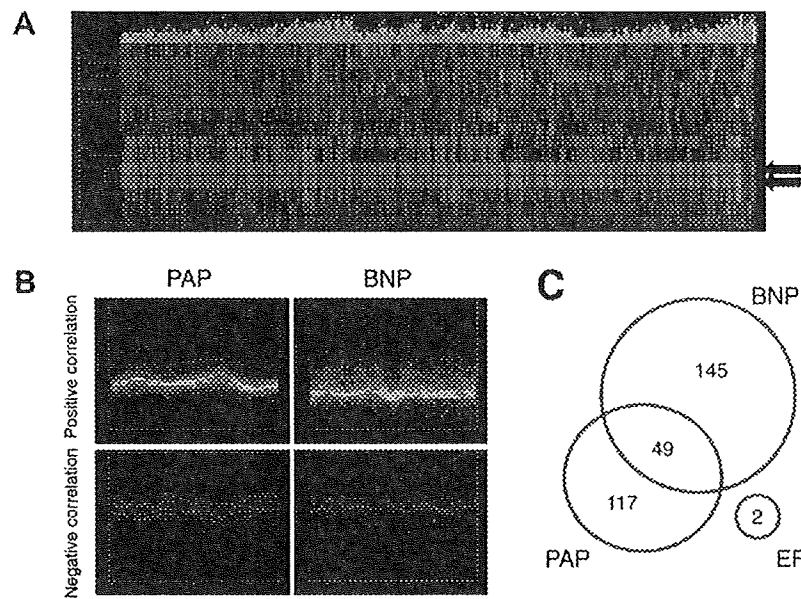
**Invasive blood pressure measurement.** The phenotype of the gene-targeted mice was examined. Before sacrificing the mice, their hemodynamic parameters were evaluated. The mice were anesthetized and ventilated, and a Millar catheter was inserted via right carotid artery. The left-ventricular systolic 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	ARNT, MYOCD, SMARCA4 BGN, CFLAR, EEF2, MTPN	LMAN1L	BTG1, NPPA, NPPB, SERPINF1 CKS1B, DDR2, FCCR2B, FN1
<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	PIK3R1, PRKARIA, SLMAP C19ORF20, RAB9A, SYNGAP1, TTN	FMO2	ACTC1, RBBP4, TTN

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 [ $^3\text{H}$ ]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	p 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 ( $r = 0.792$ )	0.00262	No change	No change	Spiking
49333_at	XPR1	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor	Correlation with PAP ( $r = 0.765$ ), GPCR, change in CHF	0.00045	No change	No change	No change
38435_at	PRDX4	Peroxisiredoxin 4	Correlation with BNP ( $r = 0.863$ )	0.00024	Increased	Decreased	No change
45314_at	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	Correlation with both PAP and BNP ( $r = 0.715$ 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 <sub>3</sub> <sup>-</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 ( $r = 0.711$ )	>0.005	No change	No change	No change
78801_at	STK38	Serine/threonine kinase 38	Kinase activity, correlation with PAP ( $r = 0.736$ )	>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

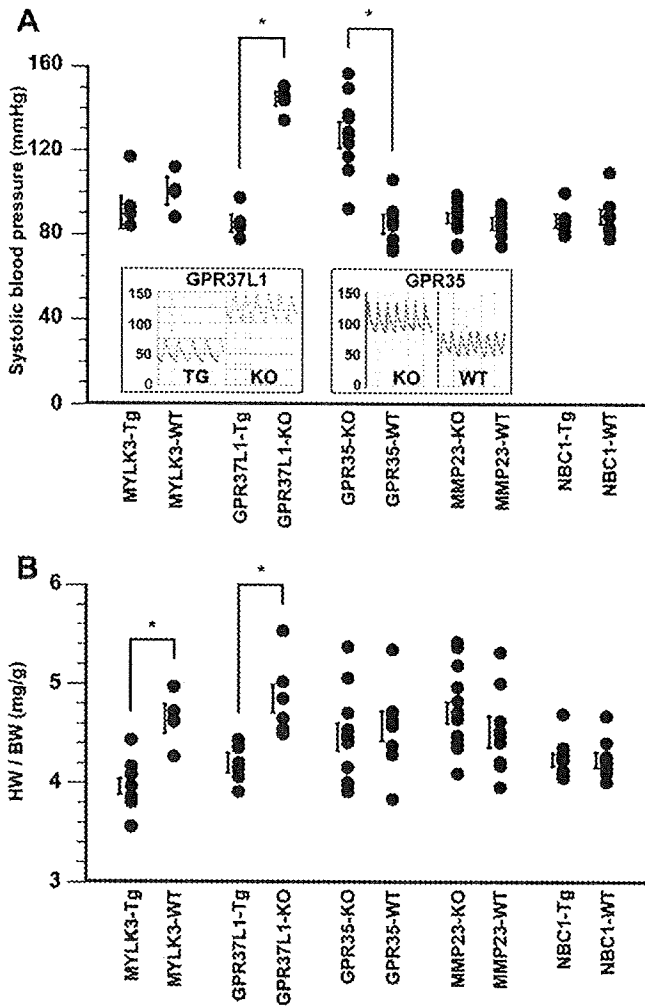
To study the *in vivo* role of the selected genes, we developed genetically modified mice: three transgenic (Tg) mice for *Mylk3*, *Gpr37l1*, or *Nbc1* and three knockout (KO) mice for *Gpr37l1*, *Gpr35*, or *Mmp23*. We estimated hemodynamic parameters using Miller catheter and the heart weight (HW)/body 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*, *Gpr3711*, *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 *Gpr3711*- 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*, *Gpr3711*, 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, *Gpr3711* 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 *Gpr3711*-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 *Gpr3711*. 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. Stamatou, 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.

