

厚生労働科学研究費補助金  
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業  
(総合)研究報告書

直接リプログラミング法による人工心筋細胞の作製

研究代表者 王 英正 岡山大学病院教授

研究要旨

近年報告された特定諸因子群による線維芽細胞の人工多能性幹(iPS)細胞及び人工心筋(iCM)細胞への直接再プログラミング法の研究成果から、次世代の心筋再生医療法として、未分化な前駆・幹細胞からさらに細胞分化系統を制御した高純度の成熟心血管細胞の移植法や複数遺伝子群の導入による心筋再生医療が可能となった。本研究目的は、心臓内幹細胞から直接リプログラミング法を用いてヒト成熟心筋細胞を作製することで新たな心筋再生医療を開発することである。

研究分担者：

伊藤 浩

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

循環器内科教授

30%前後と極めて低く、かつ、死亡までの平均生存期間も6か月と大変厳しい状況である。一方、本邦では重度小児心不全に対する心臓移植事業は進んでいなく、代替医療として心臓内幹細胞自家移植法が大いに期待されている。

A. 研究目的

重症心不全に対する治療法として、機械的人工心臓の埋め込みが目下のところ主流の先端医療であるが、高額な医療費と長期間の抗凝固療法が問題視されている。

社会的背景として、我が国での小児心臓移植の適応症例は毎年約50例程度といわれている。しかしながら、厚生労働省による統計調査では、status1で申請後に心臓移植適応と判断されてからの1年生存率は、成人の約70%に比べ小児では

直接心筋リプログラミング法による線維芽細胞から人工的心筋細胞への系統誘導に関する研究が、2010年にマウス由来の細胞で初めて成功したこと(3因子法)が発表され、2013年に入り、ヒトでも有効な誘導法(6因子法)が報告されるようになった。しかしながら、再生医療実用化に向けて心筋細胞への直接リプログラミング法は、より心筋細胞系統の高い細胞種を用いて特異性の高い因子群で誘導することが必須不可欠であり、最もヒト心筋細胞に分化しうるポテンシャルを持つ

心臓内幹細胞から心筋細胞への直接リプログラミングする方法はいまだ確立されていない。

具体的に近年の研究から、マウス心臓内線維芽細胞は GATA4, Tbx5, Mef2c, Hand2 の転写因子群により直接心筋細胞に形質変換できることが報告されたが、標的細胞への遺伝子導入効率によりその心筋誘導効率が左右されることが問題となっている (*Cell*.142: 375;2010, *Nature*. 485: 599;2012, *Nature*. 485: 593;2012, *Circ Res*. 111: 50;2012 )。

一方、最近ヒト心筋細胞へ直接誘導する転写因子群は microRNA ( mir-1, mir-133 ) を含む 6 因子を必要とする誘導法が報告されているが、再生医療への臨床実用化に際し、より特異性の高い因子群に絞り込むことと in vivo での実証が必須不可欠である( *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;2013 )。

これらの画期的な研究成果により、複数の心筋に必須な転写因子群を細胞内に導入することによって、異なった細胞系統から直接心筋細胞にリプログラミングできることが明らかにされた。しかしながら、再生医療に用いることが可能な人工ヒト心筋細胞の作成はいまだ報告がない。

本研究では、最も心筋細胞への系統譜に近いヒト心臓幹細胞を用いて、上記の 3 因子に加え、成熟心筋細胞の作製に必要な直接心筋リプログラミング法の確立をめざす。

## B. 研究方法

### 1. ヒト心臓内幹細胞から成熟心筋細胞への直接リプログラミング

成熟心筋細胞への直接リプログラミング法は、従来報告された GATA4, Tbx5, Mef2C の遺伝子導入法を用いて検討し、対象とする細胞をより心筋細胞の系譜に近い心臓内幹細胞を用いる。導

入前の幹細胞を経時的に可視化するためリポーター遺伝子として、eGFP をレンチウイルスシステムにて細胞内に導入する。細胞の分化後の特性判定に対応して、リポーター遺伝子を制御するプロモーターとして、全細胞を可視化する PGK と心筋細胞のみを選択的に判別する alpha-MHC プロモーターの 2 種類を使い分ける。

心筋細胞への分化誘導の効率を向上させるため、ラット新生児心筋細胞との共培養実験も同時に進める。また、共培養後の細胞間融合による心筋分化の判定を容易にするため、ラット心筋細胞培養液を 10% に希釈した培養血清で、3 因子導入した心臓内幹細胞を一定期間培養し効果判定を行う。

人工心筋細胞の分化および成熟性については、各種心筋構造タンパクの定量的 RT-PCR や免疫組織染色で判定し、さらに細胞機能評価として、カルシウムの取り込みや各種イオンチャンネルの遺伝子発現形態について定量的に検証する。

### 2. 複合多因子群の遺伝子導入による系統誘導の効率化

GATA4, Tbx5, Mef2C 以外の直接リプログラミング因子群の候補として、近年マウスの実験や本研究室での疾患特異的 iPS 細胞用いた網羅的遺伝子解析として、Myocardin, Hand2, mir-1, mir-133 が挙げられている。当初 3 因子法による心筋系統誘導実験が進まないときには、上記の 4 因子群を併用した合計 7 因子群を用いた細胞性質改変法に切り替えて実験を進めていく。

### 3. 生体内での心筋細胞への再プログラム化

ヒト培養細胞系において、上記の候補 7 因子群で心筋分化誘導できることを確認したのち、候補因子群を用いた心筋梗塞モデルへの遺伝子導入による心筋系統誘導を行う。一方、既に報告され

ている4因子群を用いたヒト人工心筋細胞を心筋梗塞ヌードマウスに移植し心筋再生能を検討する。

(倫理面への配慮)

1. ヒト心臓組織の入手は、外部委員を含めた岡山大学倫理委員会にて審査承認されたプロトコル(承認766号)に従順し、患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、患者さんの同意のもと不要となった余剰組織を研究開発に使用する。同意した文書は体組織の採取直前まで患者さんの意思によって任意撤回できるよう、患者さんの人権尊重を第一とする。
2. 個人情報の保護を最優先し、ヒト組織の取り扱いに関する資料の提出及び調査には積極的に協力する。また、提供していただいたヒト組織は幹細胞の分離のみに全て使用し、遺伝子解析等をはじめとする倫理委員会で承認されていない研究目的には一切使用しない。
3. 遺伝子組み換え実験(承認9068号)やレトロ口及びレンチウイルスの感染はP2レベルの実験室で行い、移植された動物は隔離した遺伝子操作動物管理施設にて飼育を行う。
4. 動物実験計画書(承認389号)に従い、動物施設への実験動物の導入に当たっては、必要に応じて適切な検疫、隔離飼育等を行うことにより、実験実施者、飼養者及び他の実験動物の健康を損ねることのないように講じる。
5. マウス及びラットの使用実験は、動物愛護の条約精神に則り、動物を適切な麻酔下で手術及び移植行為を行う。心標本の取り出し等の状況においても、動物の安楽死を最重要事項として守り、動物の虐待を避ける。

6. 実験動物の生理、生態、習性等に応じ、かつ、実験等の目的の達成に支障を及ぼさない範囲で、適切に給餌及び給水を行うこと。

### C. 研究結果

最もヒト成熟心筋細胞の系譜に近いヒト心臓内幹細胞にGATA4, Tbx5, Mef2Cの3因子を遺伝子導入後、2~4週目にかけて細胞の心筋分化形態について心筋構造タンパクであるalpha-MHCプロモーター制御下でのeGFPの蛍光発色度に関してFACSで定量した。3因子導入後2週目より約5%のヒト心筋細胞分化が観察され、この現象は4週目にかけて徐々に増加し、最大で10%前後のヒト心筋細胞分化を確認した。

マイクロアレイによる包括的遺伝子解析では、3因子による直接リプログラミング法では、心筋分化過程においてMyH6, actinin, MyL7, NPPA, TPM1, TNNTといった心筋構造タンパクの発現上昇を有意に認めた。一方、心筋収縮に重要なカルシウムの取り込みの指標であるPLN, CASQ2, ATP2A2, RYR2といったカルシウム動態に関する調節タンパクは成熟心筋細胞に比べ、基準レベルまで到達していないことが明らかとなった。

また、心臓組織由来の全細胞のうち、成熟心筋細胞は酵素消化により死滅するが、初期培養のうち、生存しうる細胞種として、心臓内幹細胞と心臓内線維芽細胞でその多くを占めていた。そこで、心臓内幹細胞を幹細胞特異的認識抗原であるSIRPA、心臓内線維芽細胞を線維芽細胞固有の表面抗原であるDDR2でそれぞれFACSを用いて純化精製し、3因子の遺伝子導入後における心筋細胞分化度について比較検討した。

ヒト心臓内幹細胞はDDR2陰性でSIRPA陽性

細胞であり、心臓内のDDR2陽性細胞はすべて線維芽細胞で構成され、心筋前駆細胞の特徴である各種心筋固有の転写因子（Nkx2.5, GATA4, Hand1, Hand2, Tbx5, Mef2C）はDDR2陰性でかつSIRPA陽性の心臓内幹細胞において、強く発現していることを確認した。

このように心筋細胞に分化しうるエリート細胞である心臓内幹細胞は心臓内線維芽細胞に比べ、3因子導入後における心筋細胞分化効率において、約5倍高く心筋細胞へ分化するポテンシャルを持っていることが判明した。

#### D. 考察

心臓は心筋細胞、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、ペースメーカー細胞ならびに交感・副交感神経支配により成り立つ複雑な臓器である。重度な障害を受けた心筋および付随細胞は心不全疾患を生じるが、最も作業心筋の実質的機能を反映するのは個々における心筋細胞の駆動力と絶対細胞数である。

従来マウスで報告されたきた心臓内線維芽細胞への複合遺伝子導入法による直接心筋リプログラミングに比べ、より心筋細胞に近い系譜を持つ心臓内幹細胞に同一遺伝子群を導入した方が、高率に人工的ヒト心筋細胞を作製することができることが明らかとなった。

一方、ヒト心臓内幹細胞に対して、GATA4, Tbx5, Mef2Cの3因子導入により、マウスに見られた機能的な作業心筋細胞までの直接再プログラミングまで完全には至っていないものの、複数の成熟心筋細胞で発現がみられる構造タンパクの遺伝子プロファイルが上昇していることから、前駆細胞から心筋細胞に系統誘導が進んでいることが確実である。

しかし、成熟心筋細胞として機能するために必要なカルシウム調節タンパクの発現量は十分でなく、今後、ヒト心臓内幹細胞に対して、Myocardin, Hand2, mir-1, mir-133を取り入れた合計7因子群を用いたヒト心筋細胞への直接リプログラミング法に取り組んでいく予定である。

#### E. 結論

臨床的には心不全疾患の治療は心筋細胞再生のみに依存するわけでないため、血管新生作用やドナー細胞より分泌されるサイトカイン効果などにより、障害を受けた心筋組織に修復が行われ、結果的に機能改善につながっている臨床試験成果が多く報告されている。

最新の心筋細胞再生法として、マウスでは心臓内線維芽細胞にGATA4, Tbx5, Mef2Cの3因子を導入することにより、機能的な心筋細胞に誘導することは可能であるが、ヒト組織では、心臓内線維芽細胞に比べ、心筋前駆細胞の方が、同一の3因子群導入法において、高率に心筋細胞への誘導が可能であった。

しかしながら、人工的ヒト心筋細胞の誘導過程は、マウスより制御機構が複雑で、Myocardin, Hand2, mir-1, mir-133といった候補因子群の追加によるより成熟度の高い心筋細胞に誘導する必要があることが示唆された。今後、既報の6因子法以外の新規リプログラミング因子群による最適化が機能的ヒト作業心筋細胞の作成に必須不可欠である (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;2013)。

臨床の現場では重篤な心不全疾患が多く存在し、より多くの実質的心筋細胞再生をもたらす技術開発が、より広い領域において心機能改善をもたらす、救命率の高い治療法につながると考え

られている。この問題を解決すべく、本研究はiPS細胞作製技術を応用した直接リプログラミング法による心筋細胞再生法であり、今後の臨床応用に向けた継続的な研究開発が期待される。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano KF, Matsubara H, Miura D, Fuke S, Nishii N, Nagase S, Kohno K, Morita H, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Miura A, Yutani C, Ohe T, Ito H. Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol*. 2011 Mar 3.
2. Take Y, Morita H, Wu J, Nagase S, Morita S, Toh N, Nishii N, Nakamura K, Kusano KF, Ohe T, Ito H, Zipes DP. Spontaneous electrocardiogram alterations predict ventricular fibrillation in Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2011 Feb 10.
3. Ogawa A, Nakamura K, Mizoguchi H, Fujii N, Fujio H, Kusano KF, Ohe T, Ito H. Prednisolone ameliorates idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jan 1;183(1):139-40
4. Nishii N, Ogawa M, Morita H, Nakamura K, Banba K, Miura D, Kumagai N, Matsunaga A, Kawamura H, Urakawa S, Miyaji K, Nagai M, Satoh K, Nakagawa K, Tanaka M, Hiramatsu S, Tada T, Murakami M, Nagase S, Kohno K, Kusano KF, Saku K, Ohe T, Ito H. SCN5A mutation is associated with early and frequent recurrence of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Circ J*. 2010 Nov 25;74(12):2572-8.
5. Kijima Y, Taniguchi M, Akagi T, Nakagawa K, Kusano K, Ito H, Sano S. Torn atrial septum during transcatheter closure of atrial septal defect visualized by real-time three-dimensional transesophageal echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2010 Nov;23(11):1222.e5-8.
6. Nagase S, Hiramatsu S, Morita H, Nishii N, Murakami M, Nakamura K, Kusano KF, Ito H, Ohe T. Electroanatomical correlation of repolarization abnormalities in Brugada syndrome: detection of type 1 electrocardiogram in the right ventricular outflow tract. *J Am Coll Cardiol*. Dec 14;56(25):2143-5 (2010).
7. Miura A, Nakamura K, Kusano KF, Matsubara H, Ogawa A, Akagi S, Oto T, Murakami T, Ohtsuka A, Yutani C, Ohe T, Ito H. Three-dimensional structure of pulmonary capillary vessels in patients with pulmonary hypertension. *Circulation*. May 18;121(19):2151-3 (2010).
8. Toh N, Kanzaki H, Nakatani S, Ohara T, Kim J, Kusano KF, Hashimura K, Ohe T, Ito H, Kitakaze M. Left atrial volume combined with atrial pump function identifies hypertensive patients with a history of paroxysmal atrial fibrillation. *Hypertension*. May;55(5):1150-6 (2010).
9. Tanaka M, Nakamura K, Kusano KF, Morita H, Ohta-Ogo K, Miura D, Miura A, Nakagawa K, Tada T, Murakami M, Nishii

- N, Nagase S, Hata Y, Kohno K, Ouchida M, Shimizu K, Yutani C, Ohe T, Ito H. Elevated oxidative stress is associated with ventricular fibrillation episodes in patients with Brugada-type electrocardiogram without SCN5A mutation. *Cardiovasc Pathol*. 2011 Jan-Feb;20(1):e37-42.
10. Yamanaka R, Otsuka F, Nakamura K, Yamashita M, Otani H, Takeda M, Matsumoto Y, Kusano KF, Ito H, Makino H. Involvement of the bone morphogenetic protein system in endothelin- and aldosterone-induced cell proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from human patients with pulmonary arterial hypertension. *Hypertens Res*. 2010 May;33(5):435-45.
  11. Toh N, Morita H, Nagase S, Taniguchi M, Miura D, Nishii N, Nakamura K, Ohe T, Kusano KF, Ito H. Atrial electrophysiological and structural remodeling in high-risk patients with Brugada syndrome: assessment with electrophysiology and echocardiography. *Heart Rhythm*. 2010;7(2):218-24.
  12. Ikeda T, Nakamura K, Akagi S, Kusano KF, Matsubara H, Fujio H, Ogawa A, Miura A, Miura D, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Date H, Ohe T, Ito H. Inhibitory effects of simvastatin on platelet-derived growth factor signaling in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010 Jan;55(1):39-48.
  13. The no-reflow phenomenon associated with percutaneous coronary intervention: its mechanisms and treatment. Hiroshi Ito *Cardiovasc Interv and Ther* 26; 2-11, 2011
  14. Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano KF, Matsubara H, Miura D, Fuke S, Nishii N, Nagase S, Kohno K, Morita H, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Miura A, Yutani C, Ohe T, Ito H. *Int J Cardiol*. 2011 Mar 3. [Epub ahead of print]
  15. Prednisolone ameliorates idiopathic pulmonary arterial hypertension. Ogawa A, Nakamura K, Mizoguchi H, Fujii N, Fujio H, Kusano KF, Ohe T, Ito H. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jan 1;183(1):139-40.
  16. Elevated oxidative stress is associated with ventricular fibrillation episodes in patients with Brugada-type electrocardiogram without SCN5A mutation. Tanaka M, Nakamura K, Kusano KF, Morita H, Ohta-Ogo K, Miura D, Miura A, Nakagawa K, Tada T, Murakami M, Nishii N, Nagase S, Hata Y, Kohno K, Ouchida M, Shimizu K, Yutani C, Ohe T, Ito H. *Cardiovasc Pathol*. 2011 Jan-Feb;20(1):e37-42. Epub 2010 Mar 12.
  17. Circulating KCNH2 Current-Activating Factor in Patients with Heart Failure and Ventricular Tachyarrhythmia. Sugiyama H, Nakamura K, Morita H, Akagi S, Tani Y, Katayama Y, Nishii N, Miyoshi T, Nagase S, Kohno K, Kusano KF, Ohe T, Kurokawa J, Furukawa T, Ito H. *PLoS One*. 2011;6(5):e19897. Epub 2011 May 19.

18. Association of increased plasma adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in non-elderly men. Doi M, Miyoshi T, Hirohata S, Nakamura K, Usui S, Takeda K, Iwamoto M, Kusachi S, Kusano K, Ito H. *Cardiovasc Diabetol*. 2011 May 23;10:44.
19. Ezetimibe improves postprandial hyperlipemia and its induced endothelial dysfunction. Yunoki K, Nakamura K, Miyoshi T, Enko K, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Ito H. *Atherosclerosis*. 2011 Apr 22. [Epub ahead of print]
20. Impact of hypertriglyceridemia on endothelial dysfunction during statin ± ezetimibe therapy in patients with coronary heart disease. Yunoki K, Nakamura K, Miyoshi T, Enko K, Kubo M, Murakami M, Hata Y, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Ito H. *Am J Cardiol*. 2011 Aug 1;108(3):333-9. Epub 2011 May 3.
21. Optimal treatment for coronary artery disease in patients with diabetes: percutaneous coronary intervention, coronary artery bypass graft, and medications. Ito H. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Jan;59(1):6-13. Epub 2011 Jan 12. Review.
22. The Role of Echocardiography in Predicting Responders to Cardiac Resynchronization Therapy –Results From the Japan Cardiac Resynchronization Therapy Registry Trial (J-CRT)-Yoshihiro Seo, Hiroshi Ito, Satoshi Nakatani, Mitsuaki Takami, Shigeto Naito, Tsuyoshi Shiga, Kenji Ando, Yuji Wakayama, Kazutaka Aonuma, the J-CRT in vestigators *Circulation Journal* 75(5); 1156-1163, 2011
23. Adding thiazide to a renin-angiotensin blocker improves left ventricular relaxation and improves heart failure in patients with hypertension Hiroshi Ito, Katsuhisa Ishii, Hajime Kihara, Noriaki Kasayuki, Fumiaki Nakamura, Kenei Shimada, Shota Fukuda, Katsuomi Iwakura, Junichi Yoshikawa for Effect of ARB/Diuretics on Diastolic Function in Patients with Hypertension (EDEN) trial investigators Hypertension Research 2011
24. Intermittent arm ischemia induces vasodilatation of the contralateral upper limb Kenki Enko, Kazufumi Nakamura, Kei Yunoki, Toru Miyoshi, Satoshi Akagi, Masashi Yoshida, Norihia Toh, Mutsuko Sangawa, Nobuhiro Nishii, Satoshi Nagase, Kunihisa Kohno, Hiroshi Morita, Kengo F. Kusano, Hiroshi Ito *J Physiol Sci* 61; 507-513, 2011
25. Transcatheter Closure of a Large Atrial Septal Defect under Microprobe Transesophageal Echocardiographic Guidance. Taniguchi M, Akagi T, Kijima Y, Ito H, Sano S. *Echocardiography*. 2011 Dec 9. doi: 10.1111/j.1540-8175.2011.01600.x. [Epub ahead of print]
26. Gender Differences in Age-Related Changes in Left and Right Ventricular Geometries and Functions. Daimon M, Watanabe H, Abe Y, Hirata K, Hozumi T, Ishii K, Ito H, Iwakura K, Izumi C, Matsuzaki M, Minagoe S, Abe H, Murata K, Nakatani S, Negishi K, Yoshida K, Tanabe K, Tanaka N, Tokai K, Yoshikawa J; The Japanese Normal Values for Echocardiographic

- Measurements Project (JAMP) Study Investigators. *Circ J*. 2011 Nov 25;75(12):2840-2846. Epub 2011 Sep 23.
27. Four-year clinical outcomes of the OLIVUS-Ex (impact of Olmesartan on progression of coronary atherosclerosis: Evaluation by intravascular ultrasound) extension trial. Hirohata A, Yamamoto K, Miyoshi T, Hatanaka K, Hirohata S, Yamawaki H, Komatsubara I, Hirose E, Kobayashi Y, Ohkawa K, Ohara M, Takafuji H, Sano F, Toyama Y, Kusachi S, Ohe T, Ito H. *Atherosclerosis*. 2012 Jan;220(1):134-8. Epub 2011 Nov 9.
  28. Hirohata A, Yamamoto K, Miyoshi T, Hatanaka K, Hirohata S, Yamawaki H, Komatsubara I, Hirose E, Kobayashi Y, Ohkawa K, Ohara M, Takafuji H, Sano F, Toyama Y, Kusachi S, Ohe T, Ito H: Four-year clinical outcomes of the OLIVUS-Ex (impact of Olmesartan on progression of coronary atherosclerosis: evaluation by intravascular ultrasound) extension trial. *Atherosclerosis*. 2012 Jan;220(1):134-8.
  29. Ohta-Ogo K, Hao H, Ishibashi-Ueda H, Hirota S, Nakamura K, Ohe T, Ito H: CD44 expression in plexiform lesions of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pathology International*. 2012 Apr;62(4):219-25.
  30. Ogawa A, Miyaji K, Yamadori I, Shinno Y, Miura A, Kusano KF, Ito H, Date H, Matsubara H: Safety and efficacy of epoprostenol therapy in pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis. *Circulation Journal*. 2012 Jun 25;76(7):1729-36.
  31. Fukuda S, Watanabe H, Daimon M, Abe Y, Hirashiki A, Hirata K, Ito H, Iwai-Takano M, Iwakura K, Izumi C, Hidaka T, Yuasa T, Murata K, Nakatani S, Negishi K, Nishigami K, Nishikage T, Ota T, Hayashida A, Sakata K, Tanaka N, Yamada S, Yamamoto K, Yoshikawa J: Normal values of real-time 3-dimensional echocardiographic parameters in a healthy Japanese population: the JAMP-3D Study. *Circulation Journal*. 2012 Apr 25;76(5):1177-81.
  32. Watanabe N, Taniguchi M, Akagi T, Tanabe Y, Toh N, Kusano K, Ito H, Koide N, Sano S: Usefulness of the right parasternal approach to evaluate the morphology of atrial septal defect for transcatheter closure using two-dimensional and three-dimensional transthoracic echocardiography. *Journal of the American Society Echocardiography*. 2012 Apr;25(4):376-82.
  33. Mizoguchi H, Ogawa A, Munemasa M, Mikouchi H, Ito H, Matsubara H: Refined Balloon Pulmonary Angioplasty for Inoperable Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012 Nov 27. [Epub ahead of print]
  34. Takaya Y, Taniguchi M, Akagi T, Nobusada S, Kusano K, Ito H, Sano S: Long-Term Effects of Transcatheter Closure of Atrial Septal Defect on Cardiac Remodeling and Exercise Capacity in Patients Older than 40 Years with a Reduction in



- Cardiopulmonary Function. *J Interv Cardiol.* 2012 Nov 19. [Epub ahead of print]
35. Tanabe Y, Oe H, Miyoshi A, Toh N, Ugawa S, Watanabe N, Takagaki M, Sano S, Ito H: Combined Subaortic and Mid-ventricular Obstruction With Significant Aortic Stenosis Diagnosed by Triphasic Doppler Flow Pattern: Multiple Levels of Left Ventricular Outflow Tract Obstruction. *J Am Coll Cardiol.* 2012 Nov 20;60(21):2252.
  36. Saito Y, Nakamura K, Miyaji K, Akagi S, Mizoguchi H, Ogawa A, Fuke S, Fujio H, Kiyooka T, Nagase S, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Matsubara H, Ohe T, Ito H: Acute vasoreactivity testing with nicardipine in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Pharmacol Sci.* 2012 Nov 16;120(3):206-12.
  37. Osawa K, Miyoshi T, Sato S, Akagi N, Morimitsu Y, Nakamura K, Kohno K, Kusano K, Kanazawa S, Ito H: Safety and Efficacy of a Bolus Injection of Landiolol Hydrochloride as a Premedication for Multidetector-Row Computed Tomography Coronary Angiography. *Circ J.* 2012 Oct 3. [Epub ahead of print]
  38. Toh N, Nishii N, Nakamura K, Tada T, Oe H, Nagase S, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Ito H: Cardiac dysfunction and prolonged hemodynamic deterioration after implantable cardioverter-defibrillator shock in patients with systolic heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012 Oct 1;5(5):898-905.
  39. Dan K, Miyoshi T, Ueeda M, Ohtsuka H, Ugawa S, Ohnishi N, Takaishi A, Nakamura K, Kusano K, Ito H: Impact of chronic kidney disease on left main coronary artery disease and prognosis in Japanese patients. *Circ J.* 2012;76(9):2266-72.
  40. Iwamoto M, Miyoshi T, Doi M, Takeda K, Kajiyama M, Nosaka K, Nakayama R, Hirohata S, Usui S, Kusachi S, Sakane K, Nakamura K, Ito H: Elevated serum adipocyte fatty acid-binding protein concentrations are independently associated with renal dysfunction in patients with stable angina pectoris. *Cardiovasc Diabetol.* 2012 Mar 21;11:26.
  41. Takaya Y, Taniguchi M, Sugawara M, Nobusada S, Kusano K, Akagi T, Ito H: Evaluation of exercise capacity using wave intensity in chronic heart failure with normal ejection fraction. *Heart Vessels.* 2012 Feb 4. [Epub ahead of print]
  42. Watanabe N, Taniguchi M, Akagi T, Tanabe Y, Toh N, Kusano K, Ito H, Koide N, Sano S: Usefulness of the right parasternal approach to evaluate the morphology of atrial septal defect for transcatheter closure using two-dimensional and three-dimensional transthoracic echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2012 Apr;25(4):376-82.
  43. Taniguchi M, Akagi T, Kijima Y, Ito H, Sano S: Transcatheter closure of a large atrial septal defect under microprobe transesophageal echocardiographic guidance. *Echocardiography.* 2012 Apr;29(4):E94-6.
  44. Take Y, Morita H, Toh N, Nishii N, Nagase S, Nakamura K, Kusano KF, Ohe T, Ito H: Identification of high-risk syncope related

to ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. Heart Rhythm. 2012 May;9(5):752-9.

45. Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano KF, Matsubara H, Miura D, Fuke S, Nishii N, Nagase S, Kohno K, Morita H, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Miura A, Yutani C, Ohe T, Ito H: Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Int J Cardiol. 2012 Aug 23;159(2):100-6.
46. Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano KF, Matsubara H, Miura D, Fuke S, Nishii N, Nagase S, Kohno K, Morita H, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Miura A, Yutani C, Ohe T, Ito H: Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Int J Cardiol. 2012 Aug 23;159(2):100-6.

#### 学会発表

1. 永瀬 聡、村上正人、多田 毅、田中正道、中川晃志、西井伸洋、中村一文、幡 芳樹、森田 宏、河野晋久、草野研吾、伊藤 浩 Prevalence and Clinical Significance of Apical Aneurysm in Hypertrophic Cardiomyopathy-Low Prevalence but High Risk of Sustained Ventricular Tachycardia. Heart Rhythm 2010
2. 草野研吾、森 藍子、森田 宏、寒川睦子、野坂和正、大江 透、伊藤 浩 ECG Changes During Japanese Style Hot-Bathing in

Patients with Brugada Syndrome Heart Rhythm 2010

3. 永瀬 聡、村上正人、多田 毅、田中正道、中川晃志、三浦大志、西井伸洋、中村一文、幡 芳樹、森田 宏、河野晋久、草野研吾、伊藤 浩 Early Repolarization at Left Ventricular Epicardial Potential is Associated with Fatal Arrhythmic Events in Brugada Syndrome Heart Rhythm 2010
4. 森田 宏、Douglas P. Zipes, 永瀬 聡、西井伸洋、草野研吾、大江 透、伊藤 浩、Jiashin Wu Mapping of Polymorphic Ventricular Tachycardia in Patients and an Experimental Model of Brugada Syndrome Heart Rhythm 2010
5. 杜 徳尚、西井伸洋、森田 宏、谷口 学、永瀬 聡、中村一文、草野研吾、伊藤 浩 Defibrillation Threshold Testing During Implantable Cardioverter-Defibrillator Implantation Causes Transient Impairment of Cardiac Function Heart Rhythm 2010
6. 西井伸洋、森田 宏、永瀬 聡、中村一文、幡 芳樹、河野晋久、草野研吾、伊藤 浩 Two Cases of Inappropriate ICD Therapies due to T Wave Oversensing Induced by Body Twisting Heart Rhythm 2010
7. 森田 宏、永瀬 聡、西井伸洋、中村一文、草野研吾、大江 透、伊藤 浩 Exercise Aggregates Fragmented QRS in Patients with Brugada Syndrome Heart Rhythm 2010
8. 杜 徳尚、伊藤 浩 Transient Deterioration of Left Ventricular Diastolic Function Caused by Defibrillation Threshold Testing During Implantable-Cardioverter

- Defibrillator Implantation: Its Impact on Ca<sup>2+</sup> Transient and Clinical Evidence 第 83 回米国心臓学会
9. 中村一文、伊藤 浩 Imatinib in the Presence of Platelet-derived Growth Factor Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension 第 83 回米国心臓学会
  10. 三好 亨、伊藤 浩 Cd44 Contributes to the Development of Abdominal Aortic Aneurysm in Mice Through the Interaction With Hyaluronic Acid and the Recruitment of Macrophages 第 83 回米国心臓学会
  11. 三好 亨、伊藤 浩 Serum Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein is Associated With Coronary Lesion Complexity in Patients With Coronary Artery Disease 第 83 回米国心臓学会
  12. 中村一文、伊藤 浩 Increased Cardiomyocyte Stiffness in the Transverse Direction and Incomplete Relaxation in Hypertrophied Rat Hearts Induced by Chronic  $\beta$ -adrenergic Stimulation 第 83 回米国心臓学会
  13. 赤木 達、伊藤 浩 Prostaglandin 12 Induced Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Apoptosis via Upregulation of Fas Ligand in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension 第 83 回米国心臓学会
  14. 福家聡一郎、伊藤 浩 Difference in Right Ventricular Loading Between Patients With Pulmonary Hypertension and Patients With Left Sided Heart Failure 第 83 回米国心臓学会
  15. 小川愛子、伊藤 浩 Bosentan Inhibits Proliferation of Cells Isolated from Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension 第 83 回米国心臓学会
  16. 三浦 綾、伊藤 浩 Differences of Diameter of Pulmonary Capillary Vessels in Patients with Pulmonary Hypertension Using Scanning Electron Microscope 第 83 回米国心臓学会
  17. Catheter Closure of Atrial Septal Defect in Patients with Multiple Rim Deficiencies Yasufumi Kijima, Manabu Taniguchi, Koji Nakagawa, Kengo Kusano, Hiroshi Ito, Shunji Sano, Teiji Akagi, *American College of Cardiology*, 2011
  18. Impact of Increased Arterial Stiffness and Wave Reflection on the Prevalence of Paroxysmal Atrial Fibrillation Toru Miyoshi, Masayuki Doi, Satoshi Hirohata, Shozo Kusachi, Kazufumi Nakamura, Satoshi Nagase, Kunihisa Kono, Hiroshi Morita, Kengo Kusano, Hiroshi Ito, *American College of Cardiology*, 2011
  19. Defibrillation Threshold Testing During Implantable Cardioverter-Defibrillator Implantation Impairs Cardiac Systolic and Diastolic Function and Prolongs Blood Pressure Recovery in Patients With Heart Failure Norihisa Toh, Nobuhiro Nishii, Kazufumi Nakamura, Satoshi Nagase, Kunihisa Kohno, Hiroshi Morita, Kengo F. Kusano, Hiroshi Ito *American College of Cardiology*, 2011
  20. Impact of Hybrid Approach Involving Pulmonary Vein Isolation and

- Transcatheter Device Closure for Patients with Atrial Septal Defect Having Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation. Manabu Taniguchi, Satoshi Nagase, Teiji Akagi, Koji Nakagawa, Yasufumi Kijima, Yoshihito Hata, Kengo Kusano, Hiroshi Ito, Shunji Sano. *American College of Cardiology*, 2011
21. Anti-inflammatory Effect of Olmesartan on Coronary Plaque Progression, Finding from the Impact of Olmesartan on Progression of Coronary Atherosclerosis: Evaluation By Intravascular Ultrasound (OLIVUS) Trial. Toru Miyoshi, Atsushi Hirohata, Shozo Kusachi, Satoshi Hirohata, Kazufumi Nakamura, Hiroshi Morita, Kengo Kusano, Hiroshi Ito *American College of Cardiology*, 2011
  22. Impact of Chronic Kidney Disease on Left Main Coronary Artery Disease in Patients with Stable Angina Pectoris. Kazuhiro Dan, Toru Miyoshi, Kengo Kusano, Hiroshi Ito, Masayuki Ueda. *American College of Cardiology*, 2011
  23. Nicorandil Further Improve Microvascular Function in Patients With STEMI Undergoing Anti-embolic Therapy Yusuke Kawai, Hironobu Toda, Atsuyuki Watanabe, Katsushi Hashimoto, Makoto Nakahama, Hiroshi Ito *American College of Cardiology*, 2011
  24. Pro-apoptotic Effects of Imatinib on Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension -Role of Akt-中村一文、赤木 達、小川愛子、三浦 綾、三浦大志、西井伸洋、永瀬 聡、森田 宏、河野晋久、松原広己、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会（横浜市）
  25. Tachycardia Zone Setting to Avoid Inappropriate Shock in Brugada Syndrome Patients with Implantable Cardioverter Defibrillator 西井伸洋、久保元基、中川晃志、田中正道、杜 徳尚、吉田賢司、村上正人、三好 亨、永瀬 聡、中村一文、河野晋久、森田 宏、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会（横浜市）
  26. Transient Impaired Calcium Handling Induced by Defibrillation Shock Causes Diastolic Dysfunction of Left Ventricle in Patients with Fatal Ventricular Arrhythmias 杜 徳尚、中村一文、西井伸洋、永瀬 聡、河野晋久、森田 宏、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会（横浜市）
  27. Circulating KCNH2 Current Activating Factor in Patients with Heart Failure and Ventricular Tachyarrhythmia 杉山洋樹、中村一文、森田 宏、赤木 達、草野研吾、大江 透、黒川詢子、古川哲史、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会(横浜市)
  28. Clinical Aspects of Unsuccessful Device Closure in Patients with Atrial Septal Defect 木島康文、赤木禎治、谷口 学、中川晃志、岡本吉生、大月審一、草野研吾、伊藤 浩、佐野俊二 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会（横浜市）
  29. Influence of Adiposity on Carotid Wave Reflection and Arterial Stiffness: a Longitudinal Study in Healthy Children 櫻木 悟、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本

循環器学会総会・学術集会（横浜市）

30. Impact of Infero/Lateral Early Repolarization Pattern in Patients with Brugada Syndrome 時岡浩二、草野研吾、森田 宏、永瀬 聡、河野晋久、中村一文、西井伸洋、谷山真規子、三浦大志、大江 透、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会（横浜市）
31. Fragmented QRS is Associated with Torsades de Pointes in Patients with Acquired Long QT Syndrome 原岡佳代、森田 宏、杜 徳尚、三好 亨、西井伸洋、永瀬 聡、中村一文、河野晋久、草野研吾、大江 透、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会（横浜市）
32. Prostaglandin I<sub>2</sub> induces Apoptosis via Upregulation of Fas Ligand in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension 赤木達、中村一文、松原広己、三浦 綾、小川愛子、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会（横浜市）
33. Depression in Patients with Cardiovascular Disease: Evaluation with the Patient the 9 item Patient Health Questionnaire (PHQ-9) 久保元基、三好亨、西井伸洋、森田 宏、中村一文、河野晋久、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会（横浜市）
34. The Risk of ECG Type Alterations and Appearance of Type-0 ECG for the Occurrence of Ventricular Fibrillation in Brugada Syndrome 森田 宏、武 寛、Douglas Zipes, 杜 徳尚、吉田賢司、西井伸洋、永瀬 聡、中村一文、河野晋久、草野研吾、大江 透, Jiashin Wu、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会
35. Delayed Gadolinium-Enhancement with Cardiac Magnetic Resonance and Early Repolarization of Inferolateral Leads in Patients with Brugada Syndrome 村上正人、永瀬 聡、田中正道、中川晃志、西井伸洋、中村一文、河野晋久、森田 宏、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会（横浜市）
36. 草野研吾, 永瀬 聡, 森田 宏, 中村一文, 西井伸洋, 田中正道, 中川晃志, 三浦大治, 伊藤 浩: 電気的ストームの実態と対処。Brugada 症候群における植込み型除細動器頻回作動に対する抗不整脈薬の長期的効果。第 27 回日本不整脈学会シンポジウム, 横浜, 2012
37. 草野研吾, 永瀬 聡, 森田 宏, 中村一文, 伊藤 浩, 大江 透: 器質的心疾患に伴う心室性不整脈の特徴と対策。第 60 回日本心臓病学会学術集会シンポジウム, 金沢, 2012
38. 久保元基, 西井伸洋, 永瀬 聡, 草野研吾, 伊藤 浩, 竹中祐樹, 森田 宏: チームで運用するリモートモニタリングの利点、問題点について。第 27 回日本不整脈学会, 横浜, 2012
39. Miyoshi T, Nakamura K, Morita H, Kusano K, Ito H: Significance of imidapril in the direct inhibition of matrix metalloproteases in experimental abdominal aortic aneurysm; comparison with losartan. 61th Annual Meeting of American College of Cardiology, Chicago, 2012
40. Nakagawa K, Kijima Y, Kusano K, Ito H, Akagi T: Balloon occlusion test overestimates the risk of acute pulmonary congestion after the transcatheter closure

- of atrial septal defect in adults. 61th Annual Meeting of American College of Cardiology, Chicago, 2012
41. Morita H, Take Y, Nagase S, Nishii N, Kusano KF, Ohe T, Ito H: Risk stratification by point scoring system based on 12-lead ECG in patients with Brugada syndrome. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
  42. Takenaka Y, Nishii N, Kubo M, Nakagawa K, Tanaka M, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Ito H: A case of induced ventricular tachycardia by ventricular pacing on T wave due to unusual double blanking. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
  43. Kusano KF, Morita H, Nagase S, Nakamura K, Ito H: Clinical characteristics and efficacy of oral pharmacological therapy in Brugada syndrome with repeated episodes of ventricular fibrillation. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
  44. Nagase S, Tanaka M, Nakagawa K, Morita H, Nishii N, Nakamura K, Kohno K, Kusano KF, Ohe T, Ito H: Prominent J wave or ST-segment elevation in left ventricular epicardium in patients with Brugada syndrome. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
  45. Tokioka K, Kusano K, Morita H, Miyoshi T, Nishii N, Hashimoto K, Nagase S, Nakamura K, Kohno K, Ito H: Inferolateral J wave and fragmented QRS are the independent predictors of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
  46. Nakagawa K, Nagase S, Tanaka M, Nishii N, Nakamura K, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Ohe T, Ito H: Amelioration of inter-ventricular conduction delay of right ventricle improves electrocardiogram from type-1 to type-2 in patients with Brugada syndrome. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
  47. Nosaka, K, Nakamura K, Kusano KF, Tada, T, Miyoshi, I, Doi, M, Kohno K, Ito H: Serum cystatin C as a biomaker of cardiac diastolic dysfunction in patients with cardiac disease and preserved ejection fraction, European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  48. Osawa K, Miyoshi T, Sato WS, Morita H, Hashimoto K, Nagase S, Kohno K, Nakamura K, Kusano K, Ito H: Impact of visceral abdominal adipose tissue on unstable coronary plaque formation detected by multidetector computed tomography in non-diabetic patients. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  49. Akagi S, Matsubara H, Miyaji K, Ogawa A, Kusano K, Ito H: Impact of dopamine and dobutamine support at the initiation of epoprostenol on short and long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  50. Kubo M, Miyoshi T, Nishii N, Nagase S, Nakamura K, Morita H, Kohno K, Kusano K, Ito H: Endothelial dysfunction in the brachial artery predicts clinical outcome in patients with coronary artery disease

- undergoing successful percutaneous coronary intervention. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
51. Miyoshi T, Yonezawa T, Doi M, Aoki A, Nakamura K, Hirohata S, Kusachi S, Ninomiya Y, Kusano K, Ito H: Hyaluronic acid metabolism is increased in human abdominal aortic aneurysm. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  52. Tanaka M, Nakamura K, Miura D, Nakagawa K, Nishii N, Nagase S, Morita H, Kusano K, Yutani C, Ito H: Lymphocytic cell infiltration of myocardium is associated with the episode of ventricular fibrillation in patients with brugada syndrome. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  53. Noda Y, Miyoshi T, Oe H, Nakamura K, Morita H, Kohno K, Toh N, Kusano K, Ito H: A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, alogliptin, improves postprandial triglycfemia and postprandial endothelial dysfunction. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  54. Fuke S, Kusano KF, Akagi S, Tanaka M, Ogawa A, Nagase S, Nakamura K, Sato T, Ito H: Assessment of right ventriculo-pulmonary arterial coupling in patients with pulmonary hypertension, European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  55. Tanaka M, Nagase S, Nishii N, Nakamura K, Morita H, Kohno K, Kusano K, Yutani C, Ito H: Autopsy case of a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy after failed endo-and epicardial radiofrequency ablation of ventricular arrhythmias originated in RV epicardium. 5th Scientific Session of Asia Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, 2012
  56. Kubo M, Nishii N, Wada T, Tanaka M, Nakagawa K, Nagase S, Morita H, Kusano K, Ito H: Observation of extracellular water excess in woman with PMS by using implantable device. A case report. 5th Scientific Session of Asia Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, 2012
  57. Nishii N, Miyoshi A, Kubo M, Nakagawa K, Tanaka M, Nagase S, Morita H, Kusano K, Ito H: Rising upper limit of ventricular tachycardia zone is useful to avoid inappropriate therapy due to rapid atrial fibrillation, but not due to paroxysmal supra ventricular tachycardia. 5th Scientific Session of Asia Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, 2012
  58. Nagase S, Tanaka M, Nakagawa K, Morita H, Nishii N, Nakamura K, Kohno K, Kusano KF, Ito H: Left ventricular epicardial recordings in patients with J wave syndrome-substrate of arrhythmogenic early repolarization. 5th Scientific Session of Asia Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, 2012
- G. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許取得  
該当なし。
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。

