

# 博士論文

論文題目 左室心筋と右室心筋のストレス応答性の違い

氏名 假屋 太郎

博士学位論文

論文題目 左室心筋と右室心筋のストレス応答性の違い

所属 東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻（医学博士課程）  
器官病態内科学講座 循環器内科学

指導教官 小室一成 教授

申請者 假屋太郎

提出：平成 26（2014）年 11 月

最終提出：平成 27（2015）年 2 月

## 目次

<b>1. 要旨</b> .....	<b>5</b>
<b>2. 序文</b> .....	<b>6</b>
2.1. はじめに .....	6
2.2. 心臓における左室と右室の機能的・解剖学的相違点 .....	6
2.3. 左室と右室の発生学的相違点 .....	7
2.4. 左室と右室の機能不全に対する臨床的介入の現状 .....	8
2.5. 慢性心不全の基礎的先行研究の概観 .....	9
2.5.1. G タンパク質共役受容体と病的な心肥大シグナル .....	9
2.5.2. 病的な心肥大シグナルにおける calcineurin-NFAT 経路 .....	11
2.5.3. Wnt シグナル経路と心筋リモデリング .....	12
2.5.4. 心筋リモデリングとアポトーシス .....	15
2.6. 左室と右室の分子生物学的相違点に関する先行研究 .....	16
<b>3. 目的</b> .....	<b>20</b>
<b>4. 方法</b> .....	<b>21</b>
4.1. マウスの実験 .....	21
4.1.1. 遺伝子改変マウスとその特徴 .....	21
4.1.1.1. 心筋特異的 Gαq 過剰発現マウス .....	21
4.1.1.2. Calcineurin Aβ ノックアウトマウス .....	21
4.1.1.3. Trpc3・Trpc6 ダブルノックアウト (Trpc3/6 DKO) マウス .....	22
4.1.2. 非観血血圧測定 .....	22
4.1.3. 投薬方法 .....	22
4.1.4. 左室・右室心筋組織の分離と摘出 .....	23
4.2. マウス成体心筋細胞単離 .....	24
4.3. RNA SEQUENCING (RNA-SEQ) とその解析 .....	25
4.3.1. RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads) の算出 .....	25
4.3.2. RPKM の解析 .....	26
4.3.3. Gene ontology 解析 .....	27
4.4. ラット新生仔心筋細胞単離と初代培養 .....	27
4.5. 新生仔ラット初代培養心筋細胞を用いた実験 .....	28
4.5.1. 新生仔ラット初代培養心筋細胞に対する siRNA のトランスフェクション .....	28
4.5.2. 薬剤による刺激 .....	28
4.6. RNA 単離とリアルタイム POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) による mRNA 定量 .....	29
4.7. タンパク質抽出、WESTERN BLOTTING とその解析 .....	31

4.8.	統計学的解析 .....	32
<b>5.</b>	<b>結果 .....</b>	<b>34</b>
5.1.	左右心室筋の mRNA 発現の相違点の探索的解析 .....	34
5.1.1.	<i>B-type natriuretic peptide (Bnp)</i> の発現量は左右心室筋組織で大きく異なる .....	34
5.1.2.	左右心室筋の <i>Bnp</i> 発現量の違いは、 <i>calcineurin</i> 経路を介さない .....	35
5.1.3.	左右心室筋の <i>Bnp</i> 発現量の違いは、 <i>Trpc3/6</i> 経路を介さない .....	36
5.1.4.	左右心室筋で等しい <i>Gαq</i> 過剰発現下でも、 <i>Bnp</i> 発現量は左室心筋で多い .....	39
5.1.5.	マウス心筋細胞単離手技により大部分の非心筋細胞を除去できる .....	41
5.1.6.	単離直後の左右心室細胞での各種 mRNA 発現量の相違点 .....	42
5.2.	左右心室筋の RNA-SEQ を用いたトランスクリプトーム解析 .....	44
5.2.1.	心不全ストレス非存在下での左右心筋細胞 mRNA 発現プロファイル .....	44
5.2.2.	<i>Gαq</i> ストレス存在下での左右心筋細胞 mRNA 発現プロファイル .....	50
5.3.	右室自由壁心筋組織ではストレス応答の結果アポトーシス経路が活性化される .....	55
5.4.	<i>Wif1</i> は心筋のアポトーシスシグナルを調節する .....	59
5.4.1.	<i>Wif1</i> mRNA はマウスにおいて右室心筋に多く発現している .....	59
5.4.2.	<i>Wif1</i> は <i>in vitro</i> 心筋細胞でのアポトーシスシグナルを増強する .....	60
<b>6.</b>	<b>考察 .....</b>	<b>62</b>
6.1.	本研究で発見した事実と、それより得られる結論 .....	62
6.2.	本研究の独自性と関連領域に及ぼしうる影響 .....	64
6.3.	本研究の限界 .....	66
6.4.	本研究の意義と今後の発展の方向性 .....	68
<b>7.</b>	<b>引用文献 .....</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>謝辞 .....</b>	<b>94</b>

## 1. 要旨

これまでの心不全の基礎医学研究は主に左室心筋を扱ってきたが、マウスに左心不全研究で用いられる薬剤による心不全ストレスを与えた際の、同一個体由来の左右心室筋のストレス応答によるトランスクリプトームの変化を網羅的に解析した先行研究はない。本研究では、マウスに対する *angiotensin II* または *isoproterenol* 投与によって、右室心筋ではアポトーシス経路が活性化することを、単離心筋細胞ペレットに対する *RNA sequencing* を用いたトランスクリプトームの網羅的解析や心筋組織のタンパク質発現解析により示し、左右心筋細胞および心筋組織のストレス応答性の違いを示した。また、このストレス応答としてのアポトーシス経路活性化に *Wnt inhibitory factor 1 (Wif1)* 遺伝子が関与している事を示した。

## 2. 序文

### 2.1. はじめに

本研究では、マウスを用いて左右心室の薬剤刺激に対するストレス応答性を検討する。この序文においては、まず、左室と右室の機能的・解剖学的・発生学的相違点を概説する。次に、臨床での慢性左心不全と慢性右心不全の治療に際しての相違点に言及する。さらに、心筋のストレス応答すなわち心不全シグナルについて概説し、序文の最後では、左室と右室の分子生物学的相違点を検討している先行研究について概観する。

### 2.2. 心臓における左室と右室の機能的・解剖学的相違点

心臓は血液を全身に循環させるためのポンプとしての機能を持ち、その機能を達成するために、ヒトを含む哺乳類の心臓は大きく 4 つの部屋に分かれている。すなわち 2 つの心房（右房・左房）と 2 つの心室（右室・左室）である。右房・右室からなる右心系は肺を灌流する肺循環へ血液を拍出し、左房・左室からなる左心系は肺以外の主要臓器を灌流する体循環へ血液を拍出する[1]。健常例では、左室収縮で生じる血圧は右室の約 5~6 倍であり、体循環の総流路抵抗（巨視的には体血管抵抗として表現される）は、肺循環のそれ（巨視的に肺血管抵抗）の約 10 倍となる。このように右室と左室では、正常な血液循環時に果たしているポンプとしての機能が異なり、これらの機能的相違点とともに、

解剖学的な特徴の差異も顕著である。

右室と左室の解剖学的相違点として、肉柱を無視した内腔の概形は、左室が回転楕円体であるのに対して、右室はそれに付着するように扁平である。心筋組織の厚さは、左室が右室の数倍である[2]。房室弁からの腱索を支える乳頭筋は、左室内には概ね 2 個認めるのに対し、右室内には概ね 3 個認める。微視的には、左室心筋は心外膜側表面からの深さによって線維方向の心室長軸に対してなす角度が徐々に変化することが知られている[3,4]が、右室心筋は壁が薄いこともあってか左室心筋で見られるような傾向に乏しい[5]。

### 2.3. 左室と右室の発生学的相違点

前項の様に左室と右室は機能的・解剖学的に多数の相違点を有するが、発生学的にも、異なる細胞集団から分化することが知られている。心臓の発生では、古典的には **heart tube** が **looping** して **heart tube** の隣り合った領域が左室と右室に分化すると考えられてきた[6]が、最近の研究で、心房・右室・流出路などは、**second heart field** と呼ばれる領域から細胞が移動してくることにより形成されることが明らかになった[7,8]。特に **second heart field** 内の前方に位置する **anterior heart field** より、流出路と右室自由壁が形成される[7]。一方、**cardiac crescent** を形成する **first heart field** から **heart tube** に分化した構造は、左室(正確には左室と、心室中隔の左側)に分化すると考えられている[9]。マウスによる検討では、**first**

heart field 由来細胞 (heart tube など) は構造的足場となり、second heart field 由来細胞は増殖能を保持して心臓の複雑な形態形成に寄与すると考えられている。

さらに、second heart field では Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が活性化しており、これが形態形成期の細胞増殖能の維持に寄与していると考えられている。すなわち、右室心筋と左室心筋は、発生学的にその由来が異なる[9,10]。

#### 2.4. 左室と右室の機能不全に対する臨床的介入の現状

左室と右室は前述のように多数の相違点を持つが、臨床的に心臓ポンプ機能低下を扱う際は、全身への酸素運搬を司る左室について論じられることがほとんどである。心臓ポンプ機能の低下すなわち慢性心不全に対する治療について、これまで左室に対する検討が重点的に行われてきており、慢性心不全治療に関するエビデンスやガイドラインは基本的に左心不全に対するものである[11,12]。慢性心不全に対する薬物治療は、 $\beta$ 遮断薬や、アンジオテンシン変換酵素阻害薬・アンジオテンシン II 受容体拮抗薬・アルドステロン拮抗薬などによって、交感神経系やレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系などの神経体液性因子をターゲットとして行われ、それらの左心不全治療におけるエビデンスは豊富である。一方で、右室に対するこれらの薬物の効果を検討した研究は複数あるものの、その評価は一定せず[13,14,15,16,17]、右心不全に対する心筋リモデリング抑制薬の使用方法に明確なコンセンサスはないのが現状である。



しかし重要なことに、慢性左心不全における右室機能低下は死亡率に対する独立したリスクとなることが知られている[18,19,20,21,22,23,24]。左心不全に対する治療介入は、神経体液性因子への介入と機械的サポート及び心臓移植という一定の解答を得ている[11,12]が、機械的サポート下においても右室機能低下は死亡リスクとなる[25]。肺高血圧症は右心不全を来たす疾患であり、近年、有効な薬剤が多数臨床使用されるに至ったが、これらのターゲットは肺血管拡張であり[26,27,28]、右室心筋リモデリング抑制という観点からの治療指針は存在しない。また、小児心疾患の治療成績の向上[29,30]によって成人先天性心疾患の患者が増加傾向にあり[31]、比較的単純と思われる心室中隔欠損・心房中隔欠損の術後成人例であっても、10%以上に肺動脈性肺高血圧が存在する[32]ため、成人先天性心疾患患者の増加に伴い肺高血圧症患者が増加する事が予測されている。この様に各種循環器疾患に対する治療法の進歩に伴い、右心不全治療の必要性がより強く認識されるに至っており[33]、右心不全の治療法の確立が待たれている。

## 2.5. 慢性心不全の基礎的先行研究の概観

### 2.5.1. G タンパク質共役受容体と病的な心肥大シグナル

これまでの慢性心不全の基礎的研究から、病的な心筋リモデリングの原因となる病的な心肥大シグナルが明らかにされてきた。病的な心肥大シグナルは多数の細

胞内シグナル経路のネットワークで調節されているが、主な胞内シグナル経路として、Gタンパク質共役受容体(G-protein coupling receptors, GPCRs)、受容体型 tyrosine kinase、ナトリウム利尿ペプチド受容体を介するもの、さらに、mechanosensitive receptor を介するものが挙げられる。このうち特に GPCR として、 $\alpha_1$  アドレナリン受容体 ( $\alpha_1$ AR)、 $\beta_1$  アドレナリン受容体 ( $\beta_1$ AR)、angiotensin II 受容体 1 (AT1R)、endothelin 受容体 ( $ET_A$ R,  $ET_B$ R) が知られており、 $\alpha_1$ AR、AT1R、 $ET_A$ R、 $ET_B$ R には  $G\alpha_q$  が、 $\beta_1$ AR には  $G\alpha_s$  が、 $G\alpha$ サブユニットとして共役する事が知られている。 $G\alpha_q$  サブユニットが活性化すると、phospholipase C (PLC)が活性化し、inositol 1,4,5-triphosphate を介する細胞内カルシウム濃度上昇への経路と、diacylglycerol を介する protein kinase C (PKC)の活性化や、複数の mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化を来す。一方、 $G\alpha_s$  サブユニットが活性化すると adenylyl cyclase から cyclic adenosine monophosphate (cAMP)を介する protein kinase A の活性化により、細胞内カルシウム濃度が上昇する。特に細胞内カルシウムの上昇は、カルシウム依存性フォスファターゼである calcineurin の活性化を介した nuclear factor of activated T cells (NFAT)の活性化や、calcium/calmodulin-dependent kinase type II (CaMKII)の活性化から、histone deacetylase (HDAC)制御を介した myocyte enhancer factor 2 (MEF2)活性化を誘導する。これら NFAT や MEF2 などの転写因子活性化により、心肥大関連の遺伝

子発現が亢進し、病的心筋肥大の表現型に至る[34]。この際に NFAT によって B-type natriuretic peptide (BNP, NPPB)や atrial natriuretic peptide (ANP, NPPA)の発現が亢進する事が知られている。

これらのシグナルを活性化するリガンドである norepinephrine ( $\alpha_1$ AR、 $\beta_1$ AR)、phenylephrine ( $\alpha_1$ AR)、isoproterenol ( $\beta_1$ AR)、angiotensin II (AT1R)、endothelin 1 (ET<sub>A</sub>R、ET<sub>B</sub>R)等(括弧内は対応する受容体)のうち、angiotensin II や isoproterenol は、マウスなど小動物で病的心肥大モデルを作製するために広く使用されている。マウスに対しては osmotic pump や薬物ペレットを用いて、angiotensin II では 432  $\mu$ g/kgBW/day もしくはそれ以下の量 (6  $\mu$ g/kgBW/day[35]) での持続投与、isoprotelenol では 0.03—60 mg/kgBW/day の持続投与[36,37,38]を行うことによって、心肥大が惹起される。

#### 2.5.2. 病的心肥大シグナルにおける calcineurin-NFAT 経路

前述のように細胞内カルシウムシグナルの異常により病的心肥大が引き起こされる[39,40,41]が、特にストア作動性カルシウム流入(store-operated calcium entry, SOCE)は calcineurin-NFAT 経路の活性化に寄与していると考えられている[42,43]。この SOCE に関与すると考えられているカチオンチャンネルに transient receptor potential canonical (TRPC) channel があり、その中でも TRPC3、TRPC6 は細胞膜でヘテロ四量体を形成し[44]、calcineurin-NFAT 活性化による心肥大シグナルの

形成に中心的役割を果たしていると考えられている[45,46,47,48,49]。 *In vivo* における検討では、 *Trpc3* と *Trpc6* いずれかのシングルノックアウトマウスは左室圧負荷モデルでの心肥大が抑制されなかったが、 *Trpc3/6* ダブルノックアウトマウスは左室圧負荷モデルでの心肥大が抑制されたため、TRPC3 もしくは TRPC6 単独でも calcineurin-NFAT の活性化を起こしうると考えられる[49]。

実際に calcineurin 酵素活性を測定するには技術的困難を伴う[50]ため、一般に calcineurin-NFAT 経路のシグナル強度を定量するためには、*regulator of calcineurin 1* (*Rcan1*) の messenger RNA (mRNA) 量が測定される[49]。RCAN1 は 2000 年に myocyte-enriched calcineurin interacting protein (MCIP1) として初めて記載された内因性 calcineurin 阻害因子であり[51]、calcineurin-NFAT 経路により数時間以内に発現が誘導される[52]。 *Rcan1* mRNA 発現量の変化を calcineurin 活性の強度変化と解釈することができる。

### 2.5.3. Wnt シグナル経路と心筋リモデリング

近年の研究から、心筋リモデリングに心臓発生シグナルである Wnt シグナル経路が関与する可能性が示唆されている[53]。Wnt シグナル経路は線虫からヒトまで広く保存されているシグナル経路で、発生初期からの形態形成や器官発生に大きな役割を果たし、組織幹細胞の維持や細胞増殖に寄与しており、これまで発生学や腫瘍学などで精力的に研究され、多数の癌や発生異常と関連してい

る[54,55]。アゴニストである Wnt タンパク質は分泌型糖タンパク質で、細胞表面の7回膜貫通型の Frizzled 受容体に結合することで下流へシグナルが伝達される。細胞内の Wnt シグナル経路は大きく分けて3つあり、(1) Wnt/ $\beta$ -catenin 経路とも呼ばれる canonical Wnt 経路、(2) non-canonical Wnt 経路の1つに分類される Planar Cell Polarity (PCP)経路、(3) non-canonical Wnt 経路の1つに分類される Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  経路がある。Wnt/ $\beta$ -catenin 経路では Frizzled 受容体と low-density-lipoprotein related protein5/6 (LRP5/6)の複合受容体に Wnt が結合することで、Dishevelled (DVL)タンパクを介して Adenomatous polyposis coli (APC)/Axin/Glycogen synthesis kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )複合体が解消され、APC/Axin/GSK3 $\beta$ 複合体による $\beta$ -catenin の分解促進反応が減弱する事で細胞質 $\beta$ -catenin 量が増加し、これが核移行することで主に T-cell family (TCF)転写因子による転写制御を誘導する。Non-canonical Wnt 経路では LRP5/6 非依存的に Wnt が Frizzled 受容体に結合し、DVL を介して下流のカスケードが惹起される。そのうち PCP 経路では Rho や Rac などの小分子 GTPase が活性化される。Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  経路では G $\alpha$ i や G $\alpha$ q を含む三量体 G タンパク質[56]及び PLC を介して小胞体からカルシウムが放出され、細胞内カルシウム濃度上昇に伴い、PKC、calcineurin、CaMKII が活性化して、NFAT 等を介して転写を調節する。

心臓の研究において、Wnt シグナル経路は心臓発生の側面から精力的に研究

され、心筋細胞分化と second heart field からの形態形成に必須であることが示されているが、心筋リモデリングにおいても Wnt シグナル経路が関与することが示唆されている[53,57]。例えば、Wnt と細胞外で結合し、Frizzled 受容体への Wnt の結合を競合阻害する soluble Frizzled-related proteins (sFRPs)の心筋特異的過剰発現マウスでは心筋梗塞後の梗塞領域や心筋アポトーシスが減少すること、また、マウス心筋梗塞モデルへの sFRP2 過剰発現間葉系幹細胞の心筋内注射で心筋梗塞領域の減少と心機能の改善が得られる[58]ことが報告されている。心筋特異的な DVL 過剰発現マウスは CaMKII 等の活性化と拡張型心筋症様の表現型を示し[57]、*Dvl1* ノックアウトマウスは圧負荷による心肥大が野生型マウスに比べて軽減することが示されている[59]。さらに、 $\beta$ -catenin のコンディショナルな過剰発現または欠損を誘導したマウスに angiotensin II (2 mg/kgBW/day)を投与すると、 $\beta$ -catenin 過剰発現マウスでは左室収縮能が進行性に低下したが、 $\beta$ -catenin 発現抑制マウスでは野生型同胞と比較して心臓の表現型に差を認めなかったことが報告されている[60]。

Wnt シグナルは内因性の抑制を受けており、Dickkopf (DKK)ファミリーや sFRP ファミリーに加えて、Wnt inhibitory factor 1 (WIF1)が分泌型アンタゴニストとして知られている。WIF1 は 1999 年に初めて記載された 379 アミノ残基の分泌タンパクで、10 個の exon から構成される[61]。興味深いことに、この初回報

告では各臓器での発現量について、特に心臓と肺で mRNA 量が多いことが示されている。WIF1 は腫瘍領域の研究で精力的に検討されており、複数の癌組織ではプロモーターの hypermethylation など WIF1 の発現低下が見られる [62,63,64,65,66,67,68] こと、WIF1 の誘導によって p53 及び p21 を介したアポトーシスが誘導され [69,70,71]、動物モデルの xenograft 癌組織は血管新生の抑制とアポトーシス誘導によって増大が抑制されることが報告されている [69]。なお、WIF1 は connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) と結合し、軟骨細胞において CTGF の軟骨マトリックス発現誘導能を阻害し [72]、卵巣腫瘍由来細胞系列での検討では WIF1 は vascular endothelial growth factor (VEGF) 受容体 type 2 と結合し、VEGF による phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt のリン酸化と GSK3 $\beta$  の Ser 9 リン酸化を減少させる [71] など、Wnt 阻害以外の生理活性を有することも知られている。心臓において WIF1 の役割は不明であり、これまでに心筋特異的ヒト WIF1 過剰発現マウスが生後 1 ヶ月から進行性の左室拡大と左室収縮能低下を示すことが報告されているのみである [73]。

本研究では特にこの Wnt シグナル経路と次項に示す心筋アポトーシスに着目している。

#### 2.5.4. 心筋リモデリングとアポトーシス

心筋のリモデリングにおいては、心肥大反応の他に、細胞死と、その部分へ

の線維組織の置換が重要であることが知られている[74]。この心筋細胞死はプログラム細胞死であり、アポトーシス、プログラム細胞壊死(programmed necrosis)[75]、オートファジー[76]の3つの関与が示されている[34,77]。アポトーシスは GPCR、サイトカイン、活性酸素の下流で生じ、中でも GPCR の下流では、CaMKII や[78]、PKC を介した NIX (BNIP3L)によって[77,79,80]心筋のアポトーシスが促進される。また、PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis)はミトコンドリアを介したアポトーシスを引き起こす事が知られている[81]が、マウス圧負荷モデルの心機能低下における心筋アポトーシスには PUMA が必須であり、*Puma* ノックアウトマウスに左室圧負荷を加えても、心肥大は生じるが、アポトーシスを伴う心機能低下は生じないことが知られている[82]。

## 2.6. 左室と右室の分子生物学的相違点に関する先行研究

ここまでで重要なことは、心筋リモデリングにおけるシグナル伝達経路に関する 2.5 で概説した先行研究は、*in vitro* では cell line または左右心室筋が混在し多くが左室由来心筋である初代培養心筋細胞で検討され、*in vivo* では左室もしくは両心室全体で研究されている点である。

左室と右室を分子生物学的側面から比較した先行研究は複数ある。ヒトにおいては、ヒトの左室または右室心筋サンプルのアレイ解析の結果、既知 12657 遺伝子のうち 53 遺伝子が左右心室筋の間で発現量に差を認めた[83]。拡張型心



筋症または虚血性心筋症患者の右室または左室サンプルの 12000 遺伝子を対象とした発現解析では、20 遺伝子が不全右室心筋と不全左室心筋との間で発現量に差を生じた[84]。また、先天性心疾患においては、左室流出路狭窄または右室流出路狭窄の手術時に採取した肥大側の心室筋サンプルにつきマイクロアレイ解析を行い、心肥大に関連する 175 遺伝子のうち、左室肥大心筋で高発現であったものが 6 遺伝子、右室肥大心筋で高発現であったものが 11 遺伝子であったことが報告されている[85]。

動物における研究では、ベースラインでのマウス左右心室筋・心房筋の発現プロファイルの検討で、**Wnt** シグナルが心室と心房の分化に関与しているのではないかと推測されているが、左右心室の相違点は考察されていない[86]。ストレス応答性の検討では、ラットの心筋梗塞モデルにおいて、左室に心筋梗塞を作成した場合と右室に作成した場合での 13824 遺伝子のマイクロアレイ解析がある。この検討で **sham** 群で右室に多く発現する遺伝子は 729 個あり、左室に多く発現する遺伝子が 208 個あったが、さらなる解析は心リズム関連の遺伝子 120 個に絞って行われ、一部の電位依存性カルシウムチャネルサブユニットが心筋梗塞後の右室でより増加する事などが示されている[87]。また、マウス左室圧負荷と右室圧負荷において、それぞれの心室で発現が増加する遺伝子群の違いがマイクロアレイ解析で検討されており、圧負荷右室では圧負荷左室に見られな

い *Sfrp2*、*Dkk3*、*Wif1* といった Wnt 抑制因子の mRNA 発現上昇を認めている[88]。大動脈-下大静脈シャント作製によるブタ心臓容量負荷モデルでの検討では、angiotensinogen (AGTN)、prepro-endothelin-1 (ppET1)、insulin-like growth factor の 3 遺伝子の左右心室での発現量の挙動が解析され、AGTN と ppET1 が右室心筋で発現が増加していることが示され、これは右室心筋への物理的負荷の増加が左室心筋より多いために起きていると推測されている[89]。ウサギの左右心室圧負荷モデルではプロテオミクスの解析も行われており、圧負荷左室と圧負荷右室で sham と比較して発現が上昇するタンパク質が異なることが示されているが、結果の羅列にとどまっている[90]。

このように分子生物学的観点から、左室と右室の遺伝子発現の違いとストレス応答性の違いの関連を示唆する先行研究は圧負荷・容量負荷・心筋梗塞作製動物を用いたものと複数存在する[2]が、2.2 に述べたように右室と左室では機能的な相違点が大であるので、これらのモデルでの左右心臓に対しての等価なストレスを推測または決定することは困難であり、先行研究で示唆されているストレス応答の違いは、どちらかの心室に過剰なストレスを与えた結果現れた応答の差である可能性を否定できない。病的左室リモデリングの分子生物学的研究を *in vivo* で行う際は、圧負荷・容量負荷・心筋梗塞作製だけでなく、薬剤投与による心肥大シグナルを活性化した動物モデルも利用されるが、これまでの

左室と右室の分子生物学的相違点の検討で薬剤負荷モデルを用いたものは認められない。

### 3. 目的

以上のように、心不全においては左心系だけでなく右心系も問題となるが、これまでの心不全の基礎医学研究は左室に対して詳細に行われてきた。これまで心負荷モデルでの左右心室の反応の相違点については散発的に検討されてきたものの、左室研究と同様な薬剤負荷を行った際の左右心室の網羅的な分子生物学的比較研究は行われていない。臨床的な観察と先行する基礎的検討からは、左室心筋と右室心筋は心不全における分子生物学的シグナル伝達の様式が異なることが予想される。

本研究では、マウスの左室心筋と右室心筋において、薬剤によるストレスに対するシグナル応答に差異があることを仮説 1 とし、この仮説 1 での差異形成の鍵となる遺伝子が存在することを仮説 2 とした。これらの仮説 1、2 を検討することを本研究の目的とした。

## 4. 方法

### 4.1. マウスの実験

マウスは近交系 C57BL/6J (Jackson Laboratory) 及び C57BL/6JJcl (日本クレア) の、生後 8~9 週齢の、体重 20~26 g のものを用いた。餌は Transgenic Dough Diet, Sterile, Bacon flavor (Bio-Serv, #S3472)を用いた。マウスを用いた実験は全て実施施設の動物実験委員会の承認、すなわち、東京大学医学部動物実験委員会の承認 (承認番号: 医-P14-084)、Johns Hopkins University Animal Care and Use Committee の承認 (承認番号: MO1M379) のもとで行われた。

#### 4.1.1. 遺伝子改変マウスとその特徴

##### 4.1.1.1. 心筋特異的 Gαq 過剰発現マウス

Johns Hopkins Medical Institute で飼養していたこのマウスは、心筋特異的とされる  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ MHC)プロモーターの下流で Gαq タンパクが過剰発現するように設計された、D'Angelo らによって 1997 年に発表された[91]マウスで、このグループ (Dorn II ら) から譲渡されたものである。このマウスは心筋特異的な Gαq の過剰発現をもとにした、拡張型心筋症様の表現型を示すことが知られている。

##### 4.1.1.2. Calcineurin Aβノックアウトマウス

Johns Hopkins Medical Institute で飼養していたこのマウスは、*calcineurin* の Aβ

サブユニットを全身でノックアウトした、Bueno らによって 2002 年に発表された[37]マウスで、このグループ (Molkentin ら) から譲渡されたものである。このマウスは angiotensin II や isoproterenol の持続投与や圧負荷による心肥大が起きないことが知られている[37]。

#### 4.1.1.3. *Trpc3*・*Trpc6* ダブルノックアウト (*Trpc3/6* DKO) マウス

Johns Hopkins Medical Institute で飼養していたこのマウスは、*Trpc3* と *Trpc6* の両遺伝子を全身でノックアウトしたマウスである。これは、Hartmann らから譲渡された *Trpc3* ノックアウトマウス[92]と、Dietrich らから譲渡された *Trpc6* ノックアウトマウス[93]より、Johns Hopkins Medical Institute で作出され、2014 年に初めて記載されたマウスであり、圧負荷による心肥大反応が減弱している[49]。

#### 4.1.2. 非観血血圧測定

マウスの血圧測定は、MK2000ST NP-NIBP MONITOR (室町機械株式会社) を用いて行った。マウスを保定具によって保定し、尾動脈に cuff-pulse sensor を装着し、暗所にて十分な安静を確認した後、3 回測定し、最大血圧、最小血圧、平均血圧の各項目につき 3 回の平均値を測定値とした。

#### 4.1.3. 投薬方法

マウスに対する薬剤の全身投与は、osmotic pump での持続皮下投与で行った。薬剤を充填した ALZET osmotic pump (DURECT Corporation、model 1002) を背

部皮下に植え込む手術は次の通りである：isoflurane（エスカイン吸入麻酔液、ファイザー株式会社）の吸入と、etomidate（東京化成化学, #E0897）200 µg の腹腔内注射で十分な麻酔を得たのち、後頸部皮膚を除毛ののち切開し、そこから皮下に尾側に十分長くトンネルを作成し、その奥にポンプを留置して閉創した。薬剤は、angiotensin II (Sigma-Aldrich, #9525)、(-)-isoproterenol hydrochloride (Sigma-Aldrich, #I6504)の生理食塩液溶液を使用し、それぞれ 432 µg/kgBW/day、15 mg/kgBW/day で2週間投与した。

#### 4.1.4. 左室・右室心筋組織の分離と摘出

マウス成体心筋組織の分離と摘出は次の通り行った。マウスを頸椎脱臼で安楽死の後に開胸して心臓を摘出し、phosphate buffered saline (PBS; 136.9 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)で心臓を十分洗った後、全心臓の重量を計測し、心房と大血管を除去し、右室自由壁を心室中隔の右室接合部を切離する事で得て、右室自由壁と、残った心室中隔及び左室自由壁の重量を測定した。右室自由壁は心室中隔接合部から 0.5 mm～1 mm 程度を捨て、残りを次の実験に供した。左室は心尖部・心室中隔・左室自由壁に分け、左室自由壁は右室接合部から 0.5 mm～1 mm 程度を捨て、残りを次の実験に供した。

マウス新生仔心筋組織の左右の分離は次の通り行った。断頭にて安楽死の後、実体顕微鏡下で開胸して心臓を摘出し、右室自由壁と左室自由壁を実体顕微鏡

下で分離・採取して、次の実験に供した。

#### 4.2. マウス成体心筋細胞単離

成体マウスからの心筋細胞単離は Shioya による方法[94]を一部改変して行った。すなわち、用いる cell isolation buffer (以下 CIB) は 37°C で pH 7.4 に調整し 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターで処理したもので、組成は次の通りである : 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.33 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 22 mM dextrose, 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)。マウスに unfractionated heparin sodium (ヘパリンナトリウム注、エイワイファーマ) 100 単位を腹腔内投与し、その 10 分後に頸椎脱臼にて安楽死させ、即座に仰臥位にして開胸し、左房と上行大動脈で周囲から切離して心臓を摘出し、0.4 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)を含む氷冷 CIB に入れ心停止を得た。次いで 2 本の鋭なピンセット (Dumont, #7) を用いて、氷冷 CIB から取り出して 30 秒以内に、摘出した心臓の上行大動脈断端を、実体顕微鏡下で 22G のカニューレ (Radnoti, #130164-22) にカニューレーションして 5-0 絹糸にて固定し、37°C に加温した 0.4 mM EGTA 含有 CIB を 4 mL/min の流速で 1 分灌流した後、37°C に加温した 1 mg/mL の collagenase type II (Worthington, #CLS-2)、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Protease from *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, #P8811)、0.1 mM の  $\text{Ca}^{2+}$ を含む CIB (これを No. 1 CIB と呼ぶ) を 1.2 mL/min の流速にて 8 分 30 秒灌流した。灌流後の心臓



を心室基部にて横切し、その心尖部側につき、右室自由壁と左室自由壁を分けて取り出し、それぞれ、37°Cに加温した、1 mg/mL の collagenase type II、50 µg/mL の protease、2 mg/mL の bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, #A7906)(以下 BSA)、0.1 mM の Ca<sup>2+</sup>を含む CIB（これを No. 2 CIB と呼ぶ）5 mL の中にて、眼科用剪刀で 30 回ミンスしたのち大口径のスポイトで 30 回愛護的にピペティングを行う事で細胞を懸濁し、メッシュ径 0.2 mm のメッシュを通過させ細胞懸濁液を回収した。この細胞懸濁液を 300 rpm、2 分で遠心して上清を除去すると、残ったペレットは心筋細胞優位の細胞ペレットであり、次のステップに用いた。

RNA 抽出に用いる場合は、このペレットに TRI reagent (Molecular Research Center, #TR118) 1 mL を加えて再懸濁する事で後の実験に供した。

#### 4.3. RNA sequencing (RNA-seq)とその解析

##### 4.3.1. RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads)の算出

RNA-seq のために上記 4.2 のごとく調製した左右心室筋細胞ペレットから total RNA を抽出し、そのうち polyA が付加されたものを TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina, #RS-122-2101)で精製してライブラリを作成し、Genome Analyzer II (Illumina)でシーケンスした。得られた raw data は UCSC Genome Informatics ([www.hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html#mouse](http://www.hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html#mouse)) で得られる C57BL/6J 由来マウスリファレンスゲノム mm9 にアライメントし、統計解析ソフ

ト R 上で、パッケージツール DEGseq (version 1.16.0)[95]を用いて mRNA 発現量の指標としての RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads)を算出した。なお、RNA-seq により解析した心筋細胞ペレットは、vehicle 2 週間投与群(n = 3)の右室と左室、angiotensin II 432 mg/kgBW/day 2 週間投与群(n = 3)の右室と左室由来である。

#### 4.3.2. RPKM の解析

上記の vehicle 群について、左室心筋と右室心筋で RPKM の違いを paired Student's *t* test で検定し、(左室 RPKM の平均値) / (右室 RPKM の平均値) および (右室 RPKM の平均値) / (左室 RPKM の平均値) を計算した。また、angiotensin II (Ang II)刺激によって右室 RPKM と左室 RPKM の示す挙動は、vehicle 群と比較して減少・不変・増加のいずれかに、次の方法で判定した。まず、vehicle 群左室 RPKM と Ang II 群左室 RPKM の差を unpaired Student's *t* test で検定しその *P* 値を  $P_L$  とし、(Ang II 群左室 RPKM の平均値) / (vehicle 群左室 RPKM の平均値) を算出し  $FC_L$  とした。次に、vehicle 群右室 RPKM と Ang II 群右室 RPKM の差を unpaired Student's *t* test で検定しその *P* 値を  $P_R$  とし、(Ang II 群右室 RPKM の平均値) / (vehicle 群右室 RPKM の平均値) を算出し  $FC_R$  とした。Vehicle 群と比較した Ang II 群の RPKM につき、左室においては、 $FC_L \leq 0.67$  を減少、 $0.67 < FC_L < 1.5$  かつ  $P_L \geq 0.05$  を不変、 $FC_L \geq 1.5$  を増加と定義し、右室においては

$FC_R \leq 0.67$  を減少、 $0.67 < FC_R < 1.5$  かつ  $P_R \geq 0.05$  を不変、 $FC_R \geq 1.5$  を増加と定義した。

#### 4.3.3. Gene ontology 解析

DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [96,97] の Functional Annotation Tool を用いた。得られた遺伝子リストを入力し、Gene Ontology 内、GOTERM\_BP\_FAT が示すリストを参照した。

#### 4.4. ラット新生仔心筋細胞単離と初代培養

日齢 1~3 の Wister rat 新生仔をイソフルランで麻酔したのち、70 %アルコールに浸漬し、無菌的に開胸し心臓を摘出した。摘出した心臓は 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター済み氷冷の修正 Krebs-Henseleit (KH)バッファー (NaCl 140 mM, KCl 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, HEPES 10 mM, dextrose 12.5 mM, pH 7.4 [37°C]) 内で心臓 1 個あたり 6 分割した。これをマグネティックスターラー入りの滅菌済みビーカーに集め、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の collagenase type II と 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の trypsin (Life Technologies, #15090-046) を含む KH バッファー (37°C) 内で 15 分攪拌して細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液は、等量の、10% FBS・penicillin-streptomycin 添加 Dulbecco's modified Eagle medium (Nacalai Tesque, #08459-06) (以下 10%FBS-DMEM) と混合して回収した。このステップを 6 回繰り返し細胞懸濁液を得て、800 rpm・5 分の遠心で細胞ペレットを得て、これ

を新生仔 20 匹当たり 10 mL の 10%FBS-DMEM 培地で再懸濁し、75 cm<sup>2</sup> フラスコ内で 37°C で 90 分間培養の後、上清の細胞懸濁液を回収して、5 x 10<sup>5</sup>/mL の濃度に調整して 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma-Aldrich, #B5002) を終濃度 0.1 mM で加えて培養皿に播種した。翌日には培地を BrdU 非含 10%FBS-DMEM に交換した。

#### 4.5. 新生仔ラット初代培養心筋細胞を用いた実験

##### 4.5.1. 新生仔ラット初代培養心筋細胞に対する siRNA のトランスフェクション

単離・播種した翌日に培地を BrdU 非含 10%FBS-DMEM に交換した後、37°C で 1 時間培養し、さらに細胞 5 x 10<sup>5</sup> あたり siRNA 10 pmol、Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies, # 13778075) 1 μL となるように Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, #31985070) で 37°C ・ 5 時間培養して siRNA をトランスフェクションした後、培地を 10%FBS-DMEM に交換した。

siRNA は、Silencer Select Negative Control No. 1 siRNA (Life Technologies, #4390843)、Silencer Select Pre-designed siRNA, Wif1, siRNA ID: s137744 (Life Technologies)を用いた。

##### 4.5.2. 薬剤による刺激

上記、siRNA のトランスフェクションの 24 時間後から薬剤刺激を行った。培地を Insulin, Transferrin, Selenium, Ethanolamine Solution (Life Technologies,

#51500-056) 添加抗生剤含有 DMEM (以下 ITS-DMEM) に交換し、刺激薬剤を添加した。刺激薬剤の種類・最終濃度・刺激時間は次の通りである。過酸化水素 (Wako, #081-04215) は 20  $\mu$ M または 50  $\mu$ M で 24 時間、angiotensin II は 1  $\mu$ M で 48 時間、phenylephrine (ネオシネンジコーワ注、興和) は 20  $\mu$ M で 48 時間。

#### 4.6. RNA 単離とリアルタイム polymerase chain reaction (PCR)による mRNA 定量

組織片または細胞ペレットからの RNA 抽出は、TRI reagent を用いた。組織片は TRI reagent 内でホモジェナイザーで破碎し、培養細胞は培地除去後に TRI reagent を加え十分なピペティングで懸濁した。製品インストラクションに従い抽出した total RNA ペレットを蒸留水で溶解した後 NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) で溶液の吸光度を測定して RNA 濃度を調整し、High capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies, #4387406) で製品インストラクションに従い逆転写して、各サンプルの cDNA ライブラリを得た。この cDNA を用いて、各種遺伝子のプライマーミックスと SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, #4309155) または Taqman Gene Expression Master Mix (Life Technologies, #4369016) (Johns Hopkins University にて結果 5.1.4.まで及び結果 5.1.6.) と、もしくは THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, #QPS-201) または THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, #QPS-101) (東京大学にて結果 5.1.5.と 5.2.以降) とを混合し、CFX 384 Touch (Bio-Rad) (結果 5.1.4.まで及

び結果 5.1.6.) または LightCycler480 (Roche Applied Science) (結果 5.1.5.と 5.2.以降) を用いて、リアルタイム PCR を行った。

表 1 SYBR Green 法で用いたプライマーの一覧

Gene	Forward primer	Reverse primer
Mouse		
<i>Bnp (Nppb)</i>	5'-AAGTCCTAGCCAGTCTCCAGA-3'	5'-GAGCTGTCTCTGGGCCATTTC-3'
<i>Anp (Nppa)</i>	5'-TCGTCTTGGCCTTTTGGCT-3'	5'-TCCAGGTGGTCTAGCAGGTTCT-3'
<i>Gapdh</i>	5'-CATGGCCTTCCGTGTTTCCTA-3'	5'-CCTGCTTACCACCTTCTTGAT-3'
<i>Postn</i>	5'-TAGCCCAATTAGGCTTGGCATC-3'	5'-TAAGAAGGCGTTGGTCCATGCT-3'
<i>Pecam1</i>	5'-CGGTGTTTCAGCGAGATCC-3'	5'-ACTCGACAGGATGGAAATCAC-3'
<i>Wif1</i>	5'-GCCACGAACCCAACAAGT-3'	5'-TCCCTTCTATCCTCAGCCTTT-3'
<i>Puma (Bbc3)</i>	5'-ATGGCGGACGACCTCAAC-3'	5'-AGTCCCATGAAGAGATTGTACATGAC-3'
<i>Nix (Bnip3l)</i>	5'-AAGAGGCAGTTCGCACTGTGACA-3'	5'-TCTACAACCTTCTTCTTCTGACTGAGAGCTG-3'
<i>Casp3</i>	5'-TCAGAGGCGACTACTGCCGGA-3'	5'-CCACCGGTATCTTCTGGCAAGCC-3'
<i>Ctgf</i>	5'-AGCCTCAAACCTCCAAACACC-3'	5'-CAACAGGGATTTGACCAC-3'
<i>Sosc3</i>	5'-GGGTGGCAAAGAAAAGGAG-3'	5'-GTTGAGCGTCAAGACCCAGT-3'
<i>Rgs2</i>	5'-GCAAGAAAAGCAAACAGCAA-3'	5'-AATGCAGCCAGCCCATATT-3'
<i>Aqp4</i>	5'-TGGAGGATTGGGAGTCACC-3'	5'-TGAACACCAACTGGAAAGTGA-3'
<i>Notch4</i>	5'-ACAACCTGCCCTGTACC-3'	5'-CAGCCACCCAGTTCTGTCTC-3'
<i>Nos3</i>	5'-TGATACGCTATGCGGGCTA-3'	5'-CAGCCATGTTGGATACAGAGC-3'
Rat		
<i>Wif1</i>	5'-TTTGCCTCCAGGACTTG-3'	5'-TGCATTTACCTCCGTTTCG-3'
<i>Puma (Bbc3)</i>	5'-AGTGCGCCTTCACTTTGG-3'	5'-GGCTCATATGCTCTTCACAGG-3'
<i>Nix (Bnip3l)</i>	5'-TGATGTTGAGATGCACACCAG-3'	5'-AGCCTCAACTTCTTTTCTCCA-3'
<i>Gapdh</i>	5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3'	5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'

SYBR Green 法で用いたプライマーの塩基配列は表 1 に示すとおりである。蛍光プローブ法でのプライマーは次の commercial primers を用いた。Mouse *Rcan1*, Mm01213407\_m1; mouse *Trpc3*, Mm00444690\_m1; mouse *Trpc6*, Mm0043441\_m1; 18S rRNA, #4319413E Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (全て Life

Technologies)。

#### 4.7. タンパク質抽出、Western blotting とその解析

培養細胞からのタンパク質抽出は 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 添加 Cell Lysis Buffer (CellSignaling, #9803) を用い、組織からのタンパク質抽出は 10 mL 当たり 1 錠の cOmplete Mini EDTA-Free (Roche Applied Science, #1836170) と 1 錠の PhosSTOP (Roche Applied Science, #04906845001) を溶解した 1 mM PMSF 添加 Cell Lysis Buffer を用いて Cell Lysis Buffer の製品説明に準じて行った。すなわち、組織は氷冷 Cell Lysis Buffer 内でホモジェナイズし、細胞は氷冷 PBS で一度簡単に洗浄した後、氷冷 Cell Lysis Buffer に懸濁の後 15 秒間超音波破碎を行い、それぞれの溶解液を 14000 g・10 分間遠心し、上清をタンパク質溶液とした。タンパク質溶液は BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, #23227) でタンパク質濃度を定量して至適濃度に調整した。濃度調整後、NuPAGE LDS Sample Buffer (Life Technologies, #NP0007) と 0.1 M dithiothreitol を添加し、95°C・10 分間の変性処理を行ったものを、SuperSep Ace 5-20% ポリアクリルアミドゲル (Wako, #197-15011) にアプライして 25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) バッファー (Life Technologies, #LC2675-5) で 100 V・60 分に引き続き 150 V・90 分の電気泳動を行った。これを 10% methanol 添加 Tris-glycine 転写バッファー (Bio-rad, #161-0771) 内で、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  の

polyvinylidene difluoride 膜 (Immun-Blot PVDF membrane, Bio-Rad, #162-0177)に 35V・90 分で転写した。転写膜は 5% nonfat dry milk、0.1% Tween-20 (Sigma-Sldrich, #P2287) 添加 Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl)中 で室温下 1 時間ブロッキングし、一次抗体で 4°C下 12 時間インキュベートし、 0.1% Tween-20 添加 TBS (以下 TBST) で各 5 分 3 回洗浄の後、二次抗体 (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, #sc-2004) で室温下 1 時間インキュベーションした。最後に TBST で各 5 分 6 回洗浄して、化学発光基質として ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, #RPN2232) または SuperSignal West Femto Maxmum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, #34094) を加えて、X 線フィルムへの感光または LAS-4000mini (Fujifilm, Japan) での撮影により化学発光像を得た。一次抗体は 5% nonfat dry milk 加 TBST にて括弧内の希釈率で次を希釈して使用した。Santa Cruz Biotechnology: Gαq/11 (1:200), #sc-392。Cell Signaling Technology: cleaved Caspase-9 (1:500), #9509; GAPDH (1:10000), #5174。

得られた化学発光像につき、バンドの定量は画像処理ソフト ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)のパッケージである FIJI (<http://fiji.sc/fiji>)を用いた。

#### 4.8. 統計学的解析

統計学的解析は、RNA-seq のデータについては StataSE 13.1 (StataCorp LP, USA)



を用いた。そのほかは、特に注記しない限り Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA)を用いた。特に注記しない限り、数値の表記は平均±標準偏差を示す。2群間の比較は、特に注記しない限り unpaired Student's *t* test を用いた。3群以上の比較では、one-way ANOVA を用いた。交互作用効果の検討には two-way ANOVA を用いた。有意水準は 0.05 とした。

## 5. 結果

### 5.1. 左右心室筋の mRNA 発現の相違点の探索的解析

#### 5.1.1. B-type natriuretic peptide (*Bnp*)の発現量は左右心室筋組織で大きく異なる

左右心室筋のストレス応答性の相違点を調べるに先立ち、無刺激下での左右心室筋の分子生物学的相違点を探索的に解析した。

心筋の部位によって遺伝子発現が異なるかを簡単に検討するために、心筋組織を右室自由壁(RVF)、心室中隔(IVS)、左室自由壁(LVF)、心尖部(AP)の4つに分割し、病的な心肥大シグナルのバイオマーカーとして知られる B-type natriuretic peptide (BNP)の mRNA 発現量をそれぞれの部位について定量すると、LVF での発現量は RVF と比較して  $3.80 \pm 0.89$  倍と有意に多かった。多重比較検定 (StataSE 13.1 を使用) では、RVF での発現量のみが IVS・AP・LVF と比較して有意に少ないことが示された (図 1)。*Bnp* mRNA 発現量の傾向については、上記に示す心室筋4部位の中では、RVF と、残る IVS・LVF・AP に大きく二分され、右室壁に比べ左室壁では発現が亢進していることが示された。

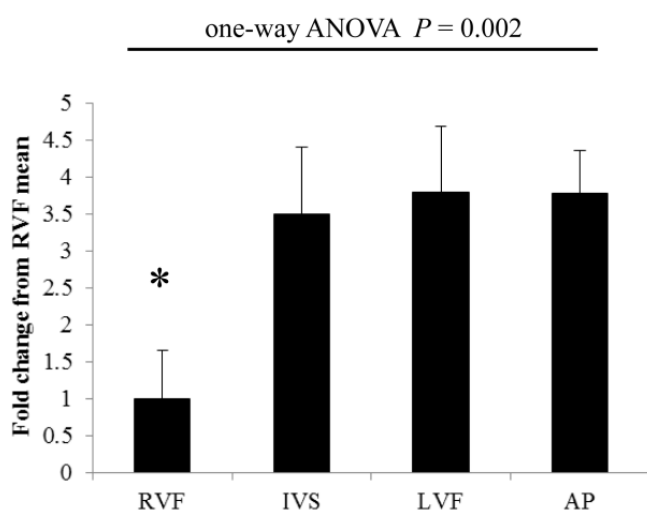


図 1 マウス心臓各部位の *Bnp* mRNA 発現量

RVF での発現量を 1 とした相対値で表現している。略号は本文を参照のこと。\*Bonferroni 補正での多重比較検定で RVF は IVS, LVF, AP 全てに対して有意な差 ( $P = 0.001, 0.002, 0.001$ ) を示した。個体数は  $n = 5$ 。

#### 5.1.2. 左右心室筋の *Bnp* 発現量の違いは、*calcineurin* 経路を介さない

上記 5.1.1 で示された左右心室筋 *Bnp* 発現量の違いが病的な心肥大シグナル経路の鍵分子である *calcineurin* によって調整されている可能性を考え、*calcineurin Aβ* ノックアウトマウスの心臓での *Bnp* などの mRNA 発現量を定量した。*Calcineurin Aβ* ノックアウトマウスにおいても無投薬状態で左右心室に *Bnp* 発現量の差を認めた (図 2)。Angiotensin II ( $432 \mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{day}$ ) を 14 日間投与した後の左右心筋 *Bnp* 発現量には差を認めるが、野生型マウスで認めるような vehicle 投与群と比較しての *Bnp* や *Anp* の発現上昇は認めなかった (図 3)。これより、*Bnp* 発現量の左右心筋での差は *calcineurin* 経路を介しないと結論した。

### 5.1.3. 左右心室筋の *Bnp* 発現量の違いは、*Trpc3/6* 経路を介さない

心肥大シグナルには *Trpc3* や *Trpc6* が関与する[45]が、5.1.2 までで示された左右心筋の *Bnp* 発現の違いに *Trpc3*, *Trpc6* が関与しているかを検討するために *Trpc3*・*Trpc6* ダブルノックアウトマウス (*Trpc3/6* DKO マウス) の心臓での *Bnp* などの mRNA 発現量を定量した。*Trpc3/6* DKO マウスにおいても無投薬状態で左右心室に *Bnp* 発現量の差を認めた (図 2)。Angiotensin II (432 µg/kgBW/day) を 14 日間投与した後の左右心筋 *Bnp* 発現量には差を認めるが、野生型マウスで認めるような vehicle 投与群と比較した *Bnp* や *Anp* の発現上昇は認めなかった (図 3)。これより、*Bnp* 発現量の左右心筋での差は *Trpc3*, *Trpc6* 経路を介しないと結論した。

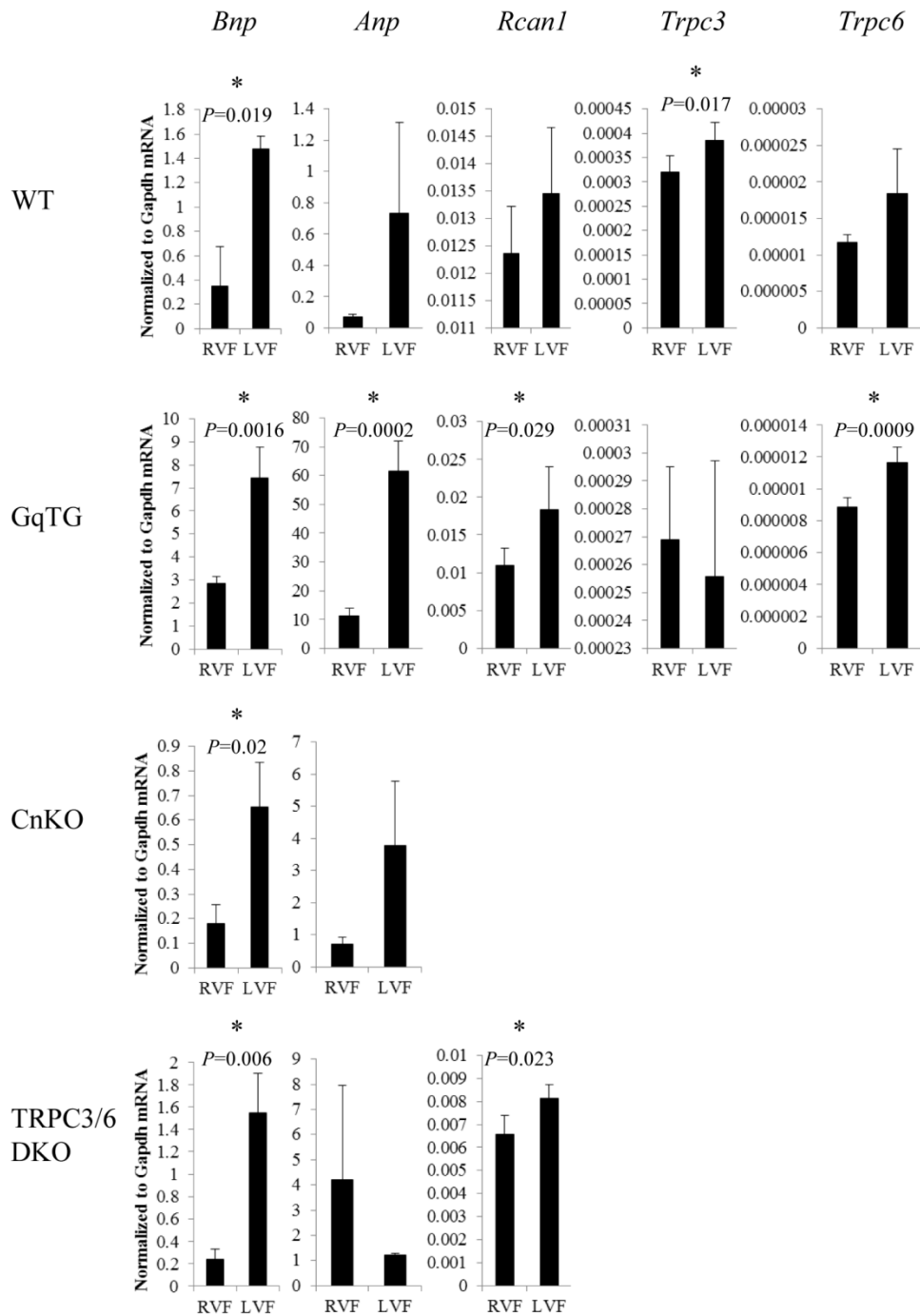


図 2 各種マウスの左右心室筋での mRNA 発現

マウスは、野生型 (WT)、 $\alpha$ MHC-Ga $\alpha$  過剰発現マウス (GqTG)、*Calcineurin A $\beta$*  ノックアウトマウス (CnKO)、*Trpc3*・*Trpc6* ダブルノックアウトマウス (TRPC3/6 DKO) を用いた。Paired *t* test で  $P < 0.05$  を示したものに\*とその  $P$  値を付した。全てのマウスにおいて、未刺激下で右室心筋より左室心筋で *Bnp* mRNA は多い。個体数は WT が  $n = 4$ 、GqTG が  $n = 5$ 、CnKO が  $n = 3$ 、TRPC3/6 DKO が  $n = 4$ 。

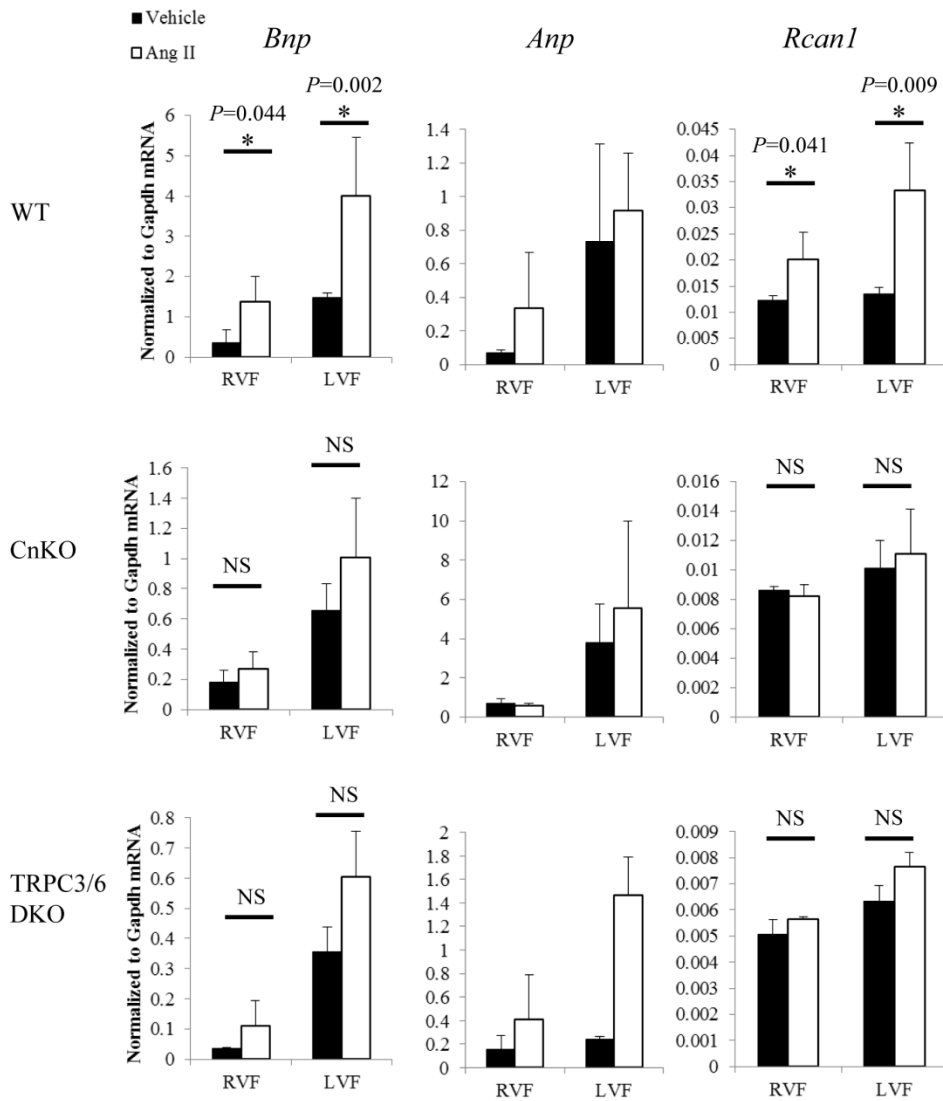


図 3 Angiotensin II 投与後の各種マウス左右心筋の遺伝子発現の変化

マウスの種類の表記は図 2 と同様である。各マウスに angiotensin II (432  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{day}$ ) を 14 日間投与した (Ang II)。野生型で見られる、angiotensin II での *Bnp* mRNA、*Rcan1* mRNA の左右心室筋での上昇は CnKO や TRPC3/6 DKO では見られない。個体数は WT が  $n = 4$ 、CnKO が  $n = 3$ 、TRPC3/6 DKO が  $n = 4$ 。

5.1.4. 左右心室筋で等しい  $G\alpha_q$  過剰発現下でも、*Bnp* 発現量は左室心筋で多い

心筋における  $G\alpha_q$  シグナルは心不全シグナルとして知られている。 $\alpha$ MHC プロモーター制御下での  $G\alpha_q$  過剰発現マウスは心不全を来す[91]が、この 8 週齢マウスでの左右心室筋の *Bnp* 発現量を検討すると、野生型同胞と比較して *Bnp* mRNA 発現量は右室で 13.8 倍、左室で 6.1 倍の高値を示したが、 $G\alpha_q$  タンパクの左右心室筋での発現量に差がないにもかかわらず、左室心筋が右室心筋よりも多く *Bnp* mRNA を発現している点では、野生型同胞と変わりなかった (図 2、図 4)。この結果より、同等の  $G\alpha_q$  刺激の結果としても、*Bnp* mRNA の発現量は左室の方が多いたことが示された。

ここまでの結果で、成体マウスの *Bnp* mRNA は、左室自由壁組織では右室自由壁組織と比べて多く発現しており、その差異には、心不全シグナルの鍵分子として知られる calcineurin や TRPC3/6 の決定的な関与がないことが示された。心不全シグナル経路に関連する分子の中でバイオマーカーとして汎用される *Bnp* にあっても、鍵分子を介さない発現量の左右差を認めるため、左右心室筋の遺伝子発現プロファイルの相違点を網羅的に解析する合理性があると考えられた。

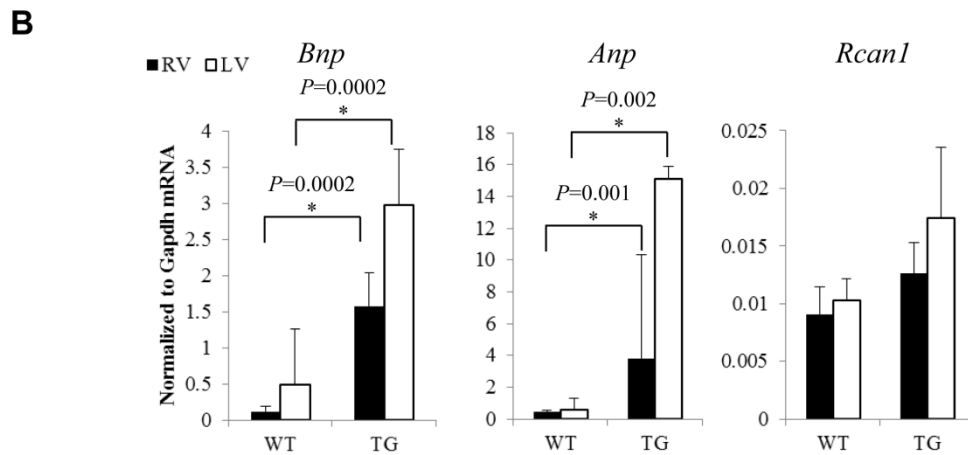
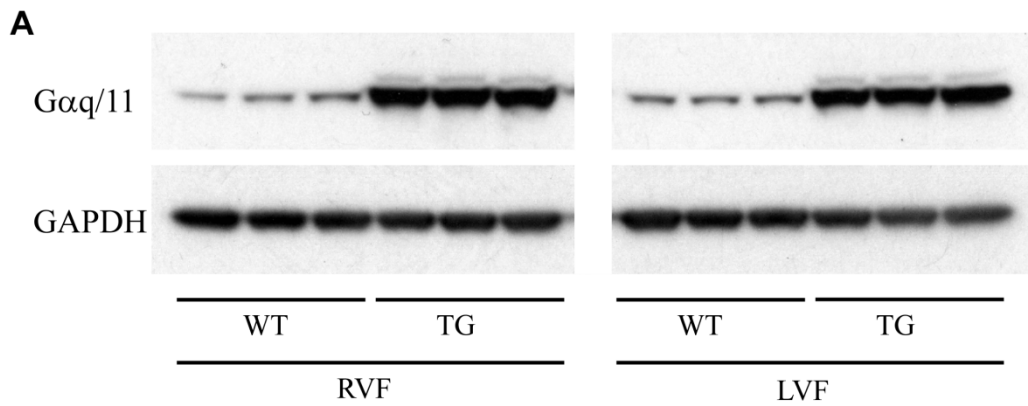


図 4  $\alpha$ MHC-Gαq 過剰発現マウス左右心室筋での、Gαq タンパクの発現と、心不全関連遺伝子の挙動

- A. Gαq/11 の Western blotting. 各レーンにつきタンパク質 25  $\mu$ g をアプライした。左 (LVF) 右 (RVF) 心室筋とも、野生型 (WT) に比べて心筋特異的 Gαq 過剰発現マウス (TG) では、Gαq/11 タンパクの発現が同様に増加しており、その増加について RVF と LVF で大きな差はない。
- B. 左右心室での遺伝子発現の WT と TG の比較。Bnp、Anp mRNA とともに、TG では WT より増加している。TG での Bnp mRNA に左右差があることは図 2 で示した (個体数は各群 n = 5)。



#### 5.1.5. マウス心筋細胞単離手技により大部分の非心筋細胞を除去できる

心筋に対する網羅的な mRNA 発現解析（トランスクリプトーム解析）を行うに際して、心筋組織から抽出した mRNA では、組織サンプルに含まれる組織球や血管内皮細胞などの非心筋細胞の量によってサンプル間のばらつきが生じると推測された。そのため、マウス成体単离心筋細胞ペレットからの RNA をトランスクリプトーム解析の対象とすることを念頭に置き、本研究でのマウス成体心筋細胞単離において、心筋細胞と非心筋細胞がどの程度分離できるかを検討した。

非心筋細胞を代表して、組織球系のマーカーとして *periostin (Postn)*、血管内皮細胞系のマーカーとして *PECAM-1 (Pecam1)* に着目し、心筋細胞単離で得られる細胞ペレットと、その際生じる上清に含まれる細胞成分の mRNA を定量した。*Pecam1* mRNA は上清に有意に多く含まれ (paired Student's *t* test;  $P = 0.039, 0.0008$ )、*Postn* mRNA も上清に多い傾向を示した。これらの平均値の比較では 8 ~ 25 倍程度上清での mRNA 発現量が単離ペレットと比較して多かった。一方、心筋のマーカーと見なせる *Bnp* は、ペレットと上清で mRNA 量の有意な差を認めなかった (図 5)。これらから、本研究での心筋単離は、非心筋細胞の多くを除去することができ、得られた心筋細胞ペレットは心筋組織に比して心筋細胞の割合が濃縮されていることがわかる。

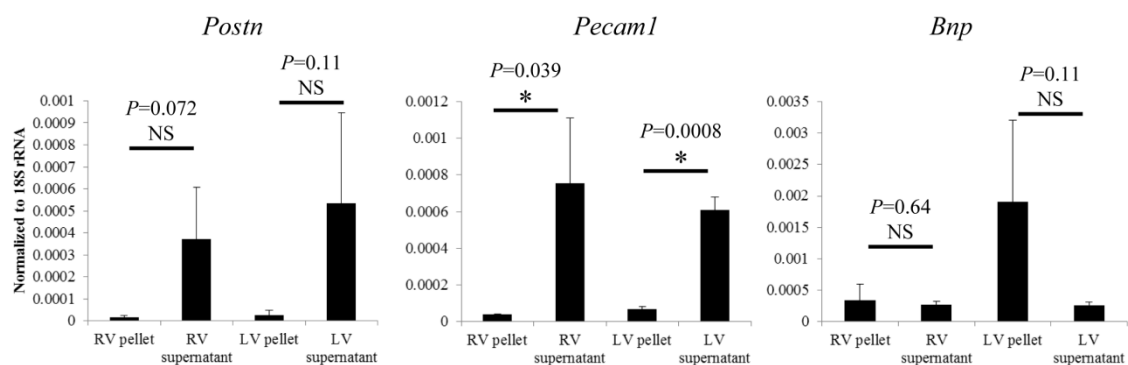


図 5 成体マウス心筋単離における単離ペレットと上清に含まれる mRNA の発現量  
*Pecam1* は左右心室ともに、上清から mRNA を多く検出した。これは、単離手技によって *Pecam1* を含む細胞が多く上清に分けられることを示している。Paired Student's *t* test で  $P < 0.05$  を示したものに\*を付した (個体数は  $n = 4$ )。

#### 5.1.6. 単離直後の左右心室細胞での各種 mRNA 発現量の相違点

心筋組織では右室自由壁と左室自由壁で mRNA の発現プロファイルが異なることが 5.1.4.までの結果から示唆されている。心筋細胞での各種 mRNA 発現量を解析するために、5.1.5 で示したような、高純度な心筋細胞集団である単离心筋細胞ペレットに対して各種遺伝子の mRNA 定量を行った。その結果、野生型マウスにおいて、*Bnp*、*Anp*、*Rcan1*、*Trpc3*、*Trpc6* 全てについて、右室心筋細胞に比べ左室心筋細胞で mRNA の高発現を認めた (図 6)。これまでの心筋組織で検討してきた各遺伝子の mRNA 発現量の差が、単离心筋細胞ペレットでより明瞭に示された。

ここまでの検討の結果、心筋細胞の mRNA 発現のトランスクリプトーム解析

の際には、心筋組織由来 total RNA を用いる手法に比べて、単離心筋ペレット由来 total RNA を用いる方が、心筋細胞の性質をよりよく反映しており、また、個体間のばらつきも少なく、より適切であることが示唆された。

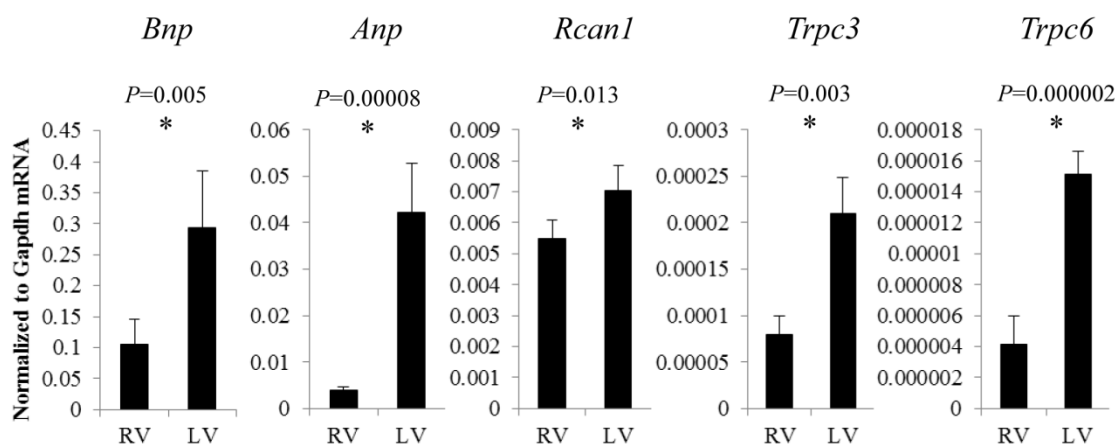


図 6 単離直後の左右心室由来マウス心筋細胞での各種 mRNA 発現  
 野生型マウス(C57BL/6J)から得た単離心筋細胞ペレット由来 mRNA。Paired Student's *t* test で  $P < 0.05$  を示したものに\*を付した (個体数は  $n = 5$ )。

## 5.2. 左右心室筋の RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析

### 5.2.1. 心不全ストレス非存在下での左右心筋細胞 mRNA 発現プロファイル

左右心室のトランスクリプトームの検討を行うため、マウス単離心筋細胞ペレット由来の RNA から RNA-seq を行い、non-coding RNA や micro RNA を含む 22134 遺伝子についてその発現量を解析した。心不全ストレス負荷群として、angiotensin II の 2 週間投与群を設定した。まず、心不全ストレス非存在下と考えられる vehicle 投与群で、心筋細胞単離手技で得た 3 匹の左室自由壁心筋細胞ペレットと右室自由壁心筋ペレットの RPKM を方法 4.3.2. に示す方法で比較して、左室で発現量が多い ( $P < 0.05$ ) 遺伝子は 2112 個、うち 2 倍以上の差がある遺伝子は 145 個であった。右室で発現量が多い ( $P < 0.05$ ) 遺伝子は 280 個、うち 2 倍以上の差がある遺伝子は 14 個であった (表 2)。なお、左右の比較においては発現量が多い方の RPKM が 1 未満の遺伝子は除外した。

Gene ontology 解析では、左室心筋細胞で右室より 1.5 倍以上発現量の多い遺伝子は、“regulation of GTPase mediated signal transduction”や“intracellular signaling cascade”などのカテゴリーに含まれるものが多く、右室心筋細胞で左室より 1.3 倍以上発現量の多い遺伝子は、“negative regulation of signal transduction”, “negative regulation of cell communication”, “negative regulation of Wnt receptor signaling pathway”などのカテゴリーに含まれるものが多く含まれた (表 3)。

これより、心不全ストレス非存在下の左右心筋細胞で mRNA 発現プロファイルに明確な差があることが示された。

表 2 単離心筋細胞集団において左室または右室に多く発現する mRNA

A 左室心筋細胞優位 (2 倍以上) の遺伝子

Gene symbol	Gene name	LV/RV 比 (a/b)	LV の 平均 RPKM (a)	RV の 平均 RPKM (b)	P value
<i>Nppa</i>	natriuretic peptide precursor type A	17.50	64.58	3.69	0.0128
<i>Nrn1</i>	neuritin 1	13.21	6.66	0.50	0.0041
<i>Irx2</i>	similar to iroquois-class homeobox protein IRX2; Iroquois related homeobox 2 (Drosophila)	7.92	1.06	0.13	0.0268
<i>Nppb</i>	natriuretic peptide precursor type B	6.51	152.66	23.47	0.0187
<i>Irx1</i>	Iroquois related homeobox 1 (Drosophila)	4.75	1.59	0.34	0.0032
<i>Isg15</i>	ISG15 ubiquitin-like modifier; predicted gene 9706	3.72	1.53	0.41	0.0188
<i>Pcdh12</i>	protocadherin 12	3.34	1.78	0.53	0.0281
<i>2210010C17Rik</i>	RIKEN cDNA 2210010C17 gene	3.34	1.08	0.32	0.0265
<i>Irx5</i>	Iroquois related homeobox 5 (Drosophila)	3.21	1.31	0.41	0.0224
<i>Acta1</i>	actin, alpha 1, skeletal muscle	3.19	184.02	57.64	0.0103
<i>Bcl6b</i>	B-cell CLL/lymphoma 6, member B	3.15	2.40	0.76	0.0211
<i>Ankrd1</i>	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	3.14	240.43	76.65	0.0127
<i>Rgs4</i>	regulator of G-protein signaling 4	3.11	2.34	0.75	0.0048
<i>Il2rg</i>	predicted gene 614; interleukin 2 receptor, gamma chain	3.09	1.72	0.56	0.0105
<i>Rbp7</i>	retinol binding protein 7, cellular	3.08	7.09	2.30	0.0325
<i>Aplnr</i>	apelin receptor	3.05	3.32	1.09	0.0440
<i>Sncg</i>	synuclein, gamma	3.00	1.03	0.34	0.0396
<i>Tpm2</i>	tropomyosin 2, beta	3.00	1.50	0.50	0.0227
<i>Fmn13</i>	formin-like 3	2.96	2.22	0.75	0.0278
<i>Gimap8</i>	GTPase, IMAP family member 8	2.94	1.50	0.51	0.0326
<i>Podxl</i>	podocalyxin-like	2.92	12.74	4.36	0.0454
<i>P2ry14</i>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	2.88	1.03	0.36	0.0017
<i>Sema7a</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI membrane anchor, (semaphorin) 7A	2.84	4.33	1.52	0.0335
<i>Mir1839</i>	microRNA 1839	2.84	4.41	1.55	0.0400
<i>Gnb3</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 3	2.82	2.69	0.95	0.0363
<i>Arhgef15</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 15	2.81	5.12	1.82	0.0380
<i>Hey1</i>	hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	2.81	2.59	0.92	0.0386
<i>Zfp366</i>	zinc finger protein 366	2.81	2.40	0.85	0.0436
<i>Ctsk</i>	cathepsin K	2.80	1.06	0.38	0.0294
<i>Fgfr3</i>	fibroblast growth factor receptor 3	2.78	1.29	0.46	0.0030
<i>Btl9</i>	butyrophilin-like 9	2.77	4.73	1.71	0.0415
<i>Myo1b</i>	myosin IB	2.76	1.91	0.69	0.0478
<i>Gimap4</i>	GTPase, IMAP family member 4	2.75	4.14	1.50	0.0331
<i>Eltl1</i>	EGF, latrophilin seven transmembrane domain containing 1	2.73	9.90	3.62	0.0309
<i>Arap3</i>	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 3	2.72	4.59	1.69	0.0244
<i>Ets1</i>	E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain	2.71	5.24	1.93	0.0347
<i>Rassf9</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 9	2.70	2.28	0.85	0.0282
<i>Pcdh1</i>	protocadherin 1	2.69	3.03	1.13	0.0489
<i>Tie1</i>	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	2.67	10.62	3.98	0.0481

<i>Cmpk2</i>	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	2.65	1.44	0.54	0.0198
<i>Postn</i>	periostin, osteoblast specific factor	2.64	2.22	0.84	0.0223
<i>Gpr4</i>	G protein-coupled receptor 4	2.64	1.89	0.72	0.0452
<i>Arhgap27</i>	Rho GTPase activating protein 27; SH3 domain containing 20	2.61	1.46	0.56	0.0235
<i>Sh2d3c</i>	SH2 domain containing 3C	2.61	3.22	1.23	0.0179
<i>Cdh5</i>	cadherin 5	2.60	24.01	9.25	0.0454
<i>Cnksr1</i>	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1	2.59	3.23	1.25	0.0166
<i>Slc26a10</i>	solute carrier family 26, member 10	2.59	3.12	1.21	0.0345
<i>Trim30a</i>	tripartite motif-containing 30A	2.58	1.32	0.51	0.0270
<i>Cav2</i>	caveolin 2	2.58	9.88	3.83	0.0406
<i>Notch4</i>	Notch gene homolog 4 (Drosophila)	2.58	2.60	1.01	0.0291
<i>Sema3g</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3G	2.56	2.53	0.99	0.0294
<i>Tspan13</i>	tetraspanin 13	2.54	9.09	3.58	0.0349
<i>Mxra7</i>	matrix-remodelling associated 7	2.52	1.86	0.74	0.0435
<i>Gucy1b3</i>	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	2.51	2.10	0.84	0.0214
<i>Mcf2l</i>	mcf.2 transforming sequence-like	2.50	6.46	2.58	0.0249
<i>Notch3</i>	Notch gene homolog 3 (Drosophila)	2.50	2.36	0.94	0.0402
<i>She</i>	src homology 2 domain-containing transforming protein E	2.50	1.56	0.63	0.0273
<i>Serpini1</i>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade I, member 1	2.49	1.18	0.48	0.0027
<i>Ebf3</i>	early B-cell factor 3	2.49	1.03	0.41	0.0236
<i>Fgd5</i>	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5	2.48	3.06	1.23	0.0482
<i>9430020K01Rik</i>	RIKEN cDNA 9430020K01 gene	2.46	6.52	2.65	0.0388
<i>Dock9</i>	dedicator of cytokinesis 9	2.44	3.06	1.25	0.0384
<i>Lrrc8c</i>	leucine rich repeat containing 8 family, member C	2.43	3.12	1.28	0.0311
<i>Pdgfrb</i>	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	2.42	5.23	2.16	0.0362
<i>Shroom4</i>	shroom family member 4	2.42	1.66	0.69	0.0135
<i>Rasgrp2</i>	RAS, guanyl releasing protein 2	2.42	3.78	1.56	0.0077
<i>Ccde85a</i>	coiled-coil domain containing 85A	2.41	1.31	0.54	0.0124
<i>Rgs5</i>	regulator of G-protein signaling 5	2.41	50.52	20.98	0.0413
<i>Shank3</i>	SH3/ankyrin domain gene 3	2.40	3.71	1.54	0.0359
<i>Rapgef3</i>	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	2.39	2.48	1.04	0.0074
<i>Dll4</i>	delta-like 4 (Drosophila)	2.39	2.45	1.02	0.0422
<i>Hspa12b</i>	heat shock protein 12B	2.37	4.93	2.08	0.0407
<i>Timp4</i>	tissue inhibitor of metalloproteinase 4	2.37	13.82	5.84	0.0353
<i>BC020535</i>	cDNA sequence BC020535	2.36	3.34	1.42	0.0038
<i>Flt1</i>	FMS-like tyrosine kinase 1	2.36	9.50	4.03	0.0205
<i>Ifi203</i>	similar to Interferon-activatable protein 203 (Ifi-203) (Interferon-inducible protein p203); similar to interferon activated gene 203; interferon activated gene 203	2.35	2.05	0.87	0.0370
<i>Ptprb</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	2.35	7.78	3.31	0.0403
<i>Kitl</i>	kit ligand	2.35	10.25	4.36	0.0281
<i>Ndufa4l2</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2	2.35	3.47	1.48	0.0474
<i>Cav1</i>	caveolin 1, caveolae protein	2.34	47.47	20.25	0.0470
<i>Tshz2</i>	teashirt zinc finger family member 2	2.34	1.39	0.59	0.0288
<i>Mcc</i>	mutated in colorectal cancers	2.34	1.01	0.43	0.0395
<i>Ly6a</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	2.33	29.35	12.59	0.0480
<i>Aspn</i>	asporin	2.32	4.02	1.73	0.0358
<i>Mybpc2</i>	myosin binding protein C, fast-type	2.31	4.08	1.76	0.0140
<i>4933436C20Rik</i>	RIKEN cDNA 4933436C20 gene	2.30	1.20	0.52	0.0267
<i>Sdc3</i>	syndecan 3	2.30	5.02	2.19	0.0324
<i>Bdh1</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	2.30	31.05	13.53	0.0125
<i>Oas2</i>	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	2.29	1.79	0.78	0.0384
<i>Vtn</i>	vitronectin	2.29	3.30	1.44	0.0341
<i>Plekhg1</i>	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1	2.28	1.39	0.61	0.0098
<i>Ttl7</i>	tubulin tyrosine ligase-like family, member 7	2.28	1.32	0.58	0.0253
<i>Ehd2</i>	EH-domain containing 2	2.28	15.87	6.97	0.0423
<i>Ablim3</i>	actin binding LIM protein family, member 3	2.28	7.12	3.13	0.0410
<i>BC006779</i>	cDNA sequence BC006779	2.27	2.29	1.01	0.0171

<i>Dach1</i>	dachshund 1 (Drosophila)	2.27	1.25	0.55	0.0415
<i>Gpr116</i>	G protein-coupled receptor 116	2.26	18.34	8.10	0.0249
<i>Kank3</i>	KN motif and ankyrin repeat domains 3	2.25	7.07	3.14	0.0303
<i>Gnb4</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 4	2.24	1.38	0.61	0.0211
<i>Unc5b</i>	unc-5 homolog B (C. elegans)	2.24	1.60	0.72	0.0415
<i>Rgs3</i>	regulator of G-protein signaling 3	2.23	1.53	0.69	0.0422
<i>Cyp26b1</i>	cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	2.22	1.74	0.78	0.0212
<i>Egfl7</i>	EGF-like domain 7	2.22	11.72	5.28	0.0156
<i>Abcb1a</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	2.21	2.68	1.21	0.0382
<i>Sp100</i>	nuclear antigen Sp100	2.21	2.46	1.12	0.0140
<i>Coro2b</i>	coronin, actin binding protein, 2B	2.20	1.42	0.65	0.0462
<i>Sipa1</i>	signal-induced proliferation associated gene 1	2.19	1.82	0.83	0.0484
<i>Lims2</i>	LIM and senescent cell antigen like domains 2	2.18	14.22	6.52	0.0500
<i>Arhgap31</i>	CDC42 GTPase-activating protein	2.18	4.19	1.92	0.0431
<i>Cdc42ep4</i>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4	2.18	2.29	1.05	0.0444
<i>B4galt4</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4	2.18	2.18	1.00	0.0012
<i>Spns2</i>	spinster homolog 2 (Drosophila)	2.17	1.55	0.71	0.0352
<i>Adcy4</i>	adenylate cyclase 4	2.17	2.38	1.10	0.0409
<i>Prkd2</i>	protein kinase D2	2.16	2.20	1.02	0.0346
<i>Tmem88</i>	transmembrane protein 88	2.16	2.53	1.17	0.0412
<i>Tmem204</i>	transmembrane protein 204	2.16	5.70	2.64	0.0415
<i>Dpysl3</i>	dihydropyrimidinase-like 3	2.15	2.72	1.26	0.0087
<i>1500017E21Rik</i>	RIKEN cDNA 1500017E21 gene	2.15	1.40	0.65	0.0115
<i>Masp1</i>	mannan-binding lectin serine peptidase 1	2.14	2.13	0.99	0.0372
<i>Vwa3a</i>	von Willebrand factor A domain containing 3A	2.14	1.93	0.90	0.0005
<i>Rin3</i>	Ras and Rab interactor 3	2.14	2.41	1.13	0.0127
<i>Gng11</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	2.13	6.80	3.19	0.0172
<i>Ndrg1</i>	N-myc downstream regulated gene 1	2.13	4.38	2.05	0.0149
<i>Dok4</i>	docking protein 4	2.13	2.28	1.07	0.0459
<i>Mmrn2</i>	multimerin 2	2.12	3.96	1.87	0.0314
<i>Tinagl1</i>	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	2.12	8.10	3.83	0.0497
<i>Gck</i>	glucokinase	2.11	21.05	9.98	0.0113
<i>Grap</i>	GRB2-related adaptor protein	2.11	2.29	1.09	0.0470
<i>Hecw2</i>	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	2.10	1.29	0.61	0.0326
<i>Gpr56</i>	G protein-coupled receptor 56	2.10	8.03	3.82	0.0182
<i>Cd38</i>	CD38 antigen	2.09	2.15	1.03	0.0188
<i>Notch1</i>	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	2.08	3.01	1.44	0.0289
<i>Stat2</i>	signal transducer and activator of transcription 2	2.07	1.70	0.82	0.0177
<i>Srgn</i>	serglycin	2.06	8.16	3.96	0.0420
<i>Slc9a3r2</i>	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 2	2.06	14.52	7.04	0.0337
<i>Rtn4r</i>	reticulon 4 receptor	2.06	4.64	2.26	0.0182
<i>Phldb2</i>	pleckstrin homology-like domain, family B, member 2	2.05	1.82	0.89	0.0181
<i>Gja4</i>	gap junction protein, alpha 4	2.04	1.28	0.63	0.0078
<i>Ptgds</i>	prostaglandin D2 synthase (brain)	2.04	274.89	134.91	0.0172
<i>Prex2</i>	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 2	2.03	1.73	0.85	0.0408
<i>Ddx58</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	2.03	1.23	0.61	0.0059
<i>Shisa5</i>	shisa homolog 5 (Xenopus laevis)	2.02	5.03	2.48	0.0228
<i>Fmn1l</i>	formin-like 1	2.02	1.47	0.73	0.0451
<i>Prkch</i>	protein kinase C, eta	2.02	2.48	1.23	0.0286
<i>Abcg2</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	2.00	5.23	2.61	0.0087

## B 右室心筋細胞優位 (2倍以上) の遺伝子

Gene symbol	Gene name	RV/LV 比 (b/a)	LV の 平均 RPKM (a)	RV の 平均 RPKM (b)	P value
<i>Chst4</i>	carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 4	8.82	0.18	1.59	0.0440
<i>Wif1</i>	Wnt inhibitory factor 1	6.15	0.54	3.31	0.0030
<i>C2</i>	complement component 2 (within H-2S)	5.93	0.19	1.13	0.0177
<i>H19</i>	H19 fetal liver mRNA	4.62	0.54	2.50	0.0046
<i>Six1</i>	sine oculis-related homeobox 1 homolog (Drosophila)	3.96	0.45	1.78	0.0043
<i>Aldob</i>	aldolase B, fructose-bisphosphate	3.64	1.88	6.85	0.0130
<i>Ubxn10</i>	UBX domain protein 10	3.16	1.54	4.86	0.0123
<i>Ddc</i>	dopa decarboxylase	2.73	0.95	2.60	0.0107
<i>Cytl1</i>	cytokine-like 1	2.72	0.88	2.38	0.0442
<i>Vwf</i>	Von Willebrand factor homolog	2.71	1.26	3.42	0.0422
<i>Aqp4</i>	aquaporin 4	2.60	1.79	4.65	0.0016
<i>Pfkfb1</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 1	2.35	7.01	16.48	0.0080
<i>Npr3</i>	natriuretic peptide receptor 3	2.33	0.71	1.66	0.0413
<i>0610040J01Rik</i>	RIKEN cDNA 0610040J01 gene	2.07	1.35	2.79	0.0198

表 3 左室または右室心筋細胞に多く発現する遺伝子群の Gene ontology 解析

### A 左室心筋細胞優位 (1.5倍以上) の遺伝子群の Gene ontology 解析

Gene ontology term	遺伝子数	%	P value
regulation of small GTPase mediated signal transduction	14	5.05	0.00002
negative regulation of cell motion	6	2.17	0.00008
intracellular signaling cascade	29	10.47	0.00010
blood vessel development	13	4.69	0.00020
vasculature development	13	4.69	0.00025
blood vessel morphogenesis	11	3.97	0.00056
negative regulation of cell migration	5	1.81	0.00063
angiogenesis	9	3.25	0.00064
negative regulation of locomotion	5	1.81	0.00094
Notch signaling pathway	6	2.17	0.00101
phosphate metabolic process	25	9.03	0.00136
phosphorus metabolic process	25	9.03	0.00136
regulation of Rho protein signal transduction	7	2.53	0.00143
phosphorylation	21	7.58	0.00325
regulation of epithelial cell differentiation	4	1.44	0.00361
positive regulation of cell differentiation	9	3.25	0.00365
positive regulation of developmental process	10	3.61	0.00366
activation of NF-kappaB-inducing kinase activity	3	1.08	0.00406
negative regulation of epithelial cell differentiation	3	1.08	0.00406
regulation of cell motion	7	2.53	0.00430
regulation of Ras protein signal transduction	9	3.25	0.00448
protein amino acid phosphorylation	19	6.86	0.00470
blood circulation	7	2.53	0.00514
circulatory system process	7	2.53	0.00514
protein kinase cascade	10	3.61	0.00683
cell migration	10	3.61	0.00761
actin filament organization	5	1.81	0.00830
actin cytoskeleton organization	8	2.89	0.00950
regulation of cell migration	6	2.17	0.01018
lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	3	1.08	0.01218
actin filament-based process	8	2.89	0.01323
vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	3	1.08	0.01649
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	8	2.89	0.02047
regulation of locomotion	6	2.17	0.02067
localization of cell	10	3.61	0.02088
cell motility	10	3.61	0.02088



regulation of phosphorylation	10	3.61	0.02353
regulation of angiogenesis	4	1.44	0.02622
regulation of phosphate metabolic process	10	3.61	0.02901
regulation of phosphorus metabolic process	10	3.61	0.02901
regulation of nitric oxide biosynthetic process	3	1.08	0.02957
regulation of protein amino acid phosphorylation	6	2.17	0.02967
regulation of tube size	4	1.44	0.03099
regulation of blood vessel size	4	1.44	0.03099
small GTPase mediated signal transduction	9	3.25	0.03197
vascular process in circulatory system	4	1.44	0.03440
negative regulation of angiogenesis	3	1.08	0.03885
regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	4	1.44	0.03987
negative regulation of nitric oxide biosynthetic process	2	0.72	0.04223
enzyme linked receptor protein signaling pathway	9	3.25	0.04292
regulation of cell proliferation	14	5.05	0.04493
patterning of blood vessels	3	1.08	0.04557
negative regulation of cell differentiation	7	2.53	0.04647
regulation of cell morphogenesis	5	1.81	0.05011
positive regulation of cell proliferation	9	3.25	0.05121
Ras protein signal transduction	4	1.44	0.05204
cyclic nucleotide biosynthetic process	3	1.08	0.05268
positive regulation of pigment cell differentiation	2	0.72	0.05590
positive regulation of melanocyte differentiation	2	0.72	0.05590
ISG15-protein conjugation	2	0.72	0.05590
Rho protein signal transduction	3	1.08	0.05637
I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	3	1.08	0.06015
regulation of hydrolase activity	7	2.53	0.06319
regulation of blood pressure	4	1.44	0.06579
regulation of system process	7	2.53	0.06832
positive regulation of pigmentation during development	2	0.72	0.06939
regulation of cell development	6	2.17	0.07802
MAPKKK cascade	5	1.81	0.08045
positive regulation of catalytic activity	8	2.89	0.08073
cell motion	10	3.61	0.08091
substrate-bound cell migration	2	0.72	0.08268
regulation of melanocyte differentiation	2	0.72	0.08268
regulation of pigment cell differentiation	2	0.72	0.08268
regulation of protein modification process	6	2.17	0.08764
cyclic nucleotide metabolic process	3	1.08	0.09318
cytoskeleton organization	9	3.25	0.09470
positive regulation of axon extension	2	0.72	0.09578
regulation of potassium ion transport	2	0.72	0.09578
positive regulation of B cell activation	3	1.08	0.09762
negative regulation of signal transduction	6	2.17	0.09835

## B 右室心筋細胞優位 (1.3 倍以上) の遺伝子群の Gene ontology 解析

Gene ontology term	遺伝子数	%	P value
negative regulation of signal transduction	5	7.25	0.00439
response to toxin	3	4.35	0.00567
negative regulation of cell communication	5	7.25	0.00590
enzyme linked receptor protein signaling pathway	5	7.25	0.02162
lipid biosynthetic process	5	7.25	0.02484
response to copper ion	2	2.90	0.02699
positive regulation of molecular function	5	7.25	0.03115
fatty acid metabolic process	4	5.80	0.03492
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	4	5.80	0.03885
response to peptide hormone stimulus	3	4.35	0.05295
prostaglandin metabolic process	2	2.90	0.05327
prostanoid metabolic process	2	2.90	0.05327
chemical homeostasis	5	7.25	0.05358
blood vessel development	4	5.80	0.06961
vasculature development	4	5.80	0.07370

regulation of protein amino acid phosphorylation	3	4.35	0.08081
morphogenesis of a branching structure	3	4.35	0.08544
negative regulation of Wnt receptor signaling pathway	2	2.90	0.09670
positive regulation of macromolecule metabolic process	6	8.70	0.09948
skeletal system development	4	5.80	0.09965

### 5.2.2. Gαq ストレス存在下での左右心筋細胞 mRNA 発現プロファイル

次に、心不全ストレスを与えた状態での左右心筋細胞集団での mRNA 発現の変化を RNA-seq で網羅的に検討した。過去の報告[37]に準じ、Gαq アゴニストである angiotensin II の subpressor dose 持続投与 (432 μg/kgBW/day、14 日間) によって心不全ストレスを与えたマウス (個体数 n = 3) を、vehicle 投与マウス (個体数 n = 3) と比較した。まず、angiotensin II 群では非観血血圧の有意な上昇は生じず (図 7A)、心臓重量について vehicle 群と比較し左室+心室中隔は増加したが、右室は増加しなかった (図 7B)。Angiotensin II 群と vehicle 群につき、左右心室からの単離心筋ペレットを RNA-seq で解析すると、angiotensin II 群での各遺伝子は右室と左室それぞれにおいて vehicle 群と比較して減少・不変・増加のいずれかの変化を示すが、方法 4.3.2. で定義した挙動の組み合わせで遺伝子を分類すると、表 4 に示すとおりとなった。左右心室筋いずれかで遺伝子発現が 1.5 倍以上の変化を示したものは 498 遺伝子で、解析対象遺伝子の 2.2% に達した。

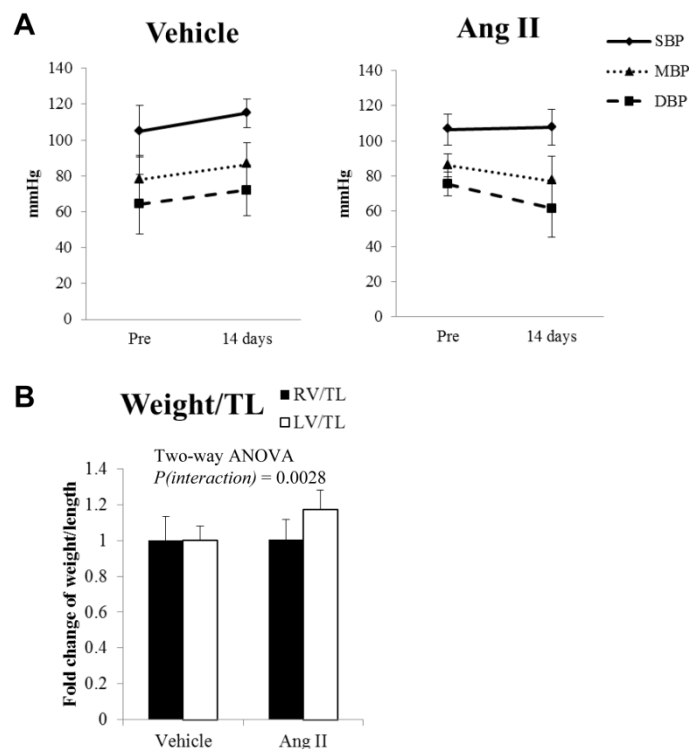


図 7 Angiotensin II 負荷後のマウスの血圧と心筋重量

A Angiotensin II 432  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{day}$  2 週間投与(Ang II)の投与前後で有意な血圧上昇は認めない(個体数は Vehicle 群  $n = 5$ 、Ang II 群  $n = 4$ 、それぞれ Paired Student's *t* test)。B Tibial length (TL)で補正した左右心筋重量を、vehicle 群の平均値で補正したもの(個体数は各群  $n = 10$ )。Ang II 刺激で左室のみ心筋重量の増加を認める。SBP, 収縮期血圧; MBP, 平均血圧; DBP, 拡張期血圧。RV, 右室心筋重量; LV, 左室心筋重量。

表 4 Angiotensin II 負荷後のマウス右室・左室心筋での遺伝子発現の変化

RPKM の挙動*			遺伝子数	%
右室で	左室で			
増加	不変	(Group 1)	122	0.55
増加	減少	(Group 2)	4	0.02
増加	増加	(Group 3)	66	0.3
不変	不変	(Group 4)	10091	45.59
不変	減少	(Group 5)	105	0.47
不変	増加	(Group 6)	83	0.37
減少	不変	(Group 7)	53	0.24
減少	減少	(Group 8)	61	0.28
減少	増加	(Group 9)	4	0.02
その他			11545	52.16
計			22134	100

\*減少・増加・不変の定義は方法 4.3.2.を参照のこと。

得られた遺伝子群の gene ontology 解析では、angiotensin II 刺激にて右室で 1.5 倍以上増加し左室で不変である遺伝子群（表 4 の Group 1）には、”regulation of apoptosis”, “regulation of programmed cell death”に関連する遺伝子が有意に多く含まれていた（表 5A）。左室で 1.5 倍以上増加し右室で不変である遺伝子群（表 4 の Group 6）には、”blood vessel morphogenesis”に関連する遺伝子が有意に多く含まれていた（表 5B）。左室・右室共に 1.5 倍以上発現が増加した遺伝子群（表 4 の Group 3）には、”circadian rhythm”や”muscle contraction”に関連する遺伝子が有意に多く含まれていた（表 5C）。さらにこれらの gene ontology term を示した遺伝子の具体名を表 6 に記した。Vehicle 投与群で左右心室筋細胞の angiotensin II 受容体遺伝子の発現量には有意差はなかった。これらの結果からは、angiotensin II 刺激によって、右室心筋細胞では左室心筋細胞に比べてアポトーシス経路などが活性化され、左室心筋細胞では右室心筋細胞に比べて血管新生経路などが活性化されることが示された。

**表 5 Angiotensin II 負荷後マウス心筋細胞で、左右いずれかで発現量増加を示した遺伝子群の gene ontology 解析**

**A 右室で発現が増加し、左室では変化がなかった遺伝子群の gene ontology**

Gene Ontology term	遺伝子数	%	P value
regulation of apoptosis	10	8.3	0.0043
regulation of programmed cell death	10	8.3	0.0047
regulation of cell death	10	8.3	0.0048
response to toxin	3	2.5	0.0119
positive regulation of apoptosis	6	5.0	0.0139
positive regulation of programmed cell death	6	5.0	0.0144
positive regulation of cell death	6	5.0	0.0149
actin cytoskeleton organization	5	4.1	0.0149
induction of apoptosis	5	4.1	0.0155
induction of programmed cell death	5	4.1	0.0155
actin filament-based process	5	4.1	0.0185

transcription	18	14.9	0.0216
positive regulation of cytokine biosynthetic process	3	2.5	0.0242
death	8	6.6	0.0292
regulation of T cell proliferation	3	2.5	0.0451
regulation of cytokine production	4	3.3	0.0457
cellular amino acid derivative metabolic process	4	3.3	0.0474
apoptosis	7	5.8	0.0506
regulation of cytokine biosynthetic process	3	2.5	0.0522
programmed cell death	7	5.8	0.0541
regulation of activated T cell proliferation	2	1.7	0.0668
cell death	7	5.8	0.0708
regulation of lymphocyte proliferation	3	2.5	0.0772
regulation of mononuclear cell proliferation	3	2.5	0.0772
regulation of transcription	19	15.7	0.0782
regulation of leukocyte proliferation	3	2.5	0.0805
response to endogenous stimulus	4	3.3	0.0891

## B 左室で発現が増加し、右室では変化がなかった遺伝子群の gene ontology

Gene Ontology term	遺伝子数	%	P value
blood vessel morphogenesis	5	6.2	0.0073
cell motion	6	7.4	0.0139
cell migration	5	6.2	0.0141
tissue remodeling	3	3.7	0.0144
blood vessel development	5	6.2	0.0149
vasculature development	5	6.2	0.0162
cellular response to stress	6	7.4	0.0202
cell motility	5	6.2	0.0246
localization of cell	5	6.2	0.0246
response to DNA damage stimulus	5	6.2	0.0254
immune response	6	7.4	0.0360
catecholamine biosynthetic process	2	2.5	0.0458
response to wounding	5	6.2	0.0460
regulation of cell growth	3	3.7	0.0500
positive regulation of developmental process	4	4.9	0.0508
DNA repair	4	4.9	0.0555
positive regulation of cell growth	2	2.5	0.0606
cartilage condensation	2	2.5	0.0606
cell adhesion	6	7.4	0.0667
biological adhesion	6	7.4	0.0671
regulation of epidermis development	2	2.5	0.0680
dopamine metabolic process	2	2.5	0.0716
positive regulation of cell size	2	2.5	0.0716
DNA metabolic process	5	6.2	0.0813
blood vessel remodeling	2	2.5	0.0824
immune effector process	3	3.7	0.0866
skeletal system morphogenesis	3	3.7	0.0913
positive regulation of immune response	3	3.7	0.0985

C 左室・右室ともに発現が増加した遺伝子群の gene ontology

Gene Ontology term	遺伝子数	%	P value
circadian rhythm	4	6.3	0.0002
rhythmic process	5	7.8	0.0003
muscle contraction	4	6.3	0.0009
muscle system process	4	6.3	0.0012
negative regulation of specific transcription from RNA polymerase II promoter	3	4.7	0.0020
negative regulation of gene-specific transcription	3	4.7	0.0024
regulation of specific transcription from RNA polymerase II promoter	3	4.7	0.0113
regulation of gene-specific transcription	3	4.7	0.0190
negative regulation of macromolecule metabolic process	6	9.4	0.0211
heart development	4	6.3	0.0333
regulation of cell growth	3	4.7	0.0342
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4	6.3	0.0364
negative regulation of gene expression	5	7.8	0.0400
negative regulation of macromolecule biosynthetic process	5	7.8	0.0424
negative regulation of cellular biosynthetic process	5	7.8	0.0463
negative regulation of biosynthetic process	5	7.8	0.0476
positive regulation of cell proliferation	4	6.3	0.0604
negative regulation of transcription, DNA-dependent	4	6.3	0.0733
negative regulation of RNA metabolic process	4	6.3	0.0744
regulation of cell proliferation	5	7.8	0.0893

表 6 右室のみ・左室のみ・両心室で発現が増加していた、各 gene ontology term に属する遺伝子の具体名

Gene ontology term	Genes
右室のみで増加 (左室は不変)	
regulation of apoptosis	<i>Xpa, Casp3, Rarg, Btg2, Pycard, Nr4a2, Trp53inp1, Hspa1a, Ngfrap1, Bmf</i>
positive regulation of apoptosis	<i>Xpa, Casp3, Rarg, Pycard, Trp53inp1, Ngfrap1</i>
transcription	<i>Maff, Tshz2, Erg, Egr3, Rarg, Crem, Arid5a, Nr4a2, Wtip, Zfp580, Notch3, Ahrr, Btg2, Nr1d2, Ebf1, Irf1, Bhlhe40, Hdac8</i>
apoptosis	<i>Sema6a, Casp3, Tnfsf10, Pycard, Trp53inp1, Ngfrap1, Bmf</i>
左室のみで増加 (右室は不変)	
blood vessel morphogenesis	<i>Ctgf, Hbegf, Amot, Dbh, Tgfb2</i>
cell migration	<i>Ctgf, Hbegf, Amot, Dbh, Tgfb2</i>
tissue remodeling	<i>Enpp1, Dbh, Tgfb2</i>
blood vessel development	<i>Ctgf, Hbegf, Amot, Dbh, Tgfb2</i>
右室と左室で亢進	
circadian rhythm	<i>Nr1d1, Dbp, Per2, Per3</i>
muscle contraction	<i>Mybpc2, Myom2, Myh7, Tpm2</i>
heart development	<i>Myocd, Nppb, Adamts1, Calcrl</i>

### 5.3. 右室自由壁心筋組織ではストレス応答の結果アポトーシス経路が活性化される

上記 5.2 では単離心筋細胞ペレットでのトランスクリプトーム解析を行ったが、次に非心筋細胞も含めた心筋組織全体としてのシグナルの挙動を検討した。まずは 5.2 で行った RNA-seq 解析の、リアルタイム PCR での再現性を複数の遺伝子で確認した。リアルタイム PCR では、vehicle 投与群の左右心室筋で、特に *Wif1*、*Socs3*、*Rgs2*、*Aqp4* が右室優位に発現していることを確認した。逆に左室優位の発現を示した遺伝子には *Notch4* があった。これらの遺伝子の左右差は RNA-seq の結果と同一であったが、*Nos3* など、単離心筋細胞ペレットの RNA-seq では発現量に左右差があるにもかかわらず、左右心室筋組織からのリアルタイム PCR では発現量に左右差を示さない遺伝子もあり、これは心筋組織に含まれる非心筋細胞などが mRNA 発現量に影響しているためと思われた (図 8)。

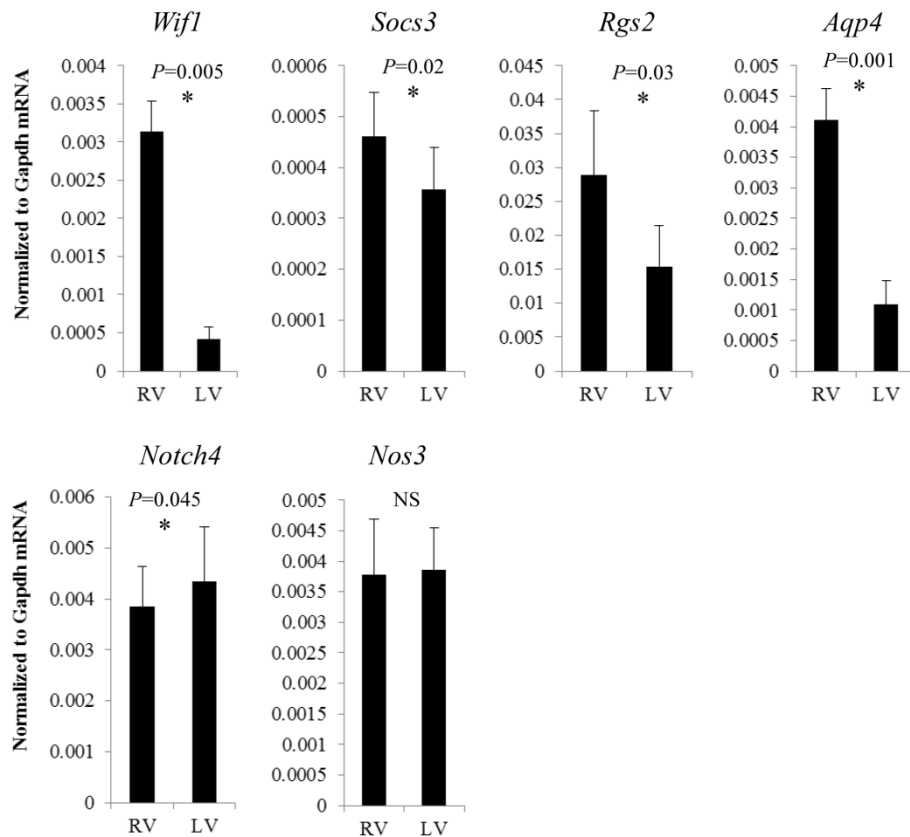


図 8 ベースライン左右心室筋組織の mRNA 発現

Paired Student's *t* test で  $P < 0.05$  を示したものに\*と *P* 値を付した (個体数は  $n = 3$ )。

次に心不全ストレス負荷群とコントロール群について、心室の右室自由壁組織と左室自由壁組織の mRNA またはタンパク質の挙動を解析した。具体的には、angiotensin II (432  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{day}$ ) 2 週間負荷後、isoproterenol (15  $\text{mg}/\text{kgBW}/\text{day}$ ) 2 週間負荷後の左右心室筋組織についてアポトーシスシグナルの検討を行った。アポトーシスのマーカーとして *Puma*、*Nix*、*Caspase 3 (Casp3)* の mRNA 発現量を定量した。特に isoproterenol 15  $\text{mg}/\text{kgBW}/\text{day}$  2 週間投与群において、*Puma*、*Casp3* mRNA の発現量が右室で増加する (共に  $P_{\text{interaction}} = 0.0004$ ) 事が示された



(図 9A)。タンパク質発現においても、アポトーシスシグナルの活性化を意味する cleaved Caspase-9 の発現上昇を angiotensin II 刺激後の右室のみで認めた ( $P_{interaction} = 0.006$ 、図 9B)。これらより、右室自由壁心筋では、angiotensin II 刺激または isoproterenol 刺激でアポトーシス経路が活性化することが示唆された。

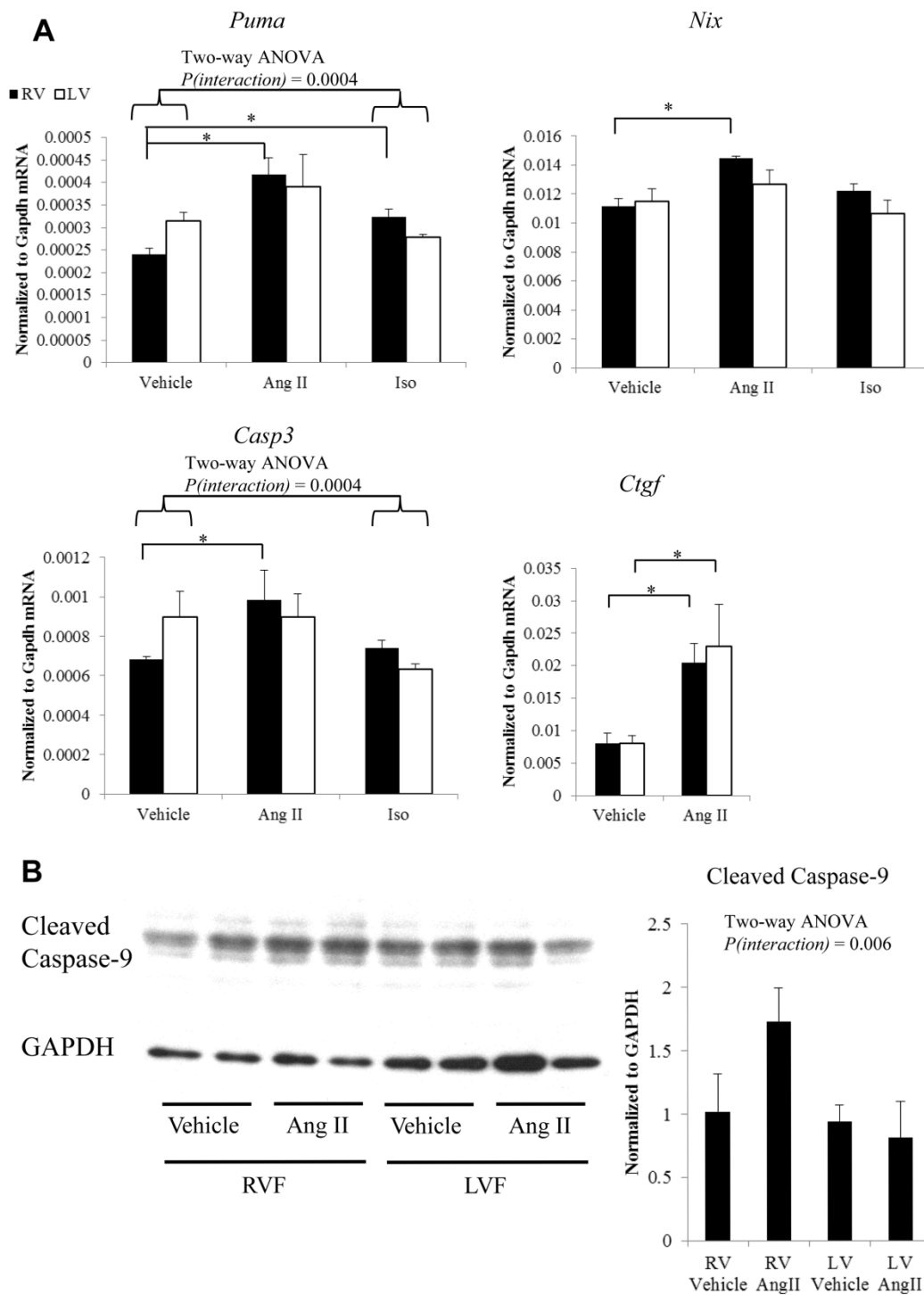


図 9 マウスに対するストレス負荷後の左右心室 mRNA・タンパク質発現の変化

A リアルタイム PCR による mRNA 発現量の検討 (各群  $n = 3$ )。Student's  $t$  test で  $P < 0.05$  を示したものに\*を付した。B Western blotting による cleaved Caspase-9 の定量。各レーンにつきタンパク質 40  $\mu\text{g}$  をアプライした。棒グラフの各群は  $n = 4$ 。略号は、Ang II, angiotensin II 432  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{day}$  刺激群; Iso, isoproterenol 15  $\text{mg}/\text{kgBW}/\text{day}$  刺激群。いずれも刺激期間は 14 日間。

#### 5.4. *Wif1* は心筋のアポトーシスシグナルを調節する

##### 5.4.1. *Wif1* mRNA はマウスにおいて右室心筋に多く発現している

*Wif1* mRNA は右室心筋細胞で左室心筋細胞の 6.15 倍多く発現している (表 2B) ことを 5.2.1. で示した。先行研究で *Wif1* mRNA は心臓に多く発現することが知られている [61] が、マウスの各臓器から RNA を単離し *Wif1* mRNA の定量を行うと、各臓器の中でも特に右室に多く発現していることが示唆された (図 10A)。また、成長に伴う *Wif1* mRNA 発現の左右心室筋における経時的変化は図 10B に示すとおりで、出生後は成長に伴い発現量の減少を示すが、左右心室筋を比較すると出生直後より既に右室での発現量が多いことが示された。

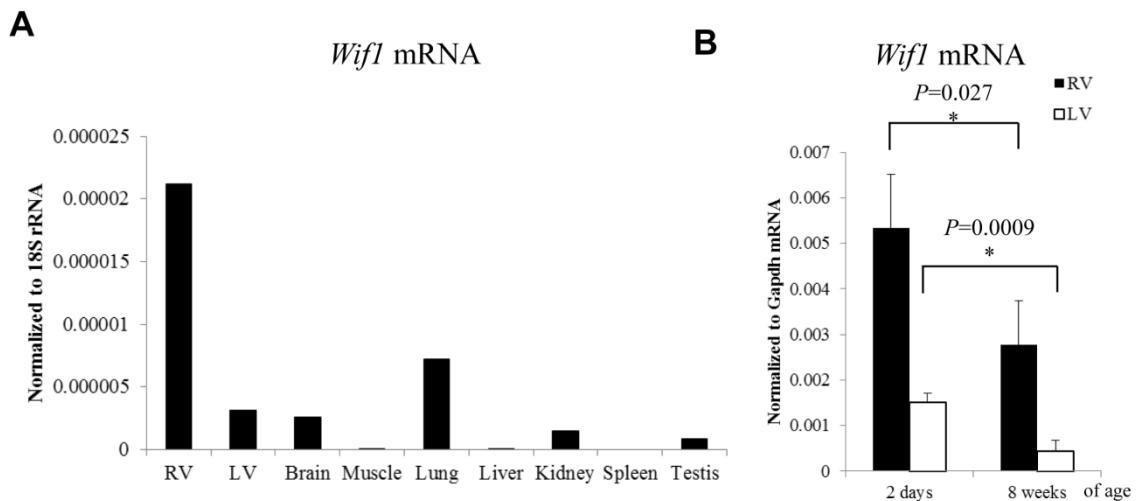


図 10 マウスにおける *Wif1* mRNA の発現

A 各臓器での *Wif1* mRNA の発現量。

B 成長に伴う左右心室での発現量の変化。2 日齢から 8 週齢にかけて左右心室筋において共に発現量は低下するが、右室心筋優位な発現を示す (Paired Student's *t* test:  $P = 0.0027$ ,  $0.0009$ 。個体数は  $n = 4$ )。

#### 5.4.2. *Wif1* は *in vitro* 心筋細胞でのアポトーシスシグナルを増強する

序文 2.5.3.に示したように、**WIF1** は複数の癌組織でアポトーシスを調節する事が知られているが、心筋細胞での **WIF1** の作用の詳細な検討はこれまでない。本研究では、**WIF1** が、5.3 までに示した左右心室筋のストレス応答性の違いに関与する可能性を検討した。*Wif1* の発現を操作することによって心筋細胞のアポトーシス経路が調節される様式を解析するにあたり、*in vivo* で右室心筋のみ *Wif1* の発現を調節することは現時点で技術的に困難であるので、心筋細胞の *in vitro* 解析に汎用される新生仔ラット初代培養心筋細胞を用いて解析を行った。なお、新生仔ラット初代培養心筋細胞は、新生仔ラットの左室心筋細胞と右室心筋細胞の混合物の培養系である。新生仔ラット初代培養心筋細胞に対し *Wif1* siRNA (si*Wif1*) のトランスフェクションを行い *Wif1* mRNA をノックダウンした状態で、*in vitro* で心筋細胞にアポトーシスを惹起することが知られている過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) で刺激を行った。その結果、*Wif1* ノックダウン群では *Wif1* 非ノックダウン群と比べ  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激での *Puma* mRNA の発現亢進が軽度であった ( $P_{\text{interaction}} = 0.013$ ) (図 11A)。すなわち、心筋細胞においては、*Wif1* により薬物刺激によるアポトーシス経路の活性化が増強しており、*Wif1* が心筋細胞のストレス応答性を部分的に決定していることが示唆された。

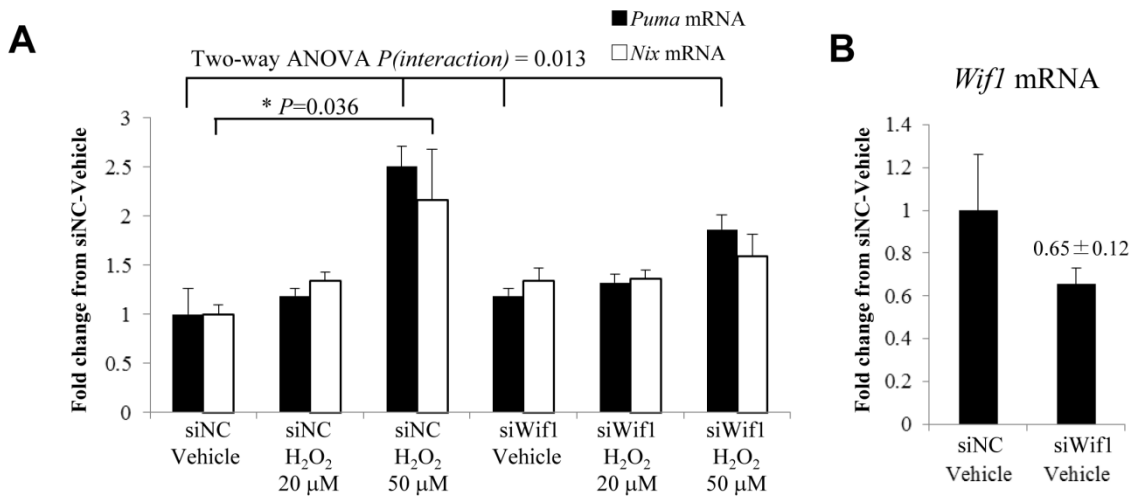


図 11 ラット新生仔初代培養心筋細胞のアポトーシスシグナルは *Wif1* で調節される  
 A *Wif1* siRNA (siWif1)による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激の修飾。B Aにおける *Wif1* mRNA ノックダウンの確認。発現量はすべて 18S rRNA で normalization を行い、siNC 処理 vehicle 投与群の発現を 1 とした相対値で表現している。siNC, negative control siRNA 処理群; siWif1, *Wif1* siRNA 処理群 (各群 n = 3)。

## 6. 考察

### 6.1. 本研究で発見した事実と、それより得られる結論

本研究は大きく 2 つの部分に分けられる。前半は、主に RNA-seq を用いた左右心筋組織・左右心筋細胞の mRNA 発現プロファイルの相違点と、angiotensin II などの心不全ストレスによる左右心筋の mRNA プロファイルの変化の検討である。ここでは、まず、心不全ストレス非存在下で左右心筋の mRNA 発現プロファイルが異なることを示した。具体的には、心不全のバイオマーカーとして知られる *Bnp* の mRNA 発現は左室で多く、その左右心室での発現量の違いは *calcineurin* 経路や *Trpc3/6* 経路に依存しないことをノックアウトマウスでの検討で示し、さらに心筋特異的 *Gαq* 過剰発現マウスを用いて、左右心室筋にほぼ等しく *Gαq* 負荷が加わった際も左右での *Bnp* mRNA 発現量の差は保存されることを示した。この様に、*Bnp* 発現の左右差の形成には、心不全シグナルの鍵分子である *calcineurin*、*TRPC3/6* や *Gαq* が決定的な関与をしていないことがわかった。

さらに、*Gαq* 負荷を加えた際の左右心室筋の振る舞いをより明確にするため、*Gαq* 刺激モデルとして知られる angiotensin II の subpressor dose での投与をマウスに行った後、左右心筋をわけた心筋細胞単離を行い、その RNA-seq と gene ontology 解析を行うことで、左右心筋細胞における angiotensin II 刺激への応答性の違いを検討した。その結果、angiotensin II 刺激によって、右室心筋細胞ではア

ポトーシス経路が活性化することが示唆され、左室心筋細胞では血管新生経路が活性化することが示唆された。特に右室心筋のアポトーシス経路の活性化についてはさらに心筋組織でも検討し、angiotensin II や isoproterenol による刺激で *Puma* mRNA や cleaved caspase-9 タンパクが右室でより増加することを示し、以上より、右室心筋では angiotensin II や isoproterenol による刺激によってアポトーシス経路が活性化することを示した。

後半は、この右室特異的なアポトーシス経路の活性化の原因となりうる遺伝子として、右室に多く発現していることが前半にて明らかになった **WIF1** に着目し、心筋細胞における **WIF1** のアポトーシス経路活性化への影響を *in vitro* で解析した。新生仔ラット初代培養心筋細胞で、siRNA による *Wif1* のノックダウンによって、 $H_2O_2$  刺激によるアポトーシス経路の活性化が非ノックダウン群と比較して減弱する事を示した。この培養細胞は、*Wif1* 発現の多い右室由来心筋細胞と、*Wif1* 発現の少ない左室由来心筋細胞が混在していると考えられるが、右室由来心筋細胞の *Wif1* が大幅にノックダウンされることと、左室由来心筋細胞の *Wif1* もある程度ノックダウンされることで、全体として  $H_2O_2$  刺激で惹起されるアポトーシスシグナルが減弱したと思われた。

以上のごとく、本研究では、マウスの左室心筋と右室心筋では心不全ストレスに対するシグナル応答に差異があること（仮説 1）、特に左室研究で用いられ

るような angiotensin II 等の薬物による心不全ストレスによって右室心筋でアポトーシス経路が活性化することを示した。さらに、アポトーシス経路の活性化を、右室で多く発現している *Wif1* が調節することから、*Wif1* 遺伝子が左室心筋と右室心筋のストレス応答性の違いに寄与している（仮説 2）可能性を示した。

## 6.2. 本研究の独自性と関連領域に及ぼしうる影響

本論文は、右室心筋の心不全ストレスへの応答性が左室心筋と同一ではない事を、心不全シグナル研究で頻用されている薬剤負荷モデルにおいて示した。左右心室筋での遺伝子発現の違いとストレス応答性の違いの関連を示唆する先行研究は序文 2.6. で述べたように圧負荷動物モデル・容量負荷動物モデル・心筋梗塞動物モデルなどを用いたものが複数あるが、これらの負荷が左右心室にとって等価であることは保証されていない。本研究では薬剤負荷を行った同一個体の左右心室筋単離細胞ペレットを解析することで、より洗練された形で左右心室筋細胞の心不全ストレスに対する反応性の違いを解析し得た点で独自性を有する。また、その結果左右心室でそれぞれ特異的に惹起されるシグナル経路を同定し、その左右差に関連しうる遺伝子として *Wif1* を示した点でも独自性を有する。

解析に用いた手法も一定の独自性を有する。成体マウスの心筋単離においては、左室・右室の混合された心筋細胞をその後の実験に供するのが一般的であ



るが、本研究では成体マウスの左室心筋細胞と右室心筋細胞を分けて回収することで左右心室筋細胞の差異の解析を実現した。

本研究で認められた左室心筋と右室心筋のストレス応答性の違いは、心臓発生の研究と心不全シグナルの研究の知見を Wnt シグナルを共通項として統一的に理解する手がかりになるかも知れない。心臓発生のこれまでの知見では、心筋前駆細胞より Wnt シグナルの OFF にて first heart field が分化して heart tube として形態の足場になり主に左室を形成し、Wnt シグナルの ON にて分化した second heart field が増殖能を保持したまま心臓の形態形成に寄与して心房と右室・流出路を形成するとされている[53]が、成体ではこの発生期のプロセスを打ち消すように右室で Wnt を阻害する WIF1 が多く発現していることは興味深い。心臓の形態形成プロセスが完了する頃に右室の Wnt シグナルがどのように調節されるかについての先行報告は知る限り存在しないが、心臓発生の際に Wnt シグナルが ON となって心房・右室・流出路が形成され、最終段階で second heart field 由来組織に WIF1 が強く発現することで、Wnt シグナル抑制と共にその増殖能が抑制されて形態形成が完了し、WIF1 発現が持続することでその状態を保持しているという一連のプロセスが存在するかもしれない。少なくとも、心臓形態形成の後半の段階で Wnt シグナル強度の左右心室での強弱が逆転する現象が存在することが強く示唆される。本研究は、心臓形態形成において、Wnt シグナル

が時間・空間的に調節される際の **WIF1** の役割を考察する上での手がかりとなり得る。

加えて、心不全シグナルに関する先行研究では **Wnt** シグナルが心筋リモデリングを促進することが示唆されている[53]が、本研究の結果からは、左室では **WIF1** の発現が少ないため、右室に比べて病的ストレスの下流としての **Wnt** シグナルを介した心筋リモデリングが起こりやすいことが推測される。これは本研究の **angiotensin II** 負荷マウスにおいて左室のみで心筋重量が増加したという結果だけでなく、より少量の **angiotensin II** 持続投与マウスで左室のみで心筋重量が増加したという報告[35]、ラットに対して **norepinephrine** 持続投与を行った際に左右心室収縮期圧が上昇し左室心筋重量は増加したが右室心筋重量が増加しなかったという報告[98]とも整合性を有する。本研究の結果からは、ストレス応答によって、右室では **WIF1** が多く **Wnt** シグナルが抑制傾向にあるため心肥大は抑制されるがアポトーシス経路が活性化され、左室では **Wnt** シグナルが相対的に強いため心肥大が惹起されるという、左右心室のストレス応答性の違いを矛盾なく説明しうるメカニズムを推測する事ができる。

### 6.3. 本研究の限界

本研究は少なくとも次の 5 点の **limitation** を有している。(1) **WIF1** のみが左右心室のアポトーシス強度を調節していることを示しているわけではない。他に

も左右の違いを調節している遺伝子が存在している可能性がある。(2) angiotensin II 刺激モデルにて、左室後負荷が上昇していないことを非観血血圧測定で間接的に示し、肺動脈圧に関しても有意な上昇はないと推測したが、肺動脈圧を測定しておらず、右室後負荷に変化がないことを直接示せていない。低酸素暴露ラットの肺高血圧の進行に angiotensin II が必要であること[99]や、低酸素暴露ラットで肺高血圧が進行するにつれて右室でのアンジオテンシン変換酵素の発現が増加すること[100]、特発性肺動脈性肺高血圧症患者の血清の angiotensin II 濃度が上昇していること[101]などから、angiotensin II と肺高血圧の進展には関連があることが強く示唆されるが、マウスに対する angiotensin II の慢性投与(432 µg/kgBW/day、14日間)のみによって肺動脈圧が上昇するかを明確に検討した先行研究はなく、本研究での angiotensin II の用量で肺動脈圧が上昇しているかについては検討が必要である。(3) 左右心室筋の反応性の違いが心筋への張力などの機械的ストレスでも調節されている可能性がある。(4) 病理組織学的検討にて右室心筋でアポトーシスを起こす細胞数が増加していることを示していない。(5) ヒト心筋でも本研究と同様の結果、すなわち右室での WIF1 発現が多い等の結果は確認されておらず、ヒトにおいても心不全シグナルによって右室にアポトーシスが起きやすいかどうかは不明である。先行研究では、マウスとヒトで臓器特異的遺伝子の発現パターンは比較的類似しているこ

とが示されており[102,103]、転写因子間の相互作用はマウスとヒトで解析対象の約半数が保存されていたという報告がある[104]。よって本研究でマウス心筋において示した各種シグナル伝達様式がヒト心筋でも同様である可能性はあるものの、それは確認されていない。ヒト心筋における WIF1 とアポトーシスの関連や、ヒト左右心室筋における angiotensin II などの神経体液性因子に対する応答の相違点については、今後の検討が待たれる。

#### 6.4. 本研究の意義と今後の発展の方向性

これまでの慢性心不全の基礎的研究は左室心筋に関するものがほとんどであったが、本研究では、左室心筋と右室心筋の心不全ストレスに対する応答の相違点が左室研究で頻用される薬剤負荷モデルで示されたため、今後の心不全研究では、左室と右室を分けて検討する必要があることが明確に示されたと言える点で意義深い。また、序文 2.4.で述べたように、臨床においては、近年、右心不全治療の必要性がより強く認識され、右心不全の治療法の確立が待たれている。この要請に応えるためにも左室と右室での分子生物学的プロファイルの相違点を明らかにし、右室心筋のストレス応答様式を明らかにすることがのぞまれ、本研究はその端緒となりうる。

臨床への橋渡しを念頭に置くと、ヒトの心不全においても、左室と右室のストレス応答性が異なる可能性は十分あると考えられる。本研究のように右室で

アポトーシス経路がより活性化しているかどうかの検証が必要ではあるものの、その様な特徴的なストレス応答がある場合は、その経路を標的として右心不全の治療開発が進むことが期待される。右心不全の原因となる肺高血圧症が今後増加するという予測は序文 2.4. で触れたが、本研究の結果とそれを元にした推測は、肺高血圧症に合併した右心不全への治療、または肺高血圧症における右心不全の進行を抑制する治療の開発に発展しうると考えられる。肺動脈性肺高血圧症は肺高血圧症に含まれる一病型で、発症患者の3年生存率は約50%と悪く、多くは右心不全により死に至ることが知られており、その治療開発が望まれている[105]。肺動脈性肺高血圧症で負荷が加わった右室は良好に適応できる場合と、十分適応できず拡大・収縮低下をきたす場合がある事が臨床的観察から知られている[106,107]が、その転帰を決定する因子が右室心筋におけるアポトーシス経路のシグナル強度であるかもしれない。ストレス応答としての右室のアポトーシスシグナルを抑制することで、右心機能低下を防ぎ肺動脈性肺高血圧症を含む肺高血圧症の予後改善をもたらすような介入が可能になる可能性がある。

また、肺高血圧・右心不全モデル動物を用いた検討も期待される。右心不全の動物モデルとして、肺動脈絞扼による右室圧負荷モデルはこれまで多く利用されてきた[88,90,108]が、他に、肺動脈性肺高血圧症モデルとして、慢性低酸素暴露ラット、monocrotaline (MCT)投与ラット、MCT投与・片肺全摘ラット、VEGF

受容体拮抗薬である SU5416 (semaxinib)投与に慢性低酸素暴露を加えたラット、SU5416 投与・片肺全摘ラット、S100A4 過剰発現マウス、interleukin-6 過剰発現マウスなどが知られており[109]、特にマウスでは SU5416・慢性低酸素暴露モデルがヒト肺動脈性肺高血圧症と比較的似た血管平滑筋増殖・内膜増殖などの肺血管リモデリングとそれに伴う右室圧上昇を示すことが知られている[110]。これらのモデル動物における右室心筋と左室心筋の反応を解析し、特に右室のアポトーシスシグナルを解析することによって、肺高血圧症における右心不全の発症機序や治療標的、或いは左室への影響に迫れるかもしれない。

このような *in vivo* 解析に際しては、左室または右室特異的な遺伝子発現の操作により、左室と右室を比較する詳細な検討が可能になるとと思われる。左室心筋に siRNA 生理食塩液溶液を開胸下で注射して左室心筋の遺伝子をノックダウンする手法はこれまで報告されている[111]が、その手法は右室に応用できる可能性がある。ただし心筋への siRNA 注射による遺伝子ノックダウン効果は数日間にとどまる一時的なものである[111]ため、この系をより洗練させるためには、右室特異的な Cre-loxP システムなどによる遺伝子操作が望ましい。これまで成体での右室特異的なプロモーターの報告はないが、その様なプロモーターなどを探索し、それを用いて右室特異的なコンディショナル・ノックアウトマウスを作成することが可能であれば、右心不全研究の急速な発展が期待できる。

左室心筋と右室心筋のストレス応答性についての分子生物学的検討は、本研究を踏まえてさらに進むことにより、従来の左心不全にとどまらず、右心不全を伴う左心不全、肺動脈性肺高血圧症を含む肺高血圧症に伴う右心不全、先天性心疾患、成人先天性心疾患など、左心・右心を問わない全ての心不全の治療開発に大きく資することが可能であると考ええる。

## 7. 引用文献

- [1] Katz, A.M. *Physiology of the heart, 5th ed.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business (2011).
- [2] Friedberg, M. K. and Redington, A. N. Right versus left ventricular failure: differences, similarities, and interactions. *Circulation* **129**(9): 1033-1044 (2014).
- [3] Lombaert, H., Peyrat, J. M., Croisille, P., Rapacchi, S., Fanton, L., Cheriet, F., Clarysse, P., Magnin, I., Delingette, H. and Ayache, N. Human atlas of the cardiac fiber architecture: study on a healthy population. *IEEE Trans Med Imaging* **31**(7): 1436-1447 (2012).
- [4] Lower, R. *Tractatus de Corde, item de Motu & Colore Sanguinis, et Chyli in eum Transitu*, Amsterdami, apud Danielem Elzevirium (1669).
- [5] Greenbaum, R. A., Ho, S. Y., Gibson, D. G., Becker, A. E. and Anderson, R. H. Left ventricular fibre architecture in man. *Br Heart J* **45**(3): 248-263 (1981).
- [6] Stalsberg, H. and DeHaan, R. L. The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol* **19**(2): 128-159 (1969).
- [7] Zaffran, S., Kelly, R. G., Meilhac, S. M., Buckingham, M. E. and Brown, N. A. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res* **95**(3): 261-268 (2004).



- [8] Kelly, R. G. The second heart field. *Curr Top Dev Biol* **100**: 33-65 (2012).
- [9] Buckingham, M., Meilhac, S. and Zaffran, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* **6**(11): 826-835 (2005).
- [10] Vincent, S. D. and Buckingham, M. E. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol* **90**: 1-41 (2010).
- [11] McMurray, J. J., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Bohm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M. A., Jaarsma, T., Kober, L., Lip, G. Y., Maggioni, A. P., Parkhomenko, A., Pieske, B. M., Popescu, B. A., Ronnevik, P. K., Rutten, F. H., Schwitter, J., Seferovic, P., Stepinska, J., Trindade, P. T., Voors, A. A., Zannad, F. and Zeiher, A. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* **33**(14): 1787-1847 (2012).
- [12] Yancy, C. W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D. E., Jr., Drazner, M. H., Fonarow, G. C., Geraci, S. A., Horwich, T., Januzzi, J. L., Johnson, M. R., Kasper, E. K., Levy, W. C., Masoudi, F. A., McBride, P. E., McMurray, J. J., Mitchell, J. E., Peterson, P. N., Riegel, B., Sam, F., Stevenson, L. W., Tang, W. H., Tsai, E. J. and

Wilkoff, B. L. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* **128**(16): e240-327 (2013).

[13] Massie, B., Kramer, B. L., Topic, N. and Henderson, S. G. Hemodynamic and radionuclide effects of acute captopril therapy for heart failure: changes in left and right ventricular volumes and function at rest and during exercise. *Circulation* **65**(7): 1374-1381 (1982).

[14] Quaife, R. A., Christian, P. E., Gilbert, E. M., Datz, F. L., Volkman, K. and Bristow, M. R. Effects of carvedilol on right ventricular function in chronic heart failure. *Am J Cardiol* **81**(2): 247-250 (1998).

[15] Dore, A., Houde, C., Chan, K. L., Ducharme, A., Khairy, P., Juneau, M., Marcotte, F. and Mercier, L. A. Angiotensin receptor blockade and exercise capacity in adults with systemic right ventricles: a multicenter, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Circulation* **112**(16): 2411-2416 (2005).

[16] Provencher, S., Herve, P., Jais, X., Lebrec, D., Humbert, M., Simonneau, G. and Sitbon, O. Deleterious effects of beta-blockers on exercise capacity and hemodynamics in patients with portopulmonary hypertension. *Gastroenterology* **130**(1): 120-126 (2006).

- [17] van der Bom, T., Winter, M. M., Bouma, B. J., Groenink, M., Vliegen, H. W., Pieper, P. G., van Dijk, A. P., Sieswerda, G. T., Roos-Hesselink, J. W., Zwinderman, A. H. and Mulder, B. J. Effect of valsartan on systemic right ventricular function: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot trial. *Circulation* **127**(3): 322-330 (2013).
- [18] Polak, J. F., Holman, B. L., Wynne, J. and Colucci, W. S. Right ventricular ejection fraction: an indicator of increased mortality in patients with congestive heart failure associated with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **2**(2): 217-224 (1983).
- [19] Di Salvo, T. G., Mathier, M., Semigran, M. J. and Dec, G. W. Preserved right ventricular ejection fraction predicts exercise capacity and survival in advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* **25**(5): 1143-1153 (1995).
- [20] Sun, J. P., James, K. B., Yang, X. S., Solankhi, N., Shah, M. S., Arheart, K. L., Thomas, J. D. and Stewart, W. J. Comparison of mortality rates and progression of left ventricular dysfunction in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and dilated versus nondilated right ventricular cavities. *Am J Cardiol* **80**(12): 1583-1587 (1997).
- [21] de Groote, P., Millaire, A., Foucher-Hossein, C., Nogue, O., Marchandise, X., Ducloux, G. and Lablanche, J. M. Right ventricular ejection fraction is an independent predictor of survival in patients with moderate heart failure. *J Am Coll Cardiol* **32**(4):

948-954 (1998).

[22] Ghio, S., Gavazzi, A., Campana, C., Inserra, C., Klersy, C., Sebastiani, R., Arbustini, E., Recusani, F. and Tavazzi, L. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* **37**(1): 183-188 (2001).

[23] Meluzin, J., Spinarova, L., Hude, P., Krejci, J., Kincl, V., Panovsky, R. and Dusek, L. Prognostic importance of various echocardiographic right ventricular functional parameters in patients with symptomatic heart failure. *J Am Soc Echocardiogr* **18**(5): 435-444 (2005).

[24] Haddad, F., Doyle, R., Murphy, D. J. and Hunt, S. A. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation* **117**(13): 1717-1731 (2008).

[25] Holman, W. L., Kormos, R. L., Naftel, D. C., Miller, M. A., Pagani, F. D., Blume, E., Cleeton, T., Koenig, S. C., Edwards, L. and Kirklin, J. K. Predictors of death and transplant in patients with a mechanical circulatory support device: a multi-institutional study. *J Heart Lung Transplant* **28**(1): 44-50 (2009).

[26] Galie, N., Hoeper, M. M., Humbert, M., Torbicki, A., Vachiery, J. L., Barbera, J. A., Beghetti, M., Corris, P., Gaine, S., Gibbs, J. S., Gomez-Sanchez, M. A., Jondeau, G.,

Klepetko, W., Opitz, C., Peacock, A., Rubin, L., Zellweger, M. and Simonneau, G. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* **30**(20): 2493-2537 (2009).

[27] McLaughlin, V. V., Archer, S. L., Badesch, D. B., Barst, R. J., Farber, H. W., Lindner, J. R., Mathier, M. A., McGoon, M. D., Park, M. H., Rosenson, R. S., Rubin, L. J., Tapson, V. F., Varga, J., Harrington, R. A., Anderson, J. L., Bates, E. R., Bridges, C. R., Eisenberg, M. J., Ferrari, V. A., Grines, C. L., Hlatky, M. A., Jacobs, A. K., Kaul, S., Lichtenberg, R. C., Moliterno, D. J., Mukherjee, D., Pohost, G. M., Schofield, R. S., Shubrooks, S. J., Stein, J. H., Tracy, C. M., Weitz, H. H. and Wesley, D. J. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. *Circulation* **119**(16): 2250-2294 (2009).

[28] Simonneau, G., Gatzoulis, M. A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C.,

Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M. A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R. F., Olschewski, H., Robbins, I. M. and Souza, R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **62**(25 Suppl): D34-41 (2013).

[29] Pillutla, P., Shetty, K. D. and Foster, E. Mortality associated with adult congenital heart disease: Trends in the US population from 1979 to 2005. *Am Heart J* **158**(5): 874-879 (2009).

[30] Khairy, P., Ionescu-Ittu, R., Mackie, A. S., Abrahamowicz, M., Pilote, L. and Marelli, A. J. Changing mortality in congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* **56**(14): 1149-1157 (2010).

[31] Avila, P., Mercier, L. A., Dore, A., Marcotte, F., Mongeon, F. P., Ibrahim, R., Asgar, A., Miro, J., Andelfinger, G., Mondesert, B., de Guise, P., Poirier, N. and Khairy, P. Adult Congenital Heart Disease: A Growing Epidemic. *Can J Cardiol* **30**(12S): S410-S419 (2014).

[32] Engelfriet, P. M., Duffels, M. G., Moller, T., Boersma, E., Tijssen, J. G., Thaulow, E., Gatzoulis, M. A. and Mulder, B. J. Pulmonary arterial hypertension in adults born with a heart septal defect: the Euro Heart Survey on adult congenital heart disease. *Heart* **93**(6): 682-687 (2007).

[33] Voelkel, N. F., Quaife, R. A., Leinwand, L. A., Barst, R. J., McGoon, M. D.,

Meldrum, D. R., Dupuis, J., Long, C. S., Rubin, L. J., Smart, F. W., Suzuki, Y. J., Gladwin, M., Denholm, E. M. and Gail, D. B. Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation* **114**(17): 1883-1891 (2006).

[34] Shah, A. M. and Mann, D. L. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet* **378**(9792): 704-712 (2011).

[35] Ichihara, S., Senbonmatsu, T., Price, E., Jr., Ichiki, T., Gaffney, F. A. and Inagami, T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* **104**(3): 346-351 (2001).

[36] Osadchii, O. E. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev* **12**(1): 66-86 (2007).

[37] Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Tymitz, K. M., Glascock, B. J., Kimball, T. F., Lorenz, J. N. and Molkenin, J. D. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4586-4591 (2002).

[38] Cha, H. N., Choi, J. H., Kim, Y. W., Kim, J. Y., Ahn, M. W. and Park, S. Y. Metformin Inhibits Isoproterenol-induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Korean J Physiol Pharmacol* **14**(6): 377-384 (2010).

- [39] Wehrens, X. H., Lehnart, S. E. and Marks, A. R. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol* **67**: 69-98 (2005).
- [40] Frey, N. and Olson, E. N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* **65**: 45-79 (2003).
- [41] Houser, S. R., Piacentino, V., 3rd and Weisser, J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* **32**(9): 1595-1607 (2000).
- [42] Hunton, D. L., Lucchesi, P. A., Pang, Y., Cheng, X., Dell'Italia, L. J. and Marchase, R. B. Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated T-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **277**(16): 14266-14273 (2002).
- [43] Uehara, A., Yasukochi, M., Imanaga, I., Nishi, M. and Takeshima, H. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium* **31**(2): 89-96 (2002).
- [44] Amiri, H., Schultz, G. and Schaefer, M. FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium* **33**(5-6): 463-470 (2003).
- [45] Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Hill, J. A. and Olson, E. N. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic



cardiac remodeling. *J Clin Invest* **116**(12): 3114-3126 (2006).

[46] Nakayama, H., Wilkin, B. J., Bodi, I. and Molkenin, J. D. Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB J* **20**(10): 1660-1670 (2006).

[47] Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T. and Kurose, H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J* **25**(22): 5305-5316 (2006).

[48] Eder, P. and Molkenin, J. D. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ Res* **108**(2): 265-272 (2011).

[49] Seo, K., Rainer, P. P., Shalkey Hahn, V., Lee, D. I., Jo, S. H., Andersen, A., Liu, T., Xu, X., Willette, R. N., Lepore, J. J., Marino, J. P., Jr., Birnbaumer, L., Schnackenberg, C. G. and Kass, D. A. Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(4): 1551-1556 (2014).

[50] Molkenin, J. D. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res* **87**(9): 731-738 (2000).

[51] Rothermel, B., Vega, R. B., Yang, J., Wu, H., Bassel-Duby, R. and Williams, R. S. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated

muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem* **275**(12): 8719-8725 (2000).

[52] Yang, J., Rothermel, B., Vega, R. B., Frey, N., McKinsey, T. A., Olson, E. N., Bassel-Duby, R. and Williams, R. S. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* **87**(12): E61-68 (2000).

[53] Bergmann, M. W. WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development. *Circ Res* **107**(10): 1198-1208 (2010).

[54] Komiya, Y. and Habas, R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**(2): 68-75 (2008).

[55] Anastas, J. N. and Moon, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* **13**(1): 11-26 (2013).

[56] Force, T., Woulfe, K., Koch, W. J. and Kerkela, R. Molecular scaffolds regulate bidirectional crosstalk between Wnt and classical seven-transmembrane-domain receptor signaling pathways. *Sci STKE* **2007**(397): pe41 (2007).

[57] Malekar, P., Hagenmueller, M., Anyanwu, A., Buss, S., Streit, M. R., Weiss, C. S., Wolf, D., Riffel, J., Bauer, A., Katus, H. A. and Hardt, S. E. Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling. *Hypertension* **55**(4): 939-945 (2010).

- [58] Alfaro, M. P., Pagni, M., Vincent, A., Atkinson, J., Hill, M. F., Cates, J., Davidson, J. M., Rottman, J., Lee, E. and Young, P. P. The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(47): 18366-18371 (2008).
- [59] van de Schans, V. A., van den Borne, S. W., Strzelecka, A. E., Janssen, B. J., van der Velden, J. L., Langen, R. C., Wynshaw-Boris, A., Smits, J. F. and Blankesteyn, W. M. Interruption of Wnt signaling attenuates the onset of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* **49**(3): 473-480 (2007).
- [60] Baurand, A., Zelarayan, L., Betney, R., Gehrke, C., Dunger, S., Noack, C., Busjahn, A., Huelsken, J., Taketo, M. M., Birchmeier, W., Dietz, R. and Bergmann, M. W. Beta-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling. *Circ Res* **100**(9): 1353-1362 (2007).
- [61] Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., Rebbert, M. L., Rattner, A., Smallwood, P. M., Samos, C. H., Nusse, R., Dawid, I. B. and Nathans, J. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* **398**(6726): 431-436 (1999).
- [62] Wissmann, C., Wild, P. J., Kaiser, S., Roepcke, S., Stoehr, R., Woenckhaus, M., Kristiansen, G., Hsieh, J. C., Hofstaedter, F., Hartmann, A., Knuechel, R., Rosenthal, A. and Pilarsky, C. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate,

breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* **201**(2): 204-212 (2003).

[63] Byun, T., Karimi, M., Marsh, J. L., Milovanovic, T., Lin, F. and Holcombe, R. F. Expression of secreted Wnt antagonists in gastrointestinal tissues: potential role in stem cell homeostasis. *J Clin Pathol* **58**(5): 515-519 (2005).

[64] Taniguchi, H., Yamamoto, H., Hirata, T., Miyamoto, N., Oki, M., Nosho, K., Adachi, Y., Endo, T., Imai, K. and Shinomura, Y. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* **24**(53): 7946-7952 (2005).

[65] Ai, L., Tao, Q., Zhong, S., Fields, C. R., Kim, W. J., Lee, M. W., Cui, Y., Brown, K. D. and Robertson, K. D. Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer. *Carcinogenesis* **27**(7): 1341-1348 (2006).

[66] Urakami, S., Shiina, H., Enokida, H., Kawakami, T., Tokizane, T., Ogishima, T., Tanaka, Y., Li, L. C., Ribeiro-Filho, L. A., Terashima, M., Kikuno, N., Adachi, H., Yoneda, T., Kishi, H., Shigeno, K., Konety, B. R., Igawa, M. and Dahiya, R. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res* **12**(2): 383-391 (2006).

- [67] Queimado, L., Obeso, D., Hatfield, M. D., Yang, Y., Thompson, D. M. and Reis, A. M. Dysregulation of Wnt pathway components in human salivary gland tumors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **134**(1): 94-101 (2008).
- [68] Kawakami, K., Hirata, H., Yamamura, S., Kikuno, N., Saini, S., Majid, S., Tanaka, Y., Kawamoto, K., Enokida, H., Nakagawa, M. and Dahiya, R. Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer. *Cancer Res* **69**(22): 8603-8610 (2009).
- [69] Ramachandran, I., Thavathiru, E., Ramalingam, S., Natarajan, G., Mills, W. K., Benbrook, D. M., Zuna, R., Lightfoot, S., Reis, A., Anant, S. and Queimado, L. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Oncogene* **31**(22): 2725-2737 (2012).
- [70] Ramachandran, I., Ganapathy, V., Gillies, E., Fonseca, I., Sureban, S. M., Houchen, C. W., Reis, A. and Queimado, L. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death Dis* **5**: e1246 (2014).
- [71] Ko, Y. B., Kim, B. R., Yoon, K., Choi, E. K., Seo, S. H., Lee, Y., Lee, M. A., Yang, J. B., Park, M. S. and Rho, S. B. WIF1 can effectively co-regulate pro-apoptotic activity through the combination with DKK1. *Cell Signal* **26**(11): 2562-2572 (2014).
- [72] Surmann-Schmitt, C., Sasaki, T., Hattori, T., Eitzinger, N., Schett, G., von der

Mark, K. and Stock, M. The Wnt antagonist Wif-1 interacts with CTGF and inhibits CTGF activity. *J Cell Physiol* **227**(5): 2207-2216 (2012).

[73] Lu, D., Dong, W., Zhang, X., Quan, X., Bao, D., Lu, Y. and Zhang, L. WIF1 causes dysfunction of heart in transgenic mice. *Transgenic Res* **22**(6): 1179-1189 (2013).

[74] Whelan, R. S., Kaplinskiy, V. and Kitsis, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* **72**: 19-44 (2010).

[75] Kung, G., Konstantinidis, K. and Kitsis, R. N. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circ Res* **108**(8): 1017-1036 (2011).

[76] Nishida, K., Kyoi, S., Yamaguchi, O., Sadoshima, J. and Otsu, K. The role of autophagy in the heart. *Cell Death Differ* **16**(1): 31-38 (2009).

[77] Dorn, G. W., 2nd Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* **81**(3): 465-473 (2009).

[78] Erickson, J. R., Joiner, M. L., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C. V., Bartlett, R. K., Lowe, J. S., O'Donnell, S. E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M. C., Zimmerman, K., Ham, A. J., Weiss, R. M., Spitz, D. R., Shea, M. A., Colbran, R. J., Mohler, P. J. and Anderson, M. E. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* **133**(3): 462-474 (2008).

- [79] Diwan, A., Wansapura, J., Syed, F. M., Matkovich, S. J., Lorenz, J. N. and Dorn, G. W., 2nd Nix-mediated apoptosis links myocardial fibrosis, cardiac remodeling, and hypertrophy decompensation. *Circulation* **117**(3): 396-404 (2008).
- [80] Yussman, M. G., Toyokawa, T., Odley, A., Lynch, R. A., Wu, G., Colbert, M. C., Aronow, B. J., Lorenz, J. N. and Dorn, G. W., 2nd Mitochondrial death protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy. *Nat Med* **8**(7): 725-730 (2002).
- [81] Nakano, K. and Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3): 683-694 (2001).
- [82] Mandl, A., Huong Pham, L., Toth, K., Zambetti, G. and Erhardt, P. Puma deletion delays cardiac dysfunction in murine heart failure models through attenuation of apoptosis. *Circulation* **124**(1): 31-39 (2011).
- [83] Kaynak, B., von Heydebreck, A., Mebus, S., Seelow, D., Hennig, S., Vogel, J., Sperling, H. P., Pregla, R., Alexi-Meskishvili, V., Hetzer, R., Lange, P. E., Vingron, M., Lehrach, H. and Sperling, S. Genome-wide array analysis of normal and malformed human hearts. *Circulation* **107**(19): 2467-2474 (2003).
- [84] Steenman, M., Chen, Y. W., Le Cunff, M., Lamirault, G., Varro, A., Hoffman, E. and Leger, J. J. Transcriptomal analysis of failing and nonfailing human hearts. *Physiol*

*Genomics* **12**(2): 97-112 (2003).

[85] Kaufman, B. D., Desai, M., Reddy, S., Osorio, J. C., Chen, J. M., Mosca, R. S., Ferrante, A. W. and Mital, S. Genomic profiling of left and right ventricular hypertrophy in congenital heart disease. *J Card Fail* **14**(9): 760-767 (2008).

[86] Tabibiazar, R., Wagner, R. A., Liao, A. and Quertermous, T. Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns. *Circ Res* **93**(12): 1193-1201 (2003).

[87] Chugh, S. S., Whitesel, S., Turner, M., Roberts, C. T., Jr. and Nagalla, S. R. Genetic basis for chamber-specific ventricular phenotypes in the rat infarct model. *Cardiovasc Res* **57**(2): 477-485 (2003).

[88] Urashima, T., Zhao, M., Wagner, R., Fajardo, G., Farahani, S., Quertermous, T. and Bernstein, D. Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murine model of pulmonary stenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(3): H1351-H1368 (2008).

[89] Modesti, P. A., Vanni, S., Bertolozzi, I., Cecioni, I., Lumachi, C., Perna, A. M., Boddi, M. and Gensini, G. F. Different growth factor activation in the right and left ventricles in experimental volume overload. *Hypertension* **43**(1): 101-108 (2004).

[90] Friehs, I., Cowan, D. B., Choi, Y. H., Black, K. M., Barnett, R., Bhasin, M. K.,



Daly, C., Dillon, S. J., Libermann, T. A., McGowan, F. X., del Nido, P. J., Levitsky, S. and McCully, J. D. Pressure-overload hypertrophy of the developing heart reveals activation of divergent gene and protein pathways in the left and right ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**(5): H697-708 (2013).

[91] D'Angelo, D. D., Sakata, Y., Lorenz, J. N., Boivin, G. P., Walsh, R. A., Liggett, S. B. and Dorn, G. W., 2nd Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 8121-8126 (1997).

[92] Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H. A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L. and Konnerth, A. TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* **59**(3): 392-398 (2008).

[93] Dietrich, A., Mederos, Y. Schnitzler M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F. C., Gudermann, T. and Birnbaumer, L. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol* **25**(16): 6980-6989 (2005).

[94] Shioya, T. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *J Physiol Sci* **57**(6): 327-335 (2007).

[95] Wang, L., Feng, Z., Wang, X. and Zhang, X. DEGseq: an R package for

identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* **26**(1): 136-138 (2010).

[96] Huang da, W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**(1): 44-57 (2009).

[97] Huang da, W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**(1): 1-13 (2009).

[98] Irlbeck, M., Muhling, O., Iwai, T. and Zimmer, H. G. Different response of the rat left and right heart to norepinephrine. *Cardiovasc Res* **31**(1): 157-162 (1996).

[99] Morrell, N. W., Morris, K. G. and Stenmark, K. R. Role of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II in development of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol* **269**(4 Pt 2): H1186-1194 (1995).

[100] Morrell, N. W., Danilov, S. M., Satyan, K. B., Morris, K. G. and Stenmark, K. R. Right ventricular angiotensin converting enzyme activity and expression is increased during hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* **34**(2): 393-403 (1997).

[101] de Man, F. S., Tu, L., Handoko, M. L., Rain, S., Ruiters, G., Francois, C., Scholij, I., Dorfmueller, P., Simonneau, G., Fadel, E., Perros, F., Boonstra, A., Postmus, P. E., van

der Velden, J., Vonk-Noordegraaf, A., Humbert, M., Eddahibi, S. and Guignabert, C. Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **186**(8): 780-789 (2012).

[102] Chan, E. T., Quon, G. T., Chua, G., Babak, T., Trochesset, M., Zirngibl, R. A., Aubin, J., Ratcliffe, M. J., Wilde, A., Brudno, M., Morris, Q. D. and Hughes, T. R. Conservation of core gene expression in vertebrate tissues. *J Biol* **8**(3): 33 (2009).

[103] Zheng-Bradley, X., Rung, J., Parkinson, H. and Brazma, A. Large scale comparison of global gene expression patterns in human and mouse. *Genome Biol* **11**(12): R124 (2010).

[104] Ravasi, T., Suzuki, H., Cannistraci, C. V., Katayama, S., Bajic, V. B., Tan, K., Akalin, A., Schmeier, S., Kanamori-Katayama, M., Bertin, N., Carninci, P., Daub, C. O., Forrest, A. R., Gough, J., Grimmond, S., Han, J. H., Hashimoto, T., Hide, W., Hofmann, O., Kamburov, A., Kaur, M., Kawaji, H., Kubosaki, A., Lassmann, T., van Nimwegen, E., MacPherson, C. R., Ogawa, C., Radovanovic, A., Schwartz, A., Teasdale, R. D., Tegner, J., Lenhard, B., Teichmann, S. A., Arakawa, T., Ninomiya, N., Murakami, K., Tagami, M., Fukuda, S., Imamura, K., Kai, C., Ishihara, R., Kitazume, Y., Kawai, J., Hume, D. A., Ideker, T. and Hayashizaki, Y. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell* **140**(5): 744-752 (2010).

- [105] Humbert, M., Sitbon, O., Yaici, A., Montani, D., O'Callaghan, D. S., Jais, X., Parent, F., Savale, L., Natali, D., Gunther, S., Chaouat, A., Chabot, F., Cordier, J. F., Habib, G., Gressin, V., Jing, Z. C., Souza, R. and Simonneau, G. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **36**(3): 549-555 (2010).
- [106] Vonk-Noordegraaf, A., Haddad, F., Chin, K. M., Forfia, P. R., Kawut, S. M., Lumens, J., Naeije, R., Newman, J., Oudiz, R. J., Provencher, S., Torbicki, A., Voelkel, N. F. and Hassoun, P. M. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol* **62**(25 Suppl): D22-33 (2013).
- [107] Ryan, J. J. and Archer, S. L. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res* **115**(1): 176-188 (2014).
- [108] Kitahori, K., He, H., Kawata, M., Cowan, D. B., Friehs, I., Del Nido, P. J. and McGowan, F. X., Jr. Development of left ventricular diastolic dysfunction with preservation of ejection fraction during progression of infant right ventricular hypertrophy. *Circ Heart Fail* **2**(6): 599-607 (2009).
- [109] Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. and McMurtry, I. F. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery

and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**(6): L1013-1032 (2009).

[110] Ciucan, L., Bonneau, O., Hussey, M., Duggan, N., Holmes, A. M., Good, R., Stringer, R., Jones, P., Morrell, N. W., Jarai, G., Walker, C., Westwick, J. and Thomas, M. A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **184**(10): 1171-1182 (2011).

[111] Morgan, P. E., Correa, M. V., Ennis, I. L., Diez, A. A., Perez, N. G. and Cingolani, H. E. Silencing of sodium/hydrogen exchanger in the heart by direct injection of naked siRNA. *J Appl Physiol (1985)* **111**(2): 566-572 (2011).

## 8. 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導および多大な助言をいただいた瀧本英樹先生（肺高血圧先進医療研究学講座、Johns Hopkins University Department of Cardiology）、指導教官の小室一成先生（循環器内科学）とはじめとする、東京大学大学院医学系研究科循環器内科学および関係の先生方に感謝の意を表す。

本研究の一部は、NIH RO1 HL 093432、日本学術振興会若手研究者インターナショナル・トレーニング・プログラム(ITP)（平成 24 年度）、文部科学省科学研究費補助金（平成 25 年度、研究活動スタート支援：課題番号 25893400）、東京大学大学院医学系研究科博士課程研究遂行協力制度（平成 25 年度、平成 26 年度）のサポートのもと行われた。