

心不全における DNA 損傷の病的意義の解明

小室一成

東京大学 医学部附属病院 循環器内科

【研究の背景】

人口の高齢化に伴って心不全の患者は増えているが、その予後・治療応答は個々の患者によって大きく異なる。薬物治療に反応して病態をコントロールできる症例もあるが、治療に反応しない場合の予後は極めて悪い。**心不全の予後規定因子を同定してその機能的意義を解明することが臨床上特に重要である。**

我々は、心不全患者の心臓組織の single-cell RNA-seq 解析により、予後の悪い心不全患者が特異的に有する不全型の心筋を同定し、その細胞は DNA 損傷応答が生じていることを明らかにした(Nomura, Komuro et al. *Nat Commun* 2018)。DNA 損傷を起こした細胞では、Poly ADP-Ribose polymerase (PARP) というタンパク質が損傷部位にリクルートされ、DNA 修復タンパク・損傷 DNA・ひいては PARP 自体に Poly ADP-Ribose (PAR) を誘導することが知られている。そこで我々は、心不全患者に対して PAR 染色と臨床経過の統合解析を行ったところ、薬物応答不良群で有意に PAR 陽性率が高く、陽性率 5.74% を閾値として PAR 陽性群と陰性群を分割すると、感度 81.5%・特異度 87.1% で薬物応答性を予測できることを見出した(Ko, Komuro et al. *JACC Basic Transl Sci.* 2019; 特許出願済)。すなわち、我々は**心筋 DNA 損傷を心不全の予後規定因子として確立した**。しかしながら、**DNA 損傷がいかにかに心筋の不可逆性を規定しているか?** という最も重要な問いを解かなければ、心不全の本質的な治療法を確立できない。

DNA 損傷はゲノム上の特定の遺伝子領域で生じ、その領域の遺伝子発現、そして細胞機能に大きく影響を及ぼしている可能性がある。例えば脳では、神経活動が活発化するとニューロンにおいて early response genes (*Fos*, *Npas4*, *Egr1* など) のプロモーターにトポイソメラーゼ 2β がリクルートされて生じる二本鎖切断 (γ -H2A.X が誘導される DNA 損傷) によって、下流の遺伝子発現が活性化される(Madabhushi et al. *Cell* 2015)。我々の超解像顕微鏡解析では、心筋 DNA 損傷は核膜周囲のクロマチンにおいて選択的に生じており、核膜周囲でヘテロクロマチンとして抑制されていた胎児型遺伝子領域に DNA 損傷が誘導されることで胎児型遺伝子群の再活性化(Komuro, Yazaki. *Annu Rev Physiol* 1993) が生じている可能性がある。そこで本研究では、**心不全の本質である DNA 損傷がいかにかにして誘導されるか? その損傷が遺伝子発現・細胞機能にどのように影響を与えるか?** を明らかにし、その分子機序を標的とした治療法の開発を目指す

【目 的】

心筋 DNA 損傷が生じる機序・DNA 損傷が誘導する心不全発症機序を解明して、心不全における心筋 DNA 損傷の生物学的・臨床的意義を明らかにする。

【方 法】

圧負荷心不全モデルマウス・心筋梗塞モデルマウス・心不全患者・DNA 損傷モデル(LMNA 遺伝子変異マウス・LMNA 遺伝子変異 iPS 心筋)を用いて、シングルセル RNA-seq 解析(遺伝子発現)・CUT&RUN(エピゲノム解析)・電子顕微鏡解析(細胞内分子構造)・プロテインアレイ(タンパク相互作用解析)・ゲノム編集/遺伝子改変(機能解析)といった技術を用いて心筋 DNA 損傷が生じる機序・DNA 損傷が誘導する心不全発症機序を解明する。

【結 果】

① DNA 損傷陽性心筋の誘導機序・心不全発症における機能的意義の解明 (Ko, Komuro et al. Nat Commun. in review)

我々はまず圧負荷心不全モデルマウスの心臓を用いてシングルセル RNA-seq 解析を実施し、リガンド・受容体データベースと統合して、心臓内の各細胞種の間には存在する分子間相互作用を網羅的に解析した。その結果、圧負荷によって心筋細胞と線維芽細胞の間に TGF- β シグナル関連分子の相互作用が増強しており、線維芽細胞において機能未知の遺伝子 Htra3 (セリンプロテアーゼタンパクをコード) が発現していることを見出した。全身において Htra3 が心臓線維芽細胞で特異的に発現していることを確認した後に Htra3 KO マウスを作製したところ、軽度の圧負荷によって重度の心不全が誘発されたことから、線維芽細胞が発現する Htra3 は心臓恒常性を維持する上で重要な保護的分子であることがわかった。

そこで Htra3 KO マウスを用いてシングルセル解析を実施したところ、Htra3 の KO によって線維芽細胞で TGF- β シグナルが活性化することがわかり、タンパク免疫沈降によって Htra3 と TGF- β の直接の相互作用が確認された。さらに Htra3 を心臓線維芽細胞において過剰発現すると TGF- β の分解が顕著に亢進したことから、Htra3 は TGF- β と結合して分解を誘導することがわかった。さらに KO マウスの心筋シングルセル RNA-seq 解析を実施したところ、心筋に誘導される著明な TGF- β シグナルの活性化によって DNA 修復遺伝子の発現低下・NADPH oxidase NOX4 の発現上昇を介した DNA 損傷の蓄積・p53 シグナルの活性化が生じること、さらには不全心筋特有の分泌タンパク質を発現することを見出した。

さらに、ヒト心不全患者の心臓から単離した心筋細胞をシングルセル RNA-seq で解析し、マウスで同定された不全心筋の特徴 (TGF- β ・DNA 損傷・p53 シグナル活性化および特有の分泌タンパク質発現) が同様に認められることを確認した。そして心不全患者の血液プロテオームデータと統合することによって、DNA 損傷陽性の不全心筋が分泌する IGFBP7 が心不全の重症度を規定するバイオマーカーであることを発見した。

② 致死的不整脈の発症に関係するドパミン受容体 D1 陽性心筋の発見 (Yamaguchi, Komuro et al. Nat Commun. 2020)

心不全患者は致死的不整脈を発症すると突然死を起こすことがあるが、その分子機序は長らく不明であった。そこで我々は、圧負荷心不全モデルマウス・心不全患者の心筋シングルセル RNA-seq データを用いて、共通して不全心筋で発現上昇するドパミン受容体 D1 (DRD1) 遺伝子に着目した。興味深いことに、この DRD1 陽性心筋は心不全患者の中でも致死的不整脈を生じる患者において特異的に認められた。

そこで DRD1 遺伝子をマウスの心筋細胞において特異的に過剰発現したところ、リアノジン受容体のリン酸化が亢進して細胞内カルシウム濃度が上昇し、カルシウムトランジェントが異常となった。さらに DRD1 遺伝子を心筋特異的に KO したところ、圧負荷心不全で誘導される致死的不整脈が消失した。以上のことから、DNA 損傷によって誘導される不全心筋において発現上昇する DRD1 陽性心筋は心不全患者の致死的不整脈の発症に寄与することが明らかとなった。

③ Lamin A/C (LMNA) 遺伝子変異が誘発する DNA 損傷は VDR 機能不全で生じる (Ito, Komuro et al. submitted)

以前我々は、遺伝的な要因で心不全を発症する拡張型心筋症のゲノム解析を実施し、LMNA 遺伝子変異患者は予後不良な拡張型心筋症・心不全を発症することを見出していた (Tobita, Komuro et al. Sci Rep. 2018)。そこで LMNA 遺伝子変異 p.Q353R を有する患者から iPS 細胞を樹立し、心筋細胞に分化誘導すると DNA 損傷の蓄積が生じることを見出した。以前我々は、DNA 損傷を修復する Xrcc1 を心筋特異的に KO して DNA 損傷を蓄積させると、軽度の圧負荷によって心不全を発症したことを見出しており (Higo, Komuro et al. Nat Commun. 2017)、心筋の DNA 損傷は心不全の直接的な原因と考えられた。そこで上記の LMNA 変異 iPS 心筋で生じる DNA 損傷を減弱させる化合物を特定するスクリーニングを実施したところ、ビタミン D2 を候補化合物として同定することに成功した。

さらに、網羅的にタンパク相互作用を解析するプロテインアレイを実施したところ、変異 Lamin A/C タンパクで野生型と比較して結合が増強するタンパクとして VDR (ビタミン D 受容体) を同定した。また免疫染色を実施したところ、LMNA 変異 iPS 心筋では変異 Lamin A/C とともに VDR が核膜に局在していることがわかり、レポーターアッセイによって LMNA 変異 iPS 心筋では VDR による転写活性が減弱していることが判明した。また RNA-seq によって、LMNA 変異 iPS 心筋では DNA 修復関連遺伝子群の発現が減弱している一方、ビタミン D2 投与によってそれらの発現が回復することも見出した。さらに、圧負荷によってマウスで誘導される心筋 DNA 損傷・心不全発症をビタミン D2 投与によってレスキューできることも実証した。以上のことから、心筋において DNA 損傷を誘発する LMNA 遺伝子変異の背景には VDR 機能不全が存在することを見出した。

④ LMNA 遺伝子変異で生じる心筋成熟化不良は TEAD1 機能不全で生じる (Yamada, Komuro et al. in preparation)

上記のように LMNA 変異は DNA 損傷を惹起するが、一方で心筋細胞の構造や機能に対する直接的な影響の存在も示

唆される。そこで我々は、LMNA 変異 p.Q353R をマウスにおいて CRISPR/Cas9 で導入して機能解析を実施した。この LMNA 変異マウスは拡張型心筋症・心不全を発症して出生直後に速やかに死亡した。そこで胎仔の心臓を取り出してシングルセル RNA-seq 解析を実施したところ、LMNA 変異を有する心筋では成熟化の不良が生じており、シングルセル ATAC-seq 解析を実施したところ、その心筋成熟化には TEAD1 が上流転写因子として関わることがわかった。心筋細胞の構造的な成熟化不良については電子顕微鏡解析によっても確認することができた。

そこで前述したプロテインアレイを実施したところ、Lamin A/C に p.Q353R 変異が入ると TEAD1 との相互作用が顕著に亢進することがわかり、免疫染色によって LMNA 変異 iPS 心筋では特異的に TEAD1 が変異 Lamin A/C とともに核膜に局在していることがわかり、変異 Lamin A/C によって TEAD1 が核膜にトラップされることによって転写に寄与できなくなると示唆された。また、TEAD1 による転写を活性化する化合物 TT-10 を投与することによって、LMNA 変異 iPS 心筋において心筋成熟化に関連する遺伝子の発現回復が認められた。さらに、同じ LMNA p.Q353R 変異を有する患者の心臓から心筋細胞を単離してシングルセル RNA-seq を実施すると、TEAD1 によって制御される下流遺伝子の発現が顕著に減弱していたことから、マウス・iPS で同定した分子機序はヒト心不全患者においても同様に認められることを確認することができた。

⑤ 心筋梗塞後の心筋において RNA 分解を制御する Btg2 の同定 (Ko, Komuro et al. in preparation)

我々は心筋梗塞後の梗塞巣に残存する心筋細胞を単離してシングルセル解析を実施することで、梗塞後に DNA 損傷が蓄積して p53 シグナルが活性化し、p16 陽性の老化心筋へと変化することを見出していた。そこで DNA 損傷・p53 シグナルが心筋に与える影響を解析するために CUT&RUN によって DNA 損傷の局在をゲノムワイドに解析したところ、DNA 二本鎖切断を誘導する TOP2β・DNA 損傷で生じる gH2A.X・その後の修復に関わる RAD51/XRCC1/XRCC4 などが胎仔型遺伝子 (Myh7 など) や p53 関連遺伝子 (p21・Btg2 など) の領域に生じることがわかった。そこで、p53 の下流として働く Btg2 に着目して機能解析を実施した。

Btg2 を心筋細胞で特異的に KO すると心筋梗塞後の心臓リモデリングが増悪したことから、Btg2 は心筋細胞において保護的に働く遺伝子であることがわかった。そこでこの KO マウスに心筋梗塞の前後で心筋細胞を単離してシングルセル RNA-seq 解析を実施したところ、生理的な状況では Btg2 は心筋細胞を構成するサルコメア関連遺伝子の発現を減弱させており、心筋梗塞後には発生関連遺伝子の発現を減弱させていることがわかった。Btg2 は mRNA の polyA に結合して脱アデニル化を誘導して RNA 分解を制御することが知られており、本研究によって、生理的・病的状態で Btg2 は分解する標的遺伝子を変えることによって心臓恒常性を維持していることが明らかとなった。

【考 察】

上記の各研究によって得られた知見から心筋 DNA 損傷の意義について考察する。

① DNA 損傷陽性心筋の誘導機序・心不全発症における機能的意義の解明 (Ko, Komuro et al. Nat Commun. in review)

本研究では、心臓線維芽細胞の Htra3 に着目し、その KO によって分解標的とする TGF-β の活性化が誘導する心筋細胞の DNA 損傷蓄積・分泌形質獲得といった分子機序を明らかにした。TGF-β シグナル活性化 > DNA 修復遺伝子不活化・NOX4 活性化 > 心筋 DNA 損傷蓄積 > p53 シグナル活性化 > 不全心筋特有の分泌形質獲得 (例:IGFBP7)、といった流れを詳細に明らかにできたことから、心不全における DNA 損傷の位置付けが明確となった。

② 致死的不整脈の発症に関係するドパミン受容体 D1 陽性心筋の発見 (Yamaguchi, Komuro et al. Nat Commun. 2020)

本研究では、不全心筋の別の側面として、ドパミン受容体 D1 遺伝子活性化によって誘発される伝導障害といった病態が存在することを明らかにした。この因子を標的として致死的不整脈を予測・治療できる可能性があり、臨床における意義も大きいものと考えている。

③ Lamin A/C (LMNA) 遺伝子変異が誘発する DNA 損傷は VDR 機能不全で生じる (Ito, Komuro et al. submitted)

本研究では、重症拡張型心筋症・心不全の原因である LMNA 遺伝子変異が VDR 機能不全によって DNA 損傷の蓄積を誘導することを明らかにした。ビタミン D2 投与によって DNA 損傷を減弱させて圧負荷心不全の病態を改善できることも示しており、心不全全般において生じる心筋 DNA 損傷を改善する手段としてビタミン D2 を同定した点でも意義がある。

④ LMNA 遺伝子変異で生じる心筋成熟化不良は TEAD1 機能不全で生じる (Yamada, Komuro et al. in preparation)

本研究では、上記 LMNA 変異で DNA 損傷と同時に生じる心筋細胞の形態的・機能的な成熟化不良が生じる背景として、TEAD1 の転写における機能不全が存在することを明らかにした。また TEAD1 の機能を制御する化合物 TT-10 の投与によ

って成熟化遺伝子群の発現回復が認められたことから、これによる治療可能性を見出したことにも意義があると言える。

⑤ 心筋梗塞後の心筋において RNA 分解を制御する Btg2 の同定 (Ko, Komuro et al. in preparation)

本研究では、心筋細胞で DNA 損傷・修復が生じる領域をゲノムワイドに解析することによって同定した Btg2 が、特異的な RNA 分解を介して生理的・病的状態における心筋恒常性を制御していることを明らかにした。個体において DNA 損傷・修復が生じる部位を同定する手段を確立しただけでなく、その DNA 損傷・修復が心筋梗塞病態を制御することを明らかにした点で意義があると言える。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で明らかにした上記 5 つの成果はいずれも臨床的意義が高いと考えられる。具体的には、①で明らかにした Htra3・TGF- β ・IGFBP7 はいずれも心不全の層別化・治療標的となり得る。実際に IGFBP7 は重症心不全を判別する予後予測バイオマーカーとなることを実証している。②で明らかにした DRD1 は心不全において致死的不整脈を予測・治療する因子となり得る。③で明らかにしたビタミン D2・VDR を制御することによって、DNA 修復因子を活性化して DNA 損傷を減弱する治療法に直結する。④で明らかにした TEAD1 は LMNA 変異で異常となる心筋成熟化における標的分子となる。我々は実際に、TEAD1 の機能を活性化する TT-10 による治療可能性を示している。最後に、⑤で明らかにした Btg2 を制御することによって心筋梗塞で必要となる mRNA 分解を調節した治療法につながる。我々のこれらの研究によって、心不全を中心とした心臓疾患における DNA 損傷の機能的意義が明らかとなった。今後は、明らかとなった分子機序を標的としたバイオマーカー・治療標的としてさらに発展させていく。

【参考・引用文献】

1. Kato M, Nomura S, Yamada S, Aburatani H, Komuro I. Single-Cardiomyocyte RNA Sequencing to Dissect the Molecular Pathophysiology of the Heart. *Methods Mol Biol*. 2320: 183-192, 2021
2. Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Ishii S, Numata G, Tokiwa H, Maemura S, Suzuki T, Takiguchi H, Kubota Y, Seo K, Sakata A, Nomura S, Hatano M, Ueda K, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Nishimura S, Komuro I. Three-Dimensional Visualization of Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling in Mice. *Circulation*. 144: 1452-1455, 2021
3. Ishizuka M, Harada M, Nomura S, Ko T, Ikeda Y, Guo J, Bujo S, Yanagisawa-Murakami H, Satoh M, Yamada S, Kumagai H, Motozawa Y, Hara H, Fujiwara T, Sato T, Takeda N, Takeda N, Otsu K, Morita H, Toko H, Komuro I. CXCR7 ameliorates myocardial infarction as a β -arrestin-biased receptor. *Sci Rep*. 11: 3426, 2021
4. Nomura S, Komuro I. Precision medicine for heart failure based on molecular mechanisms: The 2019 ISHR Research Achievement Award Lecture. *J Mol Cell Cardiol*. 152: 29-39, 2021
5. Koyama S, Ito K, Terao C, Akiyama M, Horikoshi M, Momozawa Y, Matsunaga H, Ieki H, Ozaki K, Onouchi Y, Takahashi A, Nomura S, Morita H, Akazawa H, Kim C, Seo JS, Higasa K, Iwasaki M, Yamaji T, Sawada N, Tsugane S, Koyama T, Ikezaki H, Takashima N, Tanaka K, Arisawa K, Kuriki K, Naito M, Wakai K, Suna S, Sakata Y, Sato H, Hori M, Sakata Y, Matsuda K, Murakami Y, Aburatani H, Kubo M, Matsuda F, Kamatani Y, Komuro I. Population-specific and trans-ancestry genome-wide analyses identify distinct and shared genetic risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 52: 1169-1177, 2020
6. Yamaguchi T, Sumida TS, Nomura S, Satoh M, Higo T, Ito M, Ko T, Fujita K, Sweet ME, Sanbe A, Yoshimi K, Manabe I, Sasaoka T, Taylor MRG, Toko H, Takimoto E, Naito AT, Komuro I. Cardiac dopamine D1 receptor triggers ventricular arrhythmia in chronic heart failure. *Nat Commun*. 11: 4364, 2020
7. Ito M, Hara H, Takeda N, Naito AT, Nomura S, Kondo M, Hata Y, Uchiyama M, Morita H, Komuro I. Characterization of a small molecule that promotes cell cycle activation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 128: 90-95, 2019
8. Satoh M, Nomura S, Harada M, Yamaguchi T, Ko T, Sumida T, Toko H, Naito AT, Takeda N, Tobita T, Fujita T, Ito

- M, Fujita K, Ishizuka M, Kariya T, Akazawa H, Kobayashi Y, Morita H, Takimoto E, Aburatani H, **Komuro I**. High-throughput single-molecule RNA imaging analysis reveals heterogeneous responses of cardiomyocytes to hemodynamic overload. *J Mol Cell Cardiol.* 128: 77–89, 2019
9. Ko T, Fujita K, Nomura S, Uemura Y, Yamada S, Tobita T, Katoh M, Satoh M, Ito M, Domoto Y, Hosoya Y, Amiya E, Hatano M, Morita H, Fukayama M, Aburatani H, **Komuro I**. Quantification of DNA Damage in Heart Tissue as a Novel Prediction Tool for Therapeutic Prognosis of Patients With Dilated Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci.* 4: 670–680, 2019
10. Hara H, Takeda N, Kondo M, Kubota M, Saito T, Maruyama J, Fujiwara T, Maemura S, Ito M, Naito AT, Harada M, Toko H, Nomura S, Kumagai H, Ikeda Y, Ueno H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Hata Y, Uchiyama M, **Komuro I**. Discovery of a Small Molecule to Increase Cardiomyocytes and Protect the Heart After Ischemic Injury. *JACC Basic Transl Sci.* 3: 639–653, 2018
11. Tobita T, Nomura S, Fujita T, Morita H, Asano Y, Onoue K, Ito M, Imai Y, Suzuki A, Ko T, Satoh M, Fujita K, Naito AT, Furutani Y, Toko H, Harada M, Amiya E, Hatano M, Takimoto E, Shiga T, Nakanishi T, Sakata Y, Ono M, Saito Y, Takashima S, Hagiwara N, Aburatani H, **Komuro I**. Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling. *Sci Rep.* 8: 1998, 2018
12. Nomura S, Satoh M, Fujita T, Higo T, Sumida T, Ko T, Yamaguchi T, Tobita T, Naito AT, Ito M, Fujita K, Harada M, Toko H, Kobayashi Y, Ito K, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, **Komuro I**. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat Commun.* 9: 4435, 2018
13. Higo T, Naito AT, Sumida T, Shibamoto M, Okada K, Nomura S, Nakagawa A, Yamaguchi T, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, **Ito M**, Hikoso S, Akazawa H, Lee JK, Shiojima I, McKinnon PJ, Sakata Y, **Komuro I**. DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nat Commun.* 8: 15104, 2017
14. Fujii K, Shibata M, Nakayama Y, Ogata F, Matsumoto S, Noshita K, Iwami S, Nakae S, **Komuro I**, Nagai R, Manabe I. A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation. *Nat Med.* 23: 611–622, 2017
15. Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, **Komuro I**. Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat Commun.* 6: 6241, 2015
16. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, **Komuro I**. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* 149:1298–1313, 2012.
17. Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Akira S, Yamamoto A, **Komuro I**, Otsu K. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* 485:251–255, 2012.
18. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, **Komuro I**. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* 15:1082–1087, 2009.
19. Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, **Komuro I**. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* 454:345–349, 2008.
20. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkenstein JD, Zou Y, **Komuro I**. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 446:444–448, 2007.