

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5674046号
(P5674046)

(45) 発行日 平成27年2月18日(2015.2.18)

(24) 登録日 平成27年1月9日(2015.1.9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 G
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 E
C O 7 K 7/18 (2006.01)	C O 7 K 7/18

請求項の数 9 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2011-534275 (P2011-534275)
 (86) (22) 出願日 平成22年9月29日(2010.9.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/066952
 (87) 国際公開番号 W02011/040469
 (87) 国際公開日 平成23年4月7日(2011.4.7)
 審査請求日 平成25年8月7日(2013.8.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-226760 (P2009-226760)
 (32) 優先日 平成21年9月30日(2009.9.30)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 504150461
 国立大学法人鳥取大学
 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (72) 発明者 久留 一郎
 鳥取県米子市西町86番地 国立大学法人
 鳥取大学内
 (72) 発明者 白吉 安昭
 鳥取県米子市西町86番地 国立大学法人
 鳥取大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ペースメーカー細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または始原生殖細胞由来万能細胞に由来するペースメーカー細胞約3000個を含む細胞塊を作成し、これらを集めて約60000個以上のペースメーカー細胞を含む細胞塊としたものを移植片とすることを特徴とする、心臓ペースメーカーとして作動する移植片の製造方法であって、ペースメーカー細胞が、HCN4チャンネルとNaチャンネルを有し、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできるものである、製造方法。

【請求項2】

ペースメーカー細胞が、胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または始原生殖細胞由来万能細胞を心筋へと分化誘導し、HCN4チャンネルをマーカーとして選択することにより取得されるものである、請求項1記載の製造方法。

【請求項3】

ペースメーカー細胞が、HCN4チャンネル遺伝子を胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または始原生殖細胞由来万能細胞に導入して心筋へと分化誘導させ、HCN4チャンネル遺伝子が発現している細胞を選別することにより取得されるものである、請求項1記載の製造方法。

【請求項4】

ペースメーカー細胞が、HCN4チャンネル遺伝子に選別可能な標識をコードする遺伝子を組み込んでターゲティング遺伝子を作成し、これを胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性

10

20

幹細胞（iPS細胞）または始原生殖細胞由来万能細胞に導入し、標識が陽性である細胞を選別することにより得られるものである、請求項3記載の製造方法。

【請求項6】

請求項1～4のいずれか1項記載の製造方法により得られる心臓ペースメーカとして作動する移植片であって、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできるものである移植片。

【請求項10】

請求項1～4のいずれか1項記載の製造方法により得られる移植片を必須構成成分とし、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできるものである心臓ペースメーカ。

【請求項11】

Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできる心臓ペースメーカの製造のための請求項6記載の移植片の使用。

【請求項12】

請求項6記載の移植片を用いることを特徴とする、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできる心臓ペースメーカの製造方法。

【請求項13】

アミノ酸配列V S I N G M V N N S W（配列番号：1）またはV P M L Q D F P H D（配列番号：2）を免疫原として得られ、これらのアミノ酸配列を認識部位とするHCN4特異的抗体を用いてペースメーカ細胞の選択または選別を行うことを特徴とする、請求項2～4のいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、心臓ペースメーカ細胞、詳細には心拍数をコントロールできるペースメーカ細胞、その取得方法、その使用等に関する。本願は、2009年9月30日出願の日本国特許出願第2009-226760号に対して優先権主張をするものであり、日本国特許出願第2009-226760号の内容を本願に取り入れる。

【背景技術】

【0002】

心拍数が著しく減少する徐脈性不整脈は加齢とともに増加し、突然死や心不全、脳卒中の原因となり、少子高齢化が進むわが国において社会的な影響が大きい不整脈である。この疾患の治療法としては、心拍数を増やすために用いられる電池で作動する人工ペースメーカの移植以外に有用な手段が無く、年間およそ5万名の移植が行われている。人工ペースメーカ移植は、（1）手術を必要とし生体への侵襲性が高く、（2）電池消耗により5～8年で再植え込み術が必要となる。（3）さらに生体の活動度に合わせて心拍数が増加しないためにQOLの低下が避けられない。胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞は*in vitro*で3胚葉に分化でき、特にES細胞の凝集塊（胚様体）を形成すると心筋細胞に分化でき、その中にはペースメーカ細胞が含まれることが知られている（非特許文献1）。

【0003】

細胞から作成される生物学的ペースメーカは自ら電気信号を作ることができ、さらに自律神経のコントロールを受けることが出来れば、上記に示した人工ペースメーカの欠点を補うことが出来る。細胞から生物学的ペースメーカ細胞を作製するためには、幹細胞から心臓へ分化する過程で発生するペースメーカ細胞を選別採取する必要がある。前述のように胚性幹細胞や人工多能性幹細胞は細胞を3次元培養することで比較的容易に心臓へ分化誘導できるが、ペースメーカ細胞のみを選択的に採取することは未だ出来ていない。ペースメーカ細胞を選別できる指標が見つかっていないことがその主な原因である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Yano S, Miake J, Mizuta E, Manabe K, Bahrudin U, Morikawa K, Arakawa K, et al. Changes of HCN gene expression and I(f) currents in Nkx2.5 positive cardiomyocytes derived from murine embryonic stem cells during differentiation. Biomed Res 2008; 29:195-203.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

これまでに国内外を問わず、心臓特異的な転写因子を用いて種々の心筋細胞を選別採取する研究は行われてきたが、ペースメーカー細胞の選別採取は成功していない。さらに将来の再生医療への応用を考えた時に、胚性幹細胞や人工多能性幹細胞の遺伝子改変を必要とせず、ペースメーカー細胞だけを選別する方法を確立する必要がある。加えて、心拍数を随時かつ随意に制御することができるペースメーカー細胞が得られれば、生体の活動度に合わせて心拍数が増加しないために患者のQOLの低下を避けることができる。

【0006】

本発明者らはペースメーカー細胞の細胞表面に特異的に存在するイオンチャンネルを指標としてペースメーカー細胞を選別できないかと考えた。これが可能であれば、イオンチャンネルの抗体を用いることで胚性幹細胞や人工多能性幹細胞の遺伝子改変を行わずにペースメーカー細胞を採取することが出来、再生医療への応用が容易となる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するために、上記仮説に基づいて鋭意研究を行い、網羅的遺伝子解析を行った結果、ES細胞が心臓へ分化する過程でペースメーカー細胞に特異的なチャンネルを発現すること、マウスES細胞にHCN-GFPレポーター遺伝子をノックインした系を用いた場合、HCN4チャンネルがペースメーカー細胞を選別採取するのに有用な指標であること、この方法で採取した細胞はHCNチャンネル、Caチャンネル、HERGチャンネルを発現するが、内向き整流Kチャンネルを発現しないというペースメーカー細胞としての特徴をそなえていることを見出した。一方で、予測に反して、本発明者らは、本発明のペースメーカー細胞は、Naチャンネルを保有すること、さらにNaチャンネルを制御することでその心拍数をコントロールできる新規のペースメーカー細胞であることを見出した。さらに、本発明者らは、本発明のペースメーカー細胞を集合させて細胞塊として動物の心筋に移植したところ、強力かつ永続的なペースメーカー機能が発揮され、心拍数もコントロール可能であることを見出した。さらに、本発明者らは、この細胞を認識できる抗体の作成に成功した。かくして本発明者らは本発明を完成させたのである。

【0008】

すなわち、本発明の主な特徴は：

(i) ES細胞を心筋へ分化誘導しHCN4チャンネルをマーカーとしペースメーカー細胞を選択的に採取することが出来る。

(ii) 本発明のペースメーカー細胞は、ペースメーカー細胞としての基本的な性質に加えてNaチャンネルを多く発現し、Naチャンネルを制御することでその心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞である。

(iii) 本発明は、ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞においても利用が出来る。

(iv) 本発明のペースメーカー細胞は、一定数以上集合させて細胞塊として実際に心臓に移植した場合に、強力かつ永続的なペースメーカー機能を発揮する。しかも、その心拍数は自律神経の調節等でコントロール可能である。

(v) 本発明のペースメーカー細胞を認識できる抗体を、HCN4の細胞外ドメインの特定のアミノ酸配列を抗原認識部位として作成することができる。

【0009】

したがって、本発明は下記のものを提供する：

(1) HCN4チャンネルとNaチャンネルを有し、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞であって、胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞

胞 (iPS細胞) または始原生殖細胞由来万能細胞由来のペースメーカー細胞。

(2) 胚性幹細胞 (ES細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) または始原生殖細胞由来万能細胞を心筋へ分化誘導し、HCN4チャネルをマーカーとして選択することを特徴とする、Naチャネルの制御により心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞の取得方法。

(3) HCN4チャネル遺伝子を胚性幹細胞 (ES細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) または始原生殖細胞由来万能細胞に導入して心筋へと分化誘導させ、標識が陽性である細胞を選別取得することを特徴とする、Naチャネルの制御により心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞の製造方法。

(4) HCN4チャネル遺伝子に選別可能な標識をコードする遺伝子を組み込んでターゲット遺伝子を作成し、これを胚性幹細胞 (ES細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) または始原生殖細胞由来万能細胞に導入することを特徴とする、(3)記載のペースメーカー細胞の製造方法。 10

(5) (2) ~ (4) のいずれかに記載の方法により得られるペースメーカー細胞であって、HCN4チャネルとNaチャネルを有し、Naチャネルの制御により心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞。

(6) (1) または (5) 記載のペースメーカー細胞を含む移植片。

(7) ペースメーカー細胞が細胞塊を形成している (6) 記載の移植片。

(8) 細胞塊がペースメーカー細胞を約60000個以上含むものである (7) 記載の移植片。 20

(9) 細胞塊がペースメーカー細胞を約90000個以上含むものである (7) 記載の移植片。

(10) (1) または (5) 記載のペースメーカー細胞、あるいは (6) ~ (9) のいずれかに記載の移植片を必須構成成分とする、Naチャネルの制御により心拍数をコントロールできる心臓ペースメーカー。

(11) Naチャネルの制御により心拍数をコントロールできる心臓ペースメーカーの製造に用いられる (1) または (5) 記載のペースメーカー細胞、あるいは (6) ~ (9) のいずれかに記載の移植片。

(12) Naチャネルの制御により心拍数をコントロールできる心臓ペースメーカーの製造方法であって、(1) または (5) 記載のペースメーカー細胞、あるいは (6) ~ (9) のいずれかに記載の移植片を用いることを特徴とする方法。 30

(13) アミノ酸配列V S I N G M V N N S W (配列番号: 1) またはV P M L Q D F P H D (配列番号: 2) を免疫原として得られ、これらのアミノ酸配列を認識部位とするHCN4特異的抗体。

(14) (13) 記載の抗体を用いてペースメーカー細胞の選択または選別を行うことを特徴とする、(2) ~ (4) のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、本発明により心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞が提供される。本発明のペースメーカー細胞は、心拍数の制御を随時にかつ随意に行うことができる。そのため、患者のQOLの低下を防止することができる。また、本発明のペースメーカー細胞の取得方法においては、胚性幹細胞 (ES細胞) または人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の遺伝子改変を必要とせずにペースメーカー細胞だけを得ることができるので、再生医療への応用にも適している。さらに、本発明のペースメーカー細胞を一定数以上集合させて細胞塊として心筋に移植すると、ペースメーカー機能が強力かつ長続きする。 40

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】 図1は、HCN4チャネル遺伝子のプロモーター領域に、選別採取標識であるGFP遺伝子を連結したターゲット遺伝子を図式的に示す。この遺伝子を用いて、GFP遺伝子をAB1 (野生型) ES細胞株のHCN4 locusへ相同遺伝子組み 50

換えを行って、ノックインES細胞株を樹立した。

【図2】図2は、HCN4-GFP遺伝子ノックインES細胞のスクリーニング結果を示す。HCN4-GFP遺伝子ノックインES細胞の樹立をPCR法とサザンブロット法で確認した。

【図3】図3は、HCN4-GFP遺伝子ノックインES細胞の心臓への分化誘導に伴う胚様体の心拍数の変化を示すグラフである。

【図4】図4は、H7胚様体の拍動部位とGFP発現との関連を示すインキュベーションイメージングシステムの観察結果である。拍動部位とGFP発現部位を各々矢印で示し、白色破線で囲った。

【図5】図5は、GFPシグナル陽性細胞のみをFACSにより選別採取した結果を示す 10

。【図6】図6は、H7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞の形態を示す顕微鏡像である。

【図7】図7は、GFPシグナル陽性細胞の分化11日目、13日目、14日目の拍動数を示す。

【図8】図8は、分化誘導後11日目のH7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞のペースメーカー遺伝子発現を調べた結果である。+はGFP陽性分画、-はGFP陰性分画を示す。

【図9】図9は、分化誘導後7、10、15日目のH7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞の免疫染色の結果を示す。7+、7-、10+、10-、15+、15-は、それぞれ分化誘導後7日目のGFP陽性分画およびGFP陰性分画、分化誘導後10日目のGFP陽性分画およびGFP陰性分画、分化誘導後15日目のGFP陽性分画およびGFP陰性分画を示す。 20

【図10】図10は、分化誘導後18日目のH7胚葉体由来HCN4-GFP陽性細胞の免疫染色の結果を示す。

【図11】図11は、H7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞のHCN4チャンネルに駆動される自動能の解析結果を示す。

【図12】図12は、H7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞のペースメーカー活性を担うイオンチャンネルの解析結果を示す。

【図13】図13は、Naチャンネルを抑制した場合のGFPシグナル陽性細胞の電気活動をシミュレーションした結果を示す。 30

【図14】図14は、Naチャンネル阻害薬リドカイン濃度と本発明のペースメーカー細胞の心拍数の関係を示すグラフである。

【図15】図15は、H7胚葉体由来HCN4-GFP陽性細胞の β_1 受容体刺激による陽性変時作用を示す。具体的には、自律神経刺激薬イソプロテレノールによる本発明のペースメーカー細胞の心拍数の増加を示す図である。HCN4-GFP陽性細胞は交感神経の制御を受けるペースメーカー細胞である。

【図16】図16は、本発明のペースメーカー細胞の拍動数が、交感神経刺激薬イソプロテレノールに反応して増加し、副交感神経刺激薬カルバコールに反応して減少することを示す図である。 40

【図17】図17の左パネルは、組織化したペースメーカー細胞を含む細胞塊を移植した心臓のX-gal染色写真である。図17の右パネルはいずれも左パネルに示した心臓の心筋の切片をX-gal染色した顕微鏡像である。

【図18】図18は、房室ブロックラットの心臓に本発明のペースメーカー細胞を移植した効果を示す心電図である。横軸は時間(秒)、縦軸は電位(mV)である。

【図19】図19は、房室ブロックラットの心臓に本発明のペースメーカー細胞を移植した効果を示す心電図、ならびに交感神経刺激薬イソプロテレノールの腹腔内注射の心拍数に対する影響を示す心電図である。横軸は時間(秒)、縦軸は電位(mV)である。

【図20】図20は、HCN4の細胞外ドメインを認識する特異抗体の作成手順を図式化したものである。 50

【図 2 1】図 2 1 は、H C N 4 の細胞外ドメインを認識する特異抗体が H L - 1 細胞の H C N チャンネルを認識することを示すウェスタンブロッティングである。H C N 4 の細胞外ドメインを認識する特異抗体は H L - 1 細胞の H C N チャンネルを認識する。

【図 2 2】図 2 2 は、H C N 4 の細胞外ドメインを認識する特異抗体を用いた H 7 胚様体由来 H C N 4 - G F P 陽性細胞の免疫染色像である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 2 】

本発明は、主に以下の知見 (I) ~ (V) に基づくものである：

(I) 心臓の拍動を担う心臓ペースメーカー細胞の電気的な特徴に関するコンピューター・シミュレーションモデルを用いて検討し、本発明のペースメーカー細胞の性質を担う特徴的なイオンチャンネルは、H C N 遺伝子ファミリー、C a チャンネル遺伝子ファミリー、H E R G チャンネルなどの外向きチャンネルが重要である。これらによって生ずる電流が、本発明のペースメーカー細胞の自動能を発生させうることを見出した。

(I I) 網羅的遺伝子解析を行った結果、E S 細胞が心臓へ分化する過程でペースメーカー細胞に特異的なチャンネル (H C N チャンネル) を発現すること、さらに E S 細胞由来心筋細胞には H C N 4 チャンネルを発現することを見出した。

(I I I) H C N 4 チャンネル遺伝子のプロモーター領域に、選別採取標識である G F P 蛋白遺伝子を連結したレポーター遺伝子を作成し、これを遺伝子導入して片側の染色体アリルにレポーター遺伝子が組み込まれた細胞を樹立した。樹立した E S 細胞から G F P の蛍光を指標に本発明のペースメーカー細胞の選別採取に成功した。

(I V) 選別採取した本発明のペースメーカー細胞には自動能を示す細胞が存在し、ペースメーカー細胞に共通の特性を持っており、自律神経の制御を受けることを確認した。一方で、本発明のペースメーカー細胞は N a チャンネルを発現していることを細胞生物学的ならびに電気生理学的に証明し、N a チャンネルの制御下で心拍数をコントロールできることを薬理的に証明した。そこで、ペースメーカー細胞のコンピューター・シミュレーションモデルに N a チャンネルの要素を組み込んだモデルを作成し、実験結果を再現した。

(V) 本発明により得られたペースメーカー細胞は、一定数以上集合して細胞塊を形成した場合に、強力かつ持続的なペースメーカー機能を発揮できることを、房室ブロック後の動物の心室筋への細胞塊移植実験により確認した。しかも、移植された心臓の心拍数を自律神経の興奮でコントロールすることが可能であった。

(V I) 本細胞を認識できる抗体を H C N 4 の細胞外ドメインの特定のアミノ酸配列を抗原認識部位として作成し、本発明のペースメーカー細胞を認識できることを確認した。

【 0 0 1 3 】

したがって、本発明は、1 の態様において、H C N チャンネルと N a チャンネルを有し、N a チャンネルの制御により心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞であって、E S 細胞または i P S 細胞由来のペースメーカー細胞を提供する。本発明のペースメーカー細胞の H C N チャンネルは H C N 1、H C N 2、H C N 3、H C N 4 のいずれの H C N チャンネルであってもよいが、好ましくは H C N 4 チャンネルである。E S 細胞または i P S 細胞の由来動物種はいずれの動物種であってもよい。ペースメーカー細胞にて処置を行うべき動物種と同じ動物種由来の E S 細胞または i P S 細胞が好ましい。

【 0 0 1 4 】

本発明のペースメーカー細胞は、N a チャンネルを阻害または活性化させることにより拍動数 (心拍数) を随時かつ随意に制御できることを特徴とする。本発明のペースメーカー細胞の心拍数を増加させるには N a チャンネル活性化剤を細胞に作用させればよい。特に、使用可能な N a チャンネル活性化剤としては、サリチレート (s a l i c y l a t e) およびベンゾエート (b e n z o a t e) などが挙げられる。また、本発明のペースメーカー細胞の心拍数を減少させるには N a チャンネル阻害剤を細胞に作用させればよい。特に、使用可能な N a チャンネル阻害剤としては、リドカイン (l i d o c a i n e)、ピルシカイニド (p l i s i c a i n i d e)、プロカイナミド (p r o c a i n a m i d e) などが挙げられる。さらに、本発明のペースメーカー細胞は、交感神経刺激薬によって心拍数を増加さ

10

20

30

40

50

せることもできる。使用可能な交感神経刺激薬としてはイソプレテレンール (isoproterenol)、ノルエピネフリン (norepinephrine) などが挙げられる。本発明のペースメーカー細胞は、副交感神経刺激薬によって心拍数を減少させることもできる。使用可能な副交感神経刺激薬としてはカルバコール (carbachol)、アセチルコリン (acetylcholine) などが挙げられる。これらの薬剤は例示であり、とくに限定する意図はない。

【0015】

本発明は、もう1つの態様において、ES細胞、iPS細胞、あるいは始原生殖細胞由来万能細胞などを心筋へ分化誘導し、HCN4チャンネルをマーカーとして選択することを特徴とする、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞の取得方法を提供する。従来ペースメーカー細胞の選別においては細胞内に存在する蛋白を選別指標としており、イオンチャンネルを選別指標とした例は存在しなかった。今回はじめてHCNチャンネルをマーカーとしてペースメーカー細胞を採取出来ることが判明した。本発明のペースメーカー細胞の取得方法においてマーカーとして使用可能なものはHCNチャンネルであり、HCN1、HCN2、HCN3、HCN4のいずれであってもよいが、HCN4が好ましい。

【0016】

上記ペースメーカー細胞の取得方法において、使用できる好ましい出発材料は胚性幹細胞 (ES細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) または始原生殖細胞由来万能細胞である。胚性幹細胞 (ES細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) または始原生殖細胞由来万能細胞を心筋へと分化誘導させるための手段・方法は当業者が適宜選択して採用することができ、そのための培地成分、培養条件も公知のものを採用することができる。心筋へと分化誘導された細胞のHCNチャンネルの検出も、例えば、HCNチャンネル (好ましくは、HCN4チャンネル) に特異的な抗体を用いる方法などの公知の方法により行うことができ、かかる検出方法は特に限定されない。好ましくは、使用する抗体や発現されるHCNチャンネルに検出可能な標識を付しておくことが好ましい。特に好ましくは、セルソーターを用いるFACSによりHCNチャンネル (好ましくは、HCN4チャンネル) をマーカーとして本発明のペースメーカー細胞を取得する。

【0017】

本発明は、さらなる態様において、HCNチャンネル遺伝子 (好ましくは、HCN4チャンネル遺伝子) を胚性幹細胞 (ES細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) または始原生殖細胞由来万能細胞に導入して心筋へと分化誘導させ、標識が陽性である細胞を選別取得することを特徴とする、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞の製造方法を提供する。HCNチャンネル遺伝子の細胞への導入手段・方法は当業者によく知られており、CaCl₂法、リポフェクタミン法、ヌクレオフェクター法、電気せん孔法などが例示されるが、これらの手段・方法に限定されない。

【0018】

また、上記ペースメーカー細胞の製造方法において、HCNチャンネル遺伝子 (好ましくは、HCN4チャンネル遺伝子) に選別可能な標識を付して、細胞に導入することもできる。かかる手法を用いることにより、HCNチャンネルを有する細胞を選別取得することが容易になる。実施例に示すように、HCNチャンネル遺伝子 (好ましくは、HCN4チャンネル遺伝子) に選別可能な標識をコードする遺伝子 (例えばGFP遺伝子、RFP遺伝子、その他の外部から検出または結合可能な蛋白やペプチドをコードする遺伝子) を組み込んでターゲット遺伝子を作成し、これをES細胞 (iPS細胞、始原生殖細胞由来万能細胞などでも可) に導入し、心筋へと分化誘導させ、標識が陽性である細胞、すなわちHCNチャンネルを有する細胞を選別取得することにより、本発明のペースメーカー細胞を得てもよい。HCN遺伝子のプロモーター領域に選別可能な標識をコードする遺伝子を組み込むことが好ましい。また、標識としてはGFP、RFP、抗体の結合部位 (例えば、配列番号: 1や配列番号: 2などのHCN4に対する抗体の認識部位) などが好ましい。

【0019】

10

20

30

40

50

本発明においてHCN4チャンネルをマーカーとして選別取得されたペースメーカー細胞は、HCN4チャンネルおよびNaチャンネルのほか、Caチャンネル、HERGチャンネルを発現するが、内向き整流Kチャンネルを発現しないというペースメーカー細胞としての特徴をそなえていることが判明した。一方で、上記のごとく採取されたペースメーカー細胞がNaチャンネルを保有することは予想外のことであり、さらに該ペースメーカー細胞はNaチャンネルを制御することでその心拍数をコントロールできる新規タイプのペースメーカー細胞であった。

【0020】

さらなる態様において、本発明は、上記採取方法により得られるペースメーカー細胞であって、HCNチャンネルとNaチャンネルを有し、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできるペースメーカー細胞を提供する。 10

【0021】

本発明のペースメーカー細胞を用いて不整脈の治療または改善を行うことができる。本発明のペースメーカー細胞を用いて治療または改善できる不整脈の種類は、従来のペースメーカーで治療または改善できる種類であり、例えば、徐脈性心室細動などの徐脈性不整脈、房室ブロック、洞機能不全症候群などが挙げられるが、これらの不整脈に限定されない。本発明のペースメーカー細胞の懸濁液を直接心臓に適用してもよい。その際、本発明のペースメーカー細胞を適当な担体または基材に含ませて移植片としてもよい。使用可能な担体または基材としては温度感受性培養皿やフィブリンのりなどが挙げられるが、温度感受性培養皿が好ましい。本発明のペースメーカー細胞が心臓に定着し、機能を発揮してから分解される生分解性セルロースのような生分解性の担体または基材も好ましい。細胞を担体または基材に含ませるには、担体または基材の表面に細胞を付着または固定化してもよく、あるいは担体または基材中に埋め込んでよい。また、本発明のペースメーカー細胞を、温度感受性培養皿などで作られたシート状の担体または基材、あるいはマトリジェルなどのマトリクス中に含ませて、心臓に適用してもよい。 20

【0022】

さらに好ましくは、本発明のペースメーカー細胞を集合させて細胞塊としてペースメーカーに用いる。細胞塊として組織化することにより、強力かつ永続的なペースメーカー機能を発揮することができる。本発明のペースメーカー細胞を集合させて得られる細胞塊は本発明のペースメーカー細胞を含むものであるが、本発明のペースメーカー細胞以外の種類の細胞、ペースメーカー細胞の機能発揮のための物質などを含んでいてもよい。細胞塊は、約6万個以上、約7万個以上または約8万個以上、好ましくは約9万個以上、より好ましくは約15万個以上、さらに好ましくは約20万個以上の本発明のペースメーカー細胞を含む。上記個数の本発明のペースメーカー細胞を、1個の細胞塊として用いてもよく、複数個（例えば、2個～数個、10個～20個など）の細胞塊として用いてもよい。例えば、約3000個のペースメーカー細胞を含む細胞塊30個を心臓に移植してもよい。例えば、約3000個のペースメーカー細胞を含む細胞塊を5個集めてより大きな細胞塊を作成し、この組織塊4個を心臓に移植してもよい。例えば、約3000個のペースメーカー細胞を含む細胞塊を5個集めてより大きな細胞塊を作成し、この組織塊6個を心臓に移植してもよい。細胞塊の形状は、細胞塊中の本発明のペースメーカー細胞が互いに電気刺激を伝達できる限り、いずれの形状であってもよく、例えば、シート状、線状、球状、棒状、板状、その他の立体的形状であってもよく、不定形であってもよい。細胞塊の形状は、所望のペースメーカーの形状あるいは移植部位の形状に応じて適宜形状を選択することができる。 30 40

【0023】

本発明のペースメーカー細胞の細胞塊は、ハンギングドロップ培養、シート状の単層培養などの公知の方法により得ることができる。

【0024】

一定数の本発明のペースメーカー細胞により形成された細胞塊を移植片として、そのまま、あるいはシートや他のマトリクス中に担持させて、あるいは適当な容器中に入れて、心臓に移植または接続することができる。シートやマトリクスの材料は上で例示したものが 50

挙げられるが、それ以外のものでも使用可能である。また、本発明のペースメーカー細胞の細胞塊を心筋に直接移植する場合には、心筋内部または表面のいずれであってもよく、例えば、心筋中に注入してもよく、あるいは心筋表面に接着させてもよい。また、本発明のペースメーカー細胞を含む細胞塊を適当な容器に入れて、従来のペースメーカーと同様に使用してもよい。

【0025】

さらなる態様において、本発明は、本発明のペースメーカー細胞、あるいは上記移植片を必須構成成分とし、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできる心臓ペースメーカーを提供する。本発明の心臓ペースメーカーは、例えば、本発明のペースメーカー細胞やそれを
10 含む細胞塊をシートやマトリクスに担持させたものであってもよく、あるいは前記細胞塊そのものであってもよく、あるいは本発明のペースメーカー細胞または前記細胞塊を適当な容器に入れたものであってもよい。上述のごとく、Naチャンネル阻害剤または活性化剤あるいは自律神経刺激薬を用いることによって、本発明のペースメーカーの心拍数をコントロールすることができる。

【0026】

本発明のペースメーカー細胞またはそれを含む移植片を含む心臓ペースメーカーは、Naチャンネル阻害剤または活性化剤あるいは自律神経刺激薬と接触あるいはこれらを導入または
20 排出するための手段を有していることが好ましい。本発明のペースメーカー細胞またはそれを含む移植片（例えば細胞塊）を心臓に直接接触させ、あるいは心臓に埋め込むことにより、上記薬剤を心臓から直接受け渡してできるようにしてもよい。上記薬剤の投与手段としては内服または、注射器による筋肉注射または静脈内投与などが例示される。このような手段を介して本発明の心臓ペースメーカー中の細胞にNaチャンネル阻害剤または活性化剤あるいは自律神経刺激薬を導入し、あるいは除去することにより、心拍数をコントロールすることができる。

【0027】

本発明は、さらなる態様において、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできる心臓ペースメーカーの製造に用いられる、本発明により得られるペースメーカー細胞、あるいはそれを含む移植片に関するものである。

【0028】

本発明は、さらなる態様において、Naチャンネルの制御により心拍数をコントロールできる心臓ペースメーカーの製造方法であって、本発明により得られるペースメーカー細胞、あるいはそれを含む移植片を用いることを特徴とする方法に関するものである。
30

【0029】

本発明は、もう1つの態様において、Naチャンネル阻害剤または活性化剤を含有する、本発明のペースメーカー細胞あるいは本発明の移植片または細胞シートの心拍数、あるいは本発明のペースメーカーの心拍数をコントロールするための薬剤を提供する。さらなる態様において、本発明は、自律神経刺激薬を含有する、本発明のペースメーカー細胞あるいは本発明の移植片または細胞シートの心拍数、あるいは本発明のペースメーカーの心拍数をコントロールするための薬剤を提供する。かかる薬剤としては、Naチャンネル活性化剤、Na
40 ナチャンネル阻害剤、交感神経刺激薬、副交感神経刺激薬などがあり、本明細書にてすでに例示しているが、これらの薬剤に限定されない。

【0030】

薬剤中のNaチャンネル阻害剤または活性化剤の濃度、自律神経刺激薬の濃度、本発明のペースメーカー細胞あるいは本発明の移植片または細胞シートへの薬剤の適用量、本発明のペースメーカーへの薬剤の適用量は、通常行い得る試験を用いて医師が容易に決定することができる。また、このような薬剤は本発明のペースメーカー細胞あるいは本発明の移植片に直接適用できるのみならず、注射、輸液、経口投与などの経路により患者に与えることもできる。

【0031】

さらに、本発明のペースメーカーは、患者の心臓が治癒された場合など、ペースメーカーが
50

不要になった場合であっても、心臓から除去する必要はなく、ナトリウムチャンネル阻害薬であるリドカインやメキシレチンやピルジカイナイドなどの薬剤を投与することによって、その機能を止めることができ、再び必要となった場合に、ナトリウムチャンネル阻害薬であるリドカインやメキシレチンやピルジカイナイドなどの薬剤を除去することによって、その機能を再開させることができる。

【0032】

本発明は、さらなる態様において、HCN4に特異的な抗体であって、HCN4の細胞外ドメインのアミノ酸配列、好ましくはV S I N G M V N N S W (配列番号：1)またはV P M L Q D F P H D (配列番号：2)に対して惹起されるHCN4チャンネル特異的抗体が提供される。なお、これらの配列の末端にシステインを付加してキャリアー蛋白との結合に資することができる。例えば、アミノ酸配列V S I N G M V N N S W C (配列番号：3)やC V P M L Q D F P H D (配列番号：4)が挙げられる。かくして得られる抗体はHCN4の細胞外ドメインのアミノ酸配列、好ましくは配列番号：1または配列番号：2で示されるアミノ酸配列を抗原認識部位とするものである。当業者は、上記のような手法を用いて、上記アミノ酸配列に限らず、HCN4の他の部分のアミノ酸配列に対して惹起される抗体を取得することができる。

【0033】

HCN4に特異的な抗体を、本発明のペースメーカー細胞の取得方法において使用することができる。本発明のペースメーカー細胞の取得方法において使用可能なHCN4に特異的な抗体としては、上記抗体が挙げられるが、これに限定されない。HCN4に特異的な抗体に検出可能な標識を付して用いることにより、本発明のペースメーカー細胞を効率よく取得することができる。

【0034】

以下に実施例を示して本発明を具体的かつ詳細に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

【実施例1】

【0035】

本発明のペースメーカー細胞の製造

図1に示すようにHCN4チャンネル遺伝子のプロモーター領域に、選別採取標識であるGFP蛋白遺伝子を連結したターゲティング遺伝子を作成した。すなわち、HCN4遺伝子第1エクソンのMetコドンの位置に、EGFP+PGK・neoユニットを挿入しコード領域の一部を欠損させるよう設計されたターゲティングベクターを、エレクトロポレーション法で90%コンフルエント状態のAB1 ES細胞に遺伝子導入した。

ターゲティング遺伝子を導入24時間後に培地交換し、250 µg/mlになるようにGeneticinを培地に加え、約1週間程度セクションを行った。その結果出現したコロニーを96穴プレートのフィーダー細胞上に回収した。得られたクローンで遺伝子挿入が起こっているかどうか、PCRで確認した。セクション後回収したクローンのgenome DNA 10 µgを制限酵素(BstE II)で一晩切断し、0.5 µg/mlになるようにEtBrが加えてある1.0%アガロースゲルを用いて100V、80Aの条件で約5時間電気泳動した。アルカリトランスファーバッファー(0.4M NaOH、1M NaCl)でDNAを変性させ、ナイロンメンブレン(Amersham Biosciences)にトランスファーした。Bca BEST Labeling Kit(TaKaRa)によって³²P(Institute Isotopes)をラベルしたプローブで一晩ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後のメンブレンを2×SSC・0.5% SDS、2×SSC・0.1% SDS、0.2×SSC・0.1% SDSで2回、0.2×SSCの順に洗い、放射活性を測定して目的のDNA配列を検出した。

図2に示すように、ターゲティング遺伝子をES細胞に導入して片側の染色体アリルにGFP遺伝子が組み込まれたノックインES細胞を樹立することができた。この樹立をPCR法とサザンプロット法で確認した。

10

20

30

40

50

【0036】

次に、あらかじめ1時間程度ゼラチンコートディッシュにプレーティングして未分化ES細胞からフィーダー細胞を取り除いておき、約25,000個/mlになるように分化用培地(DMEM、FBS、PSG、MEM Non-Essential Amino Acids Solution、Sodium Pyruvate、2-ME)に懸濁する。8連ピペットで20 μ lの水滴を数列作り、ディッシュを反転させ立体的に培養(=Hanging drop法)し、細胞凝集塊であるEBsを作成した。EBsを作製した日を分化誘導0日目と定義し、誘導2日目に分化用培地を加え、浮遊培養を行った。6日目に、ゼラチンコートdishに接着させ、翌日培地交換を行った。図3に示すように、ノックインES細胞は胚様体を形成すると、経時的に拍動する胚様体が増加し、野生株と同等に心臓に分化した。

【0037】

胚様体を生体のままで観察できるインキュベーションイメージングシステムにより胚様体(12日目)の拍動部位でのGFPシグナルを観察した。図4に示すように、GFPのシグナルが認められるところに一致して胚様体の一部が拍動した。

GFPシグナル陽性細胞のみをFACSにより選別採取した。形成した胚様体にトリプシン処理(1 \times Trypsin/EDTA/GIBCO-BRL 37 $^{\circ}$ C 5~15分)を行い、細胞を単一細胞に解離する。分化誘導10日以降の胚様体の場合は、これに加えてコラゲナーゼ処理(コラゲナーゼタイプII/37 $^{\circ}$ C 1時間)をする。その細胞をHBSS-1%FCS(HBSS:Hank's Balanced Salt Solution/CAMBREX)、2.5 μ g/ml Propidium iodide(PI)で懸濁し、AB1またはcos7をネガティブコントロールとしてセルソーター(BECKMAN-COULTER EPICS ALTRA)により、胚様体中のGFP(+)/PI(-)細胞を採取した。図5に示すように、GFP陽性細胞は全細胞数の0.5%であった。図6はFACSにより選別採取したGFPシグナル陽性細胞を示す。

セルソーティングによって回収した細胞をゼラチンコートしたディッシュに約5,000個播いておき、回収した細胞の拍動率やその形態、大きさなどを翌日光学顕微鏡で調べ、拍動との関係を検討した。図7に示すように、GFPシグナル陽性細胞はその拍動確率が85%であった。

【0038】

GFP陽性細胞の遺伝子発現について以下の実験手順にて調べた。

RNA抽出:HT7株を用い、Day0~21の未分化ES細胞および胚様体を定時に回収し、buffer RLTに溶解後RNAを抽出した(QIAGEN RNeasy Micro Kit(QIAGEN))。ゲノムDNAのコンタミネーションを防ぐためにDNase処理を37 $^{\circ}$ Cで30分間行った(TaKaRa Dnase I(RNase free))。HCGP7株を用いたNkx2.5-GFP陽性細胞についてはcell sorterで分取後、1 \times PBSで洗浄したのち同様の処理を行った。

【0039】

RT-PCR:上記の方法で得たRNAを用いて以下の配合を行った。Oligo dT primer(50 μ M) 1 μ l、dNTP mixture(10mM each) 1 μ l、鋳型RNA 0.5 μ g、RNase不含dH₂O(蒸留水)で10 μ lにメスアップする。65 $^{\circ}$ Cで5分インキュベートしたのち氷上で急冷する。この上記鋳型RNA/Primer Mixtureに5 \times Primescript(登録商標)buffer 4 μ l、RNase inhibitor(40U/ μ l) 0.5 μ l、Primescript(登録商標)RTase(200U/ μ l) 1 μ l、RNase free dH₂O 4.5 μ lを加えて42 $^{\circ}$ Cで60分インキュベートしてcDNAを合成した(PrimeScript(登録商標)1st strand cDNA synthesis Kit(TaKaRa))。合成したcDNAを用いてPCRを行った(TaKaRa Ex Taq(登録商標)Hot Start Version)PCRの条

件は変性：94 30秒、アニーリング：60 1分、伸長：72 30秒で25～30サイクルで行った。RT-PCRで用いた遺伝子特異的プライマーのシーケンスを表1に示した。

【表1】

表1 RT-PCRに用いたプライマー			
遺伝子名		配列(5'→3')	
GAPDH	forward	TGAACGCGAAGCTCACACTGG	配列番号:5
	reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	配列番号:6
Oct3/4	forward	AGATCACTCACATCGCCAAT	配列番号:7
	reverse	AAGGTGTCCTGTAGCCTCAT	配列番号:8
Nanog	forward	GCAAGAACTCTCCTCCAT	配列番号:9
	reverse	ATACTCCACTGGTGCTGA	配列番号:10
Brachyury	forward	CATTACACACCACTGACGCA	配列番号:11
	reverse	CATAGATGGGGGTGACACAG	配列番号:12
GATA-4	forward	CTGCGGCCTCTACATGAAGC	配列番号:13
	reverse	TCTTCACTGCTGCTGCTGCT	配列番号:14
Nkx 2.5	forward	CAAGTGCTCTCCTGCTTTCC	配列番号:15
	reverse	GGCTTTGTCCAGCTCCACT	配列番号:16
MEF2c	forward	CCCTTCGAGATACCCACAAC	配列番号:17
	reverse	TGCCCATCCTTCAGAGAGTC	配列番号:18
Flk-1	forward	ATGACAGCCAGACAGACAGT	配列番号:19
	reverse	GGTGTCTGTGTCATCTGAGT	配列番号:20
Isl-1	forward	CTGCAGCCGACAGCTCAT	配列番号:21
	reverse	CTGCCTAGCCGAGATGGGTT	配列番号:22
Tbx3	forward	GAGATGGTCATCACGAAGTC	配列番号:23
	reverse	GGAAGGCCAAAGTAAATCCG	配列番号:24
c-kit	forward	CAGAATCGTGGGACCCAT	配列番号:25
	reverse	CGGCGTCCAGGTTTCTAG	配列番号:26
Mesp-1	forward	CAGAATCGTGGGACCCAT	配列番号:27
	reverse	CGGCGTCCAGGTTTCTAG	配列番号:28
Mlc2-v	forward	AAGGTGTTTGATCCCGAGGG	配列番号:29
	reverse	GGGAAAGGCTGCGAACATCT	配列番号:30
Mlc2-a	forward	TGACCCAGGCAGACAAGTTC	配列番号:31
	reverse	CGTGGGTGATGATGTAGCAG	配列番号:32
HCN1	forward	CTCCACTTTGATCTCCAGAC	配列番号:33
	reverse	TTCTGCATCTGGGTCTGTAT	配列番号:34
HCN2	forward	GACAATTTCAACGAGGTGCT	配列番号:35
	reverse	CCATCTCACGGTCATATTTG	配列番号:36
HCN3	forward	AACCCTCCATGCCAGCCTAT	配列番号:37
	reverse	CTTCCAGAGCCTTTACGCCT	配列番号:38
HCN4	forward	CGACAGCGCATCCATGACTA	配列番号:39
	reverse	GCTGGAAGACCTCGAAACGC	配列番号:40
Cav3.2	forward	GCTGTTTGGGAGGCTAGAAT	配列番号:41
	reverse	CGAAGGTGACGAAGTAGACG	配列番号:42
Connexin 30.2	forward	CTCAGCTCTAAGGCCAGGTCCCG	配列番号:43
	reverse	CCGCGCTGCGATGGCAAAGAG	配列番号:44
Connexin 40	forward	CTCCTCCCCCTGACTTCAAT	配列番号:45
	reverse	CGCCGTTTGTCACTATGGTA	配列番号:46

【0040】

シングルセルについては以下の方法で行った。

Primescript 1step enzyme mix 1 μ l、2 \times 1step buffer 1 μ l、遺伝子特異的プライマー(20 μ M) 2 μ l、鋳型cDNA 1 μ l、RNase不含有H₂Oで50 μ lにメスアップする。この反応液を以下の条件でcDNA合成、PCRを行った(PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (TaKaRa))。

逆転写反応：50 30分、逆転写酵素の失活：94 2分、変性：94 30秒、アニーリング：60 1分、伸長：72 30秒 35~43サイクルで行った。PCR産物は2.0% アガロースゲル(Nusieve 3:1 agarose (CMR))で電気泳動を行った。アガロースゲルでバンドが確認できなかったプライマーについては10%アクリルアミドゲルで電気泳動(150V、180mA、70分)後、銀染色によりバンドを確認した(PlusOne DNA Silver Staining Kit (GE Healthcare))。 10

【0041】

図8に示すように、GFPシグナル陽性細胞はHCN4チャンネル遺伝子を発現し、さらにTbx5、GATA4、mIc2a、mIc2vなどの心筋特異的な遺伝子を発現していた。

さらに、GFPシグナル陽性細胞の様々な遺伝子の発現を経時的(分化7日目、10日目、15日目)に調べた。結果を図9に示す。HCN遺伝子、その他の心筋特異的な遺伝子の発現が経時的に増加する傾向が認められた。さらに、GFP陽性分画においてCx30.2、Cx40、Cx43、Cx45の発現が経時的に増加する傾向が見られ(図9の四角で囲った遺伝子)、分化に伴って細胞の電気刺激を伝搬させる機能が強化されたことがわかる。 20

【0042】

GFP陽性細胞が発現しているチャンネルについても以下の実験手順にて調べた。

免疫染色

細胞を4%パラホルムアルデヒド-PBSにより30分間室温で固定し、PBSで3回洗い、0.2% Triton X-100-PBSを入れて10分間おいた後、PBSで2回洗い、5%スキムミルク-PBSにより30分間室温でブロッキングを行った。さらにPBSで3回洗い、0.1% tween 20-1%BSA-HBSS(BSA:ウシ血清アルブミン/SIGMA)で希釈した一次抗体と室温で30分、遮光して二次抗体と室温で30分、各々反応させ、PBSで3回洗った後、RNase処理、DAPI(Wako)による核染色を行った。 30

一次抗体には作製した抗HCN4抗体、Anti-HCN4 Rabbit polyclonal antibody (Osenses)、monoclonal Anti-tropomyosin (Sarcameric) clone CH1 (SIGMA)、Anti-Nav1.5 Rabbit polyclonal IgG (abcam)、Anti-Kir2.1 Rabbit polyclonal IgG (alomone labs)、Purified Rat Anti-Mouse CD31 (BD Pharmingen)を用いた。二次抗体には Alexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG (H+L)、Alexa Fluor 568 goat anti rat IgG (H+L)、Alexa Fluor 546 goat anti mouse IgG (H+L) (Molecular Probes)を用いた。 40

図10(および図9)に示すように、GFPシグナル陽性細胞はHCN4チャンネルのみならず、Cav3.2チャンネルというペースメーカー細胞に特異的なチャンネルを発現していた。また、Naチャンネル(Nav1.5)を強く発現していた。

【0043】

GFPシグナル陽性細胞について、活動電位とHCNチャンネル活性を、以下の実験手順にて調べた。

Patch clamp: セルソーティングで回収した細胞を、ゼラチンコートした 50

8 mm カバーガラス (Warner Instruments) に約 1,500 個播いておき、翌日以降に Patch Clump 法を用いて自動能の観測やイオンチャネルの機能解析を行った。図 1 1 に示すように、GFPシグナル陽性細胞は自発的な活動電位を発生し、HCNチャネル活性を有していた。

さらに、GFPシグナル陽性細胞について、上と同様の Patch clump 法にて自動能の観測やイオンチャネルの機能解析を行った。図 1 2 に示すように、GFPシグナル陽性細胞はペースメーカー活性に必要な ERG、Caチャネルを発現するのみならず、Naチャネル活性を強く持っていた。

【実施例 2】

【0044】

本発明のペースメーカー細胞の心拍数の制御

Kurata Y, Matsuda H, Hisatome I, Shibamoto T. Effects of pacemaker currents on creation and modulation of human ventricular pacemaker: theoretical study with application to biological pacemaker engineering. Am J Physiol Heart Circ Physiol . 2007 Jan;292(1):H701-18. に記載のペースメーカー細胞モデルを用いて、Naチャネルを

抑制した場合の電気活動をシミュレーションした。図 1 3 に示すように、GFPシグナル陽性細胞はシミュレーションにてNaチャンネルを制御すると心拍数を変動させることができることがわかった。

次に、Naチャンネルを制御することにより本発明のGFPシグナル陽性細胞の心拍数を実際に制御できることを示す実験を行った。パッチクランプ法による電気活動とビデオ撮影による収縮の定量化を行った。図 1 4 に示すように、本発明のGFPシグナル陽性細胞はNaチャンネル阻害薬により実際に心拍数を制御できることがわかった。

さらに、本発明のGFPシグナル陽性細胞が自律神経刺激薬により心拍数を増加できることを示す実験を行った。パッチクランプ法による電気活動の定量化を行った。図 1 5 に示すように、GFPシグナル陽性細胞は自律神経刺激薬により心拍数を増加できることがわかった。

【0045】

本発明のペースメーカー細胞の拍動数が、交感神経刺激薬イソプレテノールによって増加し、副交感神経刺激薬カルバコールによって減少することを確認した。本実験はパッチクランプ法を用いてペースメーカー細胞から直接電気現象(自発興奮)を測定し、灌流液中に交感神経刺激薬イソプレテノールによって増加し、副交感神経刺激薬カルバコールを添加し、これらの薬剤効果を検討した後に、これらの薬剤を除去(wash out)して薬剤効果が消失するのを観察した。

図 1 6 に示すように、 10^{-5} M のイソプレテノールを存在させる前後で拍動数に変化が生じ、イソプレテノールによって拍動数が 54 回 / 10 秒から 61 回 / 10 秒に増加した。その後、イソプレテノールを洗い流すと拍動数が 45 回 / 10 秒に減少した。次に、 10^{-4} M のカルバコールを存在させると拍動数が 17 回 / 10 秒 ~ 8 回 / 10 秒に減少した。その後、カルバコールを洗い流すと拍動数が 14 回 / 10 秒と増加傾向を示した。

【実施例 3】

【0046】

本房室ブロック心臓への発明のペースメーカー細胞の移植

(1) ペースメーカー細胞の培養

129SV/EVマウス由来のES細胞であるAB1(理化学研究所 下野博士より供与)と、これにpXNL-HCN4-EGFPプラスミドを遺伝子ノックインして樹立したHCN4-EGFP-AB1株(#33株)、GFP蛍光を指標にセルソーティングをして分取した細胞(HCN4-cos7)を用いた。また、AB1株と#33株細胞はマイトマイシンC処理を行ったSNL細胞(STO由来、LIF強制発現、ネオマイシン耐性遺伝子)上で培養した。

ES細胞の継代培養は1xPBSで洗浄した後、0.25% トリプシン/EDTA(

10

20

30

40

50

G I B C O - B R L) で細胞を d i s h からはがし、サスペンドして細胞を希釈し、新たな d i s h に (A B 1 株と # 3 3 株はマイトマイシン C (S I G M A) 処理を行った新たな S N L 細胞上に) まくことで培養を続けた。維持用培地 (Maintenance Medium) の組成は以下のとおりであった :

DULBECCO S MODIFIED EAGLE s MEDIUM (DMEM Sigma) / AB1 , #33、bovine serum(FBS JR H)、Penicillin Streptomycin L Glutamine Sodium(SIGMA)、MEM Non Essential Amino Acids Solution(GIBCO BRL)、SODIUM PYRUVATE(SIGMA)、0.1mM 2 mercaptoethanol (SIGM A)、LIF (ESGRO /Cosmo Bio)

また、培養には 0 . 1 %ゼラチン (S I G M A) でコートした直径 1 0 0 m m ディッシュ (F A L C O N) を用い、3 7 ° C、5 % C O ₂ で培養した。

【 0 0 4 7 】

(2) 胚様体の形成

胚様体の形成は、分化用培地 2 0 μ l 中に細胞が約 5 0 0 個になるよう調整したものでハンギングドロップを作り、反転させ、培養した。分化用培地 (Differentiation medium) の組成は以下のとおりであった :

DMEM、FBS、Penicillin Streptomycin L Glutamine Sodium(100×)、MEM Non Essential Amino Acids Solution、SODIUM PYRUVATE、2ME

作製したその日を 0 日目とし、2 日目で分化用培地を加える。その後、分化誘導初期でセルソーティングを行うものについては浮遊培養を続け、中期以降に行うものは 4 日目でゼラチンコートをしたディッシュへ移し、接着させた状態で培養を続けた。胚様体はセルソーティングによる G F P 陽性細胞分取後、免疫染色に用いた。

【 0 0 4 8 】

(3) セルソーティング

形成した胚様体にトリプシン処理 (1 × T r y p s i n / E D T A / G I B C O - B R L、3 7 ° C、5 ~ 1 5 分) を行い、細胞を単一細胞に解離する。分化誘導 1 0 日以降の胚様体の場合は、これに加えてコラゲナーゼ処理 (C o l l a g e n a s e t y p e I I / 3 7 ° C、1 時間) を行った。得られた細胞を H B S S - 1 % F C S (H B S S : H a n k s B a l a n c e d S a l t S o l u t i o n / C A M B R E X)、2 . 5 μ g / m l P r o p i d i u m i o d i d e (P I) で懸濁し、A B 1 または c o s 7 をネガティブコントロールとしてセルソーター (B E C K M A N - C O U L T E R E P I C S A L T R A) により、胚様体中の G F P (+) / P I (-) 細胞を採取した。

【 0 0 4 9 】

(4) 徐脈性不整脈モデルとしての A V B (A t r i o V e n t r i c u l a r B l o c k) モデルラット作製

1 0 週齢のオス I C R ラットを使用した。麻酔 (0 . 2 % ペントバルビタール、M i l l i Q) を 0 . 2 m l 注射した。人工呼吸器による呼吸補助、心電図モニターを行う。電熱線メスを使用して開胸し、マイクロシリンジを使用して 3 0 % グリセロール 1 5 μ l を肺動脈の心臓付着部位から注入した。注入後、房室結節を障害できた際、心電図から A V B の波形 (心拍数の減少、P 派と Q R S 派の独立) が起こったかどうかを確認した。確認されない場合は再度グリセロールを注入した。確認されてから 3 0 分後、心電図で A V B の波形を確認してから、胸を閉じた。人工呼吸器からラットをはずし 3 7 ° C で酸素吸入を行い、マウスが目を覚めたらケージに戻した。

術後 5 日後に心電図を確認し、P 派と Q R S 派の独立が起きているかどうかを確認した。

【 0 0 5 0 】

(5) 生物学的ペースメーカー細胞の組織学染色のための M i w Z 遺伝子導入

A 6 細胞にエレクトロポレーションにより M i w Z 遺伝子をノックインし、増殖したコロニーを未分化の状態 X - g a l 染色し、染色が強い株を 4 つセクションした。これらを分化誘導し、セルソーティングによって G F P 陽性細胞であるペースメーカー細胞を分

取し X - g a l 染色で染色されることを確認した。

【 0 0 5 1 】

(6) 生物学的ペースメーカー細胞の組織化と移植

G F P 陽性細胞であるペースメーカー細胞をセルソーティングにて選別採取を行い、コニカルチューブに細胞を採取後、1 0 0 0 回転 5 分で細胞のペレットを作成し、分化誘導メEDIUMに懸濁し、細胞を 2 0 マイクロリットル中に 3 0 0 0 個となるように調整して、ハンギングドロップ内で 3 次元培養を行った。4 8 時間後に細胞集塊を 3 0 個まとめて結合させて、ラット徐脈モデルの右心室心尖部に注射針を通して移植した。

術後 5 日の心電図で房室ブロックの波形が確認できたラットに麻酔 (0 . 2 % ペントバルビタール, M i l l i Q) を 0 . 2 m l 注射した。人工呼吸器による呼吸補助、心電図モニターを行った。電熱線メスを使用して開胸し、マイクロシリンジを使用して P B S 2 0 μ l に懸濁した凝集体を心室壁に注入した。胸を閉じ、人工呼吸器からマウスをはずし 3 7 $^{\circ}$ C で酸素吸入を行い、ラットが目覚めたらケージに戻した。5 日後に開胸し、心臓を取り出し 4 % パラホルムアルデヒド - P B S で固定した。

【 0 0 5 2 】

(7) ペースメーカー細胞の組織化の利点

G F P 陽性細胞であるペースメーカー細胞をセルソーティングにて選別採取を行い、単離細胞として分化誘導培地の中で培養すると一週間で脱分化しペースメーカー細胞としての機能を失った。一方で、細胞を 2 0 マイクロリットル中に 3 0 0 0 個となるように調整して、ハンギングドロップ内で 3 次元培養を行い凝集体を作成すれば、培養皿の中で一カ月経過してもペースメーカー細胞としての性質を保つことが可能であった。

本発明実験では、徐脈モデルラットの心室壁に約 3 0 0 0 個の凝集体を 3 0 個移植して、移植後にペースメーカー能力を発揮させることができた。約 3 0 0 0 個のペースメーカー細胞を含む細胞塊を 5 個集めてより大きな細胞塊を作成し、この組織塊 6 個を徐脈モデルラットの心室壁に移植した場合にも、移植後にペースメーカー能力を発揮させることができた。約 3 0 0 0 個のペースメーカー細胞を含む細胞塊を 5 個集めてより大きな細胞塊を作成し、この組織塊 4 個を徐脈モデルラットの心室壁に移植した場合にも、移植後にペースメーカー能力を発揮させることができた。約 3 0 0 0 個の凝集体 1 5 個を移植したのではペースメーカー機能を発揮できなかった。

【 0 0 5 3 】

(8) X - g a l 染色によるペースメーカー細胞の心室内生着の評価

心臓を 1 % グルタルアルデヒドで 3 0 分固定する。デタージェントリンス (Detergent rinse) (0 . 1 M リン酸バッファー p H 7 . 3 , 2 m M M g C l ₂ , 0 . 0 1 % デオキシコール酸ナトリウム , 0 . 0 2 % ノニデット P - 4 0 , 0 . 0 2 M トリスバッファー p H 7 . 3) 1 0 m l にて 3 回で洗浄した (各 1 0 分) 。染色溶液 (0 . 1 M リン酸バッファー p H 7 . 3 , 2 m M M g C l ₂ , 0 . 0 1 % デオキシコール酸ナトリウム , 0 . 0 2 % ノニデット P - 4 0 , 5 m M K ₄ [F e (C N) ₆] , 5 m M K ₃ [F e (C N) ₆]) 4 m l で 3 7 $^{\circ}$ C 、遮光で一晩染色した。

【 0 0 5 4 】

(9) ペースメーカー細胞移植ラットの心電図変化

まず、麻酔下で開胸して、グリセロールを使用して房室ブロックラットを作成し、その後、組織化したペースメーカー細胞を含む細胞塊を心筋壁に注入して移植した。ペースメーカー細胞は X - g a l 遺伝子が導入してあるので、X - g a l 染色により染色できた。写真でブルーに染まる細胞が移植細胞であり、組織片が生着していることが確認された (図 1 7) 。房室ブロック作成後、7 日後に房室ブロックラットが生存し、かつ、房室ブロックが持続していることを確認し (図 1 8 の房室ブロック後) 、ペースメーカー細胞を含む移植片と対照として生理的食塩水を移植した。心電図上ではペースメーカー細胞を含む移植片の移植では、幅の広い心室リズムが生じたが、生理的食塩水では幅の狭い心室波形が認められた。

図 1 9 では上から 2 列目にて房室ブロックが持続していることを確認し、ペースメーカー細胞

胞を含む移植片の移植では、幅の広い心室リズムが生じた(上から3列目)。そこで交感神経刺激薬であるイソプロテレノールを腹腔に注入すると脈の速い幅の広い心室リズム(ペースメーカー細胞由来リズム)が促進(頻拍)することが確認された。

【実施例4】

【0055】

HCN4特異的抗体の作成

抗体の作製は、MBL (Medical & Biological Laboratories) に委託した。抗原には、ペースメーカー細胞特異的なIfチャネルを構成するHCN4タンパクを選択した。細胞外からの標識を可能にするため、細胞外に露出しているpore領域の一部(配列番号: 1: VSINGMVNNSW)、pore領域と膜貫通領域の一部(配列番号: 2: VPMLQDFPHD)の2種類のアミノ酸配列にキャリアータンパクとの結合用のシステインを付加したペプチド(配列番号: 3: VSINGMVNNSWC; 配列番号: 4: CVPMLQDFPHD)を合成し、それぞれ3匹のウサギに免疫した(配列番号: 3にて免疫: No. 1~3; 配列番号: 4にて免疫: No. 4~6)。8回免疫後に全血採血して血清を回収し、抗体を得た。

抗体の精製を以下のように行った。硫酸沈殿により血清中のタンパクを精製し、カラム(PD-10 Desalting Columns / GE Healthcare)に通して硫酸を除く。プロテインGカラム(HiTrap Protein G HP / GE Healthcare)を20mMリン酸ナトリウム(pH7.0)で満たし、続けてタンパク溶液を通す。リン酸ナトリウムで洗浄した後、0.1MグリシンHCl(pH3.0)で溶出した。回収した溶液は1M Tris-HCl(pH8.8)で中和し、フィルター付チューブ(Amicon Ultra / MILLIPORE)に入れて遠心することで濃縮した。また、ELISAの結果から、比較的検出能力の高いと見られるNo. 3、No. 5を、抗原カラムを用いてアフィニティー精製した。

図20に示すように、HCN4細胞外ドメインに特異的な新規抗体を作成することができた。

得られた抗体がHCN4を認識することを以下の実験により確かめた。

ウエスタンブロッティング: cos7、HCN4-EGFP-cos7をSDS-Sample Buffer(Laemmli Sample Buffer / BIO RAD)、2-メルカプトエタノール(WAKO)に溶解し、得られたサンプルを7.5%アクリルアミドゲルの各レーンに10ulずつアプライし、80Vで濃縮ゲル中を、分離ゲルに入ってから100Vにしてさらに90分間電気泳動した。泳動後のゲルをsemi-dry法により、0.18Aの条件で30分間メンブレンにトランスファーした。トランスファー後のメンブレンを5%スキムミルク-TBSTでブロッキング後(室温で3時間、または4で一晩)、希釈した一次抗体(作製した抗HCN4抗体、既製品抗GFP抗体)と室温で30分間、希釈した二次抗体(HRP抗ウサギIgG抗体、HRP抗マウスIgG抗体)と室温で30分間各々反応させ、TBSTで3回洗浄した後ECL検出を行い、各抗体の検出能力を比較した。図21に示すように、本抗体はHCN4を強く認識することがわかった。

【0056】

次に、本抗体はGFPシグナル陽性細胞の細胞膜のHCN4を細胞外から認識できることを確かめた。実験方法・手順は以下のとおりであった。

免疫染色: 細胞を4%パラホルムアルデヒド-PBSにより30分間室温で固定し、PBSで3回洗い、0.2% Triton X-100-PBSを入れて10分間おいた後、PBSで2回洗い、5% スキムミルク-PBSにより30分間室温でブロッキングを行った。さらにPBSで3回洗い、0.1% tween 20-1% BSA-HBSS(BSA: Albumin from bovine serum / SIGMA)で希釈した一次抗体と室温で30分、遮光して二次抗体と室温で30分、各々反応させ、PBSで3回洗った後、RNase処理、DAPI(Wako)による核染色を行った。

一次抗体には作製した抗HCN4抗体、Anti HCN4 Rabbit polyclonal antibody (Osen

ses)、monoclonal Anti tropomyosin(Sarcomeric) clone CH1 (SIGMA)、Anti Nav1.5 Rabbit polyclonal IgG (abcam)、Anti Kir2.1 Rabbit polyclonal IgG (alomone labs)、Purified Rat Anti Mouse CD31 (BD Pharmingen)を用いた。二次抗体にはAlexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG(H+L)、Alexa Fluor 568 goat anti rat IgG(H+L)、Alexa Fluor 568 goat anti mouse IgG(H+L) (Molecular Probes)を用いた。

図 2 2 に示すように、本抗体は G F P シグナル陽性細胞の細胞膜の H C N 4 を細胞外から認識できることがわかった。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 5 7 】

本発明は、医療器具の分野、特に心臓ペースメーカーの分野において利用可能である。

10

【配列表フリーテキスト】

【 0 0 5 8 】

配列番号：1 は H C N 4 タンパクの細胞外ドメインの一部のアミノ酸配列である。

配列番号：2 は H C N 4 タンパクの細胞外ドメインの一部のアミノ酸配列である。

配列番号：3 は H C N 4 特異的抗体を惹起するために用いたペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：4 は H C N 4 特異的抗体を惹起するために用いたペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：5 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：6 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

20

配列番号：7 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：8 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：9 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：10 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：11 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：12 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：13 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：14 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：15 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：16 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

30

配列番号：17 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：18 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：19 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：20 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：21 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：22 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：23 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：24 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：25 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：26 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

40

配列番号：27 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：28 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：29 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：30 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：31 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：32 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：33 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：34 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

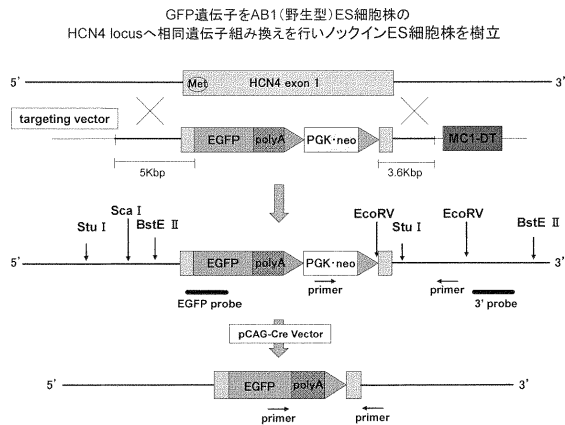
配列番号：35 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：36 は P C R で用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

50

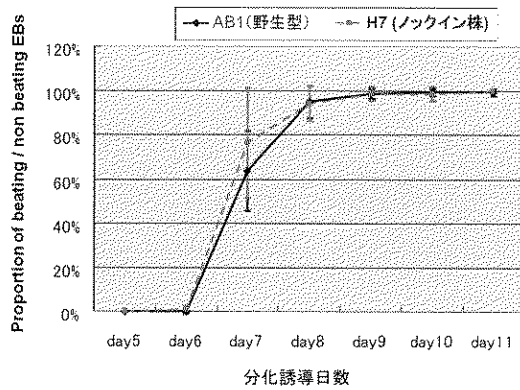
配列番号：37はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。
 配列番号：38はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。
 配列番号：39はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。
 配列番号：40はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。
 配列番号：41はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。
 配列番号：42はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。
 配列番号：43はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。
 配列番号：44はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。
 配列番号：45はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。
 配列番号：46はPCRで用いた遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列である。

【図1】

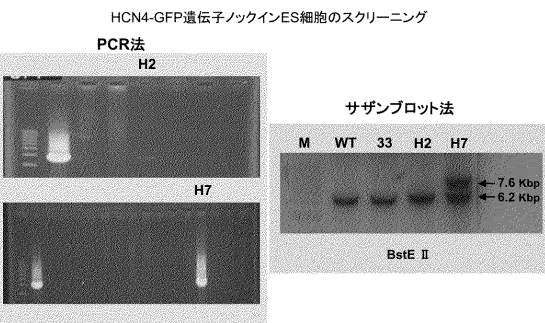


【図3】

心臓への分化誘導に伴う胚様体の心拍数の変化

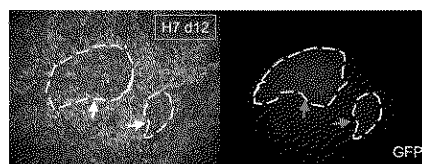


【図2】



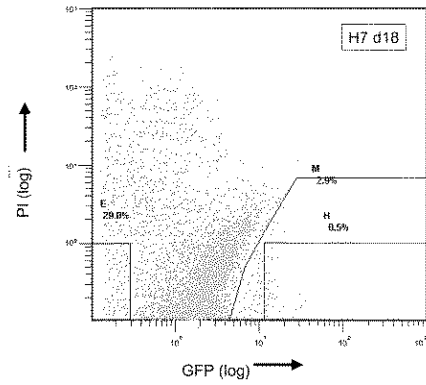
【図4】

H7胚様体の拍動部位とGFP発現との関連



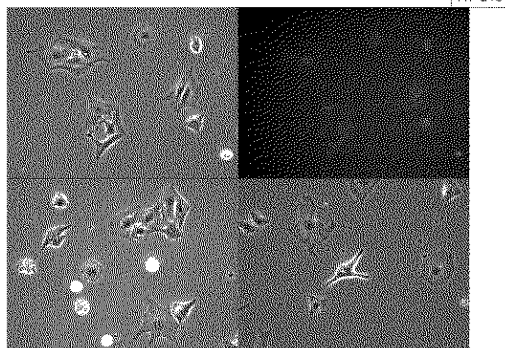
【 図 5 】

セルソーターを用いたH7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞の選別採取



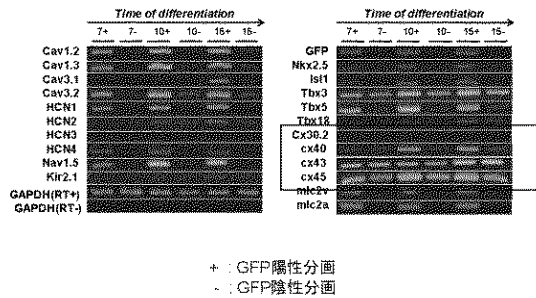
【 図 6 】

H7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞の形態



【 図 9 】

GFP陽性細胞の経時的な遺伝子発現解析



【 図 7 】

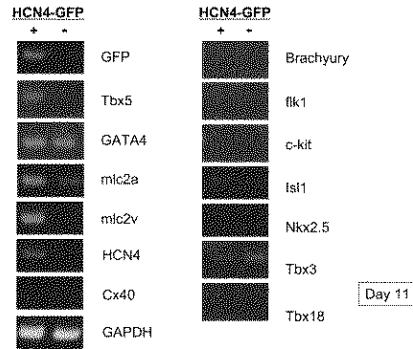
各分化時期での HCN4-GFP陽性細胞の拍動率

	beating cells/counted cells			% (Ave)
day 11	7/30	9/30	8/30	26.7±3.5
day 13	27/30	21/30	23/30	79.0±10.1
day 14	28/30	27/30	25/30	88.7±3.5
day 14	24/30	24/30	24/30	80.0±0.0

84.3±5.8

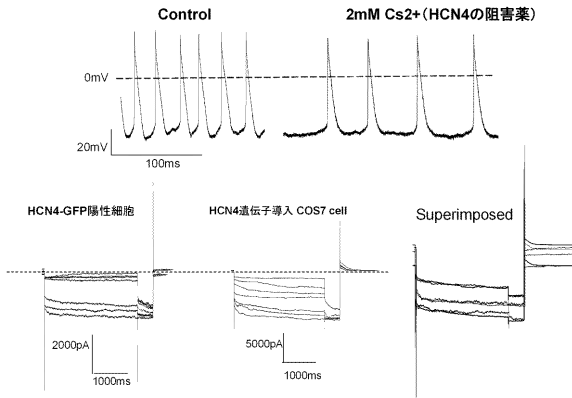
【 図 8 】

H7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞の心臓ペースメーカー遺伝子発現



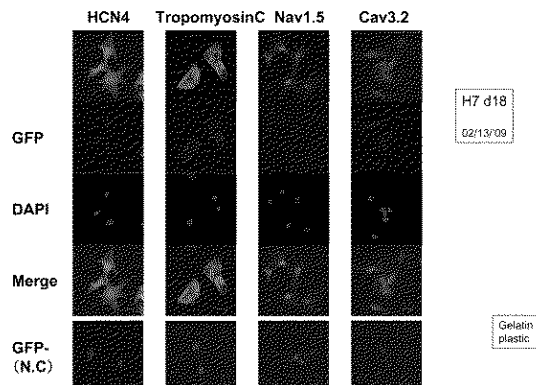
【 図 1 1 】

H7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞のHCN4チャンネルに駆動される自動能



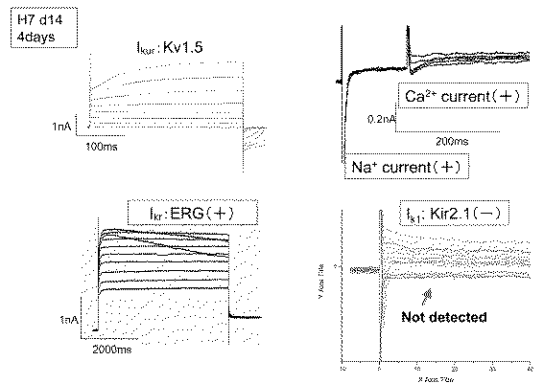
【 図 1 0 】

分化誘導後18日目のH7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞の免疫染色

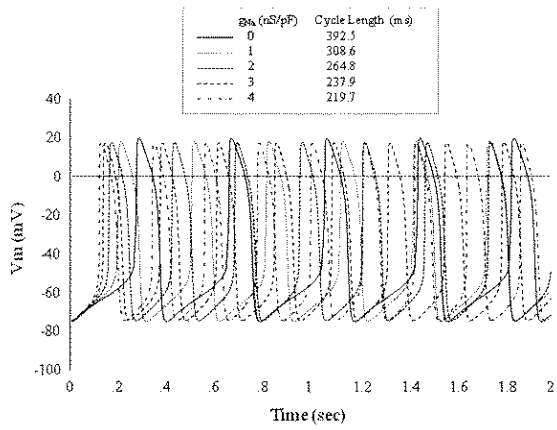


【 図 1 2 】

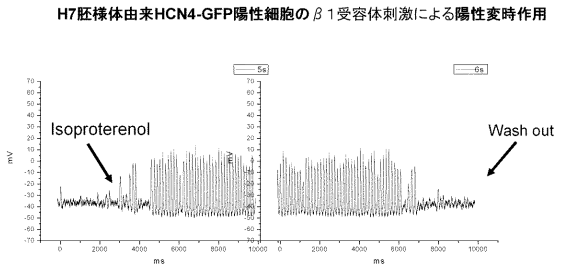
H7胚様体由来HCN4-GFP陽性細胞のペースメーカー活性を担うion channelの解析



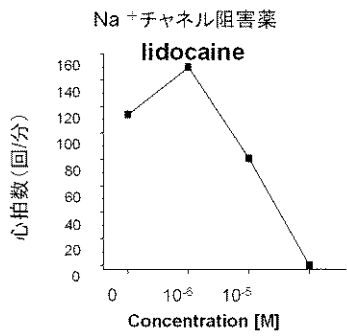
【図 1 3】



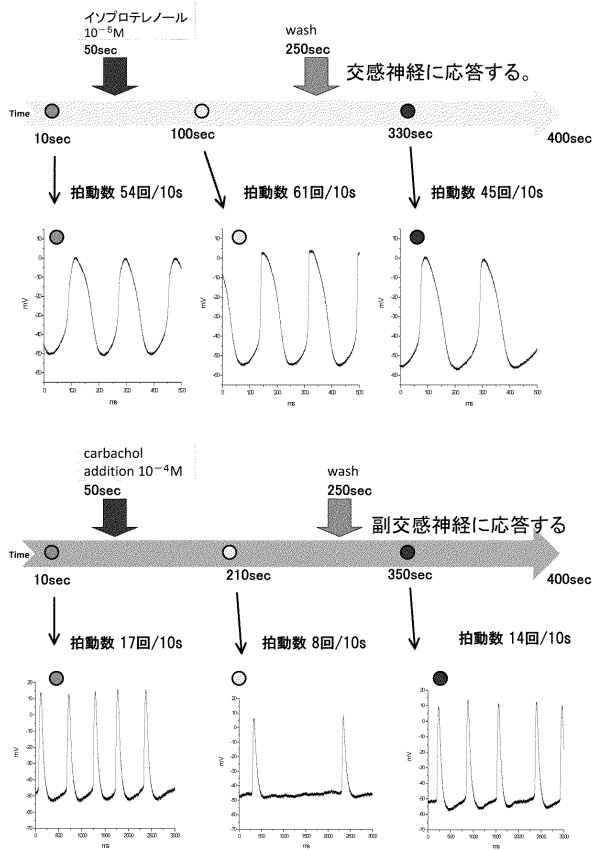
【図 1 5】



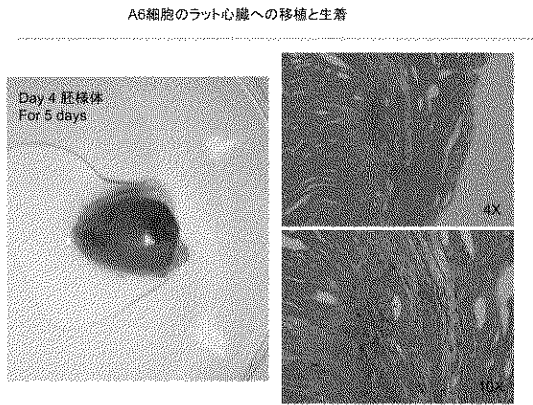
【図 1 4】



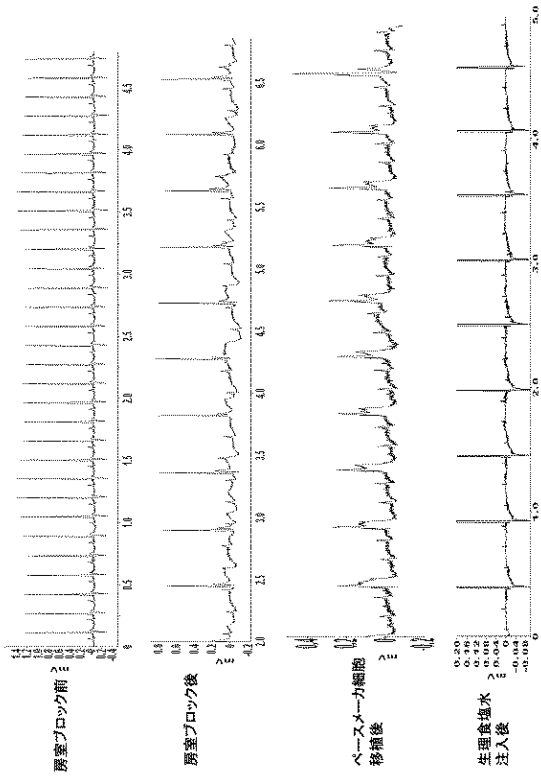
【図 1 6】



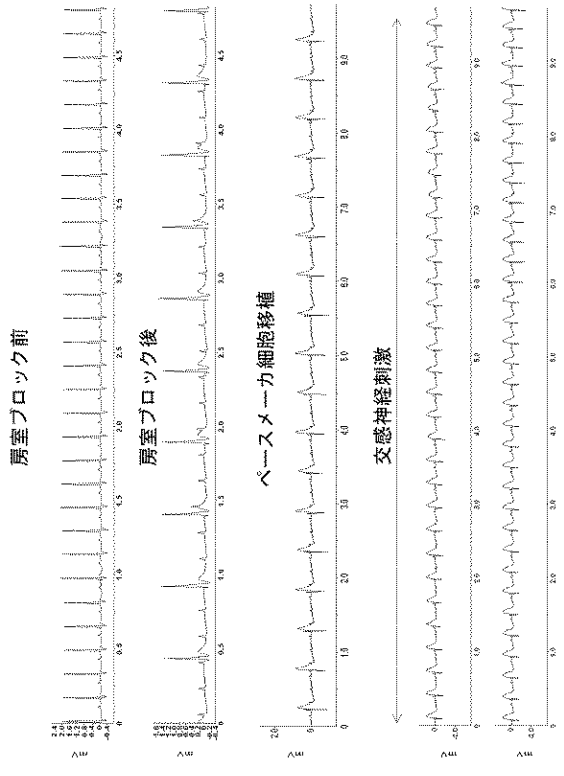
【図 1 7】



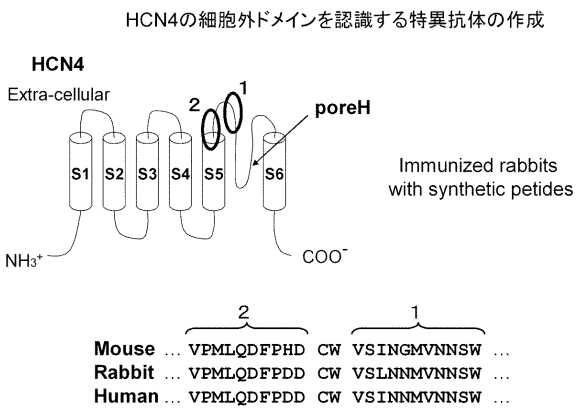
【図 18】



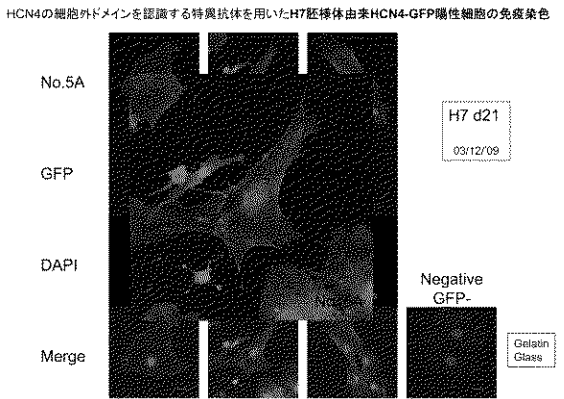
【図 19】



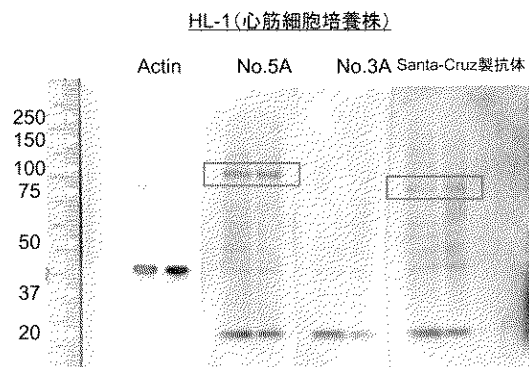
【図 20】



【図 22】



【図 21】



【配列表】

0005674046000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 三 明 淳一郎

鳥取県米子市西町 8 6 番地 国立大学法人鳥取大学内

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 1 4 1 3 4 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 0 9 / 0 1 7 2 5 4 (W O , A 1)

白吉安昭 他, イオンチャンネルを可視化選別マーカーとしたES細胞由来生物学的ペースメーカー細胞の樹立とその特性の検討, 心電図, 2 0 1 0 年, Vol.28, No.5, p.466

Biomed Res, 2 0 0 8 年, Vol.29, No.4, p.195 203

柳堅徳 他, ES細胞由来心筋ペースメーカー細胞の自動能維持におけるイオンチャンネルHCN1,4およびCav3.1の意義, 日本内分泌学会雑誌, 2 0 0 6 年, Vol.82, No.2, p.512

JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, 2 0 0 9 年 3 月, Vol.46, No.3, p.343

35

1

Stem cells, 2 0 0 7 年, Vol.25, No.11, p.2712 2719

The Journal of international medical research, 2 0 0 8 年, Vol.36, No.5, p.1049 1055

The journal of gene medicine, 2 0 0 8 年, Vol.10, No.5, p.487 497

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

A 6 1 L 2 7 / 0 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A / R E G I S T R Y / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

S c i e n c e D i r e c t

W i l e y O n l i n e L i b r a r y

C i N i i

A C S P U B L I C A T I O N S