

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590866

研究課題名（和文） チャンネル遺伝子を用いた胚性幹細胞由来バイオペースメーカーの確立と治療への応用

研究課題名（英文） Establishment of ES cell-derived biological pacemaker using ion channel and its application to bradycardia arrhythmias

研究代表者

久留 一郎 (HISATOME ICHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60211504

研究成果の概要（和文）：

ES 細胞由来心臓ペースメーカー細胞の作製を目的として、ペースメーカー活性に重要なイオンチャンネルである HCN4 の遺伝子座に EGFP 遺伝子を相同組換えによってノックインしたマウス ES 細胞株の樹立を確認した。得られたクローン株に分化誘導を施すと収縮部位では GFP を発現しており、GFP 陽性細胞を 0.1%-3.0% で分取することができ、回収した細胞のおよそ 70-90% が収縮するのを観察した。細胞同士で結合、連動して収縮しており、電気的結合を形成していることが示唆された。パッチクランプ解析からも、自動能や I_f 電流などの心臓ペースメーカー細胞に必要な電気的性質を有していることが確認された。これらの結果から、心臓ペースメーカー細胞に関する研究を行うのに適した細胞株であることが確認された。

研究成果の概要（英文）： We are attempting to establish the cardiac pacemaker cells derived from embryonic stem (ES) cells. To visualize cardiac pacemaker cells in differentiating embryoid bodies (EBs), EGFP gene was knocked in at HCN4 locus, which encodes ion channels responsible for pacemaker activity. In the present study, we conducted to establish EGFP-knock in ES cell line at HCN4 locus. PCR screening revealed two positive clones as possible knock in ES cell line. Southern blot analysis showed that one of them, H7 clone, is correctly targeted at HCN4 locus. After induction to cardiac differentiation through the formation of EBs in H7 clone, the expression of GFP was specifically localized at their contracting region in the outgrowth of EBs. Analysis of cell sorting revealed that 0.1~0.3% of differentiated H7 cells in EBs were GFP positive and that 70~90% of the sorted GFP positive cells were morphologically homogenous and beat spontaneously. Patch clamp analysis showed that spontaneously beating cells revealed the comparable electrophysiological properties with cardiac pacemaker cells, such as automaticity and I_f current. These results assured that H7 cell line was suitable to investigate and purify cardiac pacemaker cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：循環器内科

科研費の分科・細目：内科臨床医学・循環器内科

キーワード：ペースメーカー、ES細胞、イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

心臓の刺激伝導系を構成する洞房結節や房室結節、Purkinje線維などは、外部刺激がなくても自発的に興奮する能力(=自動能)を持っている。これらの特殊心筋細胞のうち、上大静脈と右心房の結合部に存在する洞房結節は、最も早い自動能を持ち、心臓のペースメーカーとして機能していることが知られている。

洞房結節における自発的な活動電位は、HCN遺伝子ファミリーにコードされる過分極活性化型の非選択性陽イオンチャネルから生じる I_f 電流を中心とした複数のイオンチャネル電流の協調によって生成される。心臓ではHCN1,2,4が存在し、刺激伝導系で顕著に発現している。洞房結節で高い発現を示すHCN4をノックアウトした動物実験では、洞房結節型の、成熟した活動電位を示す心筋細胞が有意に減少し胎生9.5・11.5日で死亡することが報告されており、洞房結節のペースメーカー機能において極めて重要であることが推測される。

めまいや失神、心不全などの原因となる徐脈性不整脈は、洞機能不全や房室ブロックによって発症し、その治療にはペースメーカー装置の植え込みが広く選択されている。最近のペースメーカー装置の発達は著しく、本体の小型軽量化、体動や体温に応じた心拍の調節が可能になっている。しかし、定期健診の必要性やバッテリー交換、体内への異物の植え込みなど、依然として問題が残されている。そこで現在、心筋細胞のイオンチャネルやその修飾因子などの遺伝子を生体内へ直接導入する方法や、多能性幹細胞に分化誘導を施して作成した洞房結節型的心筋細胞を心臓に移植する方法など、人工的にペースメーカー機能を持った細胞・組織を作成する、「生物学的ペースメーカー」という概念に基づく研究が進められている。

我々は多能性幹細胞であるES細胞に分化誘導を施して心臓ペースメーカー細胞を作製し、それらを用いた徐脈性不整脈に対する再生医療の確立を目標に研究を進めている。洞房結節の自動能に重要であるHCN4遺伝子に注目し、その遺伝子座にEGFP(enhanced green fluorescent protein)遺伝子をノックインしたES細胞株を樹立することで、心臓ペースメーカー細胞の可視化、選択的分取を試みた。

既に樹立されたEGFP遺伝子のノックインES細胞株(#33株)において、拍動領域で

GFPを発現すること、GFPを指標にcell sortingを行うと洞房結節型の活動電位を示す細胞が分取されることを確認している。また、HCN4、HCN1やCav3.2(Caチャネル)などのイオンチャネルを発現しているのみならず、tropomyosin C、connexin 40などの心筋マーカーの発現もしている。しかし、実際にはベクターはノックインされておらず、少なくとも3コピーが別領域に挿入されていること、拍動しない細胞や拍動していても異なる形態、活動電位を示す細胞が分取されてくることも判明している。

2. 研究の目的

我々は、新たにHCN4遺伝子座にGFPをノックインしたES細胞株の樹立を行い、作製された細胞株(H7株)より得られたペースメーカー細胞の解析結果について報告する。

3. 研究の方法

①遺伝子導入とPCR解析

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。導入24時間後に培地交換し、250 μ g/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。

②サザンブロッティング

セクション後回収したクローンのgenome DNA 10 μ gを制限酵素(BstEII)で一晩切断し、0.5 μ g/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 α - 32 P(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。ハイブリ後のメンブレンを2 \times SSC \cdot 0.5% SDS、2 \times SSC \cdot 0.1% SDS、0.2 \times SSC \cdot 0.1% SDSで2回、0.2 \times 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。

③細胞培養

SNL細胞(STO細胞由来、LIF強制発現、ネオマイシン耐性遺伝子)は、0.1%ゼラチン(SIGMA)でコーティングしたφ100mm dishで培養を行い、129V/EVマウス由来のAB1 ES細胞、作製したHCN4-EGFP AB1細胞とともに、Mitomycin C処理したSNL細胞を播いたφ100mm dishで培養した。

継代時は、1×PBSで3回洗浄した後0.25% Trypsin/EDTA(Invitrogen, Wako)でdishからはがし、培地(フィーダー用培地:

DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM(=DMEM, Sigma)、7.5% Fetal bovine serum(=FBS, JRH)、

Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine Sodium(=PSG, SIGMA)。ES用培地:DMEM、20% FBS、PSG、MEM Non-Essential Amino Acids Solution、Sodium Pyruvate、2-ME、LIF)に懸濁して新たなdishに播き直した。

④胚様体(Embryonic bodies =EBs)形成

あらかじめ1時間程度ゼラチンコートdishにplating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20μlの水滴を数列作り、dish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、浮遊培養を行う。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。EBsは蛍光観察、拍動率の測定、Cell sortingやPatch clampに使い、心臓ペースメーカー細胞への分化効率や解析を行った。

⑤拍動率の評価

分化誘導5日目に、胚様体をゼラチンコートした24穴プレートへ移しOut growthを形成した。光学顕微鏡を用いて拍動開始時期を観察し、その拍動率を評価した。

⑥Cell sorting

分化誘導10~18日の胚様体をCollagenase Type IIで30min~1hrs処理し、続いてTrypsin処理を5min行い単一細胞に解離した。

HBSS-10%FBS(:Hank's Balanced Salt Solution、CANBEX)に懸濁し、0.22μmフィルターに通した後解析を行った。ネガティブコントロール(=NC)としてAB1細胞を用い、GFP陽性かつPI陰性の細胞を回収し、再びdishに播き別の解析に使用した。

⑦Patch clamp

Cell sortingで回収した細胞を、ゼラチンコ

ートしたφ8mm cover glass(Warner Instruments)に約1,500個播いておき、翌日以降にPatch Clamp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。

⑧拍動細胞の観察

Cell sortingによって回収した細胞をゼラチンコートしたdish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。

⑨ノックイン細胞株のPGK・neoユニット除去

H7クローン株に、エレクトロポレーション法でCAG-Creベクターを遺伝子導入し32個のコロニーを96穴プレートにpick upして培養した。細胞の半分をストックし、残りをゼラチンコートした96穴プレートに播き直し、十分に増殖した時点でDNAを抽出し、PCR解析を行った。

4. 研究成果

I. HCN4-EGFP ES細胞の新規樹立

①遺伝子導入とPCR解析

pXNL-HCN4-EGFPプラスミドをエレクトロポレーション法で遺伝子導入しGeneticinで一週間セクションした結果、80個のクローンが得られた。ノックインされたES細胞からは約3.7kbpのPCR産物が検出することができ、PCR解析によって2つのクローン株(H2, H7)を同定した。

②サザンブロッティングによる解析

得られたクローン株2つと、野生型のAB1細胞、NCとして#33 ES細胞からそれぞれゲノムDNAを抽出し、制限酵素BstE IIで切断した。プローブは、Nhe IとXho Iで切断後、さらにNhe I、Xba Iを作用させた配列を鋳型として作製した。サザンブロッティングの結果、相同組換え体で得られる7.6kbpと6.2kbpの2つのバンドをクローン株H7で検出した。クローン株H2では6.2kbpのバンドのみを検出した。

II. 胚様体の拍動率とGFP発現

①ノックイン細胞株の拍動率

ノックイン細胞株H7を用いて、Hanging drop法により胚様体を作成し、その拍動開始時期を経時的に観察することで、野生型であるAB1細胞の心筋分化パターンと比較した。どちらの細胞由来の胚様体も、分化誘導後7日目には自律拍動を観察することができ、その拍動率は9日目にはほぼ100%に達した。この結果を受け、EGFPノックイン細胞株ではAB1株とほぼ同様の心筋分化誘導が生じていることが確認された。

②胚様体収縮部位における GFP 発現の確認
作成した胚様体で自律拍動を観察できることから、一部の細胞は心臓ペースメーカー細胞に分化していると考えられるが、それらの細胞領域において GFP が発現しているかを蛍光顕微鏡で確認した。胚様体は7日目から自律拍動を開始し、誘導後 12 日目の胚様体の収縮部位で GFP の蛍光を観察した。収縮が見られない領域での蛍光は観察されないことから、心筋細胞もしくは心臓ペースメーカー細胞特異的に GFP が発現していることが示唆される。

III. GFP 陽性細胞の分取精製と解析

① GFP 発現を指標にした細胞分取
収縮する心筋細胞を分取精製するために、GFP の発現を指標にセルソーティングを行い、回収された細胞の解析を行った。NC である AB1 細胞をまず解析し、そのデータを基に細胞選択のゲートを作成し GFP 陽性細胞の分取を試みた。ゲート内の GFP 陽性率は胚様体作成日や分化誘導日数によって多少異なり、その割合は 0.1-3.0%であった。

②分取した細胞の観察

セルソーターで回収された細胞を再び培養すると、そのうちの 70-90%で収縮を観察した。また、GFP も発現していたことから、GFP 陽性且つ収縮する細胞を効率的に分取選択できることが確認された。一部の細胞では、複数の細胞が結合し協調して収縮する様子が観察され、コネキシンによるギャップ結合を形成し電気的に結合している可能性が示差される。

③GFP 陽性細胞の電気的性質

自律拍動を示す GFP 陽性細胞で、自動能やその自発的な活動電位の発生に重要である HCN4 を始めとしたイオンチャネルの機能解析を行うために Patch clamp 法によって解析した。Current clamp mode で活動電位を測定し、whole cell patch clamp mode によりイオン電流の測定を行った。その結果、ソートされた GFP 陽性細胞では自動能型活動電位を示し、同時にペースメーカー細胞に特有な If 電流を記録できた。また自動能を有する細胞では洞結節細胞に特有な Ca^{2+} 電流と本来の洞結節細胞では発現が少ない Na^{+} 電流とが記録された。

今回樹立した HCN4-EGFP AB1 細胞株である H7 株において、相同組換え体で得られる 7.6Kbp と 6.2Kbp の 2 本のバンドをサザンブロッティング解析で検出したことから、HCN4 遺伝子座に EGFP 遺伝子がノックインされていることを確認した。しかし、6.2Kbp のバンドは 7.6Kbp のものと比較すると若干濃く、フィーダー細胞もしくは野生株 AB1 細胞のコンタミ

ネーションの可能性が疑われる。

H7 株で胚様体を作成して分化を誘導し、その拍動率を評価することで、その分化パターンについて野生型と比較検討した。どちらの細胞においても、7 日目前後に拍動し始め、9 日目ではほぼ 100%に達することから、拍動パターンはほぼ同様でありノックイン細胞株は野生株と差異はないと判断される。

次に、未分化 ES 細胞から分化させた心臓ペースメーカー細胞を、GFP の蛍光を基準にして選択的に分取精製できるか確認した。セルソーターで回収した細胞を再び培養すると、gateH で回収した場合約 80-90%、gateM で回収した場合約 70-90%の割合で拍動している様子が観察され、目的とする拍動心筋細胞を高い精度で回収できることが確認された。拍動していない細胞は、回収後細胞死に至った細胞か、HCN4 を発現している非心筋細胞、例えば神経系や腸管系の細胞であると判断される。誘導 10 日目でソーティングを行うと、最終的に 200 個ほどしか細胞を回収できなかったことから、分化誘導 10-13 日目の間で GFP を発現することが推測される。回収された一部の細胞は互いに連結し、同期して収縮することから gap junction を形成して電気的に結合している可能性がある。Connexin (30, 2, 40, 45) に対する免疫染色や細胞内の Ca^{2+} 動態、BrdU などの細胞標識薬によって細胞が分裂後結合していないことの確認を行わなければならない。

回収した自律拍動を行う心筋細胞の電気生理的な性質を確かめるために Patch clamp 解析を行ったところ、自動能やその自動的な脱分極時に重要である If 電流が測定され、心臓ペースメーカー細胞の性質を有した細胞であるといえる。しかし、自動能に関わるその他のイオンチャネル電流も測定されているが、本来は全くない、もしくは僅かに存在するだけである Na^{+} 電流が比較的大きく測定されることから、解析に用いた GFP 陽性細胞は、自動能を持つ細胞の中でも実際に歩調取りを行う真のペースメーカー細胞ではなく、ペースメーカー細胞と作業心筋を繋ぐ周辺に存在する洞房結節細胞ではないかと推測される。分取した細胞の中に真のペースメーカー細胞がいるかどうかは、①胚様体形成による分化誘導法では本当のペースメーカー細胞に分化させることはできない、②真のペースメーカー細胞集団はきわめて少ない、などの可能性が考えられ、確認することは難しい。

考察

今回樹立したノックイン細胞株 H7 は、GFP 発現を指標にして自律拍動する心筋細胞を高率で分取することができる有用な細胞株であることは確認されたが、今後臨床応用を目

指す上で解決しなければならない問題が存在する。まずひとつに、HCN4は心臓の刺激伝導系だけでなく、前述したように神経や腸管の細胞においても発現が確認されている。このことからHCN4-EGFPの発現を基に細胞を選択した場合、非心筋細胞が混入する可能性は否定できない。また、ヒトES細胞で適用する場合、その遺伝子組換えは難しいということや臨床応用を目指す上で遺伝子改変は行わないことが望ましいため、別の分取方法を考案しなければならないのは必然である。1つの方法として、HCN4や別の表面マーカーに対する抗体の利用が考えられる。分化誘導を施した細胞のうち心血管系前駆細胞を分取して再培養し、あらかじめ心血管系細胞の純度を高めておくことで非心筋細胞を減らし、ペースメーカー細胞に特有な単一もしくは複数の表面マーカー抗体を反応させ、ソーティングを行うことが挙げられる。

次に、分取される細胞数の少なさが問題となる。目的細胞を高率で回収できても全体の数%という細胞数では、移植時に必要となる数を確保することが困難となる。これを打破するには、分化誘導の条件や方法自体の変更、薬剤・成長因子の添加などによって分化効率を改善しなければならない。

最後に、作成した心臓ペースメーカー細胞を移植したとき、組織に生着し歩調取りの機能を果たすかどうか、という最大の思案すべき事柄が存在する。また、ペースメーカー細胞と作業心筋では、その最大弛緩期電位に違いがあるということも考慮しなければならない。作業心筋は静止膜電位が深いため、結合したペースメーカー細胞の膜電位も深くなってしまい、自発的な脱分極が消失してしまう可能性がある。これらの問題を避けるために、モデル動物実験において必要な細胞数や移植する部位、その回数などの移植条件を慎重に検討していかなければならない。コンピューターシミュレーションを用いた検討から、ペースメーカー機能を高めるイオンチャンネルを活性化する必要が明らかとなった。また、例えばES細胞よりパイオペースメーカーを作成出来ても、長期間組織として安定に心臓に生着する必要がある。そのために別の方法例えば成体幹細胞により血管を新生させることでペースメーカー細胞に血流を供給する必要がある。また、より多くのペースメーカー細胞を採取するためには高感度に細胞表面に発現するイオンチャンネルを検出する抗体が必要となる。また、細胞表面にイオンチャンネルを十分に発現させるための技術も必要となり、この目的には分子シャペロンならびに科学シャペロンの開発が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計14件)

平成22年

- 1) Kurata Y, Matsuda H, Hisatome I, Shibamoto T Roles of hyperpolarization-activated current I_f in sinoatrial node pacemaking: insights from bifurcation analysis of mathematical models *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 298:H1748-H1760, 2010
- 2) Morikawa K, Bahrudin U, Miake J, Igawa O, Kurata Y, Nakayama Y, Shirayoshi Y, Hisatome I Identification, isolation and characterization of HCN4-positive pacemaking cells derived from murine embryonic stem cells during cardiac differentiation *Pacing Clin Electrophysiol* 33:290-303, 2010
- 2) Mizuta E, Shirai M, Arakawa K, Hidaka K, Miake J, Ninomiya H, Kato M, Shigemasa C, Shirayoshi Y, Hisatome I, Morisaki T Different distribution of Cav3.2 and Cav3.1 transcripts encoding T-type Ca^{2+} channels in the embryonic heart of mice *Biomed Res* 31:301-305, 2010
- 4) YK Ting, K Morikawa, Y Kurata, PL Li, U Bahrudin, E Mizuta, M Kato, J Miake, Y Yamamoto, A Yoshida, M Murata, T Inoue, A Nakai, G Shiota, K Higaki, E Nanba, H Ninomiya, Y Shirayoshi, I Hisatome Transcriptional activation of SAP97 by HSF-1 stabilizes Kvl.5 in HL-1 cells *British J Pharmacol* (in press).
- 5) Peili Li, Haruaki Ninomiya, Yasutaka Kurata, Masaru Kato, Junichiro Miake, Yasutaka Yamamoto, Osamu Igawa, Akira Nakai, Katsumi Higaki, Futoshi Toyoda, Jie Wu, Minoru Horie, Hiroshi Matsuura, Akio Yoshida, Yasuaki Shirayoshi, Masayasu Hiraoka, Ichiro Hisatome Reciprocal Control of hERG Stability by Hsp70 and Hsc70 with Implication for Restoration of LQT2 Mutant Stability *Circ Res* (in press).

平成21年

- 6) Katayama A, Yamamoto Y, Tanaka K, Matsubara K, Sugitani M, Fujihara S, Harada S, Kaetsu Y, Yoshida A, Hisatome I. Fenofibrate enhances neovascularization in a murine ischemic hindlimb model. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009 Nov;54(5):399-404.
- 7) Yamamoto Y, Matsuura T, Narazaki G, Sugitani M, Tanaka K, Maeda A, Shiota G, Sato K, Yoshida A, Hisatome I. Synergistic

effects of autologous cell and hepatocyte growth factor gene therapy for neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Oct;297(4):H1329-36.

8) Kawazoe S, Ikeda N, Miki K, Shibuya M, Morikawa K, Nakano S, Oshimura M, Hisatome I, Shirayoshi Y. Extrinsic factors derived from mouse embryonal carcinoma cell lines maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells through a novel signal pathway. *Dev Growth Differ*. 2009 Feb;51(2):81-93.

9) Koshida S, Kurata Y, Notsu T, Hirota Y, Kuang TY, Li P, Bahrudin U, Harada S, Miake J, Yamamoto Y, Hoshikawa Y, Igawa O, Higaki K, Soma M, Yoshida A, Ninomiya H, Shiota G, Shirayoshi Y, Hisatome I. Stabilizing effects of eicosapentaenoic acid on Kv1.5 channel protein expressed in mammalian cells. *Eur J Pharmacol*. 2009 Feb 14;604(1-3):93-102.

10) Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, Shirayoshi Y, Yamamoto Y, Miake J, Ohkura T, Akama T, Igawa O, Shigemasa C, Kamiyo K, Ikuyama S, Caturegli P, Suzuki K. Pendrin is a novel autoantigen recognized by patients with autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Feb;94(2):442-8.

平成20年

11) Adachi M, Igawa O, Yano A, Miake J, Inoue Y, Ogura K, Kato M, Iitsuka K, Hisatome I. Long-term reliability of AAI mode pacing in patients with sinus node dysfunction and low Wenckebach block rate. *Europace*. 2008 Feb;10(2):134-7.

12) Yano S, Miake J, Mizuta E, Manabe K, Bahrudin U, Morikawa K, Arakawa K, Sasaki N, Igawa O, Shigemasa C, Yamamoto Y, Morisaki T, Hidaka K, Kurata Y, Yoshida A, Shiota G, Higaki K, Ninomiya H, Lee JK, Shirayoshi Y, Hisatome I. 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 Aug;29(4):195-203.

13) Hirota Y, Kurata Y, Kato M, Notsu T, Koshida S, Inoue T, Kawata Y, Miake J, Bahrudin U, Li P, Hoshikawa Y, Yamamoto Y, Igawa O, Shirayoshi Y, Nakai A, Ninomiya H, Higaki K, Hiraoka M, Hisatome I. Functional stabilization of Kv1.5 protein by Hsp70 in mammalian cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Aug 1;372(3):469-74.

14) Kurata Y, Matsuda H, Hisatome I, Shibamoto T. Regional difference in dynamical property of sinoatrial node pacemaking: role of Na⁺ channel current *Biophys J*. 2008 Jul;95(2):951-77.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称: 新規ペースメーカー

発明者: 久留一郎、白吉安昭、三明淳一郎

権利者: 大学法人 鳥取大学

種類: 国際特許出願

番号: **PCT/JP2010/066952**

出願年月日: 平成22年9月29日

国内外の別: 国外

名称: 新規ペースメーカー

発明者: 久留一郎、白吉安昭、三明淳一郎

権利者: 大学法人 鳥取大学

種類: 国内特許出願

番号: 特願 **2009-226760**

取得年月日: 平成21年9月30日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

新聞報道やテレビでの報道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久留 一郎 (HISATOME ICHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60211504

(2) 研究分担者

白吉 安昭 (SHIRAYOSHI YASUAKI)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90249946

研究分担者

山本 康孝 (YAMAMOTO YASUTAKA)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20362882

研究分担者

三明 淳一郎 (MIAKE JUNICHIRO)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40372677