

がんの早期発見・早期治療の為の医用材料の 開発及び応用等に関する研究

山下光司*、杉山雅紀*、牧田礼子*、山岡真弓*、藤江三千男**、中村悟己**

【要旨】

がんは、1/2の人々が罹病し、1/3の人々が死に到る死因第一位の病気であり、毎年増加の傾向が続いている。「第3次対がん10か年戦略」では、がんの罹病率及び死亡率の激減を謳っている。当該研究課題では、がんの罹病率及び死亡率を激減させる為の高機能性医用材料開発の課題として、(1)糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体MRI造影剤DEN-OH及びその改良型のGd-DTPA錯体誘導体の開発、(2)リン糖抗がん剤の開発を行った。また、(1)及び(2)の研究成果を基盤とした応用研究として(3)の研究課題(非開示)では新規な薬剤の創製と評価を行った。更に、J-オイルミルズ社との連携による(4)の共同研究課題(非開示)を行った。これらの研究課題の内の(1)及び(2)の研究課題に関する成果について以下に報告する。(研究課題(3)及び(4)の研究及びそれらの成果については、省略させていただきます。)

(1) 核磁気共鳴画像診断法(Magnetic Resonance Imaging: MRI)において、現在臨床使用されている造影剤のガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸錯体(Gd-DTPA錯体:マグネビスト)を基本骨格とし、糖で化学修飾した「糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体」を調製した。「糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体」の糖をグルコース誘導体とした糖デンドリマー型配位子のGd-錯体形成後に加水分解して調製したGd-DTPA錯体の糖誘導体(DEN-OH)は、血管内タンパク質との相互作用により血管内貯留性に優れたMRI造影剤となり、縦緩和度(T_1)が元

* 国立大学法人 静岡大学 創造科学技術大学院 ナノマテリアル部門

** 国立大学法人 浜松医科大学 医学部

のGd錯体のGd-DTPAの約8倍と高く、約1/10の低濃度で小さな富血性がんや肝臓などの臓器、血管等の画像化を可能にした。

(2) 擬似糖類の一種である「リン糖」(リンを糖のヘミアセタール環内に含む擬似糖)をリンを複素環内に含むホスホレン類から合成する新規な「リン糖」合成法を開発した。「リン糖」誘導体の白血病細胞及び固形がん細胞に対する*in vitro*評価により、様々な種類のがん細胞に対して抗腫瘍活性を示す「リン糖」誘導体を発見した。「リン糖」誘導体の中でも「デオキシハロリン糖」誘導体のジプロモリン糖(DBMPP)あるいはトリプロモリン糖(TBMPP)において、現在臨床使用されている分子標的薬剤の「グリベック」(Gleevec: メシル酸 イマチニブ)よりも優れた抗腫瘍特性を持ち、(a)従来の抗腫瘍剤と構造が異なる新規な低分子量化合物、(b)高い抗腫瘍活性、(c)血液がんや固形がん等の多種類のがん細胞に対して有効な広いスペクトル、(d)健常細胞には作用せずがん細胞に対して効果を発揮する高い特異性・選択性、(e)がん細胞に対してアポトーシス誘起する作用機序、(f)複数のがん化抑制因子を亢進し複数のがん化促進因子を抑制するマルチ標的型分子標的抗腫瘍剤、(g)がん細胞が増殖する細胞周期における共通のタンパク質Cdc25Bの発現を抑制することにより様々な種類のがん細胞の増殖を抑制する作用、等の特徴を有する(2011年11月23日(米国東部時間)PLoS ONE誌電子版:2011年11月24日に記者会見:プレス発表)。それ故、「リン糖抗腫瘍剤」の研究により、単剤による様々な種類のがんに対して抗腫瘍活性が期待でき、「単剤によるがんの有効な治療」の実現を可能にする研究成果を得た。

【はじめに】

現在、日本において、がんは死因第1位の病気ある。死因の年次別推移(厚生労働省の人口動態調査(図1))では、がんによる死亡率は増加の一途を辿っており、世界的にみてもこの傾向は同様である。また、心疾患や脳血管疾患等循環器系疾患が死因の第2位及び第3位を占めている(図1)。この事は、現状のがんの治療技術では、国の医療政策の「がんの罹病率・死亡率の激減を図る」ことの実現が難しいことを示している。それ故、医療技術の革新が不可欠であり、医用材料・医療器具・医療装置等の革新が必要であることが示唆されており、我々は、がんの早期発見・早期治療の為の医用材料開発を目的とした研究を行っている。

日本の重要な医療政策の一つの「第3次対がん10か年総合戦略」では「研究、予防及び医療を総合的に推進することにより、がんの罹患率と死亡率の激減を目指す」と目標が謳われている(図2)。がん検診の普及等社会インフラの整備の他に、「革新的な予防・診断・治療法の開発」に関わる「がん研究の推進」を行い、がんの早期発見・早期治療の為の医療技術の革新、その為の、医用材料の開発に関する研究も社会ニーズに応える最重要課題の一つである。

がんの早期治療・早期治療に関する研究においては、現在臨床使用されている「分子標的療法薬剤」(例えば、Gleevec)の新しいタイプの「多標的型分子標的抗腫瘍剤」の開発を目指した研究課題として

「リン糖抗腫瘍剤の開発研究」を行って来た。ここでは、現在臨床使用されている「分子標的療法薬剤」のGleevecと構造の異なる「リン糖」骨格に注目して、「新規な分子標的抗腫瘍剤」を開発して、「単剤によるがんの治療、様々な種類のがんに共通な抗がん剤、簡単な構造を持つ低分子量化合物、変異株や後期がんも治療できる薬剤、患者にとってQOLの高い治療、患者の経済的負担の軽減」等をキーワードに、複数の標的を持ち、がん細胞の分裂・分化の上

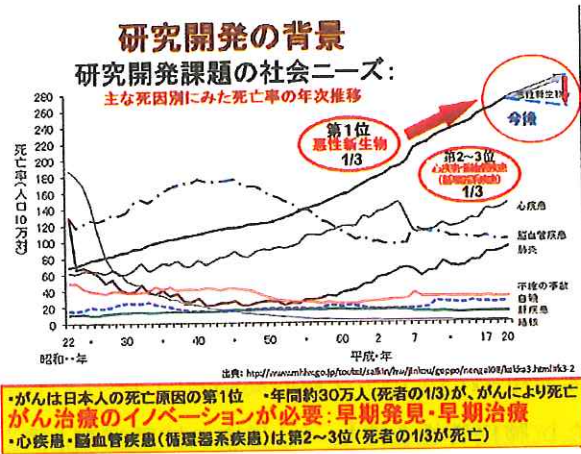


図1 死因別にみた死亡率の年次別推移(人口動態調査)

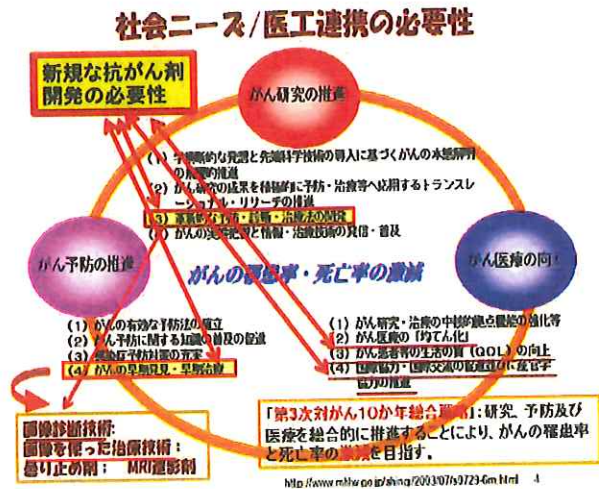


図2 対がん10か年総合戦略「がんの罹患率及び死亡率の激減」

流において作用する全く新規な構造の「多標的型分子標的抗腫瘍剤」の開発を目的として、擬似糖の一種の「リン糖」骨格を基本とする新規な抗がん剤の開発を行った。

擬似糖の中のカルバ糖やアザ糖、チア糖等については、天然産生の誘導体及び化学合成による様々な誘導体について活発な研究が行われており、重要な生理活性を有する多くの化合物が知られている。糖のヘミアセタール環内にリン原子を含むリン糖もまた生理活性が期待されるが、リン糖類は天然産生の誘導体は発見されていない。また、カルバ糖やアザ糖、チア糖等の擬似糖類と比較すると、糖化学の常道の手法である糖を出発原料とするルートでは合成が非常に難しく、研究報告例は多くはない。しかし、リン糖は、糖及びリン誘導体が生命現象に深く関与していることやリン糖の骨格に含まれる炭素—リン結合を有するホスホマイシンやピアラフォス、ホスホリン脂質等の天然産生の生理活性物質が知られていることから、重要な生理活性を示す可能性が大きい。とりわけ、リン糖は、Gleevecとは構造が異なり、リンを含む複素環骨格の新しい構造を持つ抗腫瘍剤として開発する魅力的な化合物と思われる。ここでは、我々が新規に開発した複素環化学に基づく合成方法を用いて様々なリン糖誘導体を化学合成し、医学と工学との連携により、*in vitro* 評価を行い、更に *in vivo* 評価を試みた。

【結果及び考察】

研究課題(1): 糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体MRI造影剤の開発(DEN-OH及びその改良型のGd-DTPA錯体誘導体の開発と評価)

(1)-1 研究の目標及び概要

本研究開発では、現在最も良く臨床使用されているMRI造影剤のGd-DTPA錯体(ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸(Gadolinium-Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-penta-acetic acid)錯体:商品名 マグネビスト(Magnevist))が血管外漏出型であり、造影部位非特異的な造影剤であることによる欠点、例えば、(i) Gd-DTPA錯体では画像化が難しい「血管造影(MRA)」あるいは、(ii) 小さな初期がんの鮮明な画像を得る、(iii) Gd製剤による副作用の腎性全身性線維症(Nephrogenic systemic fibrosis(NSF))の問題、等々をGd-DTPAを基本骨格としたより高機能の安全・安心なMRI造影剤を開発することにより解決しようとする研究

課題である。

糖デンドリマー型構造を基本とする化学的修飾による「がんの超早期発見」の造影剤開発のコンセプトは、医薬品として優れた性質を備えているGd-DTPAの安全性を損なうことなく、糖の生体内分子(例えば、糖、アミノ酸、タンパク質、糖たんぱく、ペプチドグリカン、等)認識機能を活用して、現在普及しているMRI装置のパフォーマンスを最大限に発揮する造影剤とする分子計に基づいている。それ故、Gd-DTPAをコア部とし、外殻部に糖を配置した「糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体」造影剤を開発する研究を行って来た。「糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体」造影剤によれば、MRI装置を高磁場化(7.0 T以上)する必要はなく、従来型の安価な普及型のMRI装置(1.5 T~3.0 T)の最高のパフォーマンスにより、従来のMRI造影剤の技術では画像診断が難しい「超早期がん」の描出あるいは単回投与による「血管造影」を、安全・高感度で鮮明に画像化できる。本研究では「糖デンドリマー型の新規なMRI造影剤」の実用化に向けた研究を行った。

この新規な血管内貯留性の「糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体」MRI造影剤(調製した様々な「糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体」の中でも、Gd錯体を最終段階で加水分解分解して調製した「糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体(DEN-OHと略記)」が、MRI造影剤として最高のパフォーマンスを発揮すれば、普及型のMRI装置によりX線CT等の放射線を用いる画像診断法と比較して極めて安全で優れた画像診断法となる

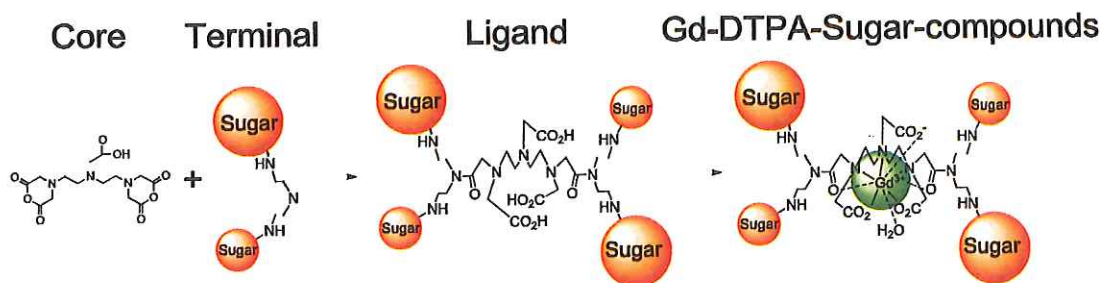
それ故、DEN-OHによるMRI画像診断法により、死因第1位の「がん」の超早期発見を従来技術のMRI造影剤(Gd-DTPA-錯体)の1/10の濃度により画像診断を普及型のMRI装置により短時間で可能にする。また、死因第2位の「心疾患」及び第3位の「脳血管疾患」等の「循環器系疾患」の画像診断法である「血管造影法:Angiography(MRA)」を、DEN-OHによって、従来技術のGd-DTPA錯体の1/10の濃度の単回投与により、鮮明な血管造影法を提供することを目標とする。

(1)-2 糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体の創製

現在MRI造影剤として実用化されているGd-DTPA錯体は分子サイズが小さく組織認識部位を有していないため、血管透過型(血管外漏出型)造影剤であり、静脈内に投与された造影剤(0.1 mM/Kg)は、5分程度で血管壁を透過する。そのため、血管の詳細な描出が困難

であるだけでなく、特定の臓器や疾患を選択的に描出することが難しい。

本研究では糖が有する組織への認識機能に着目し、Gd-DTPAをコア骨格とし、Gd-DTPAを単糖であるグルコースによりMRI造影剤分子の外殻を化学修飾した糖ドンドリマー型Gd-DTPA錯体の調製を行った(スキーム 1)。



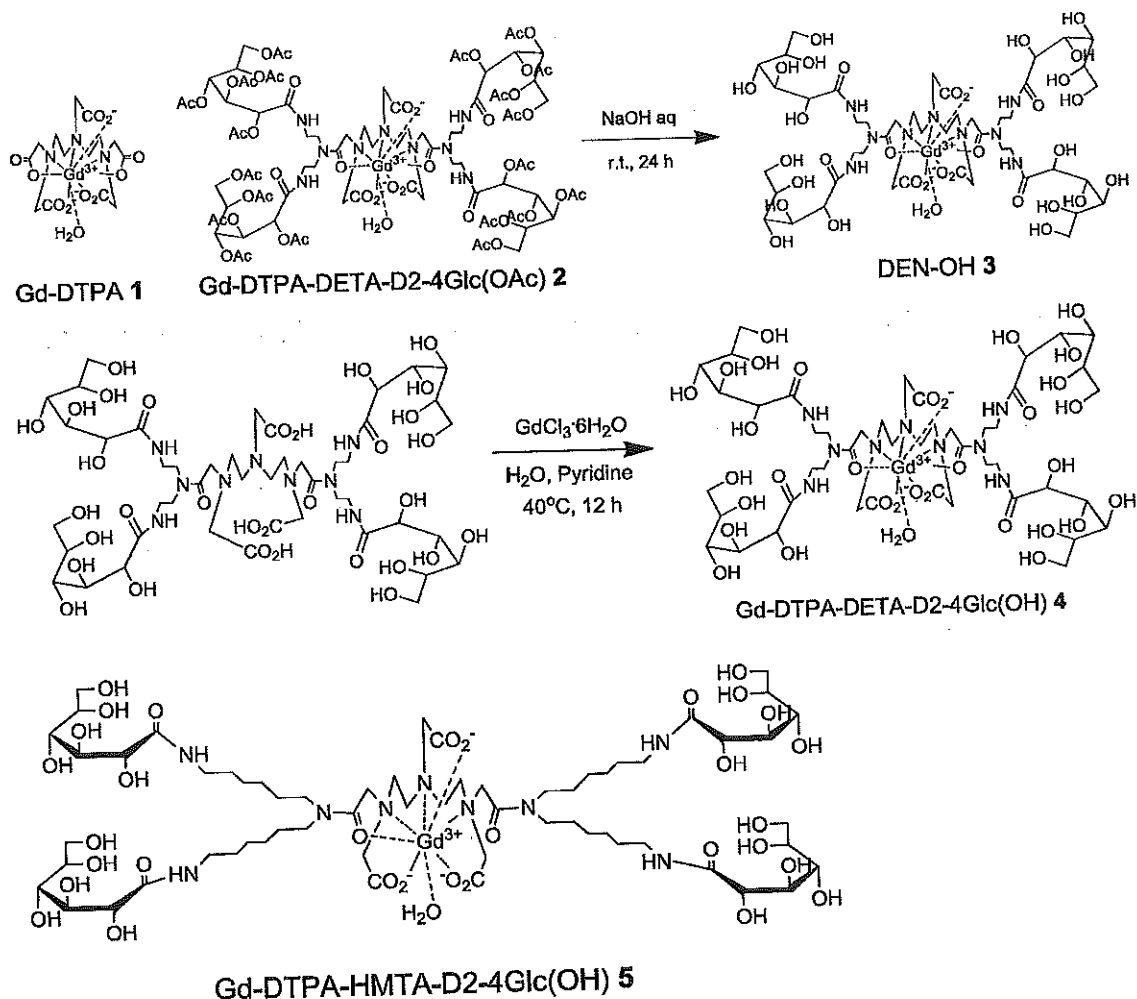
スキーム 1. 糖ドンドリマー型Gd-DTPA錯体の合成手順

スキーム 1の手法に従って、ドンドリマー分子は、末端(Terminal)部及びコア(Core)部に分割したドンドリマー部分をそれぞれ別途に合成し、コンバージェント法を用いて糖ドンドリマー型DTPA配位子を合成、配位子の中心のDTPAへのガドリニウムのキレーションを行い、「糖ドンドリマー型Gd-DTPA錯体」を調製した。加水分解ルートでは、先ず、糖化学の基本操作として糖のOH基を酢酸エステルにより保護(OAc)した配位子を合成し、次にアセチル保護されたGd-DTPA-DETA-D2-4-Glc(OAc)(2)を調製した。アセチル体の緩和率の高いGd-DTPA錯体誘導体とする為に、パーアセタート錯体2を加水分解して遊離のOH基とした新規なMRI造影剤として糖ドンドリマー型Gd-DTPA錯体(Gd-DTPA-DETA-D2-4-Glc(OH): DEN-OH (3)と略記)の合成を「加水分解ルート」により達成した(スキーム 2)。

(1)-3 糖ドンドリマー型Gd-DTPA錯体の*in vitro* 評価

(1)-3-1 調製した糖ドンドリマー型Gd-DTPA錯体の*in vitro* 評価

造影剤を用いたMRIでは、生体内と異なった状態の造影剤内に存在する水のプロトンの緩和に基づくMRI信号(電磁波)を測定し、コンピューター処理することで画像化する。X線やPET等のエネルギーの大きな放射線あるいは放射性同位体を用いる画像診断法と比較してMRI画像診断法(核磁気共鳴画像診断法)はより安全な画像診断法と言える。



スキーム2. Gd-DTPA錯体 (Magnevist(1))、加水分解ルートによる糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体 (Gd-DTPA-DETA-D2-4-Glc(OH): DEN-OH(3))の調製、及び非加水分解ルートによる糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体 (Gd-DTPA-DETA-D2-4-Glc(OH)(4)、並びに遊離のOH基の糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体(3~5)の構造式

MRI造影剤により増強された水のプロトンの縦緩和時間を測定し緩和特性(縦緩和度 T_1)を調べることは、造影剤としての性能を知る重要な評価法である。緩和時間に関して言えばMRI造影剤は T_1 強調型造影剤および T_2 強調型造影剤の2種類が知られている。MRI造影剤は水のプロトンの縦緩和時間 (T_1) あるいは横緩和時間 (T_2) を短縮させる効果を持っている¹⁻³⁾。ランタノイド系元素であるGdは、本来プロトンの T_1 の強い短縮効果を持つため、調製したGd錯体は T_1 強調型造影剤と言える。通常使用されている普及型のMRI装置(1.5T~3.0

T)でGd錯体を造影剤として用いる場合は、縦緩和が強調された型の画像診断法となる。そこで、*in vitro*における水のプロトンの T_1 を測定することにより調製した糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体の造影剤としての性能評価を行った。

(1)-3-2 錯体を形成していないガドリニウムの除去

錯体を形成していない未反応あるいは過剰の遊離のガドリニウムを除去するために、合成した全ての糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体を、その水溶液のpHを7.0に調整後、Chelex® 100 Resinを加え6時間攪拌した。その後、キシレノールオレンジによる遊離のGd(III)イオンの呈色試験による色の変化により遊離のGd(III)イオンの除去を確認した。

呈色試験の手順としては、まずサンプルチューブに微量の調製したGd錯体を入れ、続けてpHを5.0に調整した酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を加えピリジンを一滴滴下した。溶液を均一にした後、試料溶液にキシレノールオレンジ(XO)を加えた。

Chelex®100 Resinを加え溶液を攪拌しながら、適当な時間間隔でXO添加用液の色の変化を確認した。試料溶液の色が赤褐色のまま変化していない場合、錯体を形成していないガドリニウムが存在していないこと(未反応あるいは過剰の遊離のガドリニウムを除去されたこと)を示している。溶液の色が青紫色に変化した場合、錯体を形成していないガドリニウムが存在していることを示している。それ故、XO呈色試験で試料溶液の色が変化しなくなるまでChelex®100 Resinによる除去を繰り返し行なった。

(1)-3-3 縦緩和時間(T_1)の測定

合成したGd(III)錯体を超純水に溶解させ、*in vitro*評価として、卓上核磁気共鳴装置 Minispec (TD-NMR) (緩和時間測定装置)を用いて水のプロトンの T_1 を測定した。緩和時間は温度依存性が大きく、温度が上昇するほど緩和時間は長くなることが知られている。また、造影剤は体内に投与されることを考慮に入れ水溶液の温度を37°Cに固定して測定を行なった。測定誤差が極小になるよう一つのGd錯体につき5回の測定を行ない、得られた値の平均値を縦緩和時間(T_1)とした。

(1)-3-4 Gd濃度の測定

緩和時間は造影剤のGd(III)濃度に依存しているため、ICP発光分光分析装置を用いて緩和時間の測定に使用した試料水溶液のGd濃度を測定した。また、各水溶液のGd濃度を測定する際に基準となる検量線は、一定濃度に調整した3種類のGd水溶液を用いて作成した。

(1)-3-5 縦緩和率 (r_1) の測定

前述したように、造影剤のGd(III)に配位した水の強調されたプロトンの緩和時間を測定することにより得られる緩和特性(緩和率)は、造影剤としての性能を示す重要なパラメータとなる。しかし、緩和時間は造影剤のGd濃度に依存するため緩和時間をGd濃度で割った緩和率が指標として用いられている。縦緩和率 (r_1) は以下の式(式 (1))から求めることが出来る。

$$r_1 = \frac{\frac{1}{T_1} \times 1000 - r_1^{H_2O}}{[Gd(III)]} \quad (1)$$

r_1 ; 縦緩和率 [$s^{-1} \cdot mM^{-1}$]

T_1 ; 縦緩和時間 [ms]

$r_1^{H_2O}$; 水の縦緩和率 [$s^{-1} \cdot mM^{-1}$]

[Gd(III)]; Gd(III)濃度 [mM]

以下に T_1 および [Gd(III)] の測定結果から式(1)を用いて求めた各Gd錯体の r_1 を表にして示す(表1)。

表1. 水中における各Gd錯体の縦緩和率 (r_1)

Entry	Compound	r_1 [$s^{-1} \cdot mM^{-1}$] (37 °C)
1	Gd-DTPA (Magnevist)	3.5
2	Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	6.4
3	DEN-OH	31.0
4	Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	6.3
5	Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)	8.1

表1のEntry 1 のGd-DTPA (Magnevist) は臨床の現場において最も一般的に用いられているMRI造影剤である。そこで、各Gd錯体の造影剤としての性能を評価するためにGd-DTPAをスタンダードとした。

本研究で調製した全ての dendrimer 型 Gd-DTPA 錯体は Gd-DTPA と比較して高い r_1 を示した。中でも Entry 3 の DEN-OH (3) は r_1 が $31 [s^{-1} \cdot mM^{-1}]$ と Gd-DTPA と比較して 8 倍以上であった。これは、DEN-OH は臨床において、Gd-DTPA (通常・の使用濃度: $0.1mM/Kg$) よりも $1/10$ 程度の低濃度での使用が可能であることを示唆している。欧米では、血管造影 (MRA) において、長時間に亘って鮮明な画像を得るために Gd-DTPA を 2 回 ~ 3 回投与 (double or triple dose) することがあり、遊離の Gd(III) による「腎性全身性線維症 ((Nephrogenic systemic fibrosis (NSF))」が Gd-DTPA 錯体の副作用として、近年になり報告されるようになってきた⁴⁻¹⁰⁾。それ故、MRI 造影剤は、MRA においては低濃度で鮮明な画像を 1 ~ 2 時間程度与えられることが臨床の現場で求められている条件の一つであり Entry 3 の DEN-OH (3) はその条件を満たした新規 MRI 造影剤となるポテンシャルを有している。

しかし、非加水分解ルート of Entry 5 の Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)(5) の r_1 は DEN-OH (3) と比較して $1/5$ であった。Gd 錯体の加水分解条件に影響されるのではないかと考えられる。

(1)-3-6 血清アルブミン溶液中における縦緩和率(r_1)の測定

現在注目されている造影剤の中に Blood Pool Agents と呼ばれるものがある。この種の造影剤は投与後に血中に存在している巨大分子であるタンパク質と結合することで緩和率を

高めている。大きな分子(ポリエチレングリコール、デンドリマー、デキストリン等)と結合した造影剤はその緩和率が向上するということが報告がなされている¹¹⁻¹⁹⁾。Blood Pool Agentsの一つであるMS-325 (Vasovist) は血液中に最も多く存在するタンパク質である血清アルブミンをターゲットとしている²⁰⁾。そこで、本研究で合成した各糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体についても血清アルブミンによる緩和率の増強効果を得られるか否かを検討した。血清アルブミンは牛のものを用いて血中濃度である37.3 g/Lとなるように血清アルブミン溶液を調整し、 r_1 測定は前項と同様の条件および方法で行なった。

以下に r_1 および [Gd(III)] の測定結果から式(1)を用いて求めた各Gd錯体の結成アルブミン溶液中における r_1 を表にして示す(表2)。

表2. 血清アルブミン溶液中における各Gd錯体の縦緩和率 (r_1)

Entry	Compound	r_1 [$s^{-1} \cdot mM^{-1}$] (37 °C)
1	Gd-DTPA (Magnevist)	3.5
2	Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	6.9
3	DEN-OH	-
4	Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	6.8
5	Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)	7.7

表2においても、表1と同様にEntry 1 のGd-DTPA (Magnevist)をスタンダードとした。表2より、本研究で合成したEntry 2 及び4の糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体はGd-DTPAと比較して高い r_1 を示したが、Entry 5 の糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体では血清アルブミンによる緩和率の増強効果を得ることは出来なかった。

Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) (2)とGd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (4)は糖末端の官能基がそれぞれアセチル基とヒドロキシル基となる構造であるが、Table 1及びTable 2より緩和率に大きな違いがないため、糖とDTPAを結ぶスペーサーの長さがGd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) (5)の高い緩和率に影響を及ぼしているのではないかと推察した。これを確認するために、今後は更にスペーサーを長くした糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体を合成する必

要がある。

(1)-3-7 合成したGd錯体の *in vivo* 評価

In vitro 評価において、合成した糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体は現在臨床に用いられているGd-DTPA錯体 (Magnevist) よりもMRI造影剤として高機能であることが示唆された。調製したGd錯体の実用性を評価するためにラットを用いた *in vivo* 評価を行なった。スキーム1のMRI造影剤1及び3~5の各種Gd錯体の *in vivo* 評価を、それぞれ図3~図6に示す。

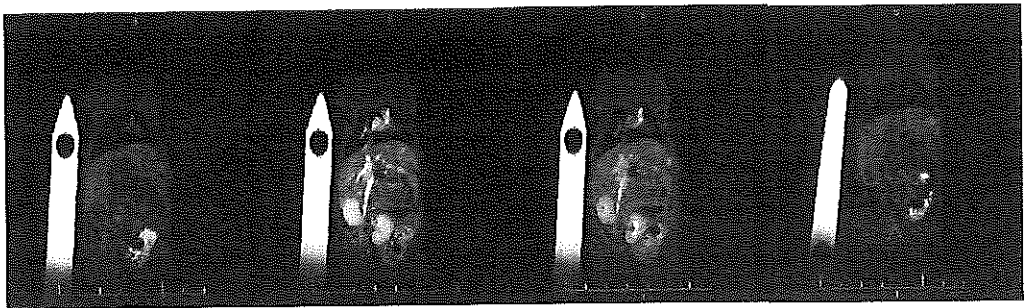


図3. Gd-DTPA (1)を投与したラットのMRI画像
(左から投与前、投与後1分後、5分後、20分後)

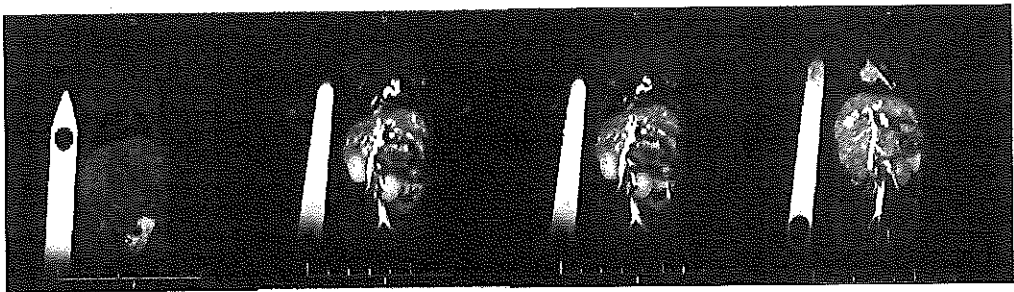


図4. DEN-OH (3)を投与したラットのMRI画像
(左から投与前、投与後1分後、5分後、20分後)

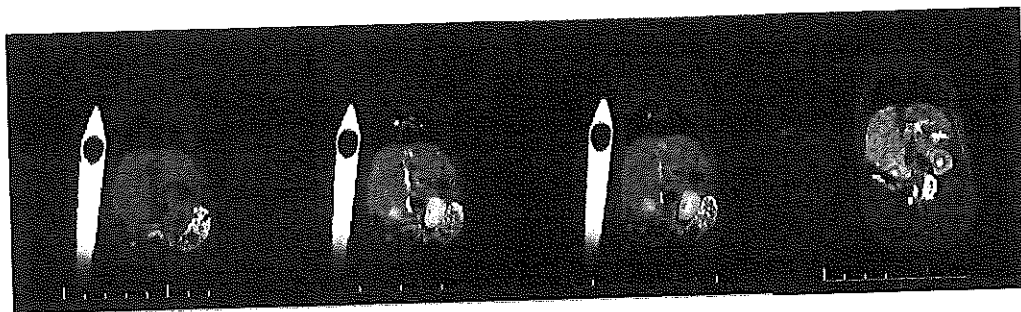


図5. Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (4)を投与したラットのMRI画像
(左から投与前、投与後1分後、5分後、20分後)

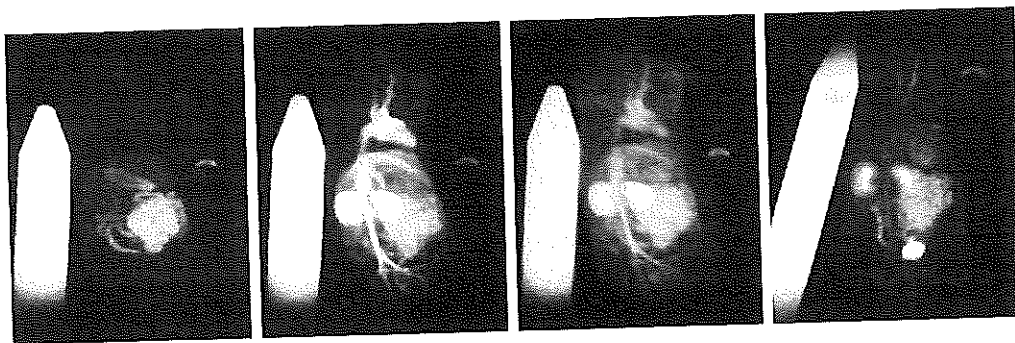


図6. Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) (5)を投与したマウスのMRA画像
(左から投与前、投与後1分後、5分後、20分後)

超伝導磁気共鳴画像撮影装置 (Signa 3.0 T) を用いてMRI画像を撮像した。*In vivo* 評価においても *in vitro* 評価と同様にGd-DTPA (Magnevist) をスタンダードとした (表1及び表2)。Gd-DTPAは0.1 mM/Kg, 合成した糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体は0.05 mM/Kgとなるように生理食塩水を用いて造影剤の濃度を調整した。

In vivo 評価から、合成したGd錯体はGd-DTPAの濃度の半分でありながらもより強いコントラストを示し、中でもDEN-OH (3)は非常に強いコントラストを示した。この結果は、「開発の標的の糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体は低濃度 (従来品 (Gd-DTPA) の約1/10の低濃度) での使用が可能」という研究目標に合致しており、臨床の現場で求められている条件を満たす新規MRI造影剤としてのポテンシャルを有していると言える。

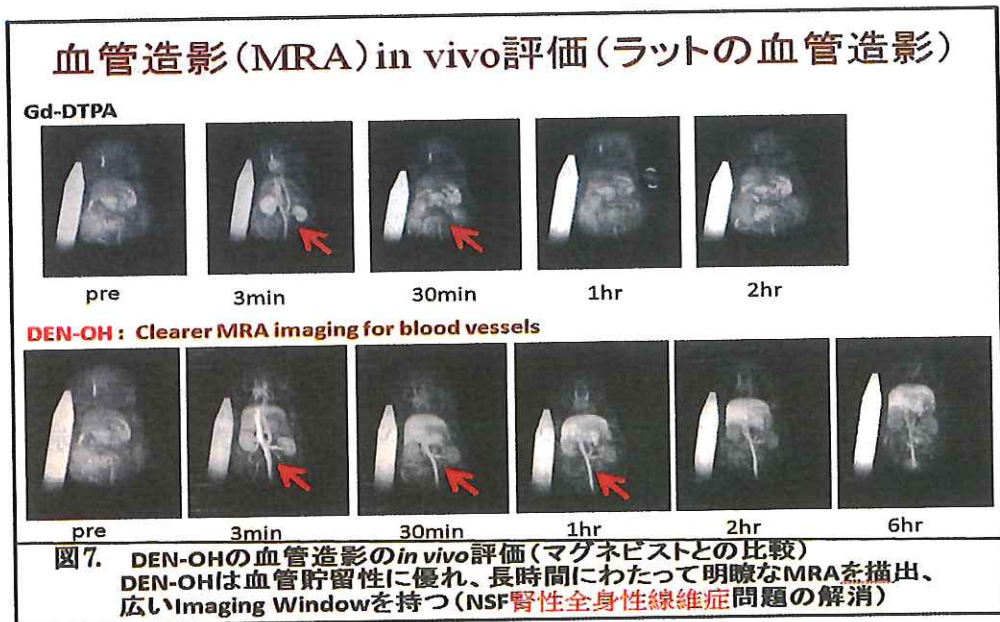
また、MRA画像のため比較し難いが、コア部のDTPAとデンドリマー外殻部の糖とを結ぶス

ペーサーの長さが糖デンドリマー型のGd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) (5)の高い緩和率に影響を及ぼしているのではないかと仮説も支持すものであり、これを確認するために、更にスペーサーを長くした糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体の合成は必要不可欠だと考えられる。

DEN-OHによるラットの血管造影及び肝細胞がんの造影の*in vivo* 評価をGd-DTPA錯体と比較した結果を図7及び図8に示す。図7では、DEN-OHは通常の半分の濃度の0.05 mM/Kgの尾静脈から単回投与により3分～1時間以上に亘って血管の鮮明な画像を与えているのに対して、Gd-DTPA錯体は投与後3分程度(～5分程度)では血管が描出されているが、30分では、血管造影が出来ていない。

また、図8は、ラットの肝細胞がんの造影を、DEN-OHを用いた場合とGd-DTPA錯体を用いた場合のMRIの*in vivo* 評価の比較である。DEN-OHでは造影剤投与後の3分以降に肝細胞がんを鮮明に画像化しているが、Gd-DTPAでは画像診断が難しい。

DEN-OHは血管貯留性に優れ、血液成分と相互作用を有するので、体内での出血(例えば、腹腔内出血)の画像化にも成功した。DEN-OHはMRI造影剤として、腹腔鏡下手技等低侵襲性のQOLの高い治療では、視野の狭い腹腔鏡下で見落とす可能性のある出血を画像化出来るので、医療過誤を防止する有効な画像診断技術を提供する。



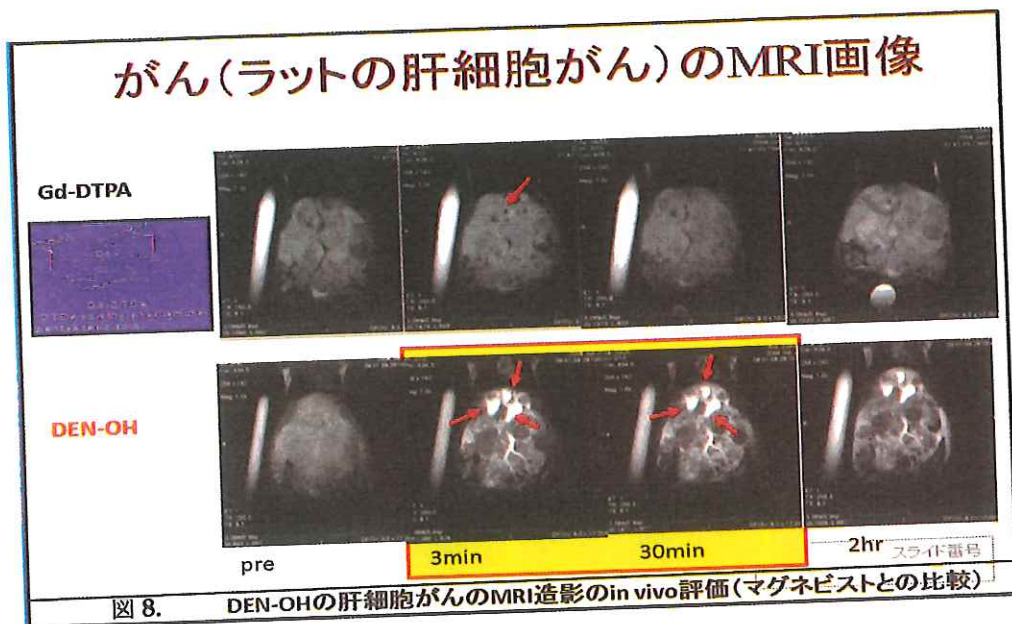


図 8. DEN-OHの肝細胞がんのMRI造影のin vivo評価(マグネピストとの比較)

以上の結果から、本研究で創製した糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体は、Blood Pool Agentsとして優れた特徴を示し、新規MRI造影剤として、持続性のある高画質の画像を与え、がん造影、血管造影、腹腔内出血描出等において優れたポテンシャルを有している。これらのMRI造影剤の糖デンドリマー型分子構造はMRI画像診断法の更なる性能向上のための分子設計の指標になると考えられる。

(1)-3-8 ドッキングシミュレーション

アルブミンのポケットとの相互作用や安定性を計算によりシミュレートする方法として統合計算化学システムMOE (Molecular Operating Environment) のドッキングシミュレーションを用い、生体内における糖デンドリマー型Gd-DTPAとアルブミンとの相互作用について検討した(図9~図11)。

図9では、タンパクが緑と青であり対象となるジプロモ体が赤で示す。グラデーションになっている部分がアルブミンのポケットの表面の形を示している。二次元の表示も同時に示した。青紫の箇所がポケットより出ているところである。

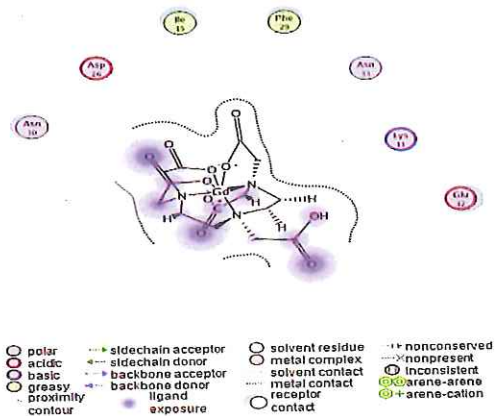
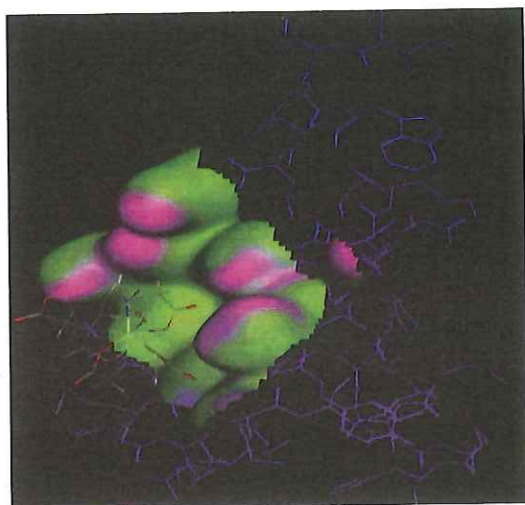


図9. Gd-DTPA (1)とのドッキングシミュレーション

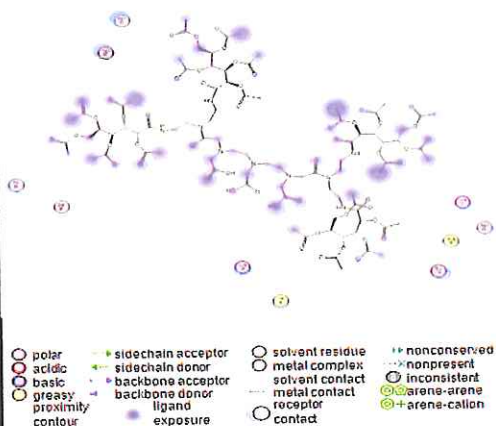
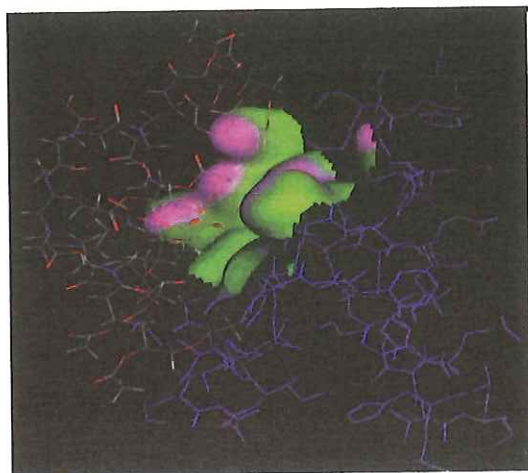


図10. DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)とのドッキングシミュレーション

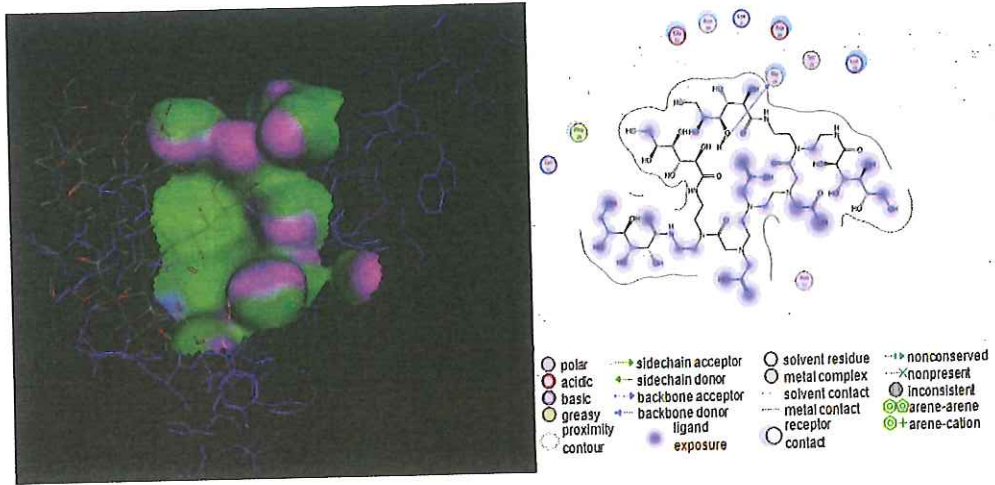


図11. DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)とのドッキングシミュレーション

MOEではドッキングした時の安定性を、ひずみを考慮したドッキングエネルギーである U_{dock} [kcal/mol]という指標($U_{\text{dock}}=U_{\text{ele}}+U_{\text{vdw}}+U_{\text{strain}}$)で表す。 U_{dock} の計算結果を表3に示す。この値がマイナスに大きければ大きい程ドッキングした時により安定である。

U_{ele} : 受容体とリガンド間の静電相互作用エネルギー

U_{vdw} : 受容体とリガンド間のvan der Waals相互作用エネルギー

U_{strain} : リガンドのひずみエネルギー

表3. 水中における各Gd錯体の縦緩和率 (r_1)

Abbreviation	U_{dock}
Gd-DTPA	-9.8591
DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	-5.9198
DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	-10.7488

これらの結果から、遊離のOH基を持つ糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体では、アルブミンとの相互作用の存在が示唆される。

(1)-4 研究課題(1)の研究成果のまとめ

糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体のDEN-OHは、血管内貯留性のGd-DTPA錯体であり、現在臨床使用されているGd-DTPA錯体(Magnevist)との比較において、血管造影(MRA)及び初期の肝細胞がんの造影等に非常に優れた造影効果を示した。また、血液成分との相互作用が強いので、腹腔内出血も鮮明に画像化できた。それ故、当該の研究開発の成果は、現状のMRI画像診断技術を革新する低侵襲性医療技術を提供し、普及型のMRI装置によって、従来品のGd-DTPA錯体の1/10程度の低濃度の造影剤により質の高い安全・安心・QOLの高い画像診断技術を提供する。また、QOLの高い内視鏡や腹腔鏡の手技の際の腹腔内等の微量の出血に対する優れた可視化技術も提供でき、医療技術の革新を齎す研究成果を得た。それ故、当該技術が、臨床研究を経て実用化できれば、国産による新規な優れたMRI造影剤を商品化できる。(糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体関係特許7件)

研究課題(2): リン糖抗がん剤の開発

(2)-1 研究の目標及び概要

急性白血病は正常の血球成熟障害とそれにより生じた白血病細胞の増殖により引き起こされる病気である。白血病細胞の増殖を抑えるための様々な薬剤や治療法が開発されてきているが、その増殖の制御は困難である。リンや糖は生体機能関連物質として生体内に存在し、生命現象に深く関与している。アザ糖やチア糖等の多くの擬似糖類は生理活性を示し、リンを含む擬似糖類である「リン糖」も有用な生理活性が期待されているが、天然産生のリン糖はいまだ発見されておらず、糖を原料とする合成方法も他の擬似糖合成に比べて難しいために、「リン糖」の合成及び評価に関する研究報告例は比較的少ない。

そこで、本研究では、リン糖類の新規な合成方法として複素環化合物を原料とする新規な合成方法²¹⁻²³⁾を開発することにより、リン糖の合成及び評価、生化学及び医学応用に関する研究を、実用化に向けて飛躍的に推進する。特に、「リン糖」誘導体を、遺伝子の構成成分の「糖」及び「リン」からなる「ヌクレオチド」との組成の類似性から「抗腫瘍剤」をターゲットとした研究を行い、様々な種類の「がん」(例えば、白血病などの血液がん、あるいは、肺がんなどの固形がん等)細胞に対して選択的・特異的に作用する新規な「多標的型分子標的抗

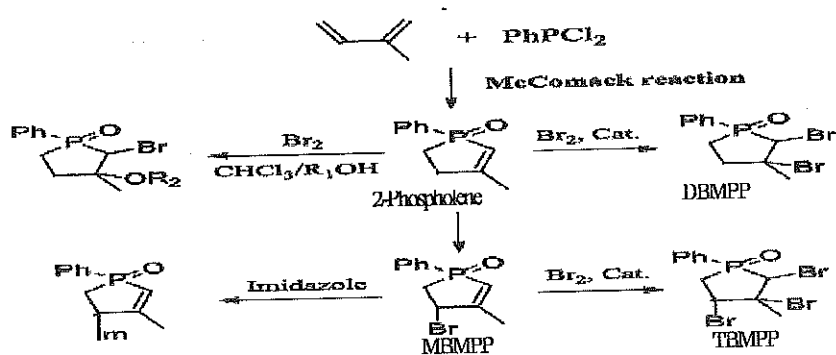
腫瘍剤」の開発を目標とした研究を行った。

現在化学療法として臨床使用されている「分子標的薬剤」、例えばGleevec(イマチニブメシラート)はチロシンキナーゼを標的とし、チロシンキナーゼ活性阻害により、白血病の非常に優れた抗がん剤である。また、消化管間質腫瘍(Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST))の化学療法にも使用される。しかし、これらの「分子標的療法薬剤」は標的のスペクトルが狭く、変異株や後期がんのような多様な遺伝子を含むがんにはあまり有効ではなく、また、通常は、効果的な治療や抗がん剤の副作用の緩和ケアの為に臨床的には「多剤併用療法」がなされている。そこで、様々な種類のがんに有効な抗腫瘍剤を開発すれば、変異核や後期がんのような様々な種類のがん細胞にも有効な抗がん剤となり、現在のがん治療技術を革新し、「単剤」による患者のQOLの高い化学療法を実現できる。

それ故、本研究開発課題では、「リン糖による多標的型分子標的抗腫瘍剤」の開発を目標とし、当該研究成果により、現在臨床で行われている「多剤併用療法」のがん治療技術を革新して「単剤」による様々な種類のがん治療技術を提供する新規な抗腫瘍剤を開発する。

(2)-2 リン糖抗腫瘍剤の創製

リン糖誘導体合成の原料として2-ホスホレン 1-オキシド類を三価リン化合物と1,3-ジエン類とのMcComack反応により合成した。例えば、3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシドは、イソブレン(2-Methyl-1,3-butadiene)とフェニル亜ホスホン酸ジクロリドとのMcComack反応により合成中間体として生成する塩化3-メチル-1-フェニル-3-ホスホレニウムの加水分解で得た。3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシドを原料として、4位のブROM化反応、2,3位のジブROM化反応、2,3位のエポキシ化反応、2-ブROM-3-ヒドロキシ化反応等のホスホレンの多様な反応活性点に対する置換反応や付加反応等により様々な種類のリン糖誘導体を調製した。更には、更なる置換反応や環化反応等により、分岐糖、デオキシハロリン糖、リン糖ヌクレオシド、リン糖イヌクレオシド、アンヒドロリン糖等の様々なリン糖類似体を創製した。例えば、分岐デオキシブROMリン糖MBMPP、DBMPPやTBMPPなどの合成ルートをスキーム 3に示す^{24,25)}。



スキーム3. 数種類の置換リン糖誘導体(ジブロモ体 DMPP、トリブロモ体 TMPP、等)の合成

(2)-3 *in vitro* 評価

リン糖誘導体を白血病細胞(K562細胞(ヒト慢性白血病細胞)やU937細胞(ヒト急性白血病細胞)など)に対してMTT法により*in vitro* 評価を行うと、アンヒドロ糖あるいはデオキシ糖が抗腫瘍活性を示した。また、健常な細胞に対しては作用しない(健常細胞は死なない)特徴を示した。リン糖誘導体の中でも、デオキシハロリン糖誘導体のDBMPPやTBMPP等が高い抗腫瘍活性を示した。図12にDBMPPやTBMPPのU937細胞に対する抗腫瘍活性評価結果をGleevec® (Imatinib mesylate((Gleevecは現在臨床使用されているチロシンキナーゼ活性阻害による優れた分子標的薬剤))と比較して示す。更に、構造-活性相関等の研究結果を基に、抗腫瘍活性の高い分子を設計して新規なリン糖を調製しK562細胞及びU937細胞に対して*in vitro* 評価したところ、Gleevecの活性よりも更に1~2桁程活性の高いリン糖誘導体(構造非表示)を得た(図13)。また、リン糖誘導体は、血液がんの白血病のがん細胞のU937細胞やK562細胞の他に、様々な白血病細胞に対しても、高い抗腫瘍活性を示した。更に、肺がん、胃がん、皮膚がん等の固形がんに対しても高い活性を示した(図14)。

リン糖誘導体DBMPPあるいはTBMPP等は、Gleevecとの比較において、(a)高い抗腫瘍活性、(b)血液がん細胞(白血病細胞)に対する広いスペクトル(白血病等の血液がんのK562細胞、U937細胞の他に様々な種類の白血病細胞(がん化白血球)に抗腫瘍活性)を示し、(c)肺がん等の固形がんに対しても活性を示した。それ故、リン糖には、様々な種類のがん細胞に有効な抗腫瘍活性が期待される。MTT法によれば、健常な白血球はリン糖によって死なず、がん化白血球と健常な白血球の混合物に対してはがん化白血球の割合に比例し

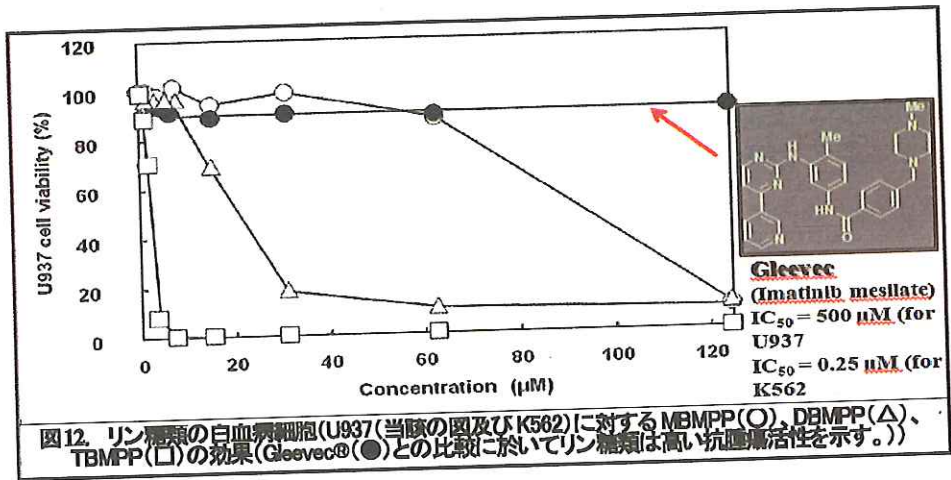


図12. リン糖類の白血病細胞(U937(当該の図及びK562)に対するMBMP(O)、DBMP(Δ)、TBMPP(□)の効果(Gleevec(●)との比較に於いてリン糖類は高い抗腫瘍活性を示す。))

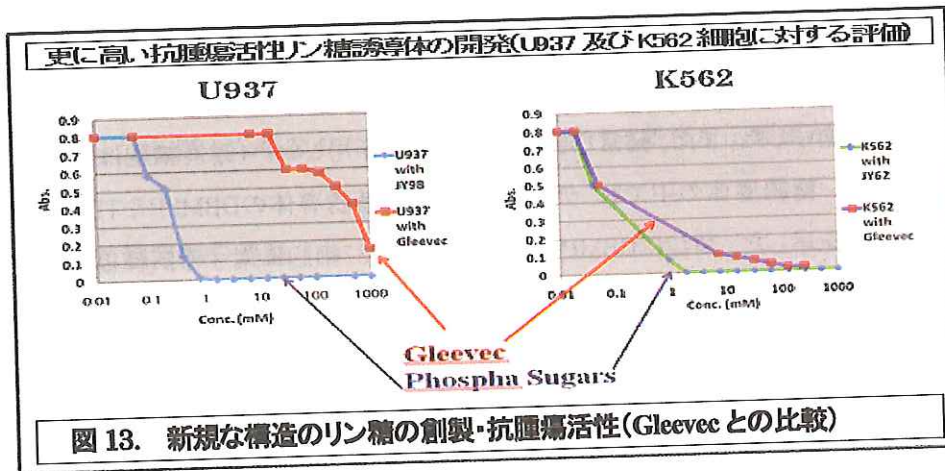


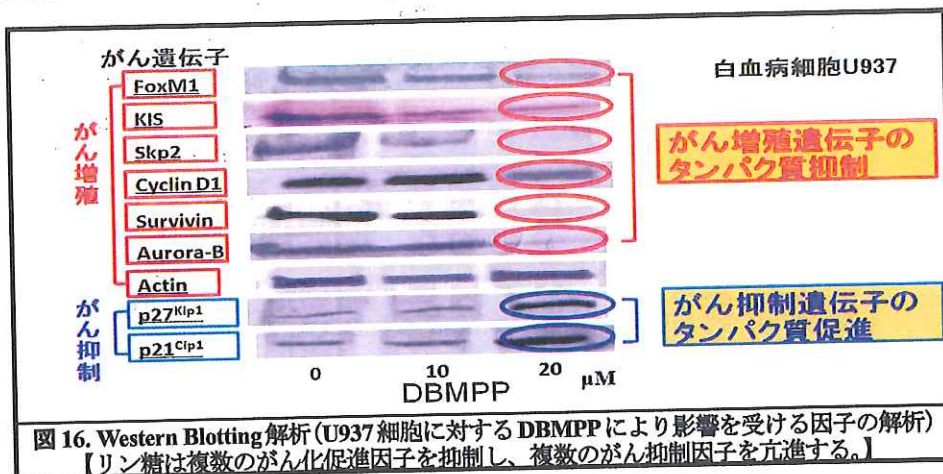
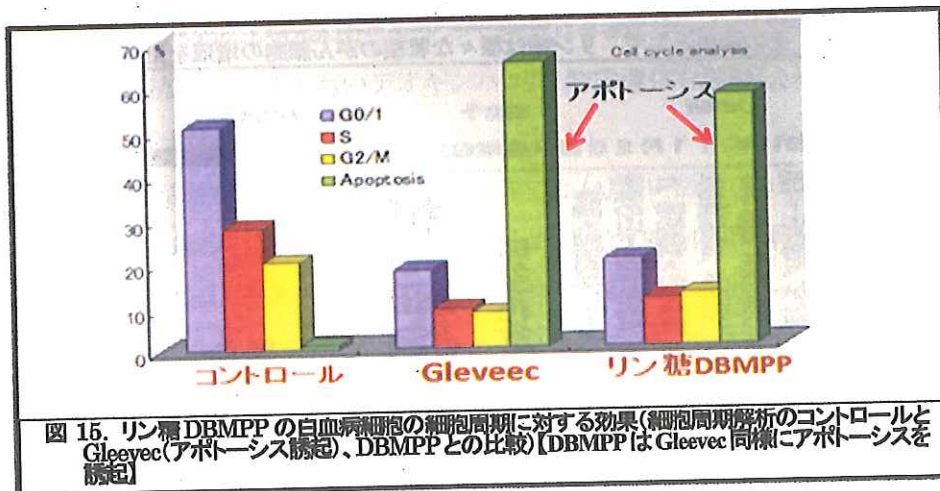
図13. 新規な構造のリン糖の創製・抗腫瘍活性(Gleevecとの比較)



図14. 圓形がん(胃がん細胞: NKH-45)に対するリン糖の抗腫瘍活性評価

て細胞死が認められ、リン糖は(d)がん細胞に対して特異的・選択的に作用する特徴を持つことが示された。

「リン糖」の白血病細胞に対する抗腫瘍活性は、細胞周期解析の結果、Gleevecと同様に(e)アポトーシスを誘起する作用機序(図15)²⁶⁾であり、Western Blotting解析の結果、リン糖類が、(f)複数のがん化促進因子の発現を抑制し、複数のがん抑制因子の発現を促進することを明らかにした(図16)²⁷⁾。また、リン糖TBMPPは、様々ながん細胞の細胞周期に共通なタンパクのCdc25Bの発現を抑制することが最近の研究により明らかとなった(図17及び新聞記事(図18)²⁸⁾。それ故、「リン糖抗腫瘍剤」は、従来にないタイプの新規な「多標的型分子標的抗腫瘍剤」となり得る。



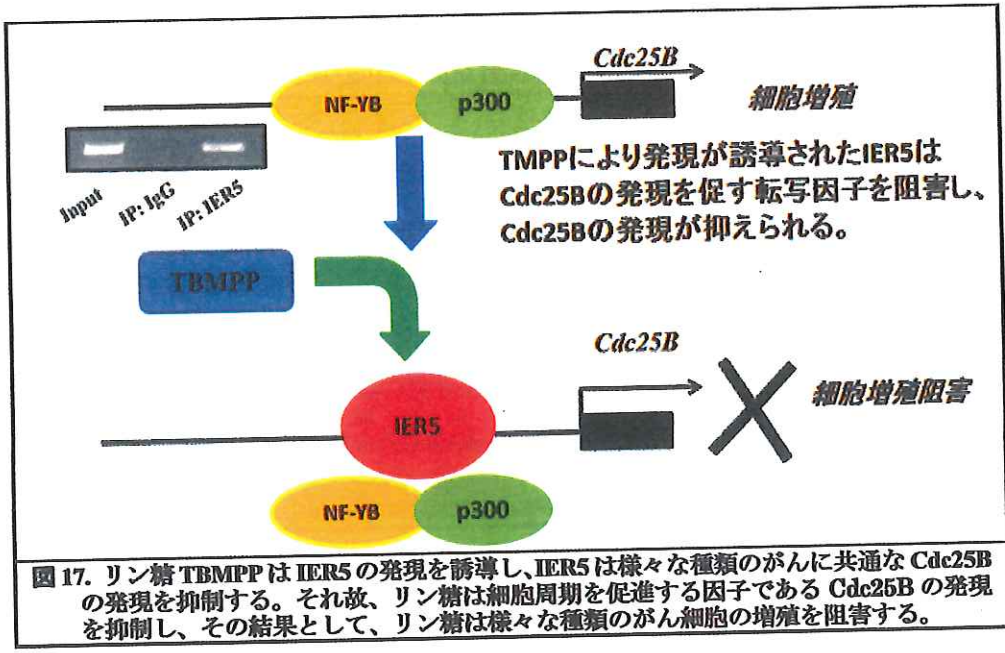


図 17. リン糖 TBMPP は IER5 の発現を誘導し、IER5 は様々な種類のがんに共通な Cdc25B の発現を抑制する。それ故、リン糖は細胞周期を促進する因子である Cdc25B の発現を抑制し、その結果として、リン糖は様々な種類のがん細胞の増殖を阻害する。

平成 23 年 (2011 年) 11 月 25 日 (金曜日) 8 (30)

がん細胞増殖を抑制

低分子化合物メカニズム解明

大 大 大 大
静 岡 医 大

静岡大創薬学技術大バク菌の発現を抑制するがん細胞の増殖を抑制する。がんの山下高野特任教授が、作用があることを解明し、そのことが増殖を有効と認め、中村樹太郎と発表した。白血球を減少させるがん治療薬「タキサン」を食後 2 週間後、がん細胞の増殖を抑制する。その結果として、リン糖は様々な種類のがん細胞の増殖を阻害する。

がん細胞の増殖を抑制する。その結果として、リン糖は様々な種類のがん細胞の増殖を阻害する。

がん細胞の増殖を抑制する。その結果として、リン糖は様々な種類のがん細胞の増殖を阻害する。

図 18. リン糖抗腫瘍剤に関する静岡新聞記事 (リン糖は、がんの細胞周期に共通な Cdc25B の発現を抑制し、様々な種類のがんを単剤で治療可能とする抗腫瘍剤として期待される) (この他に、中日新聞、読売新聞、日経新聞)

従って、現在のがん治療は「多剤併用」治療を基本とするが、「リン糖抗腫瘍剤」によれば、「単剤」により、変異がん、耐性がん、後期がんなどの現在の医療技術では治療が難しいがんに対する治療に効果を発揮できる。また、患者のQOLの飛躍的改善を図ることが出来る。更に、治療費の軽減等も達成できる画期的な「分子標的療法薬剤」となり得る。現在、「リン糖誘導体」のリポソーム、ツイン、シクロデキストリン等による水溶化を達成して、*in vivo* 評価を行っている。今後、トランスレーショナルリサーチを経て、企業との連携による実用化を行いたい。(リン糖関係特許16件)

(2)-4 研究課題(2)のまとめ

我々は、新たに合成した低分子化合物の「リン糖」誘導体に、白血病細胞を含めたがん細胞の増殖を抑制する効果があることを発見して報告してきた。本研究において、構造-活性相関を基にして、抗腫瘍活性の高いデオキシハロリン糖誘導体を創製し、それらの抗腫瘍活性及び作用機序を検討した。

リン糖の抗腫瘍活性は、Gleevecとの比較において、(a)高い活性、(b)広いスペクトルを示し、(c)がん細胞に対して選択的・特異的に作用した。また、細胞周期解析により、リン糖は、(d) Gleevecと同様ながん細胞に対してアポトーシスを誘起することによってがん細胞を死滅させる。Western Blotting解析により、リン糖は、(e)複数のがん化促進因子及び複数のがん抑制因子に影響を与え、がん化促進因子の発現を抑制し、がん化抑制因子の発現を亢進する「多標的型分子標的抗腫瘍剤」としての性格を示した。更に、最近、リン糖のTBMPPがどのようにして白血病細胞の増殖を阻害しているのかを明らかにした。

細胞の増殖は細胞周期といわれる染色体の複製、分配により、細胞が分裂を繰り返すことによりもたらされる。がん細胞はこの細胞周期の速度が速く、細胞の複製が無秩序に起こっている。がん細胞の増殖を抑え込むためには、がん細胞の細胞周期を制御することが有効であり、治療に結びつく。合成した「リン糖」誘導体には細胞周期を止め、白血病細胞の増殖を抑えることが明らかになった。その作用機序として、細胞周期の速度を促進させるCdc25Bという様々な種類のがん細胞に共通の蛋白質の発現を直接抑え込むことができることが明らかとなった。つまり、(f)合成されたリン糖誘導体は、この蛋白質の発現を抑え込むことにより、様々な種類の白血病細胞の増殖を止めることができることが示され、Cdc25Bを標的とする分

子標的治療薬としての可能性を持つことが明らかになった。また、これまでの分子標的治療薬は標的のスペクトルが狭いために、がんの種類毎に異なった抗がん剤を臨床使用しているが、様々な種類のがん細胞の細胞周期に共通のCdc25Bを標的とするこの薬剤は、様々な種類のがんに共通して用いることができる抗がん剤の開発につながる可能性があり、これからのがん治療に有効な化合物であると考えられる極めて画期的な新たな研究成果を上げることが出来た。

研究課題3及び研究課題4の研究成果については、非開示と致します。

【まとめ】

がんの早期発見・早期治療及び患者のQOLを改善する為の医用材料として、糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体MRI造影剤及び新規な構造の分子標的抗腫瘍剤としてリン糖誘導体を創製した。糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体を加水分解して調製したDEN-OHは、優れた血管内貯留性を示し、従来技術の10倍程度の高い造影効果、鮮明な血管造影、肝細胞がんの描出、腹腔内出血等に優れた特徴を備えたMRI造影剤として開発され得る。また、DBMPPあるいはTBMPP等のリン糖誘導体は、白血病細胞などの血液がんのみでなく固形がんに対しても高い抗腫瘍活性、広いスペクトルを示し、複数の標的を持ち、がん細胞に選択的・特異的にアポトーシスを誘起する。TBMPPはがん細胞の細胞周期に共通なCdc25Bの発現を抑制するので、様々な種類のがん細胞に有効な抗腫瘍剤となり得る。

謝 辞

本研究は財団法人杉山産業化学研究所の平成22年度の研究助成を受けて行われた。また、MRI造影剤及び抗腫瘍剤の創製並びに*in vitro* 及び*in vivo* 評価は、国立大学法人静岡大学内の共同研究グループ及び国立大学法人浜松医科大学の共同研究グループとの共同研究によって行われた。本研究助成及び共同研究体制に対しまして深謝致します。また、共同研究課題(4)に参画して頂きましたJ-オイルミルズ社の原勇介氏始め関係の皆様へ感謝致します。

参 考 文 献

- 1) R. A. Wallace, J. P. Harr, Jr., D. B. Miller, S. R. Woulfe, J. A. Polta, K. P. Galen, M. R. Hynes, and K. Adyanli, *Magnetic Resonance Medicine*, **40** (5), 733-739 (1998).
- 2) R. B. Lauffer, A. C. Vincent, and T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.*, **109** (7), 2216-2218 (1987).
- 3) N. Tanimoto, *Innervision*, **12**, 62-67 (1997).
- 4) T. Grobner, "A specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?", *Nephrol. Dial. Transplant.*, **21**, 1104-1108 (2006).
- 5) A. Khurana, V. M. Runge, M. Narayanan, J. F. Greene, Jr., and A. E. Nickel, "A review of 6 cases temporally related to Gadodiamide injection (Omniscan)", *Invest. Radiol.*, **42**, 139-145 (2007).
- 6) P. Marckmann, L. Skov, K. Rossen, A. Dupont, M. B. Damholt, J. G. Heaf, and H. S. Thomsen, "Suspected causative role of Gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging", *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17**, 2359-2362 (2006).
- 7) J. G. Pryor, G. Poggioli, N. Galaria, A. Gust, J. Robison, F. Samie, N. M. Hanjani, and G. A. Scott, "A clinicopathologic study of six cases", *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2007, Apr 3 [published online].
- 8) A. Deo, M. Fogel, and E. Cowper, "A population study examining the relationship of disease development to Gadolinium exposure", *Clin. J. Am. Nephrol.*, **2**, 264-267 (2007).
- 9) A. S. Boyd, J. A. Zic, and J. L. Abraham, "Gadolinium deposition in nephrogenic fibrosing dermopathy", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **56**, 27-30 (2007).
- 10) W. A. High, R. A. Ayers, J. Chandler, G. Zito, and S. E. Cowper, "Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **56**, 21-26 (2007).
- 11) C. F. Joseph, H. Regeling, B. Zwanenburg, and G. J. F. Chittenden, *Tetrahedron*, **58**, 6907-6911 (2002).

- 12) H. Kobayashi, S. Kawamoto, T. Saga, N. Sato, T. Ishimori, J. Konishi, K. Ono, K. Togashi, and M. W. Brechbiel, *Bioconjug. Chem.*, **12**, 587-593 (2001).
- 13) T. S. Desser, D. L. Rubin, H. H. Muller, F. Qing, S. Khodor, G. Zanazzi, S. W. Young, D. L. Ladd, J. A. Welloms, K. E. Kellar, and J. L. Toner, *J. Magn. Reson. Imaging*, **4**, 467-472 (1994).
- 14) D. M. J. Doble, M. Botta, J. Wang, S. Aime, A. Barge, and K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10758-10759 (2001).
- 15) S. Langereis, Q. G. Lussanet, M. H. P. Genderen, W. H. Backes, and E. W. Meijer, *Macromolecules*, **37**, 3084-3091 (2004).
- 16) V. J. Venditto, C. Aida, and M. W. Brechbiel, *Mol. Pharmacol.*, **2**, 302-311 (2005).
- 17) R. Arebizak, M. Schaffer, and E. Dellacherie, *Bioconjug. Chem.*, **8**, 605-610 (1997).
- 18) C. Corot, M. Schaffer, S. Beaute, P. Bourrinet, S. Zehaf, V. Benize, M. Sabatou, and D. Meyer, *Physical. Acta Radiol.*, **38** (Supplement 412), 605-610 (1997).
- 19) M. V. Knopp, S. O. Schoenberg, C. Rehm, F. Floemer, H. von Tengg-Kobligk, M. Bock, and H. R. Hentrich, *Investigative Radiology*. **37** (12), 706-715 (2002).
- 20) P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, and R.B. Lauffer, *Chem. Rev.* **99**, 2293-2352 (1999).
- 21) M. Yamashita, M. Uchimura, A. Iida, L. Parkanayi, and J. Clardy, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 569-70 (1988).
- 22) M. Yamashita, A. Yabui, T. Oshikawa, T. Hanaya, and H. Yamamoto, *Heterocycles*, **38**, 1449-52 (1994).
- 23) M. Yamashita, A. Yabui, K. Suzuki, Y. Kato, M. Uchimura, A. Iida, H. Mizuno, K. Ikai, T. Oshikawa, L. Parkanayi, and J. Clardy, *J. Carbohydr. Chem.*, **16**, 499-519 (1997).
- 24) G. Yu, M. Yamashita, K. Aoshima, M. Kobayashi, T. Kato, N. Kamikage, M. Takahashi, H. Takayanagi, T. Oshikawa, S. Laurent, C. Burtea, L. V. Elst, R. N. Muller, Y. Takehara, and H. Sakahara, *Heterocyclic Commun.*, **13**(2-3), 101-108 (2007).

- 25) G. Yu, M. Yamashita, K. Aoshima, M. Takahashi, T. Oshikawa, H. Takayanagi, S. Laurent, C. Burtea, L. V. Vander, and R. N. Muller, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **17**(8), 2246-2249 (2007).
- 26) S. Ito, M. Yamashita, T. Niimi, M. Fujie, K. R. Valluru, H. Totsuka, B. Haritha, M. Kasthuraiah, S. Nakamura, K. Asai, T. Suyama, J. Yamashita, Y. Iguchi, G. Yu, and T. Oshikawa, *Heterocyclic Commun.*, **15**(1), 23-30 (2009).
- 27) S. Nakamura, M. Yamashita, D. Yokota, I. Hirano, T. Ono, M. Fujie, K. Shibata, T. Niimi, T. Suyama, K. Maddali, K. Asai, J. Yamashita, Y. Iguchi, K. Ohnishi, *Invest New Drugs*, **28**, 381.391 (2010).
- 28) S. Nakamura, Y. Nagata, L. Tan, T. Takemura, K. Shibata, M. Fujie, S. Fujisawa, Y. Tanaka, M. Toda, R. Makita, K. Tsunekawa, M. Yamada, M. Yamaoka, J. Yamashita, K. Ohnishi, and M. Yamashita, *PLoS NOE*, **6**(11),| e28011 (2011) [published online].