

<特集「腫瘍の生化学と分子生物学：最新の理解」>

## エピジェネティクスを標的とした新規抗腫瘍薬剤の開発

鈴木 孝 禎\*

京都府立医科大学大学院医学研究科医薬品化学

### Development of Epigenetic Modulators for Cancer Therapy

Takayoshi Suzuki

*Department of Chemistry,*

*Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

#### 抄 録

DNAのメチル化やヒストンのメチル化、アセチル化などの翻訳後修飾は、DNAの塩基配列に依存せず遺伝子の発現を制御するエピジェネティクス機構の一部であることが知られている。このエピジェネティクス機構に異常が生じることにより、がんが発症することも報告されている。したがって、がん細胞におけるエピジェネティクスの異常な状態を正常な状態に変換することが出来れば、エピジェネティクスが関与するがんは治療できると考えられる。このような考えを基に、エピジェネティクスを化学的に制御する化合物を見出し、それらを抗がん剤として応用しようという試みが企業、アカデミアを問わず、世界中で盛んに行われている。近年特に、DNAメチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素、プロモドメインタンパク質、ヒストン脱メチル化酵素、ヒストンメチル化酵素を分子標的とした抗腫瘍薬剤の開発が進んでいる。

キーワード：エピジェネティクス, DNA, ヒストン, アセチル化, メチル化。

#### Abstract

Epigenetics deals with mechanisms of regulation of gene expression that do not involve changes in the underlying DNA sequence. Epigenetic mechanisms include DNA methylation, histone acetylation and histone methylation. In addition, disruption of the balance of epigenetic networks is known to cause cancer. Therefore, epigenetic modulators have emerged as novel anticancer agent candidates. In this review, development of epigenetic modulators are presented focusing especially on DNA methyltransferase inhibitors, histone deacetylase inhibitors, bromodomain inhibitors, histone demethylase inhibitors and histone methyltransferase inhibitors.

**Key Words:** Epigenetics, DNA, Histone, Acetylation, Methylation.

---

平成27年10月9日受付

\*連絡先 鈴木孝禎 〒606-0823 京都市左京区下鴨半木町1-5  
suzukit@koto.kpu-m.ac.jp

## はじめに

DNAの塩基配列の変化を伴わず、染色体の変化によって遺伝子発現を制御するシステムは、エピジェネティクスと呼ばれる<sup>1)</sup>。上述の染色体の変化とは、ヌクレオソーム中のDNAのメチル化、ヒストンのアセチル化やメチル化などの化学修飾のことを指す。これらのエピジェネティクスによる遺伝子発現調節において重要な役割を果たしているのは、アセチル基、メチル基等の化学修飾を導入する「書き込み酵素」、それらを取り除く「消去酵素」、および、アセチル基やメチル基を認識し相互作用する「読み取りタンパク質」である(図1)。近年のエピジェネティクス研究により、エピジェネティクスの異常は、がんの発症に関与することも分かってきた。したがって、がん細胞におけるエピジェネティクスの異常な状態を正常な状態に変換することが出来れば、がん治療が可能になると考えられる。このような考えを基に、エピジェネティクスを化学的に制御する化合物を見出し、それらを治療薬として応用しようという試みが企業、アカデミアを問わず、世界中で盛んに行

われている。本稿では、近年特に注目されているDNAメチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素、プロモドメインタンパク質、ヒストンメチル化酵素、ヒストン脱メチル化酵素に焦点を当て、それらを分子標的とした抗腫瘍薬剤の創製研究について概説する。

## DNAメチル化酵素阻害剤

DNAは、「書き込み酵素」であるDNAメチル化酵素(DNMT)によってメチル化される。メチル化されたDNAは、非メチル化状態で結合できる転写因子が結合できなくなるか、あるいは、メチル化DNA結合ドメイン(MBD)を持つ「読み取りタンパク質」が転写抑制因子をリクルートすることにより、メチル化DNA上の遺伝子転写が抑制される。また、DNAの脱メチル化機構に関しては、近年、ten-eleven translocation (TET) タンパク質がメチル化シトシンのヒドロキシル化・ホルミル化・カルボキシル化を触媒することがわかり、メチル基の酸化を経た能動的脱メチル化機構が存在すると推測されている(図1)。

一部のがんでは、プロモーター領域のCpGア

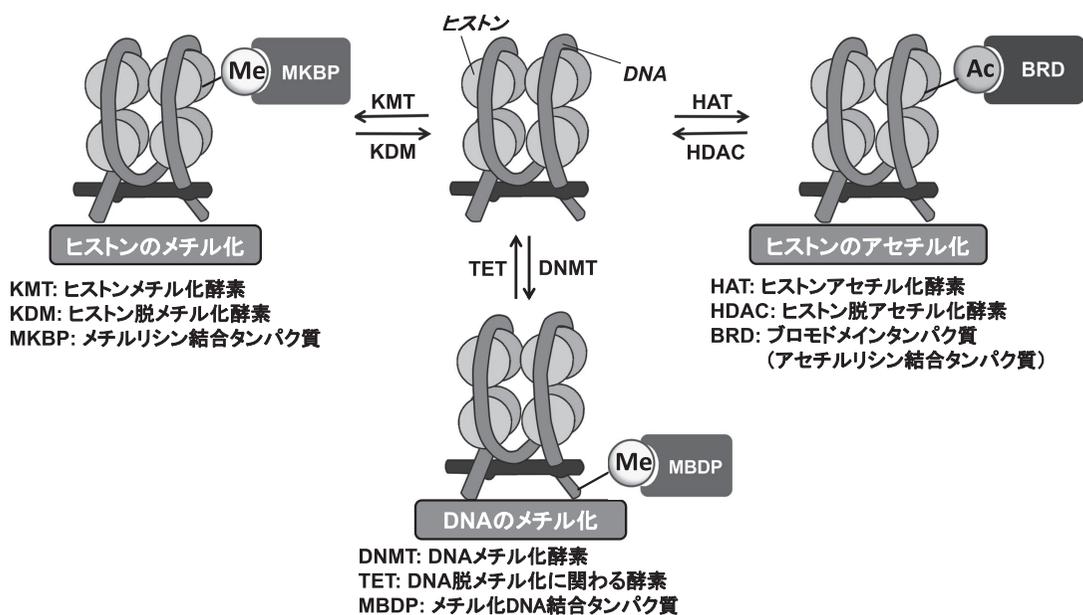


図1 DNAのメチル化とヒストンのアセチル化、メチル化に関わるエピジェネティクス

イランド (CGI) のメチル化によるがん抑制遺伝子発現抑制が高頻度に認められている。このことはがん抑制遺伝子 CGI のメチル化ががんに関与することを示している。そのため、DNMT を阻害することでがん抑制遺伝子を再活性化し、がんを縮小できると考えられている。すでに、DNMT 阻害剤のアザシチジンとデシタピン (図 2) が、骨髄異形成症候群治療薬として臨床で用いられている<sup>2)</sup>。さらに、現在、固形腫瘍において、アザシチジンあるいはデシタピンと他の抗がん剤の多剤併用療法の臨床試験が行われている<sup>3)</sup>。また、高血圧治療に用いられていた医薬品であるヒドララジン (図 2) が、DNMT を阻害する作用ももつことが分かり、現在、卵巣がん患者、脳腫瘍患者に対する第 III 相試験が行われているところである<sup>4)</sup>。

### ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

「消去酵素」であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、ヒストンの N 末端領域のアセチル化されたりシン残基を脱アセチル化する酵素であり (図 1)、エピジェネティックな遺伝子発現に関与する酵素である<sup>5)</sup>。HDAC には、11 種の亜鉛イオン依存性 HDAC と 7 種のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD<sup>+</sup>) 依存性 HDAC が知られているが、特に亜鉛イオン依存性 HDAC 阻害剤が、がん抑制遺伝子の転写を活性化し、抗がん作用を示すため、抗がん剤として期待されている。

HDAC 阻害剤であるボリノスタットとロミデプシン (図 3) は、皮膚 T 細胞リンパ腫 (CTCL) 患者に対し、高い抗腫瘍活性を示し、それぞれ、

2006 年、2009 年に FDA に CTCL 治療薬として認可された。また、最近、ロミデプシンとボリノスタット (図 3) が末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL) 治療薬として、パノビノスタット (図 3) も多発性骨髄腫治療薬として認可された。さらに現在、エンチノスタット (ホジキンリンパ腫、肺がん、乳がん: 第 II 相試験)<sup>6)</sup> (図 3) など数多くの HDAC 阻害剤の抗がん剤としての臨床試験が行われている。

亜鉛イオン依存性 HDAC (HDAC1~11) アイソザイムとがんの関連も数多く報告されている<sup>7)</sup>。したがって、アイソザイム選択的な HDAC 阻害剤は、より副作用の少ない抗がん剤となることが期待されている。最近、筆者らは、HDAC3 選択的阻害剤 T247<sup>8)</sup>、HDAC8 選択的阻害剤 NCC149<sup>9)10)</sup> を見出し、T247 が大腸がんや前立腺がんの有効であること、NCC149 およびその誘導体が T 細胞性リンパ腫や神経芽腫に有効であることを示した。

### プロモドメインタンパク質阻害剤

近年まで、エピジェネティクス情報の「書き込み酵素」(DNMT, HAT, KMT) と「消去酵素」(KDM, HDAC) がエピジェネティクス創薬の分子標的として注目されていたが (図 1)、エピジェネティクス情報の「読み取りタンパク質」であるヒストン結合モジュールを標的とした化合物は知られていなかった。しかし、2010 年、BRD に拮抗的に結合する阻害薬として JQ1<sup>11)</sup> と I-BET762<sup>12)</sup> が報告された (図 4)。JQ1 は、BRD の中でも BRD4 と BRDT を選択的に阻害する。BRD4 は、染色体異常によって NUT タンパク質

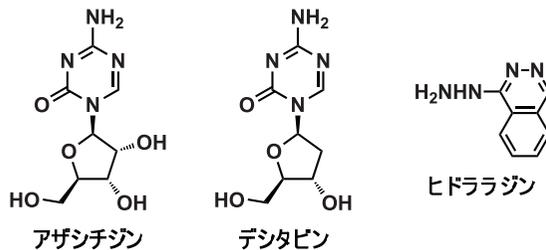


図 2 DNMT 阻害剤

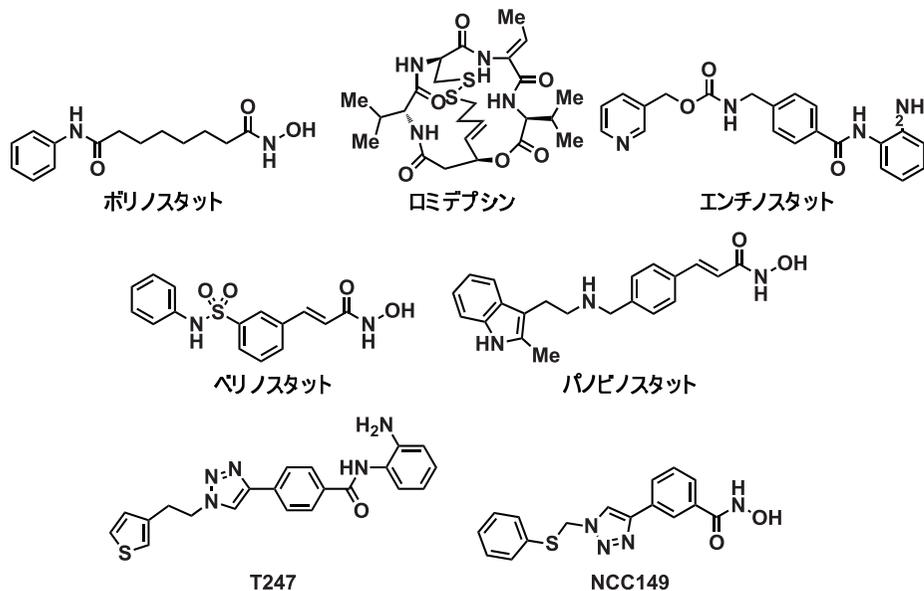


図3 HDAC 阻害剤

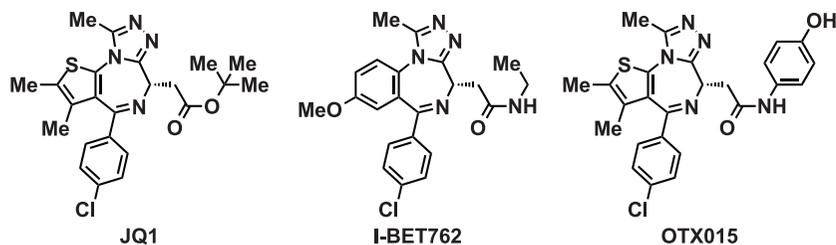


図4 BRD 阻害剤

と融合し、致死性の高い NUT midline carcinoma (NMC) を誘発する。JQ1 は、患者由来の異種移植片モデルを用いた実験で、NMC 腫瘍の形成を抑制した。この結果から、BRD4 阻害薬の抗 NMC 薬としての可能性が示された。また、I-BET762 をヒト混合系統白血病 (MLL) 細胞に処理すると、細胞周期を停止し、アポトーシスを誘導する。したがって、I-BET762 は白血病治療薬としても期待されている。現在、NMC や他のがん種に対する抗がん剤として、I-BET762 の第 I 相試験が行われているところである<sup>13)</sup>。I-BET762 以外にも、BRD 阻害剤 OTX015 (図 4) が、血液系がん治療薬として、臨床開発に入っている。

### ヒストン脱メチル化酵素阻害剤

「消去酵素」であるヒストン脱メチル化酵素 (KDM) は、メチル化されたヒストンリシン残基を脱メチル化する反応を触媒する酵素で (図 1)、エピジェネティックに遺伝子の発現を制御している<sup>14)15)</sup>。KDM は、フラビン依存性の脱メチル化酵素 (LSD1) と Jumonji C-domain を含む脱メチル化酵素 (JHDM) の二つのファミリーに分類することが出来る。LSD1 および JHDM のアイソザイムのいくつかは、がんの発症、増殖に関与することも報告されており、次世代エピジェネティック抗がん剤として期待されている<sup>16)17)</sup>。

LSD1 は、ヒストン H3 の 4 番目のリシン残基

のモノあるいはジメチル体を脱メチル化するフラビン依存性の酵素であり、エピジェネティックに遺伝子発現を制御している<sup>15)</sup>。LSD1は前立腺がん細胞、乳がん細胞、急性骨髄性白血病細胞など様々ながん細胞の増殖<sup>16)17)</sup>に関与することから、LSD1は、抗がん剤の新しい分子標的として期待されている。LSD1は、モノアミン酸化酵素(MAO)と同じくフラビン依存性の酸化酵素であることから、MAO阻害剤がLSD1を阻害する可能性が示された。さまざまなMAO阻害剤のスクリーニングが行われた結果、トラニルシプロミン(図5)が比較的強いLSD1阻害活性を示すことが分かったが、その活性、選択性の低さが問題とされていた。筆者らは、トラニルシプロミンの構造を基にしたドラッグデザインにより、現在までに、低分子LSD1阻害剤NCL1<sup>18)</sup>、NCD38<sup>19)</sup>などを見出した。これらのLSD1阻害剤は、LSD1を強く阻害する一方、MAOはほとんど阻害しない化合物であり、*in vivo*でも抗がん効果を示すことから<sup>20)</sup>、LSD1阻害剤の臨床応用が期待されている。

JHDMのアイソザイムのいくつかはがんに関与することが報告されている。近年、ケミカルライブラリースクリーニングとその後の構造展開から、H3K27のトリメチル体とジメチル体の

脱メチル化を行うKDM6を阻害するGSK-J1(図5)が報告された<sup>21)</sup>。GSK-J1のエチルエステルプロドラッグ体は、急性リンパ性白血病に有効であることが示されており<sup>22)</sup>、KDM6選択的阻害剤は、抗白血病薬として期待されている。さらに、NCDM-32<sup>23)</sup>やNCDM-64<sup>24)</sup>、NCDM-82<sup>25)</sup>といったKDM4、KDM2/7、KDM5に対する阻害薬も、筆者らにより報告されている(図5)。KDM4阻害薬であるNCDM-32はKDM4を高発現する乳がん細胞の増殖を阻害する<sup>26)</sup>。一方、KDM2/7阻害薬であるNCDM-64は細胞周期調節因子E2F1の遺伝子発現を抑えることで、G1期で細胞周期を停止させ、子宮頸がん細胞と食道がん細胞の増殖を阻害する。これらの研究から、KDM4阻害薬やKDM2/7阻害薬の抗がん剤としての応用が期待されている。

### ヒストンメチル化酵素阻害剤

「書き込み酵素」であるヒストンリシンメチル化酵素(KMT)は、補酵素のS-アデノシルメチオニン(SAM)からリシン側鎖のアミノ基にメチル基を転移させる酵素である(図1)。これまでに数多くのKMTが報告されているが、その中で、抗がん剤の標的として注目を浴びているものにDOT1LとEZH2がある。

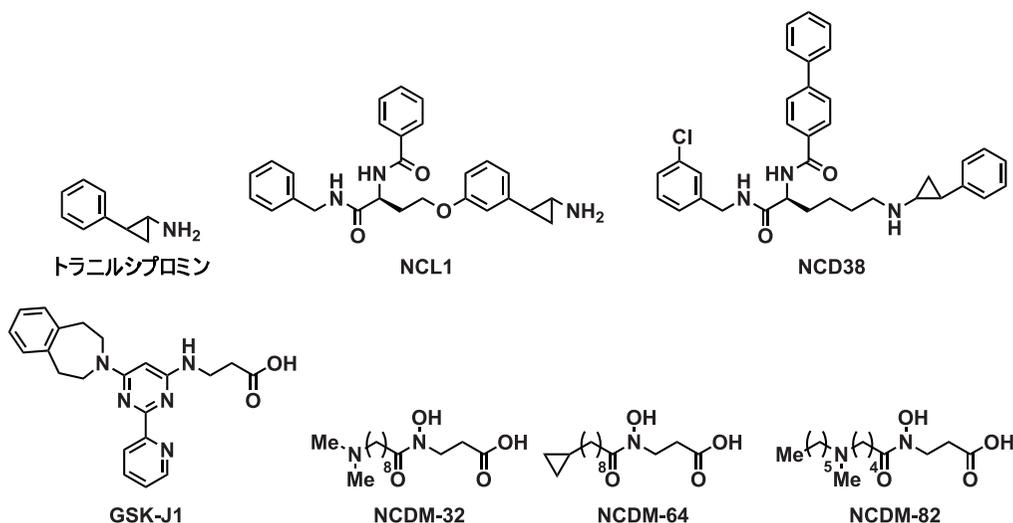


図5 KDM阻害剤



## 文 献

- 1) Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286: 481-486.
- 2) Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463.
- 3) Yang X, Lay F, Han H, Jones PA. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 536-546.
- 4) Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Cetina L, Revilla-Vazquez A, Taja-Chayeb L, Chavez-Blanco A, Angeles E, Cabrera G, Sandoval K, Trejo-Becerril C, Chanona-Vilchis J, Duenas-González A. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer* 2005; 5: 44.
- 5) Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavasiliou AG. Focus on acetylation: the role of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy and beyond. *Expert Opin Investig Drugs* 2007; 16: 569-571.
- 6) Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* 2010; 3: 5.
- 7) Itoh Y, Suzuki T, Miyata N. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 529-544.
- 8) Suzuki T, Kasuya Y, Itoh Y, Ota Y, Zhan P, Asamitsu K, Nakagawa H, Okamoto T, Miyata N. Identification of highly selective and potent histone deacetylase 3 inhibitors using click chemistry-based combinatorial fragment assembly. *PLoS ONE* 2013; 8: e68669.
- 9) Suzuki T, Ota Y, Ri M, Bando M, Gotoh A, Itoh Y, Tsumoto H, Tatum PR, Mizukami T, Nakagawa H, Iida S, Ueda R, Shirahige K, Miyata N. Rapid discovery of highly potent and selective inhibitors of histone deacetylase 8 using click chemistry to generate candidate libraries. *J Med Chem* 2012; 55: 9562-9575.
- 10) Suzuki T, Muto N, Bando M, Itoh Y, Masaki A, Ri M, Ota Y, Nakagawa H, Iida S, Shirahige K, Miyata N. Design, synthesis, and biological activity of NCC149 derivatives as histone deacetylase 8-selective inhibitors. *Chem Med Chem* 2014; 9:657-664.
- 11) Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I, Philpott M, Munro S, McKeown MR, Wang Y, Christie AL, West N, Cameron MJ, Schwartz B, Heightman TD, La Thangue N, French CA, Wiest O, Kung AL, Knapp S, Bradner JE. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; 468: 1067-1073.
- 12) Nicodeme E, Jeffrey KL, Schaefer U, Beinke S, Dwell S, Chung CW, Chandwani R, Marazzi I, Wilson P, Coste H, White J, Kirilovsky J, Rice CM, Lora JM, Prinjha RK, Lee K, Tarakhovskiy A. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 2010; 468: 1119-1123.
- 13) Mirguet O, Gosmini R, Toum J, Clement CA, Barnathan M, Brusq JM, Mordaunt JE, Grimes RM, Crowe M, Pineau O, Ajakane M, Daugan A, Jeffrey P, Cutler L, Haynes AC, Smithers NN, Chung CW, Bamborough P, Uings IJ, Lewis A, Witherington J, Parr N, Prinjha RK, Nicodème E. Discovery of epigenetic regulator I-BET762: lead optimization to afford a clinical candidate inhibitor of the BET bromodomains. *J Med Chem* 2013; 56: 7501-7515.
- 14) Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. JmxC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 715-727.
- 15) Shi Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 829-833.
- 16) Suzuki T, Miyata N. Lysine demethylases inhibitors. *J Med Chem* 2011; 54: 8236-8250.
- 17) Itoh Y, Suzuki T, Miyata N. Small-molecular modulators of cancer-associated epigenetic mechanisms. *Mol Biosyst* 2013; 9: 873-896.
- 18) Ueda R, Suzuki T, Mino K, Tsumoto H, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N. Identification of cell-active lysine specific demethylase 1-selective inhibitors. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 17536-17537.
- 19) Ogasawara D, Itoh Y, Tsumoto H, Kakizawa T, Mino K, Fukuhara K, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N, Suzuki T. Lysine-specific demethylase 1-selective inactivators: protein-targeted drug delivery mechanism. *Angew Chem Int Ed* 2013; 52: 8620-8624.
- 20) Etani T, Suzuki T, Naiki T, Naiki-Ito A, Ando R, Iida K, Kawai N, Tozawa K, Miyata N, Kohri K, Takahashi S. NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase

- lase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse effect. *Oncotarget* 2015; 6: 2865-2878.
- 21) Kruidenier L, Chung CW, Cheng Z, Liddle J, Che K, Joberty G, Bantscheff M, Bountra C, Bridges A, Diallo H, Eberhard D, Hutchinson S, Jones E, Katso R, Leveridge M, Mander PK, Mosley J, Ramirez-Molina C, Rowland P, Schofield CJ, Sheppard RJ, Smith JE, Swales C, Tanner R, Thomas P, Tumber A, Drewes G, Oppermann U, Patel DJ, Lee K, Wilson DM. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* 2012; 488: 404-408.
- 22) Ntziachristos P, Tsirigos A, Welstead GG, Trimarchi T, Bakogianni S, Xu L, Loizou E, Holmfeldt L, Strikoudis A, King B, Mullenders J, Becksfors J, Nedjic J, Paietta E, Tallman MS, Rowe JM, Tonon G, Satoh T, Kruidenier L, Prinjha R, Akira S, Van Vlierberghe P, Ferrando AA, Jaenisch R, Mullighan CG, Aifantis I. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2014; 514: 513-517.
- 23) Hamada S, Suzuki T, Mino K, Koseki K, Oehme F, Flamme I, Ozasa H, Itoh Y, Ogasawara D, Komaarashi H, Kato A, Tsumoto H, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N. Design, synthesis, enzyme-inhibitory activity, and effect on human cancer cells of a novel series of jumonji domain-containing protein 2 histone demethylase inhibitors. *J Med Chem* 2010; 53: 5629-5638.
- 24) Suzuki T, Ozasa H, Itoh Y, Zhan P, Sawada H, Mino K, Walport L, Ohkubo R, Kawamura A, Yonezawa M, Tsukada Y, Tumber A, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Schofield CJ, Miyata N. Identification of the KDM2/7 histone lysine demethylase subfamily inhibitor and its antiproliferative activity. *J Med Chem* 2013; 56: 7222-7231.
- 25) Itoh Y, Sawada H, Suzuki M, Tojo T, Sasaki R, Hasegawa M, Mizukami T, Suzuki T. Identification of jumonji AT-rich interactive domain 1A inhibitors and their effect on cancer cells. *ACS Med Chem Lett* 2015; 6: 665-670.
- 26) Ye Q, Holowatyj A, Wu J, Liu H, Zhang L, Suzuki T, Yang ZQ. Genetic alterations of KDM4 subfamily and therapeutic effect of novel demethylase inhibitor in breast cancer. *Am J Cancer Res* 2015; 5: 1519-1530.
- 27) Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Majer CR, Sneeringer CJ, Song J, Johnston LD, Scott MP, Smith JJ, Xiao Y, Jin L, Kuntz KW, Chesworth R, Moyer MP, Bernt KM, Tseng JC, Kung AL, Armstrong SA, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM. Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor. *Cancer Cell* 2011; 20: 53-65.
- 28) Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, Sacks JD, Raimondi A, Majer CR, Song J, Scott MP, Jin L, Smith JJ, Olhava EJ, Chesworth R, Moyer MP, Richon VM, Copeland RA, Keilhack H, Pollock RM, Kuntz KW. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 890-896.
- 29) McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A 3rd, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 2012; 492: 108-112.

## 著者プロフィール



## 鈴木 孝禎 Takayoshi Suzuki

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科医薬品化学・教授

略歴：1995年3月 東京大学薬学部薬学科卒業  
1997年3月 東京大学大学院薬学系研究科 薬学専攻修士課程修了  
1997年4月 (株)日本たばこ産業 入社  
2003年1月 名古屋市立大学大学院薬学系研究科 助手  
2005年7月 博士(薬学)取得(東京大学大学院薬学系研究科)  
2007年4月 名古屋市立大学大学院薬学系研究科 助教  
2007年4月 米国スクリプス研究所 客員研究員  
2009年4月 名古屋市立大学大学院薬学系研究科 講師  
2009年10月 科学技術振興機構さきがけ 研究者(兼任)  
2011年9月 京都府立医科大学大学院医学研究科 教授  
2014年10月 科学技術振興機構 CREST 研究代表者(兼任)  
現在に至る

専門分野：創薬化学, 有機化学

主な業績：1. Suzuki T, Nagae O, Kato Y, Nakagawa H, Fukuhara K, Miyata N. Phthoinduced nitric oxide release from nitrobenzene derivatives. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 11720-11726.  
2. Asaba T, Suzuki T, Ueda R, Tsumoto H, Nakagawa H, Miyata N. Inhibition of human sirtuins by in situ generation of an acetylated lysine-ADP-ribose conjugate. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 6989-6996.  
3. Ueda R, Suzuki T, Mino K, Tsumoto H, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N. Identification of cell-active lysine specific demethylase 1-selective inhibitors. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 17536-17537.  
4. Suzuki T, Ota Y, Kasuya Y, Mutsuga M, Kawamura Y, Tsumoto H, Nakagawa H, Finn MG, Miyata N. An unexpected example of protein-templated click chemistry. *Angew Chem Int Ed* 2010; 49: 6817-6820.  
5. Ogasawara D, Itoh Y, Tsumoto H, Kakizawa T, Mino K, Fukuhara K, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N, Suzuki T. Lysine-specific demethylase 1-selective inactivators: protein-targeted drug delivery mechanism. *Angew Chem Int Ed* 2013; 52: 8620-8624.