

ハイブリッドリポソームの肺がん細胞への特異的蓄積と制がん効果

行原真美子, 古水雄志, 田上 修, 松下 琢, 松本陽子, 上岡龍一*

Specific Accumulation and Antitumor Effects of Hybrid Liposomes on the Growth of Lung Tumor Cells

Mamiko YUKIHARA, Yuji KOMIZU, Osamu TANOUE, Taku MATSUSHITA, Yoko MATSUMOTO, and Ryuichi UEOKA*
Division of Applied Life Science, Graduate School of Engineering, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan

(Received May 10, 2010; Accepted August 7, 2010)

In general, chemotherapeutic effects were low for non-small cell lung cancer (NSCLC) in the lung tumor. We examined the accumulation and antitumor effects of hybrid liposomes (HL-23) composed of phospholipid (L- α -dimyristoylphosphatidylcholine: DMPC) and PEG surfactant [polyoxyethylene(23)dodecyl ether: C₁₂(EO)₂₃] on NSCLC cells *in vitro*. Accumulation of HL-23 including a fluorescence probe [1-Palmitoyl-2-[12(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine: NBDPC] was observed for NSCLC cells using a confocal laser microscope, but no accumulation of HL-23 in normal lung cells was observed. Furthermore, inhibitory effects of HL-23 on the growth of NSCLC cells were obtained on the basis of a WST-1 assay. It was also clarified that HL-23 induced apoptosis for NSCLC cells on the basis of Annexin-V binding and TUNEL assay. These results suggest that HL-23 could be applied in effective chemotherapies for NSCLC.

Key words—hybrid liposome; non-small cell lung cancer; apoptosis

緒 言

肺がんは、がん患者の上位を占めており、男性では第2位、女性では第3位であり、喫煙との因果関係が明確ながんである。肺がんは、全体の約15%を占める小細胞がん (SCLC) と約85%を占める非小細胞がん (NSCLC) に分けられる。小細胞がんは、細胞増殖が速く、転移し易いがんである。一方、非小細胞がんは、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんに分けられる。¹⁾

非小細胞がんは、抗がん剤が効き難く、病期 (ステージ) が初期であれば、外科的療法 (手術療法) が治療の第一選択とされている。²⁾ 現在、*in vitro* において、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤である Lumiracoxib,³⁾ モノテルペンから抽出される perillyl alcohol,⁴⁾ *Physalis minima* L. のクロロホルム抽出物,⁵⁾ 植物由来の抗がん剤 β -elemene,⁶⁾ パクリタキセルとカルボプラチンの併用⁷⁾ 等による、非

小細胞がんに対する抑制効果が報告されている。また、*in vivo* では、ドキシソルピシン封入りポソームの非小細胞がんモデルマウスに対する制がん効果が認められている。⁸⁾

上岡らが開発したハイブリッドリポソーム (HL)^{9,10)} は、リン脂質などのベシクル分子とミセル界面活性剤を緩衝溶液中で超音波照射することで容易に得られ、調製時に有機溶媒の混入が全くなく、素材、組成比及びイオン強度の選択により膜直径、膜流動性などのコントロールが可能な生体適合性に優れた医用素材である。¹¹⁻¹⁴⁾ HL は、動物を用いた安全性試験により、無毒性であることが明らかとなっている。また、脳腫瘍治療薬のドラッグキャリアーとして用いられ、治療効果が得られている。¹⁵⁾ 一方、HL 自身が *in vitro* 及び *in vivo* において各種がん細胞に対して増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導することを明らかにしている。¹⁶⁻²⁰⁾ さらに、生命倫理委員会の承認後、悪性リンパ腫瘍の患者に対する臨床試験において、高い安全性及び固形リンパ腫瘍の顕著な縮小効果が得られてい

る。²¹⁾ 肺がんにおいては、リン脂質 (DMPC) と PEG 系界面活性剤 [C₁₂(EO)₂₃] からなる HL-23 [90 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃] が、ヒト肺胞上皮がん (A549) 細胞及びヒト肺腺がん (RERF-LC-OK) 細胞に対し高い増殖抑制効果を *in vitro* で示し、カスパーズ及びミトコンドリアを経由したアポトーシス誘導のメカニズムが明らかとなっている。²²⁾

本研究では、肺がんの約 85% を占め、抗がん剤が効き難いと言われている非小細胞がんに焦点を当て、HL-23 及び HL-23 に蛍光脂質 (NBDPC) を組み込んだ HL-23/NBDPC [86 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃/4 mol% NBDPC] のヒト肺がん細胞に対する融合・蓄積、増殖抑制効果及びアポトーシス誘導について検討した。

実験方法

1. 試料 L- α ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) は、市販品 (日油) をそのまま使用した。ポリオキシエチレン (23) ドデシルエーテル [C₁₂(EO)₂₃] は、市販品 (Sigma) を Elworthy らの方法に従い精製したものを使用した。²³⁾ 蛍光プローブの 1-パルミトイル-2-[12-(7-ニトロ-2-1, 3-ベンゾキシアジアゾール-4-イル) アミノ] ドデカノイル]-*sn*-グリセロ-3-ホスフォコリン (NBDPC) は、市販品 (Avanti Polar Lipids) をそのまま使用した。

2. 細胞 ヒト肺胞上皮がん (A549, RIKEN Cell Bank) 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM: invitrogen) に、ヒト肺大細胞がん [H460, American Type Culture Collection (ATCC)] 細胞、ヒト肺腺がん (H23, ATCC) 細胞及びヒト肺扁平上皮がん (H520, ATCC) 細胞は、RPMI-1640 Medium (invitrogen) に、それぞれ 10% ウシ胎児血清 (FBS) 及びペニシリン-ストレプトマイシン液を加えて培養した。一方、ヒト胎児肺二倍体線維芽 (WI-38, ATCC) 細胞は、Modified Eagle Medium (MEM: invitrogen) に 1% 非必須アミノ酸 (NEAA)、1% ビルビン酸、10% FBS 及びペニシリン-ストレプトマイシン液を加えて培養した。正常ヒト肺微小血管内皮 (HMVEC-L, Lonza) 細胞は、EGM[®]-2-MV BulletKit[®] (Lonza) を用いて培養した。正常ヒト肺線維芽 (NHLF, Lonza) 細胞は、FGM[®]-2 BulletKit[®] (Lonza) を用いて培養した。

すべての細胞は、37°C、5% CO₂ の条件で培養した。

3. ハイブリッドリポソーム及び蛍光脂質含有ハイブリッドリポソームの調製 ハイブリッドリポソーム (HL-23) は、90 mol% DMPC と 10 mol% C₁₂(EO)₂₃ をリン酸緩衝液 [PBS (-)] に溶解後、45°C、窒素雰囲気下で、バス型超音波照射器 (VELVO-CLEAR, 300 W) を用いて、試料溶液 (HL-23) 1 ml 当たり 1 min 超音波照射することにより調製した。蛍光脂質含有ハイブリッドリポソーム (HL-23/NBDPC) は、HL-23 と同様に 86 mol% DMPC、10 mol% C₁₂(EO)₂₃ 及び 4 mol% NBDPC を超音波照射して調製した。孔径 0.20 μ m フィルター (ADVANTEC) でろ過滅菌し、試験溶液とした。なお、HL-23 及び HL-23/NBDPC の膜直径 (d_{hy}) は、いずれも、臨床での静脈投与の際に、細網内皮細胞による取り込み・分解を回避できる 100 nm 以下の膜直径を長期間維持することが確認されている^{22,24)}。

4. 共焦点レーザー顕微鏡による観察 HL-23/NBDPC の細胞への融合蓄積の検討は、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP, Leica) を用いたタイムラプス観察により行った。細胞を Uncoated glass bottom dish (Mat Tek) に播種し、37°C、5% CO₂ で培養後、HL-23/NBDPC を添加し 3 時間観察した。レーザーは、Ar (励起波長 488 nm、蛍光波長 505–555 nm) を用いた。なお、HL-23/NBDPC の最終濃度は [DMPC]=0.1 mM とした。

5. 細胞膜流動性測定 各細胞の膜流動性は、蛍光偏光解消法にて測定した。37°C、5% CO₂ で培養した細胞を PBS (-) で洗浄後、0.05% トリプシン/EDTA で剥がし、遠心分離後 PBS (-) を加えて、 2×10^4 cells/ml の懸濁液を調製した。その後、蛍光プローブとして 1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン (DPH) を加えて、細胞を 15 分間染色後、励起波長 357 nm、蛍光波長 432 nm で蛍光偏光強度成分を分光蛍光光度計 (F-2000, HITACHI) を用いて測定し、Eq. (1) で定義される蛍光偏光度 (P) を算出した。

$$P = (I_{vv} - C_f I_{vh}) / (I_{vv} + C_f I_{vh}) \quad (1)$$

ここで、 I_{vv} は垂直直線偏光励起光の振動方向と垂直に振動する偏光強度であり、 I_{vh} は垂直直線偏光励起光の振動方向と平行に振動する偏光強度である。また、 $I_{vv} - C_f I_{vh}$ は試料から放射される全蛍光強度であり、 $I_{vv} + C_f I_{vh}$ は偏光の度合いを表す。

$$C_f = I_{hv} / I_{hh} \quad (2)$$

C_f は補正係数であり、Eq. (2) から算出した。ここで、 I_{hv} は水平直線偏光励起光の振動方向と垂直に振動する偏光強度であり、 I_{hh} は水平直線偏光励起光の振動方向と平行に振動する偏光強度である。

6. 細胞増殖抑制効果の評価 HL-23 の肺がん細胞に対する IC_{50} 値の検討は、酵素活性測定法である WST-1 [2-メトキシ-4-ニトロフェニル-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム、モノソディウム塩] assay (Cell Counting Kit, 同仁化学研究所) を用いて行った。A549 細胞と H460 細胞は 2.0×10^4 cells/ml, H23 細胞は 5.0×10^4 cells/ml, H520 細胞は 1.5×10^5 cells/ml に調製した細胞懸濁液を、それぞれ 96 well プレート (住友ベークライト) に 0.1 ml 播種し、 37°C , $5\% \text{CO}_2$ で 24 時間培養した。試料溶液 (HL-23) を $10 \mu\text{l}/\text{well}$ 添加し、48 時間培養後、WST-1 溶液を加えて 3 時間培養した。波長 450 nm での吸光度を分光光度計 (Emax precision microplate reader, Molecular Devices) で測定した。細胞生存率を $A_{mean}/A_{control} \times 100$ で評価した。 A_{mean} は HL-23 添加後の、 $A_{control}$ は HL-23 未添加の水溶性ホルマザンの吸光度を示す。 IC_{50} 値は生存率の HL-23 濃度依存曲線から算出した。

7. Annexin-V binding assay HL-23 の各肺がん細胞に対するアポトーシス誘導については、Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche Diagnostics) を用い、Annexin-V binding assay により検討した。細胞を Uncoated glass bottom dish (Mat Tek) に播種し、 37°C , $5\% \text{CO}_2$ で 24 時間培養した。その後、HL-23 を添加し、一定時間培養後、Annexin-V-Fluorescein, Propidium Iodide (PI) 混合液を暗下、室温で 15 分間反応させた。共焦点レーザー顕微鏡により Ar レーザー (Annexin-V-Fluorescein: 励起波長 488 nm, 蛍光波長 500–600 nm, PI: 励起波長 488 nm, 蛍光波長 617–640 nm) を用いて観察した。なお、HL-23 の最終濃度は、各細胞の IC_{50} 値 [[DMPC] = 0.238 mM (A549 細胞), 0.229 mM (H460 細胞), 0.255 mM (H23 細胞), 0.201 mM (H520 細胞)] と同一にした。なお、アポトーシスを誘導した細胞膜は Annexin-V-Fluorescein (緑) にのみ染色されることが知られている。

8. TUNEL assay HL-23 の各非小細胞肺が

んに対するアポトーシス誘導については、*In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics) を使用した TUNEL assay にて検討した。細胞を Uncoated glass bottom dish (Mat Tek) に播種し、 37°C , $5\% \text{CO}_2$ で 24 時間培養した。その後、HL-23 を添加し、48 時間培養後、 10% 中性ホルムアルデヒド溶液 (4% ホルマリン含有) で細胞を固定した。Terminal deoxytransferase, Fluorescein-dUTP 混合液を暗下 37°C で 60 分間反応させ、TO-PRO-3 (in-vitrogen) にて核を染色後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。Fluorescein-dUTP の観察光源には Ar レーザー (励起波長 488 nm, 蛍光波長 515–565 nm) を、TO-PRO-3 の観察光源には He-Ne レーザー (励起波長 633 nm, 蛍光波長 640–700 nm) を用いた。なお、HL の最終濃度は各細胞の IC_{50} 値 [[DMPC] = 0.238 mM (A549 細胞), 0.229 mM (H460 細胞), 0.255 mM (H23 細胞), 0.201 mM (H520 細胞)] とした。すべての細胞において、核が TO-PRO-3 (赤) に、アポトーシスを誘導した細胞は、DNA の 3'-OH 末端が Fluorescein-dUTP (緑) に染色されることは周知の通りである。

結果と考察

1. 蛍光脂質含有ハイブリッドリポソームの細胞への融合・蓄積 HL-23/NBDPC をヒト肺上皮がん (A549) 細胞、ヒト肺大細胞がん (H460) 細胞、ヒト肺腺がん (H23) 細胞、ヒト肺扁平上皮がん (H520) 細胞及びヒト胎児肺二倍体線維芽 (WI-38) 細胞、正常ヒト肺線維芽 (NHLF) 細胞、正常ヒト肺微小血管内皮 (HMVEC-L) 細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 3 時間観察した結果を Fig. 1 に示す。肺がん細胞には HL-23/NBDPC の強い蛍光が観察されたが、正常肺細胞には極めて弱い蛍光しか観察されなかった。さらに、画像の蛍光強度の測定結果 (Fig. 2) から、肺がん細胞の蛍光量が経時的な増大が認められており、投与 180 min 後の正常細胞とがん細胞それぞれの蛍光強度の平均値を比較したところ、がん細胞の蛍光は正常細胞の約 3 倍であることが明らかとなった。これまでに HL-23/NBDPC はヒト肝臓がん細胞には蓄積し、正常ヒト肝細胞には蓄積しないことを既に報告している。²⁴⁾ また、ヒト大腸がん細胞と正常ヒト大腸細胞に対しても、全反射蛍光顕微鏡を用い

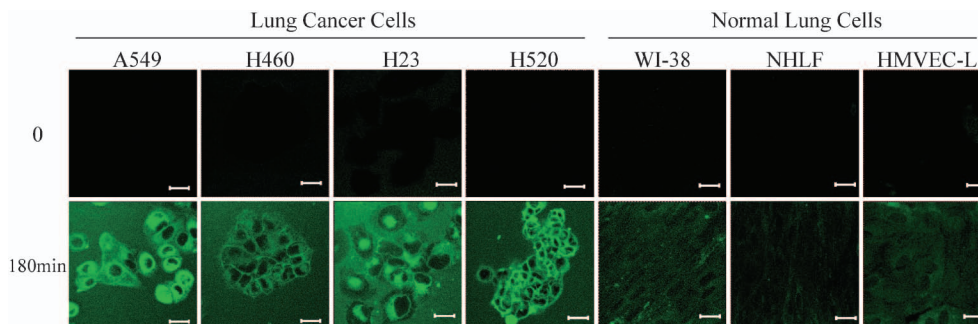


Fig. 1. Fluorescence Micrographs of Lung Cancer Cells (A549, H460, H23, H520) and Normal Lung Cells (WI-38, NHLF, HMVEC-L) after the Treatment with Hybrid Liposomes of DMPC/C₁₂(EO)₂₃ Including NBDPC (HL-23/NBDPC) Using Confocal Laser Microscopy

[DMPC] = 0.1 mM, [C₁₂(EO)₂₃] = 0.0116 mM, [NBDPC] = 0.00466 mM, Scale bar: 20 μm.

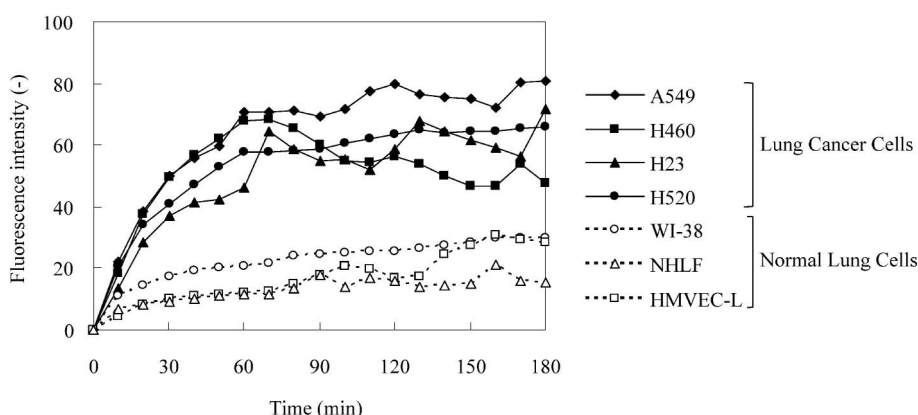


Fig. 2. Fluorescence Intensity of Hybrid Liposomes of DMPC/C₁₂(EO)₂₃ Including NBDPC (HL-23/NBDPC) in Lung Cancer Cells (A549, H460, H23, H520) and Normal Lung Cells (WI-38, NHLF, HMVEC-L) Using Confocal Laser Microscopy

[DMPC] = 0.1 mM, [C₁₂(EO)₂₃] = 0.0116 mM, [NBDPC] = 0.00466 mM.

た観察から、HL-23/NBDPCの大腸がん細胞のみへの融合・蓄積も報告している。¹⁸⁾今回、HL-23/NBDPCが肺がん細胞に選択的に融合・蓄積することを初めて明らかにした。

2. 肺がん細胞の膜流動性 肺がん細胞 (A549, H460, H23, H520) 及び正常肺細胞 (WI-38, NHLF, HMVEC-L) の膜流動性を蛍光偏光解消法により測定し、結果を Fig. 3 に示す。P 値が小さいほど膜流動性が高くなることから、肺がん細胞の P 値は、正常肺細胞よりも小さく、肺がん細胞の膜流動性は正常肺細胞よりも高いことが明らかとなった。よって、HL-23/NBDPC の肺がん細胞への蓄積は、細胞膜の流動性が関与している可能性が高いと考えられる。

3. ハイブリッドリポソームの肺がん細胞に対する増殖抑制効果 HL-23 及び DMPC 単一リポソームの A549 細胞, H460 細胞, H23 細胞及び

H520 細胞に対する IC₅₀ 値を WST-1 assay により検討し、結果を Fig. 4 (A) に示す。IC₅₀ 値は、A549 細胞では 0.238 mM, H460 細胞では 0.229 mM, H23 細胞では 0.255 mM, H520 細胞では 0.201 mM であり、DMPC 単一リポソームの IC₅₀ 値の約 1/2 であった。これまでに、DMPC 単一リポソームよりも膜流動性が高い HL-23 が、顕著ながん抑制効果を示す知見が既に報告されている。¹⁸⁾ また、HL-23 と C₁₂(EO)₂₃ ミセルの IC₅₀ 値を比較した結果 [Fig. 4 (B)], HL-23 は C₁₂(EO)₂₃ ミセルの 1/2 以下であることが確認された。本研究においては、種類の異なる肺がん細胞に対し、HL-23 が DMPC 単一リポソームより顕著に高い増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

4. 肺がん細胞に対するハイブリッドリポソームのアポトーシス誘導 HL-23 が各種肺がん細胞に対して誘導する細胞死について、Annexin-V

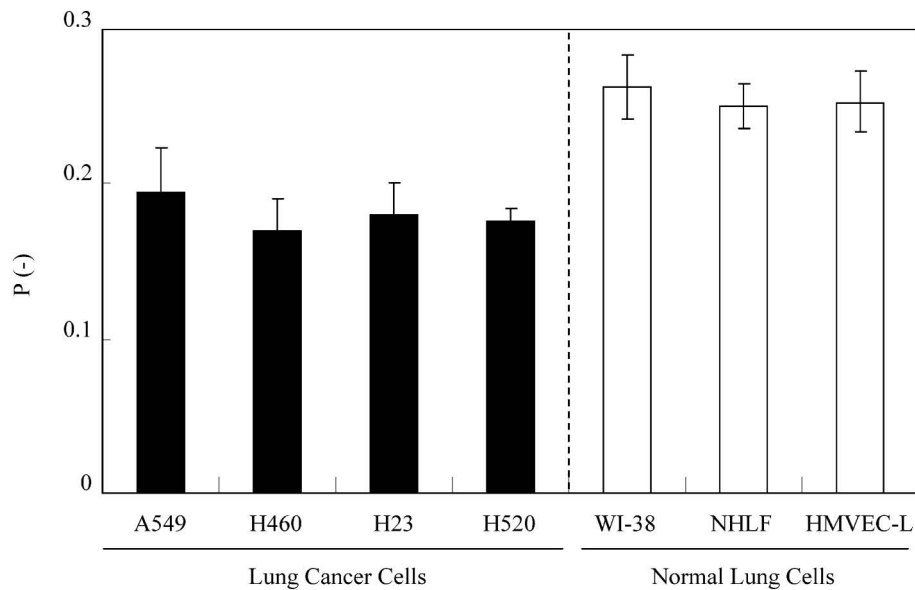


Fig. 3. Fluorescence Polarization (P value) of DPH for Lung Cancer Cells (A549, H460, H23, H520) and Normal Lung Cells (WI-38, NHLF, HMVEC-L)

Data represent the mean ($n=3$) \pm S.D.

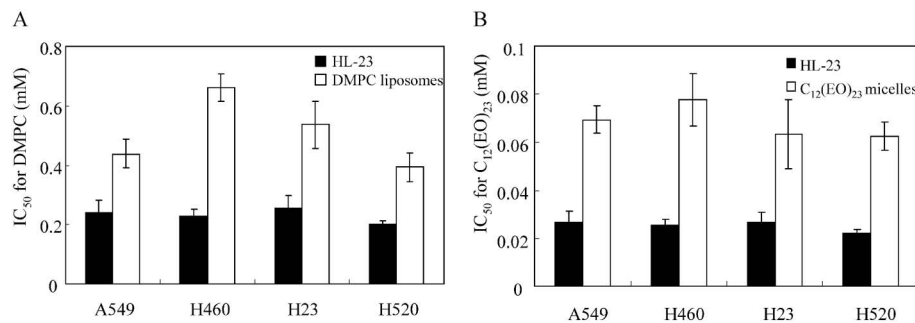


Fig. 4. (A) IC₅₀ of Hybrid Liposomes (HL-23) Composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% C₁₂(EO)₂₃ and DMPC Liposomes, (B) IC₅₀ of HL-23 and C₁₂(EO)₂₃ Micelles on the Growth of Lung Cancer Cells (A549, H460, H23, H520)

Data represent the mean ($n=3-6$) \pm S.D.

binding assay と TUNEL assay を用いて検討した。まず, Annexin-V binding assay の結果を Fig. 5 に示す。A549 細胞では, HL-23 処理 11 時間後, H460 細胞と H520 細胞では, 7 時間後, H23 細胞では, 8 時間後に Annexin-V-Fluorescein の緑色蛍光のみが観察され, 初期のアポトーシス誘導が明らかとなった。次に, TUNEL assay の結果を Fig. 6 に示す。HL-23 処理 48 時間後に, すべての細胞において TUNEL 陽性を示す緑色蛍光が観察され, DNA の断片化が確認された。以上の結果より, HL-23 は肺がん細胞に対しアポトーシスを誘導することが明らかとなった。これまでに, HL-23 はヒト肺胞上皮がん (A549) 細胞とヒト肺腺がん (RERF-LC-OK) 細胞に対してアポトーシスを誘導

する知見が得られている。¹⁹⁾ 今回, HL-23 がヒト肺大細胞がん (H460) 細胞, ヒト肺腺がん (H23) 細胞及びヒト扁平上皮がん (H520) 細胞に対しアポトーシスを誘導することを初めて明らかにした。

結 言

本研究では, 肺がんの約 85% を占め, 抗がん剤が効き難いと言われている非小細胞肺がん (NSCLC) に焦点を合わせ, ハイブリッドリポソーム (HL-23) 及び蛍光脂質含有ハイブリッドリポソーム (HL-23/NBDPC) の NSCLC (A549, H460, H23, H520) 細胞に対する融合・蓄積, 増殖抑制効果及びアポトーシス誘導について検討した。その結果, 以下のような知見が得られた。

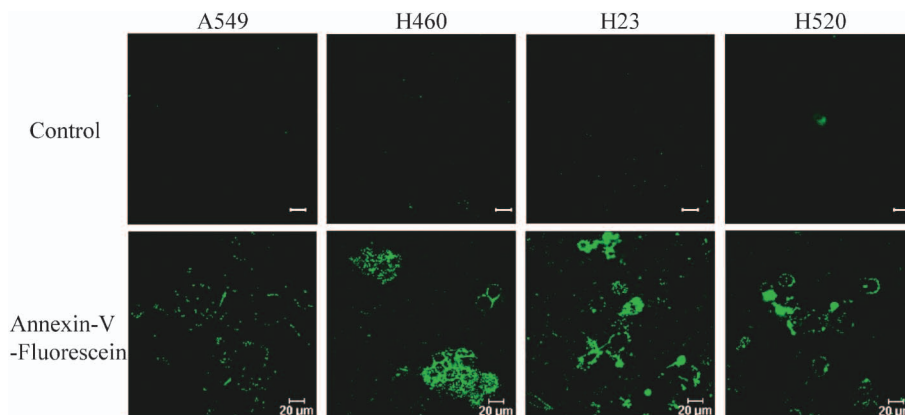


Fig. 5. Fluorescence Micrographs of Lung Cancer Cells (A549, H460, H23, H520) after the Treatment with Hybrid Liposomes (HL-23) of 90 mol% DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$ for 11 h (A549), 7 h (H460 and H520) and 8 h (H23), Using Annexin-V Binding Assay

[DMPC]=0.238 mM (A549), 0.229 mM (H460), 0.255 mM (H23), 0.201 mM (H520), [$C_{12}(EO)_{23}$]=0.0264 mM (A549), 0.0254 mM (H460), 0.0283 mM (H23), 0.0223 mM (H520). Scale bar: 20 μ m.

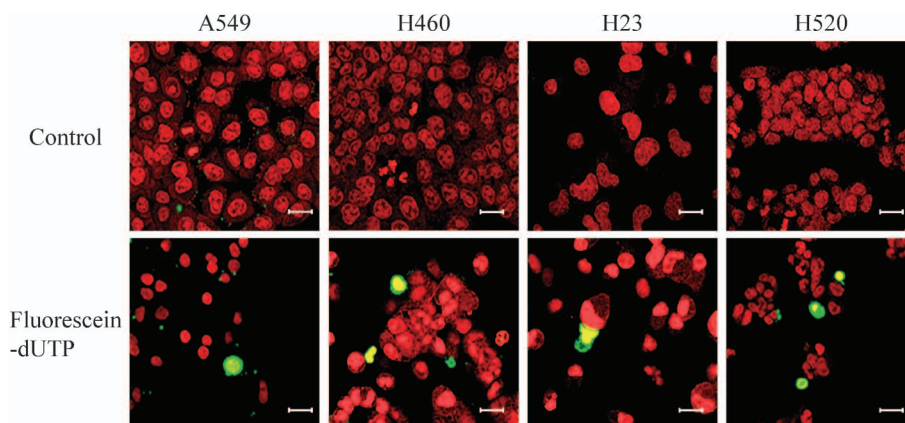


Fig. 6. Fluorescence Micrographs of Lung Cancer Cells (A549, H460, H23, H520) after the Treatment with Hybrid Liposomes (HL-23) of 90 mol% DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$ for 48 h Using TUNEL Assay

[DMPC]=0.238 mM (A549), 0.229 mM (H460), 0.255 mM (H23), 0.201 mM (H520), [$C_{12}(EO)_{23}$]=0.0264 mM (A549), 0.0254 mM (H460), 0.0283 mM (H23), 0.0223 mM (H520). Scale bar: 20 μ m.

(1) HL-23/NBDPC は、膜流動性の高い肺がん細胞に特異的に融合・蓄積し、膜流動性の低い正常肺細胞にはほとんど蓄積しないことが明らかとなった。

(2) HL-23 は肺がん細胞に対して高い増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導することが初めて明らかとなった。

以上の結果より、HL-23 は NSCLC に対し選択的に融合蓄積し、顕著に大きな増殖抑制効果を示すことが明らかになった。制がん剤が効き難いと言われる NSCLC に対して、増殖抑制効果が期待できる新しい治療薬へ発展する可能性が大きくなったことは注目に値する。

REFERENCES

- 1) Anuceanu R. V., Istudor V., *Altern. Med. Rev.*, **9**, 402–419 (2004).
- 2) Endo C., Sagawa M., Sakurama A., Sato M., Kondo T., Fujimura S., *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **9**, 283–289 (2003).
- 3) Hao J.-Q., Li Q., Xu S.-P., Shen Y.-X., Sun G.-Y., *Chin. Med. J.*, **121**, 602–607 (2008).
- 4) Yeruva L., Pierre K. J., Elegbede A., Wang R. C., Carper S. W., *Cancer Lett.*, **257**, 216–226 (2007).
- 5) Leong O. K., Muhammad T. S. T., Sulaiman S. F., *Evid. Based Complement. Altern. Med.*,

- doi:10.1093/ecam/nep057 (2009).
- 6) Wang G., Li X., Huang F., Zhao J., Ding H., Cunningham C., Coad J. E., Flynn D. C., Reed E., Li Q. Q., *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 881–893 (2005).
 - 7) Pathak A. K., Singh N., Khanna N., Reddy V. G., Prasad K. N., Kochupillai V., *J. Am. Coll. Nutr.*, **21**, 416–421 (2002).
 - 8) Chang D.-K., Lin C.-T., Wu C.-H., Wu H.-C., *PLoS ONE*, **4**, e4171 (2009).
 - 9) Ueoka R., Moss R. A., Swarup S., Matsumoto Y., Straus G., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185–2186 (1985).
 - 10) Ueoka R., Matsumoto Y., Moss R. A., Swarup S., Sugii A., Harada K., Kikuchi J., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588–1595 (1988).
 - 11) Ueoka R., Dozono H., Matsumoto Y., Cho M., Kitahara K., Kato Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219–220 (1990).
 - 12) Ueoka R., Yamada E., Yamashita O., Matsumoto Y., Kato Y., *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597–6600 (1991).
 - 13) Goto K., Matsumoto Y., Ueoka R., *J. Org. Chem.*, **60**, 3342–3346 (1990).
 - 14) Tanoue O., Baba M., Tokunaga Y., Goto K., Matsumoto Y., Ueoka R., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2129–2132 (1999).
 - 15) Kitamura I., Kochi M., Matsumoto Y., Ueoka R., Kuratsu J., Ushio Y., *Cancer Res.*, **56**, 3986–3992 (1996).
 - 16) Matsumoto Y., Kato T., Iseki S., Suzuki H., Nakano K., Iwahara M., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 1937–1940 (1999).
 - 17) Matsumoto Y., Iwamoto Y., Matsushita T., Ueoka R., *Int. J. Cancer*, **115**, 377–382 (2005).
 - 18) Komizu Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131–6134 (2006).
 - 19) Nagami H., Matsumoto Y., Ueoka R., *Int. J. Pharm.*, **315**, 167–172 (2006).
 - 20) Shimoda S., Ichihara H., Matsumoto Y., Ueoka R., *Int. J. Pharm.*, **372**, 162–168 (2009).
 - 21) Ichihara H., Nagami H., Kiyokawa T., Matsumoto Y., Ueoka R., *Anticancer Res.*, **28**, 1187–1196 (2008).
 - 22) Iwamoto Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *Int. J. Pharm.*, **292**, 231–239 (2005).
 - 23) Elworthy P. H., Macfarlane C. B., *J. Chem. Soc.*, 537–541 (1962).
 - 24) Nakano K., Iwamoto Y., Takata W., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251–3254 (2002).