

腎・心血管障害における細胞内分子機構の解明とその治療法の開発

石澤 啓介

Drug Discovery for Improvement of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease

Keisuke ISHIZAWA

Department of Medical Pharmacology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, 1-78-1 Sho-machi, Tokushima 770-8505, Japan

(Received May 24, 2011)

Chronic kidney disease (CKD) has been increasingly recognized as a major public health problem in the world. Recent studies have showed that CKD is an independent risk factor for the occurrence of cardiovascular disease (CVD). Reactive oxygen species (ROS), generated by reduction-oxidation actions, have been generated by reduction-oxidation actions, recognized as the important chemical mediators that regulate signal transduction in various cells including vascular smooth muscle cells (VSMC) and mesangial cells (MC). It has been showed that increase in ROS generation may relate to a risk for CVD and CKD. In addition, ROS mediate activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases, extracellular signal-regulated kinase 1/2, c-Jun N-terminal kinase, p38, and big MAP kinase 1, in various cells leading to change in gene expressions. Control of the oxidative stress and ROS-mediated alterations of signaling molecules including MAP kinases may provide new therapeutic strategy against CKD and CVD. In this review, we summarize mainly our data regarding the pharmacological effects of renin-angiotensin-aldosterone system blockers, bioflavonoids and adiponectin in VSMC and MC. Also we review the data on a possible new class drug against oxidative stress to improve CKD and CVD.

Key words—oxidative stress; chronic kidney disease; cardiovascular disease; mitogen-activated protein kinase; renin-angiotensin-aldosterone system

1. はじめに

近年、心臓と腎臓は密接な関係にあることが明らかとなってきており、心腎連関という概念が確立し注目されている。慢性腎臓病 (chronic kidney disease, CKD) は、タンパク尿や腎機能低下から腎不全さらには透析へ至る腎疾患であり、2002年に米国でその概念が提唱された後、欧州やアジアへも急速に広まっている。¹⁾ 日本腎臓学会はCKDを「腎臓の障害 (タンパク尿など)」、若しくは「GFR (糸球体濾過量) が 60 ml/min/1.73 m² 未満の腎機能低下が3ヵ月以上持続するもの」と定義している。CKDは腎障害が進行するのみならず、心血管疾患 (cardiovascular disease, CVD) の重要な危険因子であることが、久山町研究等の疫学研究成績か

らも明らかとなってきている。^{2,3)} 一方CKDは、食事療法、生活指導及び薬物療法でその進行を遅らせることが可能であるとともに、アンジオテンシン変換酵素阻害薬及びアンジオテンシン II AT1受容体遮断薬 (angiotensin II receptor blocker, ARB) により血圧をコントロールすることでも進行を抑制できることが知られている。⁴⁾

腎・心血管障害の発症・進展には酸化ストレスが重要な役割を果たしており、その治療法を開発する上で酸化ストレスを制御することは大きな課題であると考えられる。生体内で酸化ストレスの主体となって働く分子は、酸素を含んだフリーラジカルである活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) である。ROSとは一般にスーパーオキシド (O_2^-) とヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) と H_2O_2 を含む一群の酸素種を指す。これらの酸化ストレスが腎・心血管系細胞から産生され、シグナル伝達因子として働くことが明らかとなってきている。ROSの過剰産生は血管機能障害を惹起し、糖尿病性腎症、高血圧、動

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部医薬品機能生化学 (〒770-8505 徳島市庄町 1-78-1)

e-mail: ikeisuke@ph.tokushima-u.ac.jp

本総説は、平成22年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

脈硬化及び虚血性心疾患等の種々の循環器疾患における病態に関与することが示唆されている。⁵⁻⁷⁾

Mitogen-activated protein (MAP) kinase は、細胞の分化、増殖及びアポトーシス等に深く関与するセリン/スレオニンリン酸化酵素である。これまでに extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK)/stress activated protein kinase (SAPK), p38 及び big MAP kinase 1 (BMK1)/ERK5 の 4 種類のファミリーに分けられている。最近ではこれら 4 種類の MAP kinase すべてが酸化ストレスに感受性があることも明らかとなってきた。^{8,9)} さらに MAP kinase は、血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC), 腎メサンギウム細胞 (mesangial cells, MC) の増殖・遊走・肥大に関与することが報告されており、MAP kinase を標的とした腎・心血管障害克服に向けた新規治療法の開発も行われている。本稿では腎・心血管障害の分子機構の解明と治療法の開発、特に酸化ストレス及び MAP kinase の制御に焦点を当てて研究を行った成果を紹介する。

2. 血管・腎障害克服を目指したレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (Renin-Angiotensin-Aldosterone System, RAAS) の制御

2-1. アルドステロンによる nongenomic (非ゲノム) 作用を介した血管障害機構の解析

RAAS は腎・心血管障害において重要な役割を演じている。アルドステロンは腎臓の鉱質コルチコイド受容体に作用してナトリウムと水の代謝を調節するホルモンであるが、近年その強力な組織障害作用が報告されている。¹⁰⁾ 鉱質コルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor, MR) は、標的遺伝子プロモーターの調節領域との相互作用を通じて、血圧と電解質バランスを調節するリガンド調節転写因子のスーパーファミリーである。以前よりアルドステロンは、古典的 genomic 作用として MR を介して作用すると報告されてきた。¹¹⁾ しかし、アルドステロンのシグナル伝達は genomic 作用だけでなく、VSMC を含め、様々な組織において迅速な非ゲノム作用を起こすことが明らかとなってきた。¹²⁾ 筆者らはラット大動脈血管平滑筋細胞 (rat aortic vascular smooth muscle cells, RASMC) において、アルドステロンが非ゲノム作用を介して MAP kinase ファミリーに属する BMK1 をリン酸化し、

細胞増殖作用を示すことを明らかにした。¹³⁾ さらに本作用は、選択的 MR 拮抗薬であるエプレレノンによって抑制されるとともに抗酸化剤でも抑制されることから、酸化ストレスが関与することも見出された。¹³⁾ 本研究結果より、アルドステロンによる BMK1 のリン酸化は迅速であり、転写を介さない非ゲノム作用である可能性が示唆された。またその作用は血管平滑筋細胞の増殖に関与し、MR 受容体拮抗薬はアルドステロンによる血管障害に有用であることが示唆された。

2-2. ARB による AT1 受容体非依存的な腎保護作用に関する検討

ARB は糖尿病患者において降圧作用とは無関係に、抗酸化作用及び抗炎症作用を介して腎保護効果を示すことが報告されている。¹⁴⁾ さらに ARB は、過酸化水素及び plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) による酸化ストレスに対して、AT1 受容体拮抗作用を介さずに抑制する。¹⁵⁾ ゆえに、ARB の AT1 受容体非依存的な作用機構の存在が示唆される。メサンギウム細胞の過剰な代謝回転は、糸球体硬化症や糸球体腎炎の発症に大きく関与し、CKD の特徴的な所見の 1 つである。¹⁶⁾ 血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) は、腎障害発症・進展の過程において重要な役割を演じていることが知られており、メサンギウム細胞の遊走及び増殖を惹起するとともに、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生する作用も有することが報告されている。¹⁷⁾ 筆者らの研究結果から、AT1 受容体を siRNA によりノックダウンしたラットメサンギウム細胞 (rat mesangial cells, RMC) において、PDGF による細胞遊走は ARB であるオルメサルタンにより抑制されることが見出された。¹⁸⁾ さらに PDGF により惹起される ROS 産生、Src 及び BMK1 のリン酸化もオルメサルタンにより抑制された。¹⁸⁾ 一方、オルメサルタンは PDGF による PDGF 受容体自己リン酸化には影響しなかった。¹⁸⁾ ゆえに RMC において、オルメサル



石澤啓介

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部助教。博士 (医学)。'97 年岡山大学薬学部卒業、'99 年岡山大学大学院薬学研究科修了、'99-'06 年徳島大学病院薬剤部薬剤師、'04 年アリゾナ大学薬学部薬剤師研修、'07 年より現職。専門：循環薬理学。'09 年より日本薬学会薬理系薬学部会若手世話人。

タンは AT1 受容体非依存的に抗酸化作用を示すことで、PDGF が誘導する ROS-Src-BMK1 の経路を抑制し、腎障害を抑制する可能性が示唆された。

3. 血管・腎障害におけるアディポネクチンの役割

3-1. IGF-1 による血管平滑筋細胞遊走に対するアディポネクチンの影響 脂肪細胞はレプチン、PAI-1 及び tumor necrosis factor- α 等のアディポサイトカインと称される様々な生理活性物質を分泌しており、全身の糖・脂質代謝の恒常性を保つ上で重要な役割を果たしている。¹⁹⁾ アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの 1 つであり、低アディポネクチン血症では冠血管疾患のリスクが増加することが報告されている。²⁰⁾ またアディポネクチン欠損マウスにおいて、インスリン抵抗性と新生内膜増生の亢進がみられることが報告されており、²¹⁾ 近年、アディポネクチンがインスリン抵抗性、循環器疾患に対して保護的役割を果たしている可能性が強く示唆されている。一方、インスリン様成長因子 -1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) は強力な生理活性物質であり、動脈硬化発症・進展の段階に応じて、その増悪及び粥腫安定化の両方に寄与することが知られている。²²⁾ さらに IGF-1 は血管平滑筋細胞において、ERK1/2 リン酸化を惹起し、細胞の遊走・増殖を促進することが報告されている。²³⁾ 筆者らはアディポネクチンが IGF-1 による RASMC の遊走を抑制するとともに ERK1/2 リン酸化を抑制することを見出した。²⁴⁾ また、アディポネクチンは RASMC において 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化することを確認した。AMPK 活性化薬はアディポネクチンと同様に IGF-1 による RASMC の遊走及び ERK1/2 リン酸化を抑制した。²⁴⁾ 一方、IGF-1 により惹起される Akt リン酸化及び Akt の下流にあり抗アポトーシス作用を示すタンパクである Bad のリン酸化は、アディポネクチンにより影響を受けなかった。²⁴⁾ 以上の結果から、アディポネクチンは AMPK 活性化を介して IGF-1 による ERK1/2 リン酸化を抑制し、血管平滑筋細胞の遊走を抑制する可能性が示唆された。さらに IGF-1 に対するアディポネクチンの作用は細胞遊走に対して選択的であり、粥腫の破綻制御に関与する Akt-Bad リン酸化経路に対しては影響を示さなかった。すなわちアディポネクチン

は血管に対する IGF-1 の作用を調節することで、動脈硬化の発症・増悪を抑制し得る可能性が示された。

3-2. PDGF による腎メサンギウム細胞遊走・増殖に対するアディポネクチンの影響 アディポネクチンの腎臓に対する作用は不明な点が多い。これまでに、タンパク尿を呈する患者において血中アディポネクチン濃度が上昇すること、²⁵⁾ 末期腎不全患者において血中アディポネクチン濃度が上昇すること²⁶⁾ が報告されているが、アディポネクチンの腎臓に対する直接的な作用は明らかでない。筆者らの検討により、アディポネクチンは PDGF による RMC の遊走を抑制するとともに、BMK1, p38 及び Akt リン酸化を抑制することが明らかとなった。²⁷⁾ 本研究結果より、CKD においてアディポネクチンが腎障害を抑制する可能性が示唆された。

4. ケルセチンの生体内代謝と動脈硬化予防効果

食事性フラボノイドは、抗酸化作用を有し、その作用は虚血性心疾患や糖尿病などの予防的見地から注目を集めている。²⁸⁾ フラボノイド類に属するケルセチンは、食物中に広く含有され、抗酸化作用、血小板凝集抑制作用及び LDL 酸化抑制作用など多岐に渡る生理作用を有することが報告されている。^{29,30)} 近年ヒトにおいて、経口摂取されたケルセチンは、腸管で加水分解を受けてアグリコンとなった後、腸管粘膜から吸収される際にグルクロン酸抱合を受け、血漿中ではグルクロン酸抱合体である quercetin 3-O- β -D-glucuronide (Q3GA) として存在することが報告されている。^{31,32)} またその際、遊離型ケルセチンは血漿中に存在しないことが確認されている。^{31,32)} さらに、Q3GA の特異的モノクローナル抗体を作製し、ヒト大動脈の免疫組織染色を行ったところ、動脈硬化病巣部の新生内膜に顕著な陽性染色像が認められた。一方、正常動脈では陽性染色は認められなかったことから、Q3GA は動脈硬化巣に蓄積する可能性が示唆された。³³⁾ 筆者らは Q3GA が抗酸化活性を示すこと、加えて RASMC において PDGF による各種 MAP kinase リン酸化及び細胞の遊走・増殖を抑制することを明らかにした。³⁴⁾ 以上の結果より、Q3GA は動脈硬化巣において内膜下へ浸潤し、血管平滑筋細胞の増殖・遊走を抑制する可能性が示唆され、Q3GA による動脈硬化予防作用の一端が明らかとなった。³³⁾

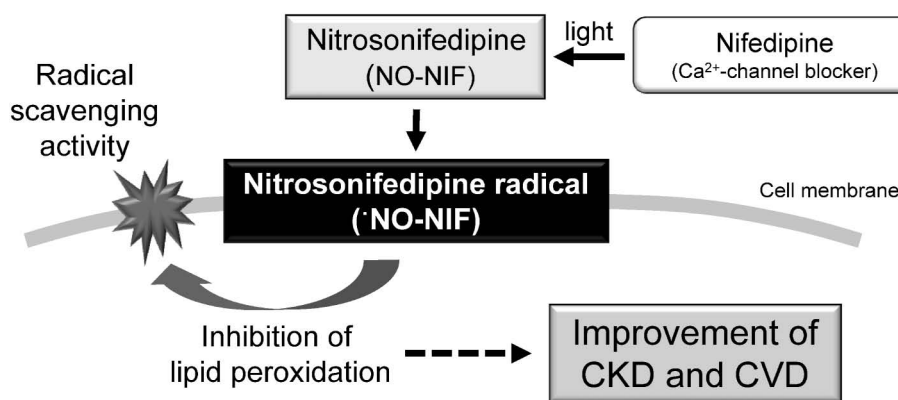


Fig. 1. Possible Effects of NO-NIF, a New Class Drug against Oxidative Stress, for Improvement of CKD and CVD

5. 細胞膜保護物質による CKD 及び CVD に対する新しい治療薬の開発

降圧薬として汎用される Ca チャネル遮断薬の nifedipine は、光分解されることで nitrosonifedipine (NO-NIF) に変換される。³⁵⁾ NO-NIF は Ca チャネル遮断作用を示さず、³⁶⁾ 脂質由来ラジカルに対して高い反応性を示すこと³⁷⁾ が報告されている。筆者らは NO-NIF が培養細胞と反応して NO-NIF ラジカルを生成すること、及び細胞膜を構成する不飽和脂肪酸と反応してラジカル消去活性を示すことを報告した。³⁸⁾ すなわち NO-NIF は、細胞膜を構成する不飽和脂肪酸と反応して NO-NIF ラジカルに変化することで、抗酸化活性を示す可能性が示唆される。さらに NO-NIF は、培養正常ヒト腎糸球体血管内皮細胞において、膜酸化開始剤である cumene hydroperoxide による細胞障害及び細胞生存率低下を抑制することを明らかにした。³⁹⁾ さらに NO 合成酵素阻害剤である *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester 投与高血圧モデルラットにおいて、尿タンパク排泄量上昇を抑制することを見出した。⁴⁰⁾ 以上の結果から、NO-NIF は細胞膜選択的に作用することで酸化ストレスによる細胞膜障害を軽減し、腎・心血管障害抑制作用を示す可能性が示唆された。NO-NIF は既存の臓器保護薬とは異なった新たな作用機構を有する CKD 及び CVD に対する予防薬・治療薬となることが期待される (Fig. 1)。

6. おわりに

筆者らは腎・心血管疾患に対する RAAS 阻害薬、アディポネクチン及びバイオフィラボノイドの効果を明らかにした。さらにその抑制機構を明らかにすることで、酸化ストレス及び MAP kinase の制御

が CKD 及び CVD 克服のための治療標的となり得る可能性が示唆された。加えて、筆者らが現在取り組んでいる細胞膜に特化した酸化ストレス制御薬の研究・開発は、今後の腎・心血管疾患に対する新規治療法を提唱し得るものと期待される。

謝辞 本研究を遂行するに当たり、終始温かい御指導・御支援、さらに自由な研究環境を与えて下さいました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部薬理学玉置俊晃教授、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部医薬品機能生化学土屋浩一郎教授並びに徳島大学病院薬剤部水口和生教授・薬剤部長に厚く御礼申し上げます。さらに種々の御指導・御鞭撻を頂きました奈良県立医科大学薬理学吉栖正典教授、香川大学医学部附属病院薬剤部芳地一教授並びに共同研究者の方々に深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) National Kidney Foundation, *Am. J. Kidney Dis.*, **39**, S1–266 (2002).
- 2) Ninomiya T., Kiyohara Y., Kubo M., Tanizaki Y., Doi Y., Okubo K., Wakugawa Y., Hata J., Oishi Y., Shikata K., Yonemoto K., Hirakata H., Iida M., *Kidney Int.*, **68**, 228–236 (2005).
- 3) Hillege H. L., Fidler V., Diercks G. F., Van Gilst W. H., De Zeeuw D., Van Veldhuisen D. J., Gans R. O., Janssen W. M., Grobbee D. E., De Jong P. E., *Circulation*, **106**, 1777–1782 (2002).
- 4) Makino H., Haneda M., Babazono T.,

- Moriya T., Ito S., Iwamoto Y., Kawamori R., Takeuchi M., Katayama S., *Hypertens. Res.*, **31**, 657–664 (2008).
- 5) Giordano F.J., *J. Clin. Invest.*, **115**, 500–508 (2005).
- 6) Madamanchi N. R., Vendrov A., Runge M. S., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 29–38 (2005).
- 7) Forbes J. M., Coughlan M. T., Cooper M. E., *Diabetes*, **57**, 1446–1454 (2008).
- 8) Abe J., Berk B. C., *Trends Cardiovasc. Med.*, **8**, 59–64 (1998).
- 9) Griendling K. K., Sorescu D., Lassegue B., Ushio-Fukai M., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 2175–2183 (2000).
- 10) Pitt B., Remme W., Zannad F., Neaton J., Martinez F., Roniker B., Bittman R., Hurley S., Kleiman J., Gatlin M., *N. Engl. J. Med.*, **348**, 1309–1321 (2003).
- 11) Arriza J. L., Weinberger C., Cerelli G., Glaser T. M., Handelin B. L., Housman D. E., Evans R. M., *Science*, **237**, 268–275 (1987).
- 12) Alzamora R., Michea L., Marusic E. T., *Hypertension*, **35**, 1099–1104 (2000).
- 13) Ishizawa K., Izawa Y., Ito H., Miki C., Miyata K., Fujita Y., Kanematsu Y., Tsuchiya K., Tamaki T., Nishiyama A., Yoshizumi M., *Hypertension*, **46**, 1046–1052 (2005).
- 14) Ogawa S., Mori T., Nako K., Kato T., Takeuchi K., Ito S., *Hypertension*, **47**, 699–705 (2006).
- 15) Shao J., Nangaku M., Inagi R., Kato H., Miyata T., Matsusaka T., Noiri E., Fujita T., *J. Hypertens.*, **25**, 1643–1649 (2007).
- 16) Striker L. J., Doi T., Elliot S., Striker G. E., *Semin. Nephrol.*, **9**, 318–328 (1989).
- 17) Silver B. J., Jaffer F. E., Abboud H. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 1056–1060 (1989).
- 18) Ishizawa K., Izawa-Ishizawa Y., Dorjsuren N., Miki E., Kihira Y., Ikeda Y., Hamano S., Kawazoe K., Minakuchi K., Tomita S., Tsuchiya K., Tamaki T., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **25**, 364–372 (2010).
- 19) Hotamisligil G. S., Arner P., Caro J. F., Atkinson R. L., Spiegelman B. M., *J. Clin. Invest.*, **95**, 2409–2415 (1995).
- 20) Kumada M., Kihara S., Sumitsuji S., Kawamoto T., Matsumoto S., Ouchi N., Arita Y., Okamoto Y., Shimomura I., Hiraoka H., Nakamura T., Funahashi T., Matsuzawa Y., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 85–89 (2003).
- 21) Kubota N., Terauchi Y., Yamauchi T., Kubota T., Moroi M., Matsui J., Eto K., Yamashita T., Kamon J., Satoh H., Yano W., Froguel P., Nagai R., Kimura S., Kadowaki T., Noda T., *J. Biol. Chem.*, **277**, 25863–25866 (2002).
- 22) Jia G., Cheng G., Soundararajan K., Agrawal D. K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, H1051–H1057 (2007).
- 23) Duan C., *Mol. Cell. Endocrinol.*, **206**, 75–83 (2003).
- 24) Motobayashi Y., Izawa-Ishizawa Y., Ishizawa K., Orino S., Yamaguchi K., Kawazoe K., Hamano S., Tsuchiya K., Tomita S., Tamaki T., *Hypertens. Res.*, **32**, 188–193 (2009).
- 25) Guebre-Egziabher F., Bernhard J., Funahashi T., Hadj-Aissa A., Fouque D., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **20**, 129–134 (2005).
- 26) Stenvinkel P., Marchlewska A., Pecoits-Filho R., Heimbürger O., Zhang Z., Hoff C., Holmes C., Axelsson J., Arvidsson S., Schalling M., Barany P., Lindholm B., Nordfors L., *Kidney Int.*, **65**, 274–281 (2004).
- 27) Ishizawa K., Dorjsuren N., Izawa-Ishizawa Y., Sugimoto R., Ikeda Y., Kihira Y., Kawazoe K., Tomita S., Tsuchiya K., Minakuchi K., Tamaki T., *J. Endocrinol.*, **202**, 309–316 (2009).
- 28) Skibola C. F., Smith M. T., *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 375–383 (2000).
- 29) Hayek T., Fuhrman B., Vaya J., Rosenblatt M., Belinky P., Coleman R., Elis A., Aviram M., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 2744–2752 (1997).
- 30) Formica J. V., Regelson W., *Food Chem. Toxicol.*, **33**, 1061–1080 (1995).
- 31) Manach C., Morand C., Crespy V., Demigne C., Texier O., Regerat F., Remesy C., *FEBS Lett.*, **426**, 331–336 (1998).
- 32) Moon J. H., Nakata R., Oshima S., Inakuma T., Terao J., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **279**, R461–R467 (2000).
- 33) Ishizawa K., Yoshizumi M., Kawai Y., Terao J., Kihira Y., Ikeda Y., Tomita S., Minakuchi K., Tsuchiya K., Tamaki T., *J. Pharmacol. Sci.*, **115**, 466–470 (2011).
- 34) Ishizawa K., Izawa-Ishizawa Y., Ohnishi S.,

- Motobayashi Y., Kawazoe K., Hamano S., Tsuchiya K., Tomita S., Minakuchi K., Tamaki T., *J. Pharmacol. Sci.*, **109**, 257–264 (2009).
- 35) Stasko A., Brezova V., Biskupic S., Ondrias K., Misik V., *Free Radic. Biol. Med.*, **17**, 545–556 (1994).
- 36) Hayase N., Inagaki S., Abiko Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 813–821 (1995).
- 37) Yanez C., Lopez-Alarcon C., Camargo C., Valenzuela V., Squella J. A., Nunez-Vergara L. J., *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 2459–2468 (2004).
- 38) Horinouchi Y., Tsuchiya K., Taoka C., Tajima S., Kihira Y., Matsuda Y., Shishido K., Yoshida M., Hamano S., Kawazoe K., Ikeda Y., Ishizawa K., Tomita S., Tamaki T., *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 208–214 (2011).
- 39) Fukuhara Y., Tsuchiya K., Horinouchi Y., Tajima S., Kihira Y., Hamano S., Kawazoe K., Ikeda Y., Ishizawa K., Tomita S., Tamaki T., *J. Med. Invest.*, **58**, 118–126 (2011).
- 40) Ishizawa K., Yamaguchi K., Horinouchi Y., Fukuhara Y., Tajima S., Hamano S., Tomita S., Tsuchiya K., Tamaki T., *J. Pharmacol. Sci.*, **109**, 14–19 (2009).