

## Temozolomide (TMZ)耐性神経膠芽腫に対して有効な併用化学療法を 可能にする新規MGMT阻害薬スクリーニング系の構築

新藤実香<sup>1</sup> 佐藤 聡<sup>1,2</sup> 山本洋平<sup>3</sup> 荒井隆雄<sup>3</sup>  
赤崎安晴<sup>3</sup> 市村幸一<sup>4</sup> 田沼靖一<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 東京理科大学薬学部生化学教室

<sup>2</sup> 東京理科大学ゲノム創薬研究センター

<sup>3</sup> 東京慈恵会医科大学脳神経外科学講座

<sup>4</sup> 国立がん研究センター研究所脳腫瘍連携研究分野

(平成 28 年 6 月 15 日受付)

### ESTABLISHING A SCREENING SYSTEM FOR NEW O<sup>6</sup>-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE INHIBITORS TO DEVELOP COMBINATION CHEMOTHERAPY FOR TEMOZOLOMIDE-RESISTANT GLIOBLASTOMA

Mika SHINDO<sup>1</sup>, Akira SATO<sup>1,2</sup>, Yohei YAMAMOTO<sup>3</sup>, Takao ARAI<sup>3</sup>, Yasuharu AKASAKI<sup>3</sup>,  
Koichi ICHIMURA<sup>4</sup>, and Sei-ichi TANUMA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

<sup>2</sup>Genome Drug Research Center, Tokyo University of Science

<sup>3</sup>Department of Neurosurgery, The Jikei University School of Medicine

<sup>4</sup>Division of Brain Tumor Translational Research, National Cancer Center Research Institute

Among gliomas, glioblastoma is the most severe malignant brain tumor. Although the first choice for chemotherapy is the alkylating agent temozolomide, it remains insufficiently efficacious. In particular, the antitumor effects of temozolomide and of other alkylating agents are reduced by the expression of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), which removes the methyl group from O<sup>6</sup>-methylguanine. Thus, in patients who express MGMT, temozolomide is less effective and the 2-year survival rate is one-third lower than in patients who do not express MGMT. Therefore, the purpose of this study was to establish a screening system for new MGMT inhibitors, which would enable us to develop temozolomide-combination chemotherapy against temozolomide-resistant glioblastoma. First we investigated the sensitivity of temozolomide in human glioblastoma cell lines—MGMT-positive cells (T98G) and MGMT-negative cells (U87MG)—by using water-soluble tetrazolium salt 8 and colonogenic assays. The 50% effective concentration of temozolomide was 390 μM in T98G cells and 28 μM in U87MG cells. These data suggest that the sensitivity of temozolomide in MGMT-expressing T98G cells was about one-twentieth lower than that in non-MGMT-expressing U87MG cells. Interestingly, the protein level of MGMT was markedly decreased by the MGMT inhibitor lomeguatrib. Next, we analyzed the cytotoxicity of the combination of temozolomide and lomeguatrib. We found that the sensitivity of the combination of temozolomide and lomeguatrib in T98G cells was 45 times greater than that of temozolomide alone. These results suggest that our direct cell-based method is useful for screening candidates for inhibiting MGMT. We are now using the cell-based screening system to search for and create effective new MGMT inhibitors.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2016;131:141-7)

Key words; glioblastoma, lomeguatrib, O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, screening system, temozolomide

## I. 緒 言

神経膠芽腫 (Glioblastoma multiforme: GBM) は、神経膠腫の分類の中でグレード4に分類されるもっとも悪性度の高い脳腫瘍である。その発症は大部分が成人であり、5年生存率は約10%、生存期間の中央値は14.6 ヶ月と報告されている<sup>1)2)</sup>。現在、基本的な治療法として腫瘍を摘出する手術が行われているが、発生部位によっては困難であり、放射線治療、化学療法を組み合わせた複合療法が行われている<sup>1)2)</sup>。化学療法における第一選択薬として、アルキル化剤のテモゾロミド (Temozolomide: TMZ, Fig. 1A) が使用されている。その作用機序は、DNAのグアニンのO<sup>6</sup>位をアルキル化することによるDNA傷害を介する腫瘍細胞死の誘発であることが報告されている<sup>3)</sup>。

TMZに耐性を示す機序の一つに、DNA修復酵素であるO<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の発現が挙げられている。MGMTは、脱アルキル化を触媒する酵素であり、テモゾロミド処理により修飾されたグアニンのアルキル基は、活性部位のシステイン残基に転移されることによって除去される<sup>3)</sup>。したがって、神経膠芽腫

に対する化学療法において、MGMTの発現が重要な予後予測因子となっている。事実、MGMTが発現していない患者群の2年生存率は48.9%であるのに対して、MGMTが発現している患者群のそれは14.8%という臨床試験結果が報告されている<sup>2)</sup>。また、MGMTの発現制御機構の一つとして、エピジェネティックな制御が知られており、ゲノムDNA上のMGMT遺伝子のCpG islandのメチル化の有無が、がんの悪性度、予後を左右することも報告されている<sup>4)</sup>。

このように、神経膠芽腫の化学療法においてMGMTの発現がTMZによる治療の奏効を決定付けることから、MGMTを標的とした創薬研究が行われている<sup>5)6)</sup>。既知のMGMT阻害化合物としては、Lomeguatrib (LOM, Fig. 2) が知られており、その作用機序は偽基質としてMGMTを不活化する<sup>4)</sup>。また、結腸直腸がんや悪性黒色腫に対して、LOMとTMZを併用した臨床第2相試験が行われている。しかし、LOMが神経膠芽腫に対して有効であるという報告はまだなされていない<sup>7)8)</sup>。加えて、これまでに複数の研究グループからMGMT阻害薬の創製についての報告があるが、臨床で使用可能な阻害薬の開発は未だにないのが

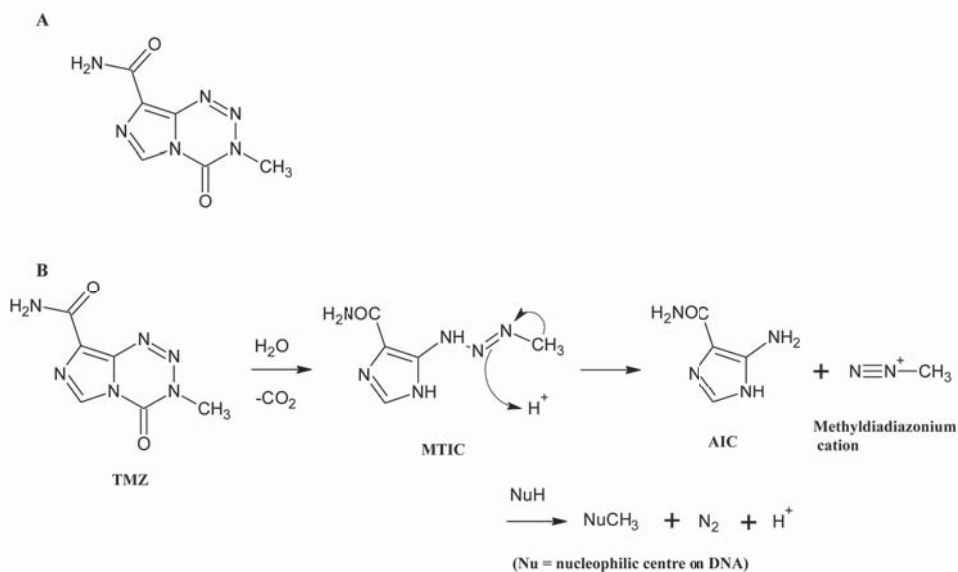


Fig.1. Chemical structure and action mechanisms of TMZ.

(A) The structure of Temozolomide (TMZ). (B) The action mechanisms of TMZ. TMZ undergoes spontaneous breakdown to form monomethyl triazene 5-(3-methyl-1H-imidazol-5-yl)-imidazole-4-carboxamide (MTIC). MTIC reacts with water to liberate 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) and the highly reactive methyl diazonium cation.

現状である<sup>9)10)</sup>。

一方、MGMT阻害薬の評価系として、リコンビナントMGMTと<sup>3</sup>Hメチル化DNAを用いて、<sup>3</sup>Hメチル基のMGMTへの転移を液体シンチレーションカウンターで測定する*in vitro*系が報告されている<sup>9)</sup>。しかし、新規MGMT阻害候補化合物を探索・創製するための評価系として、ラジオアイソトープを用いる系は、実験操作が煩雑であり、RI施設も必要とすることから、ボトルネックになっていると考えられる。そこで本研究では、TMZ耐性神経膠芽腫に対する新規MGMT阻害薬探索のためのスクリーニング系として、MGMTを発現しているヒト神経膠芽腫細胞T98Gを用いた簡便で、かつ直接細胞レベルで阻害活性を評価可能な実験系を構築したので報告する。

## II. 材料と方法

### 1. 試薬

TMZ (LKT Laboratories, #T1849) と既知MGMT阻害薬LOM (SIGMA, #SML0586) は、DMSO (SIGMA, #D2650) に溶解した。LOMは、MGMTの活性部位であるシステイン残基 (Cys 145) が、LOMのベンジル部位を偽基質として取り込むことによって、MGMTを不活化することが知られている<sup>4)</sup>。

### 2. 細胞と細胞培養

本研究では、ヒト神経膠芽腫細胞でMGMTが発現しているT98G細胞株と発現していないU87MG細胞株を用いた。T98G細胞は、RPMI-1640培地 (Wako, #189-02025)、U87MG細胞は

E-MEM培地 (Wako, #051-07615) で細胞培養した。それぞれの培地には、10% ウシ胎児血清 (FBS, Biosera, #FB-1061/500)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Wako, #168-23191) を添加して使用した。

### 3. WST-8による細胞増殖抑制効果の評価

各細胞を96 well plateに $1 \times 10^3$  cells/wellで播種し、24時間後にTMZ (0, 1, 10, 30, 100, 300, 1000  $\mu$ M) を作用させた。さらに72時間後にCell Counting Kit-8 (DOJINDO, #CK04) を10  $\mu$ L/wellで添加した後に、マイクロプレートリーダー infinite M200 (TECAN) を用いて、吸光度を測定した。

### 4. コロニー形成法による細胞増殖抑制効果の評価

T98G細胞を6 well plateに200 cells/wellで播種し、24時間後にTMZ (0, 10, 30, 100, 300, 1000  $\mu$ M) または、LOM (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ M) を作用させた。10日間培養後、4%中性緩衝ホルマリンで細胞を固定し、0.01% (w/v) クリスタルバイオレットで染色を行った。風乾後、コロニー数を計数した。また、TMZとLOMとの併用による細胞増殖抑制効果を調べるために、T98G細胞を6 well plateの各ウェルに200 cells/wellで播種し、24時間培養した後に、LOM (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1  $\mu$ M) を作用させ、その30分後に200  $\mu$ MのTMZを処理した。10日間培養した後、コロニー形成法により細胞増殖抑制効果の評価した。

### 5. ウエスタンブロット法

T98G細胞とU87MG細胞のMGMTのタンパク質発現レベルをウエスタンブロット法によって解析した。各培養細胞を回収し、氷冷した $1 \times$  PBSで2回洗浄後、遠心 (260  $\times$  g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) し、細胞ペレットを得た。この細胞ペレットに10%  $\beta$ -メルカプトエタノール (Wako, #135-07522) 含有laemmli サンプルバッファー (Bio-Rad, #1610737) を加え、100 $^{\circ}$ Cで8分間加熱した。氷上で5分間静置し、遠心 (15,000  $\times$  g, 15min, 4 $^{\circ}$ C) 後、上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析した。12%ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad, Mini-PROTEAN TGX, # 4561045) を用いて、細胞抽出液 (5  $\times$  10<sup>4</sup> cells 相当/ lane) を200 V, 35分間、電気泳動をした。泳動終了後、セミドライ

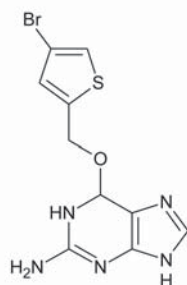


Fig.2. Chemical structure of Lomeguatrib (LOM).  
The structure of Lomeguatrib (LOM).

法でゲルからPVDFメンブレンにタンパク質を転写した。このメンブレンを室温で1時間、ブロッキングバッファーでブロッキングした。ブロッキング剤には、スキムミルク (wako, #190-12865) を用いた。その後、一次抗体を、4°Cで一晩反応させた。メンブレンを洗浄後、二次抗体を室温で1時間反応させた。目的タンパク質の検出には、検出試薬 Immobilon Western HRP Substrate Peroxide Solution (MILLIPORE, #WBKL-00-500) を用いて、ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) で行った。一次抗体は、anti-MGMT antibody (CST, #2739, 1:1000), あるいは anti-GAPDH antibody (TREVIGEN, #2275-PC, 1:20,000) を用いた。二次抗体は、anti-rabbit IgG HRP-Linked Whole Ab Donkey (GE-Healthcare, #NA934, 1:20,000) を用いた。

### III. 結 果

#### 1. ヒト神経膠芽腫細胞株 T98G および U87MG 細胞に対する TMZ の細胞増殖抑制効果

ヒト神経膠芽腫細胞株 T98G と U87MG 細胞の

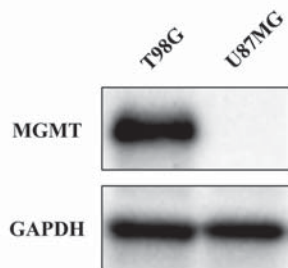


Fig.3. Protein levels of MGMT in T98G and U87MG cells.

The protein levels of MGMT and GAPDH were analyzed by western blot analysis. Cell lysates of T98G and U87MG cells were subjected to 12% SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibodies against MGMT and GAPDH. The protein level of GAPDH was used as an internal control.

Table 1. Antitumor activities of TMZ in human glioblastoma cell lines, T98G and U87MG cells.

|       | MGMT | EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |                  |
|-------|------|-----------------------------|------------------|
|       |      | WST                         | Colony formation |
| T98G  | +    | 390                         | 420              |
| U87MG | -    | 28                          | N.D.             |

Effects of TMZ on cell viabilities in human glioblastoma cell lines, T98G and U87MG cells, were evaluated by WST-8 and colonogenic assays.

N.D.; not detected

MGMTタンパク質レベルをウエスタンブロット法で解析した (Fig. 3)。内部標準タンパク質として GAPDH を使用した。予想通り、T98G 細胞では MGMT が検出されたが、U87MG 細胞ではその発現は認められなかった。つぎに、WST-8 法により、T98G (MGMT+) と U87MG (MGMT-) に対する TMZ の細胞増殖抑制効果を調べた。その結果、T98G (MGMT+) と U87MG (MGMT-) 細胞に対する TMZ の EC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 390  $\mu$ M と 28  $\mu$ M であった (Table 1)。また、コロニー形成法による、T98G (MGMT+) 細胞に対する TMZ の EC<sub>50</sub> 値は、420  $\mu$ M であった。しかし、U87MG (MGMT-) 細胞は、コロニー形成能が低いため、この方法での EC<sub>50</sub> 値の測定は出来なかった (Table 1)。これらの結果から、MGMT の発現によって、TMZ の抗腫瘍効果は減弱されることが示された。

#### 2. ヒト神経膠芽腫細胞株 T98G 細胞に対する LOM 単独処理の細胞増殖に及ぼす影響

コロニー形成法により、T98G (MGMT+) 細胞に対して LOM を単独処理した結果を Fig.4A に示す。LOM を 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ M の各

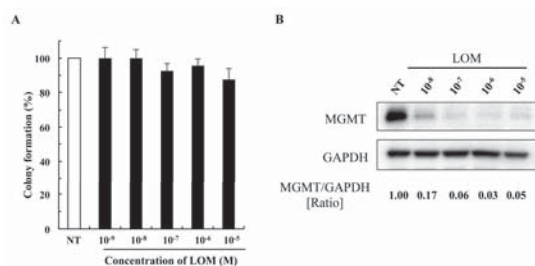


Fig.4. Anticancer activities of the single treatment with LOM in T98G cells.

The effect of LOM in MGMT-expressed T98G cells was evaluated by colonogenic assay. (A) T98G cells were treated with the indicated concentrations of LOM. The level of colony formation in non-treated cells (NT) was assigned as 100%. Values are mean  $\pm$  SE for two independent experiments in duplicate. (B) The change of MGMT protein level by the treatment of LOM in T98G cells. The protein levels of MGMT and GAPDH were examined by western blot analysis. T98G cells were treated with vehicle (NT, nontreated) or LOM (indicated concentration) for 72 hr. Cell lysates were subjected to 12% SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibodies against MGMT and GAPDH. The level of MGMT protein was represented by the ratio of MGMT density to GAPDH density relative to the non-treated stage. The protein level of GAPDH was used as an internal control.

濃度で作用させても、細胞増殖抑制効果はみられなかった (Fig. 4A)。この結果は、LOMそのものは細胞増殖抑制効果を有していないことを示している。

つぎに、T98G細胞にLOMを単独で作用 (0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ M) した時のMGMTタンパク質レベルの変化を調べた。Fig. 4Bに示すように、LOM単独処理では、細胞増殖抑制効果を示さない濃度域において、LOMの濃度依存的にMGMTのタンパク質レベルが減少することが明らかになった。

### 3. ヒト神経膠芽腫細胞株T98G細胞に対するTMZ / LOM併用による細胞増殖抑制効果

コロニー形成法を用いて、T98G細胞に対するTMZとLOMとの併用効果を調べた (Fig. 5)。ここで併用するTMZの濃度は、LOMの併用効果を見やすくするために、TMZ単独処理でT98G細胞のコロニー形成能を10-20%抑制する濃度である200  $\mu$ Mとした。TMZ (200  $\mu$ M) とLOM (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1  $\mu$ M) を併用処理し、10日間細胞培養した。その結果、TMZ 200  $\mu$ MとLOM 1  $\mu$ Mとの併用により、TMZによる細胞増殖抑制効果がコロニー形成能で、TMZ単独処理時の96%から2%までに減少し、その併用効果は約45倍に増強されることが明らかになった。

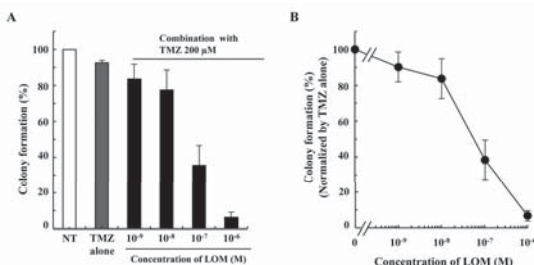


Fig. 5. Anticancer activities of the combination of TMZ with LOM in T98G cells.

T98G cells were treated with TMZ 200  $\mu$ M and various concentrations of LOM. The colony formation assay was performed and the relative values were calculated at each sample. (A) The level in non-treated cells (NT) was assigned as 100%. Values are mean  $\pm$  SE for two independent experiments in duplicate. (B) The level of colony formation in TMZ-treated cells without LOM (TMZ alone) was assigned as 100%.

## IV. 考 察

神経膠芽腫は、WHO分類においてGrade IVに分類される悪性腫瘍の中でもっとも予後不良な腫瘍の一つである。治療法として手術が選択されるが、腫瘍部位や腫瘍細胞の浸潤性から、すべての腫瘍を摘出することは困難である。また、放射線療法も照射部位に制約もあることから、化学療法が重要な役割を果たすと考えられる。しかし、神経膠芽腫に対する抗がん剤としては、アルキル化剤のTMZが第一選択薬となっているものの、十分な効果が得られていないのが現状である。その大きな原因の一つとして、脱アルキル化を触媒する酵素、MGMTの発現が示唆されている。

MGMTは、DNA修復酵素の一つであり、MGMTが発現している患者群では、TMZによってメチル化されたグアニンが脱メチル化されるため、TMZの効果が減弱するという報告がある<sup>2)</sup>。また、MGMTのプロモーター領域 (CpG island) のメチル化の度合いによって、TMZなどのアルキル化剤に対する感受性が影響を受けることが知られている<sup>4)11)</sup>。したがって、神経膠芽腫の治療において、MGMTプロモーターのメチル化の程度を測定することも重要であると考えられている。

このような背景のもとに、現在、MGMT阻害薬の開発が行われており、MGMTの活性部位であるシステイン残基 (Cys145) に偽基質として作用するLOMが見出されている<sup>4)</sup>。しかし、神経膠芽腫に対して有効であるという報告はなく、さらに臨床試験において骨髄抑制などの副作用の問題が挙げられている<sup>7)</sup>。一方で、MGMT阻害薬のスクリーニング系は、リコンビナントMGMTと<sup>3</sup>Hメチル化DNAを用いた*in vitro*系で行なわれており、<sup>3</sup>Hメチル基のMGMTへの転移を液体シンチレーションカウンターで測定している<sup>8)</sup>。このスクリーニング系は、ラジオアイソトープを使用することから、実験操作が煩雑であり、RI施設も必要とすることから、阻害薬開発の障害となっていると考えられる。そこで、我々は、MGMTを発現しているヒト神経膠芽腫細胞T98Gを用いた簡便で、かつ直接細胞レベルで阻害活性を評価可能なMGMT阻害薬スクリーニング法を

構築した。

今回、我々が確立したスクリーニング法の妥当性を評価するために、MGMT阻害化合物として市販されているLOMをポジティブ対照化合物とし、MGMT発現ヒト神経膠芽腫細胞株 (T98G) を用いて、TMZとの併用効果を調べた。LOMは、その単独処理では細胞増殖抑制効果を示さないが (Fig. 4A)、MGMTの発現をタンパク質レベルで減少させることが判明した (Fig. 4B)。MGMTは、ユビキチン経路を介して分解されるという報告がある<sup>12)</sup>。我々の結果は、腫瘍細胞においてLOMがMGMTに結合して不活化がされると、その後、プロテアソーム系が作動して、MGMTタンパク質を分解消去することを示唆する。また、この作用によって、TMZのようなアルキル化剤の効果が増強されると考えられる。このような作用を有するLOMとTMZとの併用は、MGMT発現細胞において、予想通り、TMZ単独処理よりも強い増殖抑制効果を示した (Fig. 4B)。その増強効果が約45倍であったことは、特筆すべきことである。

以上の結果から、本スクリーニング系を用いることで、つぎの項目を指標として、TMZとの併用を可能にするMGMT阻害候補化合物を簡便かつ直接細胞レベルで評価出来ると考えられる。(1) 検体候補化合物の単独処理時では、細胞増殖抑制効果も、抗がん作用も示さない。(2) 検体候補化合物の単独処理時では、細胞増殖抑制効果を示さない濃度域で、MGMTをタンパク質レベルで分解する。(3) 検体候補化合物は、TMZと併用することで、TMZの細胞増殖抑制効果を増強する。本スクリーニング系を用いて、上記の指標項目をクリアした化合物が新規MGMT阻害薬として、TMZとの併用がん化学療法確立のための新薬開発候補化合物と成り得ることが期待される。

## V. 結 語

本研究において、我々が構築したスクリーニング系は、簡便であり、細胞レベルで直接的にTMZの様なアルキル化抗がん薬との併用効果を評価できることから、TMZとの併用を可能とする新規MGMT阻害薬創製のために有用であると

考えられる。現在、本スクリーニング系を用いて、TMZ耐性の患者にも有効な治療薬と成り得る新規MGMT阻害薬の創製研究を進めている。

本研究はJSPS科研費26670648の助成による。

著者の利益相反 (conflict of interest : COI) 開示 :

本論文の研究内容に関連して特に申告なし

## 文 献

- 1) Stupp R, Mason W, Bent M, Wellwe M, Fisher B, Taphoorn M, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352: 987-96.
- 2) Stupp R, Hegi M, Mason W, Bent M, Taphoorn M, Janzer R, et al. Effect of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomized phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 459-66.
- 3) Zhang J, Stevens M, Bradshaw T. Temozolomide: Mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 2012; 5: 102-14.
- 4) Malley D, Hamoudi R, Kocalkowski S, Pearson D, Collins V, Ichimura K, et al. A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma and xenografts. *Acta Neuropathol.* 2011; 121: 651-61.
- 5) McMurry T. MGMT inhibitors-The Trinity College-Paterson Institute experience, a chemist's perception. *DNA Repair.* 2007; 6: 1161-9.
- 6) Fan CH, Liu WL, Cao H, Wen C, Chen L, Jiang G. O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e876.
- 7) Khan O, Ranson M, Michael M, Olver I, Levitt N, Mortimer P, et al. A phase II trial of lomeguatrib and temozolomide in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2008; 98: 1614-8.
- 8) Tawbi H, Villaruz L, Tarhini A, Moschos S, Sukecki M, Viverette F, et al. Inhibition of DNA repair with MGMT pseudosubstrates: phase I study of lomeguatrib in combination with dacarbazine in patients with advanced melanoma and other solid tumors. *Br J Cancer.* 2011; 105: 773-7.
- 9) Ruiz F, Gil-Redondo R, Morreale A, Ortiz A, Fabrega C, Bravo J, et al. Structure-Based Discovery of Novel Non-nucleosidic DNA Alkyltransferase Inhibitors: Virtual

- Screening and *in Vitro* and *in Vivo* Activities. J Chem Inf Model. 2008; 48: 844-54.
- 10) Bogden JM, Eastman A, Bresnick E. A system in mouse liver for the repair of *O*<sup>6</sup>-methylguanine lesions in methylated DNA. Nucleic Acids Res. 1981; 9: 3089-103.
- 11) Beier D, Röhrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, et al. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. Cancer Res. 2008; 68: 5706-15.
- 12) Srivenugopal K, Yuan X, Friedman H, Ali-Osman F. Ubiquitination-Dependent Proteolysis of *O*<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase in Human and Murine Tumor Cells following Inactivation with *O*<sup>6</sup>-Benzylguanine or 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Biochemistry. 1996; 35: 1328-34.