

特集：肝臓の発生・再生

マーカー分子による肝幹／前駆細胞の性状解析

田 中 稔

生体には様々な機能細胞が存在し、固有の遺伝子発現制御に基づき数多くのタンパク質を発現している。その中でも細胞種を特徴づける分子はマーカーと呼ばれ、細胞種の分類や同定に利用されている。特に細胞膜に発現する細胞表面マーカー分子は細胞種の同定に留まらず、その抗体を用いることで特定の細胞種のみを生きたまま純化することにも利用可能である。そのため、細胞レベルでの解析においては非常に有用なツールとなっている。幹細胞研究においてもこれまでに数多くの細胞表面マーカー分子が見出されており、幹細胞の実体の解明に寄与している。本総説では、マーカー分子による肝臓の幹／前駆細胞の性状解析について、最近明らかになってきた知見とともに今後の課題についても概説する。

1. はじめに

幹細胞とは一般的に自己複製 (self-renew) する能力と複数の細胞種に分化する能力 (multipotency) を兼ね備えた細胞と定義される。近年、iPS 細胞の作出により終末分化した細胞でも必要な遺伝子を導入することで、全能性の幹細胞となりうることが示された。一方、発生過程においては、ES 細胞に代表される全能性を持った細胞が、やがて様々な器官を構成する細胞へと分化し個体が形成されていく。この過程において、大部分の細胞は未分化性を失うが、一部の細胞はその分化能は制限されるものの幹細胞としての能力を保持し続け、個体における恒常性の維持 (ホメオスタシス) や組織の修復などに寄与することが明らかとなってきている。このような細胞は体性幹細胞や組織幹細胞と呼ばれ、血液幹細胞や神経幹細胞、間葉系幹細胞などが知られる。その他の臓器や組織においても組織幹細胞が存在することが次々に報告され、再生医療や創薬の分野

でその応用が期待されており、幹細胞システムの解明は現在ホットな分野となっている。本稿では肝臓における幹細胞について、抗体を用いた細胞分離による解析を中心にその性状や役割に関する最近の知見を紹介する。

2. 肝臓の構造と肝幹細胞

肝臓は体内最大の重量をなす実質臓器であり、生命を維持する上で必須の代謝器官である。肝臓は「生体の化学工場」に例えられることから分かるように、各種の代謝、解毒、胆汁の産生、血清タンパク質の産生など実に多様な機能を発揮している。これらの機能の大部分は肝実質細胞である肝細胞 (hepatocyte) によって担われる。肝臓には小腸より栄養に富んだ血液が門脈という血管を通して流入し、肝特有の毛細血管網である類洞を経由して、中心静脈から肝臓外へと出て行く (本特集号の塩尻の項参照)。肝細胞は類洞に沿って一列に配置され、血液と肝細胞間の効率の良い物質交換を実現している。一方、肝細胞が産生する胆汁は肝細胞間に形成された毛細胆管を通して、門脈の周囲に存在する肝内胆管へと集められ、肝外に存在する胆管を経由して最終的に十二指腸へと排出される。このように肝臓には肝内胆管を構成する上皮細胞 (biliary epithelial cell) と肝細胞という二つの上皮細胞が存在するが、これらの細胞は肝発生過程で肝芽細胞と呼ばれる共通前駆細胞からそれぞれ分化してくることが知られている。すなわ

東京大学分子細胞生物学研究所 (〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1)

Characterization of hepatic stem/progenitor cells by molecular markers

Minoru Tanaka (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, the University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan)

ち、肝臓の幹細胞の定義の一つである多分化能とは、肝細胞と胆管上皮細胞への二方向性の分化能を指す。これまでに体性幹細胞研究で最も進んだ分野としては、血液幹細胞研究が挙げられる。今から15年以上も前にマウスを用いた実験系で、骨髄に移植されたたった一つの血液幹細胞が生涯にわたって成体の造血系に寄与しうることが示され、幹細胞の定義である自己複製能と多分化能が見事に証明された¹⁾。この成功の裏には、マーカーと呼ばれる細胞種に固有の表面抗原に対する抗体を用いて細胞を標識し、雑多な細胞集団の中から目的の細胞のみを分離することができるFACS (fluorescence activated cell sorting) 法の応用と、分離した細胞を評価するための *in vitro* でのコロニーアッセイ法、*in vivo* で幹細胞を評価しうる移植系が確立されていたことがあった。一方、肝臓の幹細胞については、マーカー分子に関する研究が進んでおらず、細胞レベルでの解析は遅れをとっていたが、2000年代に入って徐々にその実体が明らかとなってきた。

3. 胎児期の肝幹細胞

個体の発生では、未分化な細胞が様々な刺激や環境により器官特有の細胞へと分化することで器官が形成されていくことが知られる。肝臓の発生はマウスでは胎齢8日頃に、心臓原基に近接する前腸内胚葉上皮の一部が肥厚・突出することに始まる。横中隔間充織に向かって浸潤した細胞が肝臓の細胞へと運命決定 (コミットメント) を受け、肝芽細胞と呼ばれる細胞集団となり肝芽を形成する (図1)。このようなコミットメントには心臓中胚葉からの線維芽細胞増殖因子 (FGF) シグナルと横中隔間充織からの骨形成タンパク質 (BMP) シグナルが重要な役割を果たすとされている^{2,3)}。また、肝芽細胞の増殖・浸潤には内皮細胞が重要な役割を果たす⁴⁾。胎齢9日頃になると、Hex, GATA4 や肝細胞核因子 4 α (HNF4 α) といった転写因子、肝特異的遺伝子であるアルブミンや α フェトプロテイン (Afp) の発現を以て、肝芽細胞は認識されるようになる。

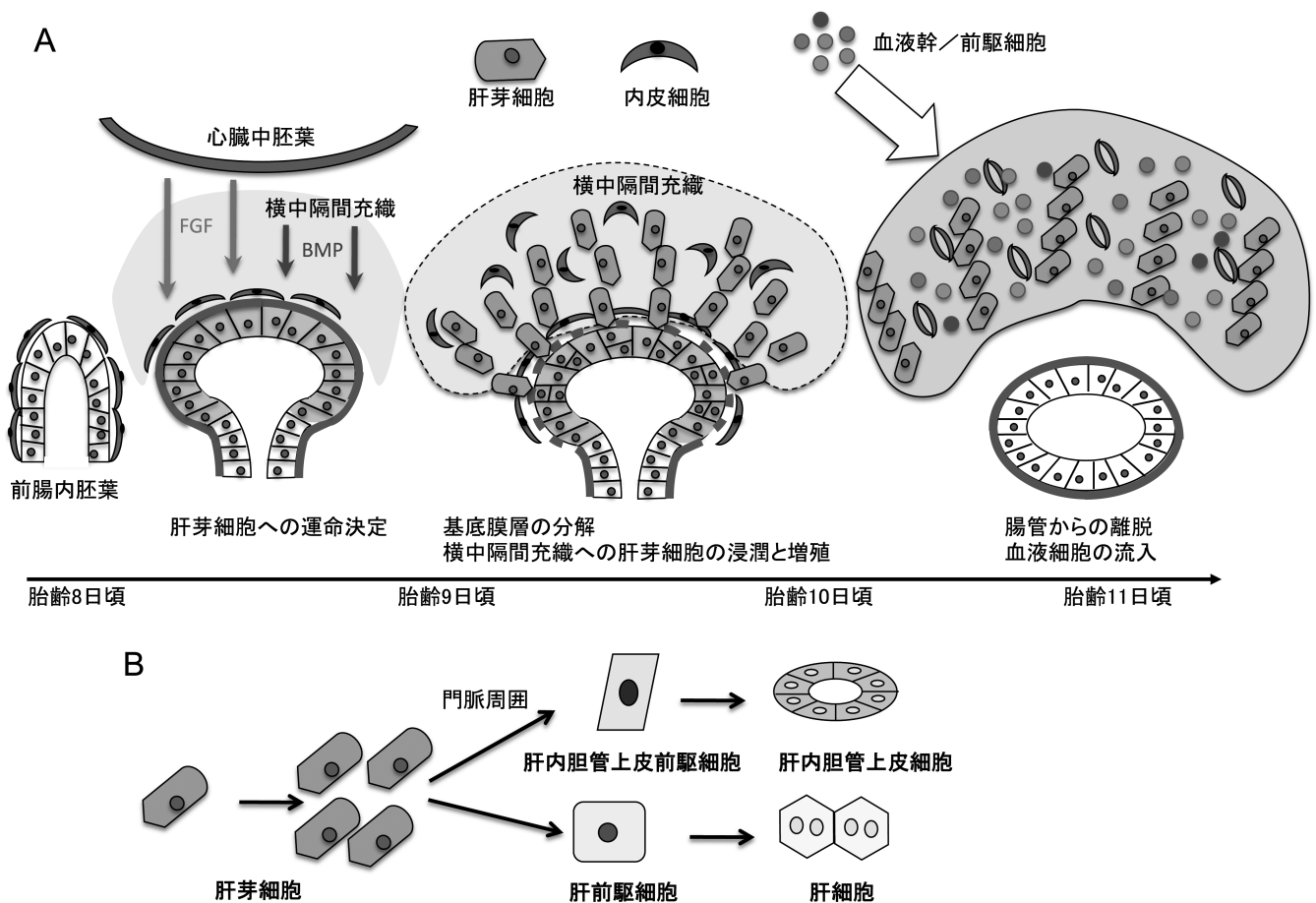


図1 肝臓の発生

(A) マウスでは胎齢8日頃に前腸内胚葉細胞は心臓中胚葉からの FGF シグナルや横中隔間充織からの BMP シグナルを受け、肝芽細胞へと運命決定される。その後、肝芽に隣接する内皮細胞の働きにより、肝芽細胞は横中隔間充織へと増殖しながら浸潤していく。やがて、肝臓は腸管から分離し、一時的に血液細胞を増やすための造血器官として機能する。(B) 胎齢中期以降、肝芽細胞は活発に増殖し、胎齢16日頃になると門脈に隣接する肝芽細胞は胆管上皮細胞への分化を開始する。

この頃の肝臓では成体肝細胞で見られるような多くの代謝関連酵素群の遺伝子は発現しておらず、代謝機能はほとんどなく、むしろ造血器官として働く。肝芽細胞が活発に増殖することで肝臓は大きくなっていくが、肝細胞と胆管上皮細胞への二方向性の分化は胎齢 16 日頃に始まり、門脈に隣接する肝芽細胞は胆管へとコミットメントを受け、それ以外の肝芽細胞は肝細胞へと分化・成熟していく。胆管上皮細胞のコミットメントには Notch シグナルやトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β) シグナルが関与することが知られている⁵⁾。肝芽細胞は旺盛な増殖能と二分化能を有することから胎児期の肝幹/前駆細胞であると考えられてきた。この肝芽細胞の性状を明らかにするべく、血液幹細胞研究に倣いマーカー分子を用いて肝芽細胞を分離しようとする試みがなされてきた。Suzuki らは FACS 法を用いた細胞分離と H-CFU-C (hepatic colony-forming unit in culture) と呼ばれる *in vitro* でのコロニー形成能を指標として、胎齢 13.5 日のマウス胎仔肝臓の非血球画分 (CD45⁻, TER119⁻) のうち、CD49f (インテグリン $\alpha 6$) と CD29 (インテグリン $\beta 1$) を発現し、c-kit を発現しない細胞画分 (c-kit⁻ CD49f⁺ CD29⁺ CD45⁻ TER119⁻) に、高い増殖能と肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有する肝芽細胞が含まれることを示した⁶⁾。一方、Kubota らは胎齢 13 日のラット胎仔肝臓から RT1A⁺OX18^{low} ICAM-1⁺細胞を単離し、その中に肝芽細胞が含まれることを報告している⁷⁾。我々もマウス肝芽細胞マーカー分子として Delta-like 1 homolog (DLK1) を同定しており⁸⁾、胎齢 11 日の肝芽細胞は epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) と DLK1 を共発現することを報告している (図 2)⁹⁾。

4. 成体肝臓の幹細胞

肝臓は古くより再生能の高い臓器として知られており、この能力が生体肝移植を可能にしている。マウスを用いた実験では、肝臓の約 70% 相当を切除しても、残存した肝臓が増殖し 1 週間から 10 日程度で元の肝重量に回復することが知られている。この場合の肝再生は、分化した肝細胞が単純に分裂すること (simple duplication) によりなされる。この系では残存した 30% の肝細胞が 2 回に満たない細胞分裂を起こせば、計算上は元の細胞数を回復することになる。一方、肝細胞が持続的に破壊される表現型を持つ urokinase plasminogen activator (uPA) トランスジェニックマウスをレシピエントとして用いた移植系では、移植された野生型の肝細胞は平均 12 回以上の細胞分裂を行ない、レシピエントの肝臓の大部分を再生したと報告されている¹⁰⁾。また、遺伝性高チロシン血症 I 型のモデルマウスでもある fumarylacetoacetate hydrolase (Fah) ノックアウト (KO) マウスも持続的に肝細胞が破壊されることが知られるが、このマウスをレシピエントとして用いた移植系にお

いても、移植された野生型肝細胞は分裂を繰り返してレシピエントの肝再生に寄与する。興味深いことに、移植 8 週間後に回収したドナー肝細胞は、次々と Fah KO マウスに移植を繰り返すこと (serial transplantation) が可能であり、少なくとも 6 世代にわたって肝再生に寄与し続けたと報告されている¹¹⁾。この間、平均 69 回以上に相当する細胞分裂がなされた計算となり、serial transplantation は幹細胞の定義の一つとされることから、肝細胞は実質無限に増殖する幹細胞 (monopotent stem cell) であるとする意見もある。このように、肝細胞自体が旺盛な肝再生能を有したことから、肝臓には肝幹細胞のような細胞は必要なく、その存在には懐疑的な意見が支配的であった。それでもなお、肝臓には組織幹細胞が存在するとの意見も根強くあり、次に示すオーバル細胞はその候補の一つと考えられた。

5. オーバル細胞とは

オーバル細胞はラットの発がんモデルにおいて肝臓内に出現する「小型の卵形の細胞」として 1956 年に Farber らにより初めて報告されて以来¹²⁾、肝臓の幹細胞や肝がんの元になる細胞の候補として、様々な興味の対象となってきた。通常、肝切除後の肝再生や肝障害モデルとしてよく用いられる四塩化炭素投与後の肝再生では、このような形態の細胞は出現しない。これは、肝細胞の増殖性が元来高く、simple duplication により再生が完了するためと考えられるが、1987 年になって Thorgeirsson らは、ラットに 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) という発がん性物質を投与して肝細胞の増殖を制限した状況下で部分肝切除 (2-AAF/PHx) を行うと、門脈域にオーバル細胞が増殖してくると報告した¹³⁾。このオーバル細胞は肝細胞索と胆管の境界領域にあたるヘリング管 (canal of Hering) に由来すると考えられ、肝細胞マーカー分子 (アルブミンや AFP など) と胆管上皮細胞マーカー分子 (CK19 や CK7 など) の両方を発現していたことから、肝発生期の肝芽細胞のように増殖能と二分化能を併せ持つ幹細胞または前駆細胞であると考えられるようになった。このように、オーバル細胞は通常の肝細胞による肝再生ができない場合に、修復のために出現する“facultative stem cell”であるとする考えが広まった。しかし、オーバル細胞の分離に適したマーカー分子が不明であったことから、細胞レベルでの解析は進まず、その実体が明らかになってくるまでには、さらに 20 年近くを要することとなった。

6. 障害肝のオーバル細胞は成体肝臓の幹細胞か？

オーバル細胞はラットの発がんモデルから見いだされ、その後様々な誘導条件が報告されたこともあり、ラットを用いた研究が先行する形となった。動物種間の薬剤感受性の違いなどにより、ラットでのオーバル細胞の誘導条件が

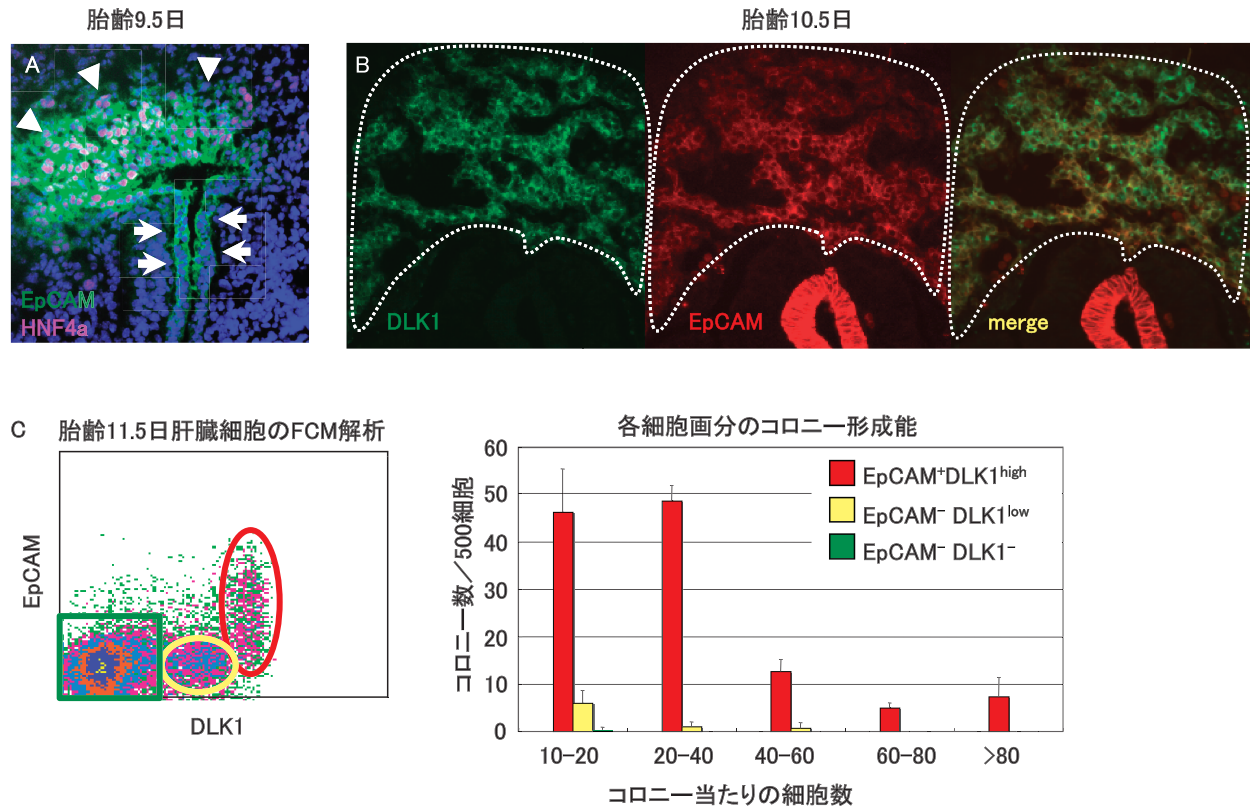


図2 肝芽におけるEpCAMとDLK1の発現

(A) 胎齢9.5日の肝芽におけるEpCAMとHNF4αの免疫組織染色。EpCAM陽性の前腸内胚葉細胞(矢印)は横中隔間充組織へと浸潤し、HNF4α陽性細胞(矢頭)の肝芽細胞へ分化する。(B) 胎齢10.5日の肝原基におけるEpCAMとDLK1の免疫組織染色。肝細胞索を形成しながら増殖する肝芽細胞はEpCAMとDLK1を共発現している。(C) 胎齢11.5日の肝臓細胞のフローサイトメトリー(FCM)解析とコロニーアッセイ。DLK1とEpCAMの抗体を用いてFCM解析を行うと、大きく三つの細胞集団に分かれる。コロニー形成能の高い肝芽細胞はDLK1とEpCAMを共発現する。

必ずしもマウスではオーバル細胞を誘導しなかったこともあり、マウスを用いたオーバル細胞の研究は遅れを取ったが、マウスにオーバル細胞を誘導する薬剤が報告されるようになり、しだいに研究も盛んになっていった。肝芽細胞の研究と同様に、オーバル細胞についてもマーカー分子による細胞分離と*in vitro*でのコロニー形成能や移植による*in vivo*での評価により、その性状を明らかにしようとする試みがなされた。Grompeらはマウスに3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)と呼ばれる薬剤の混餌食を投与することでオーバル細胞を誘導し、肝臓の非実質細胞画分から密度勾配法を用いた比重による分類と細胞の大きさを指標に、F2 fractionと呼ばれる画分にオーバル細胞が濃縮されることを示した¹⁴⁾。さらに、F2 fractionのうちc-kit⁺/CD45⁻画分が、Fah KOマウスを用いた移植系において良好に肝再生に寄与しうるオーバル細胞を含むと結論づけている。しかしながら、比重や細胞径による分類は比較的粗い分類であることに加え、この系では主に肝細胞への分化のみが評価されており、クローナリティや二分化能については論じられなかった。Dabevaら

はラットのオーバル細胞のマーカー分子としてEpCAMを報告し、2AAF/PHxによる障害肝より分離したEpCAM陽性細胞を肝障害モデルラットに移植すると肝細胞や胆管上皮細胞へと分化して肝再生に寄与したとしている¹⁵⁾。しかし、血液幹細胞の場合とは異なり、肝幹細胞を1細胞移植するだけで肝臓を再建することは事実上困難であることから、この実験には $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個の細胞が移植に用いられており、オーバル細胞が実際に自己複製し二分化能を有するような細胞であるのか否かについては不明であった。また、SuzukiらはDDC投与によりオーバル細胞を誘導したマウス肝臓の非実質細胞画分のうち、CD133⁺TER119⁻CD45⁻細胞画分に*in vitro*で大きなコロニーを形成する細胞(large colony-forming cell:LCC)が含まれることを示した¹⁶⁾。さらに、この細胞はクローナルな解析により肝幹細胞の性質を有することが示された。また、障害を与えていない正常肝臓から同様の細胞画分を調製した場合には、large colonyの形成は見られなかったことから、LCCはfacultative stem cellの様相を呈した。一方、我々はマウスのオーバル細胞マーカー分子としてEpCAMと

TROP2 を同定した¹⁷⁾。オーバル細胞は障害時に胆管付近から出現することに加え、既知のマーカーとして知られる分子 (CK19, A6, OV6 など) のほとんどが正常胆管でも発現する分子であったことから、明確に胆管上皮細胞と区別することはこれまで困難であった。実際、CD133 や EpCAM も正常胆管で強く発現する分子であったが、TROP2 は正常胆管では発現しておらず、オーバル細胞特異のマーカーと言える分子であった (図 3)。我々は DDC 投与マウスの肝臓からこれらのマーカーを用いてオーバル細胞を調製し、*in vitro* コロニー形成によるクローナルな解析を行った結果、この細胞画分に増殖能と二方向性分化能を併せ持つ幹細胞の性質を示す細胞が含まれることを示した (図 4)。しかし、このような細胞は Suzuki らの報告と異なり、正常肝臓の EpCAM 陽性細胞中にも存在し、その存在頻度やコロニー形成能は肝障害前後でほとんど変動しなかった。以上の結果から、DDC 肝障害により増殖しているオーバル細胞のほとんどは、真の肝幹細胞というよりはむしろ増殖能を制限された前駆細胞 (transit amplifying cell) に近い細胞であると結論づけた。

7. 正常肝の幹細胞と今後の課題

正常肝の EpCAM 陽性細胞中に *in vitro* で幹細胞の性質を示す細胞が存在することを述べたが、Kamiya らも正常肝の CD133+CD13+CD49f+細胞画分にクローナルに増殖し、二方向性分化能を有する肝幹/前駆細胞様細胞が含まれることを報告している¹⁸⁾。肝臓は肝細胞による再生能

が高いために組織幹細胞自体が存在しない (する必要性がない) との考えもあったが、成体肝にも確かに肝幹細胞が存在し、prospective な解析からそれらは EpCAM と CD133 を共に発現していることが明らかとなった。しかし、これらの細胞は実際に肝障害時に生体内で再生に寄与しているのか、またオーバル細胞はこれらの細胞に由来するのかなど、不明な点も残されている。加えて、肝細胞も *in vitro* で培養条件により胆管上皮細胞様細胞に分化転換 (Trans-differentiation) することが示されるなど¹⁹⁾、肝再生には複数の修復パスウェイが存在するものと考えられ、障害時の肝再生は慎重に解析していく必要がある。一方、正常肝におけるホメオスタシスの一環としての肝細胞の維持にも、EpCAM+CD133+の肝幹細胞がどのように寄与しているのかについて興味を持たれる。これについては、Kawaguchi らが転写因子である Sox9 による lineage-tracing を行った結果、Sox9 陽性細胞が肝細胞の供給源となっていることを報告している²⁰⁾。EpCAM, CD133, Sox9 はいずれも成体肝臓の胆管上皮細胞に発現する分子であることから、これらのマーカーだけでは胆管上皮細胞と肝幹細胞の正確な分類には至っておらず、肝幹細胞としての能力は胆管上皮細胞すべてに備わっているのか、それとも胆管に埋もれて存在する一部の細胞のみに賦与された能力であるのかは、さらなるマーカー分子の発見を待たねばならない。最後に現在考えられる肝臓の幹細胞システムのモデル図を示す (図 5)。

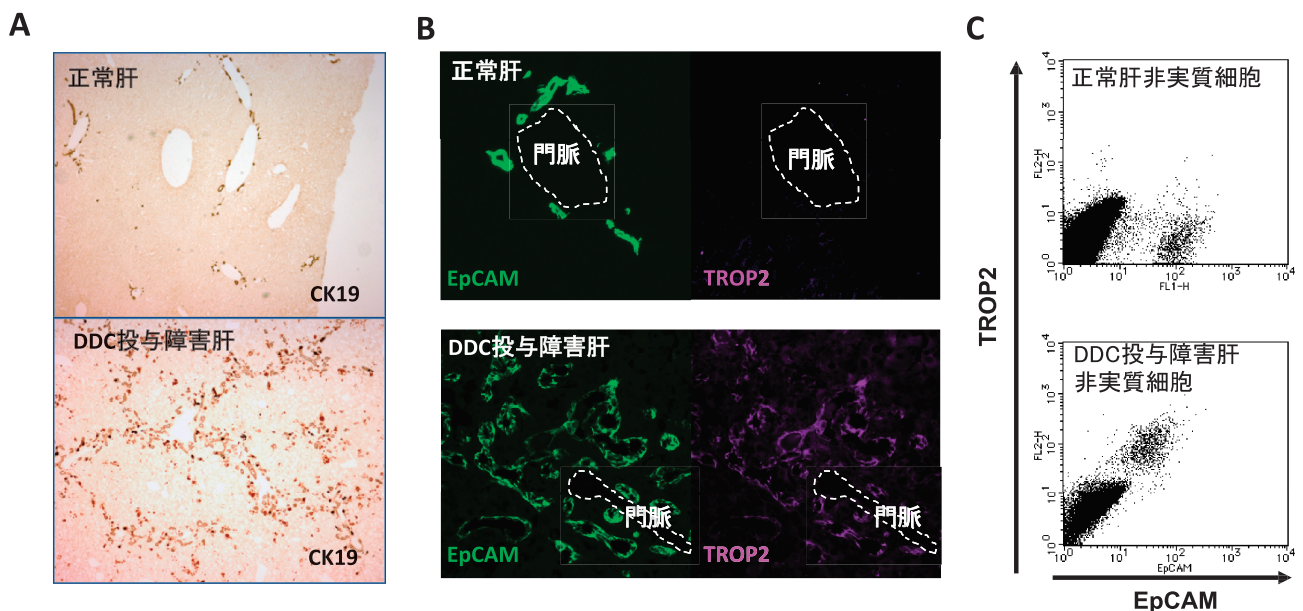


図 3 オーバル細胞マーカー分子としての EpCAM と TROP2 の発現

(A) 正常肝臓および DDC 投与障害肝臓における CK19 の免疫組織染色。DDC 投与障害肝臓では CK19 陽性のオーバル細胞が増殖の様子が観察される。(B) 正常肝臓および DDC 投与障害肝臓における EpCAM と TROP2 の免疫組織染色。(C) EpCAM 抗体と TROP2 抗体による正常肝臓と DDC 投与障害肝臓の FCM 解析。

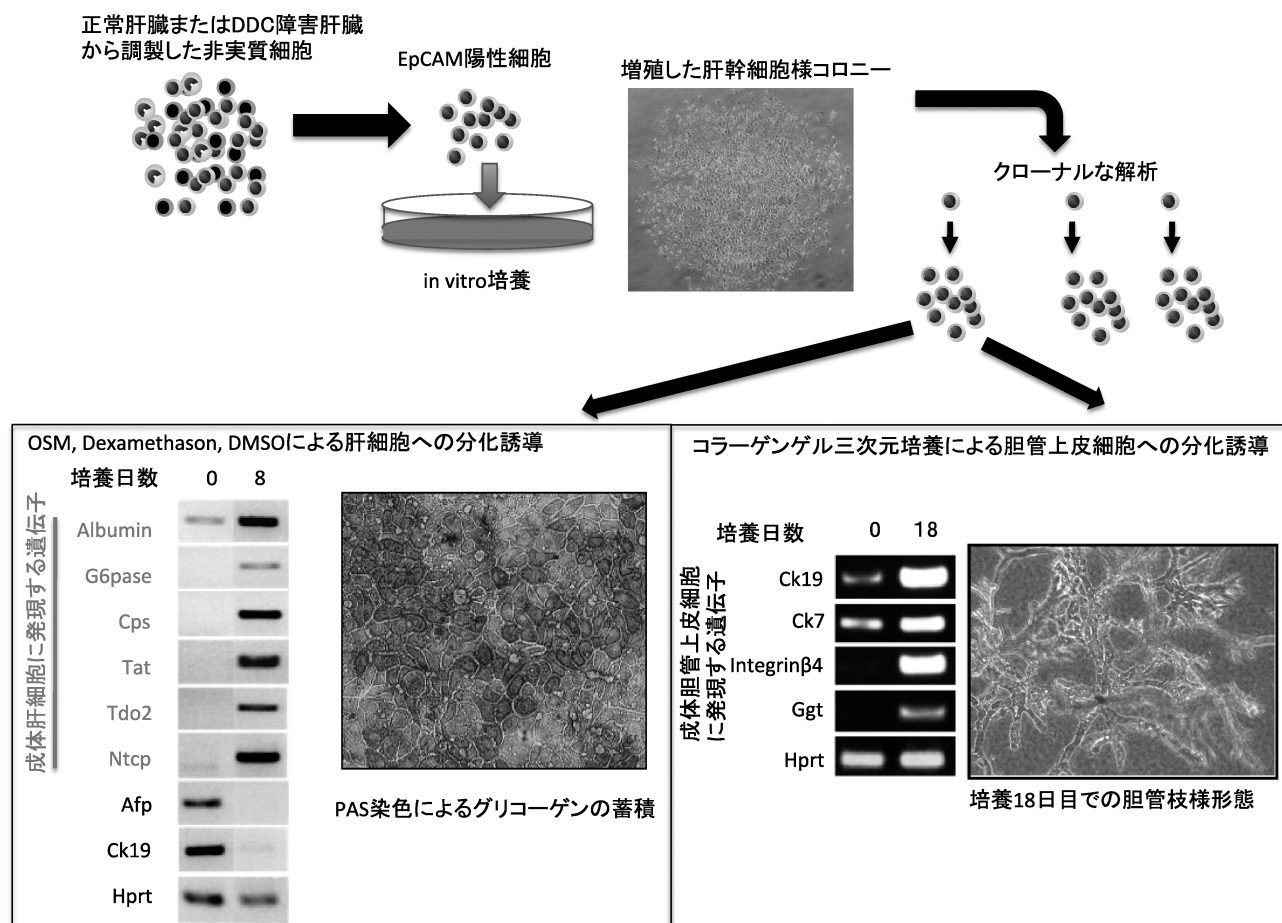


図4 EpCAM陽性細胞からの肝幹細胞様細胞株の樹立

正常肝臓またはDDC投与マウス障害肝臓から単離したEpCAM陽性細胞を*in vitro*で培養すると増殖性のコロニーが出現する。クローン化した細胞は培養条件によって、肝細胞または胆管上皮細胞に特徴的な遺伝子発現や形態を示す細胞へと分化する。

8. おわりに

ヒトにおいても種々の肝障害において、オーバル細胞に似た細胞が観察されることがある。オーバル細胞はげっ歯類での名称であり、ヒトではオーバル細胞とは呼ばず、胆管構造の異常な増加を伴うことから細胆管反応 (ductular reaction) として捉えられている。定義の問題ではあるが、ヒトの肝疾患で見られるオーバル細胞様の細胞や、マウスやラットを用いて異なる方法で誘導されたオーバル細胞は果たしてどこまで共通の性質を有する細胞群を指すのかは、この細胞を研究する上で非常に重要なポイントとなる。そもそも発がんモデルラットにおいて形態的な特徴から命名された「オーバル細胞」が各研究者の解釈によって一人歩きし、混乱を招いた部分は否定できない。そのため、最近ではこれらの細胞をオーバル細胞とは呼ばずに、intermediate hepatobiliary cell と呼び、研究者間の認識を改めようとする動きがある。マーカー分子の同定と評価法の確立によって、肝幹細胞やオーバル細胞はようやく実体が

見えてきたが、その由来や制御機構、他の組織幹細胞との相違、発がんとの関連性などまだまだ不明な点が残されており興味は尽きない。紙幅の関係で割愛したが、肝幹細胞やオーバル細胞の増殖・分化に関わる細胞内外のシグナルも明らかになりつつあり、今後、肝幹細胞研究のさらなる進展は、臓器の発生・分化や発がんのメカニズムの解明、再生医療への応用などあらゆる分野に貢献していくことが期待される。

文 献

- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996) *Science*, 273, 242-245.
- Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., & Zaret, K.S. (1999) *Science*, 284, 1998-2003.
- Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., & Zaret, K.S. (2001) *Genes Dev.*, 15, 1998-2009.
- Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., & Zaret, K.S. (2001) *Science*, 294, 559-563.
- Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N., & Miyajima, A. (2011) *J.*

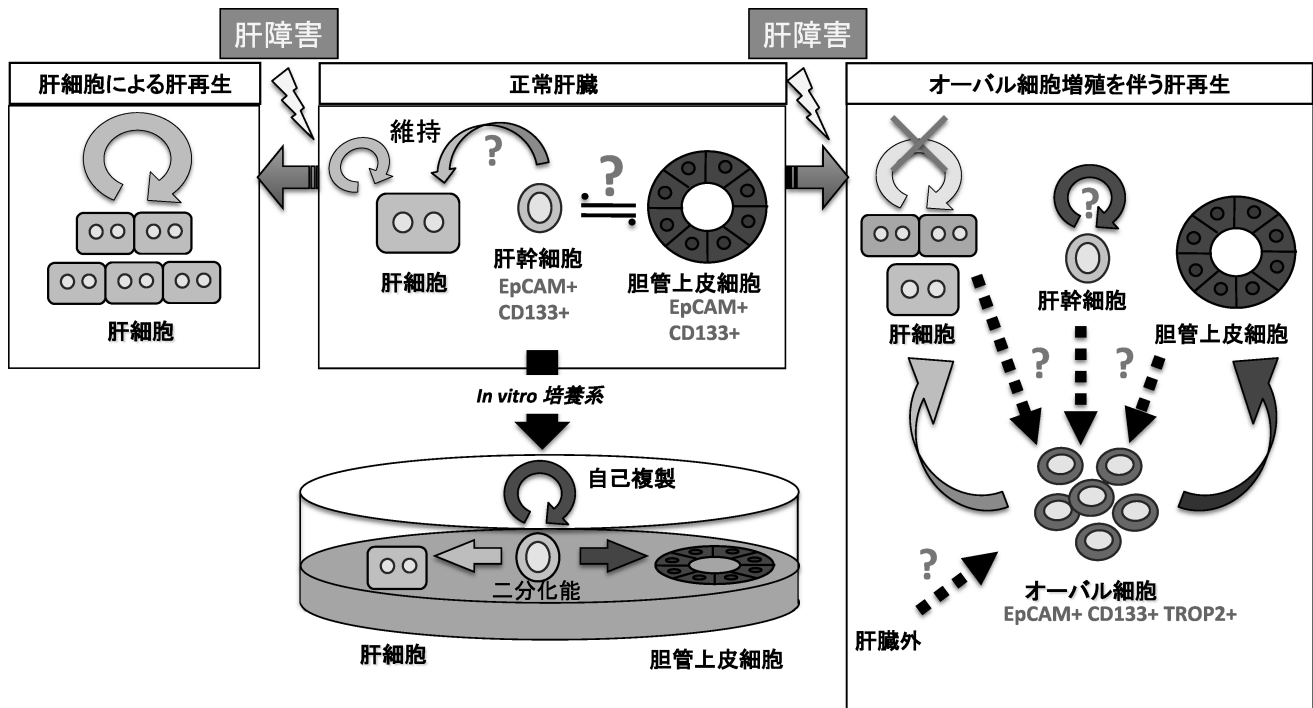


図5 肝臓における幹細胞システムのモデル

- Biochem., 149, 231–239.
- 6) Suzuki, A., Zheng, Y. W., Kaneko, S., Onodera, M., Fukao, K., Nakauchi, H., & Taniguchi, H. (2002) *J. Cell Biol.*, 156, 173–184.
 - 7) Kubota, H. & Reid, L.M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12132–12137.
 - 8) Tanimizu, N., Nishikawa, M., Saito, H., Tsujimura, T., & Miyajima, A. (2003) *J. Cell Sci.*, 116, 1775–1786.
 - 9) Tanaka, M., Okabe, M., Suzuki, K., Kamiya, Y., Tsukahara, Y., Saito, S., & Miyajima, A. (2009) *Mech. Dev.*, 126, 665–676.
 - 10) Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D., & Brinster, R.L. (1994) *Science*, 263, 1149–1152.
 - 11) Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M., & Grompe, M. (1997) *Am. J. Pathol.*, 151, 1273–1280.
 - 12) Farber, E. (1956) *Cancer Res.*, 16, 142–148.
 - 13) Evarts, R.P., Nagy, P., Marsden, E., & Thorgeirsson, S.S. (1987) *Carcinogenesis*, 8, 1737–1740.
 - 14) Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., & Grompe, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 Suppl. 1, 11881–11888.
 - 15) Yovchev, M.I., Grozdanov, P.N., Zhou, H., Racherla, H., Guha, C., & Dabeva, M.D. (2008) *Hepatology*, 47, 636–647.
 - 16) Suzuki, A., Sekiya, S., Onishi, M., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakauchi, H., & Taniguchi, H. (2008) *Hepatology*, 48, 1964–1978.
 - 17) Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., & Miyajima, A. (2009) *Development*, 136, 1951–1960.
 - 18) Kamiya, A., Kakinuma, S., Yamazaki, Y., & Nakauchi, H. (2009) *Gastroenterology*, 137, 1114–1126, 1126 e1111–1114.
 - 19) Nishikawa, Y., Doi, Y., Watanabe, H., Tokairin, T., Omori, Y., Su, M., Yoshioka, T., & Enomoto, K. (2005) *Am. J. Pathol.*, 166, 1077–1088.
 - 20) Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Matsui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J.M., Behringer, R.R., Nakamura, T., & Uemoto, S. (2011) *Nat. Genet.*, 43, 34–41.