

肝細胞分化を誘導するマスター因子の同定

鈴木 淳 史^{1,2,3}

我々のからだを構成する細胞は、場所や時間に応じて厳格な運命決定を受け、それぞれが決まった組織や器官を形成し、個体の恒常性を保つようにはたらく。肝臓を構成する肝細胞も例に漏れず、胎生期に肝芽細胞から生まれて肝臓を作り出す。しかしながら、奇妙なことに、肝細胞以外の細胞が特殊な刺激を受けて突然肝細胞になったり、肝細胞と融合することで肝細胞に変化したりすることがある。これらの現象は、肝細胞以外の細胞を肝細胞に変えることが可能な肝細胞の運命決定因子（いわゆるマスター因子）の存在を示唆している。筆者らは、この仮説をもとに研究を進めた結果、マウスの線維芽細胞に二つの転写因子を導入することで、線維芽細胞を肝細胞の性質をもった細胞へと直接変化させることに成功し、肝細胞の運命決定に必要なマスター因子を同定した。この成果は、肝細胞の運命決定機構の理解や肝疾患に対する新しい治療法の開発に貢献することが期待される。

1. はじめに

肝臓の発生は、心臓に近接した前腸内胚葉が心臓や間質組織からの刺激によって肝臓に特化することで始まる¹⁾。肝臓を構成する細胞には肝上皮細胞（肝細胞と胆管上皮細胞）や血液細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞など複数あるが、そのうちの肝細胞と胆管上皮細胞だけが前腸内胚葉由来であり、それらの起源は同一の細胞である。この細胞は肝芽細胞（hepatoblast）と呼ばれ、肝臓の幹細胞（肝幹細胞）

として肝組織発生に欠かすことはできない。通常、肝細胞は多くの転写因子の働きによって胎生期に肝芽細胞から分化するのが普通だが、まれに、障害を受けた膵臓の外分泌細胞や骨髄などに含まれる間葉系幹細胞から肝細胞が分化することがある^{2,3)}。また、骨髄移植後に血液細胞が肝細胞と融合し、肝細胞として肝臓組織を構築することもある^{4,5)}。これらの事象は、肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させる因子の存在を示唆しており、ある環境下ではそれらの因子が活性化して肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させていると考えられる。したがって、もし、このような肝細胞の運命決定因子を同定することができれば、それらを使って皮膚の線維芽細胞を肝細胞へと直接変化させることが可能になるかもしれない。そこで筆者らは、これら肝細胞の運命決定を担う特定因子を同定し、線維芽細胞から肝細胞を直接作り出すことを試みた。

2. 肝組織発生を制御する転写因子

肝臓の発生や機能維持に必要な転写因子としては、肝細胞核因子（hepatocyte nuclear factor : Hnf）がよく知られている。その中でも、肝臓が前腸内胚葉から特化するという、肝組織形成の最も初期の過程に必要とされるのが、Foxa1 (Hnf3 α) と Foxa2 (Hnf3 β) である⁶⁾。これらに Foxa3

¹九州大学 生体防御医学研究所 器官発生再生学分野 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

²独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 CREST

³独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 さきがけ

Identification of master regulators for induction of hepatocyte differentiation

Atsushi Suzuki^{1,2,3} (¹Division of Organogenesis and Regeneration, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan; ²Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency; ³Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency)

(Hnf3 γ)を加えた三つのFoxa転写因子は、共通するfork-head/winged helixドメインにおいてアミノ酸レベルで90%以上のホモロジーをもつことから、それら間には機能相補性が予想される⁷⁾。また、別の肝細胞核因子の一つ、Hnf4 α については、ノックアウトマウスが栄養外胚葉の異常で発生初期に胎性致死となってしまうため、テトラプロイド(四倍体)凝集胚を用いた解析が行われた。その結果、肝芽細胞そのものに異常は見られなかったが、肝芽細胞からの肝細胞分化に重度の異常が認められた⁸⁾。また、コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析などにより、Hnf4 α は、Hnf1 α を含む多くの標的遺伝子の発現制御を介して、分化した肝細胞の機能維持や肝臓の組織形成においても重要な役割を担っていることが明らかとなった⁹⁻¹¹⁾。肝芽細胞からの肝細胞分化では、他に、塩基性アミノ酸領域とロイシンジッパーを持った転写因子であるC/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α)が重要である。C/EBP α の発現を抑制もしくは欠損させると、肝芽細胞からの肝細胞分化が阻害され、胆管上皮細胞への分化が促進される¹²⁻¹⁴⁾。また、肝細胞特異的にC/EBP α を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスではグルコース不耐性が認められることから、C/EBP α は肝細胞の機能制御にも必要なことがわかる¹⁵⁾。

Hnf6/Onecut-1(OC-1)と呼ばれるホメオドメイン型転写因子のノックアウトマウスでは、Hnf1 β の発現低下などを介し、胆嚢の欠如や肝外胆管及び肝内胆管の形成異常が見られる。そのため、Hnf6/OC-1の機能欠損による胆管上皮細胞の分化異常が示唆された。ところが、Hnf6/OC-1のノックアウトマウスにおいても胆管上皮細胞の分化は認められることから、Hnf6/OC-1は肝芽細胞から胆管上皮細胞が分化する過程というよりはむしろ、分化した胆管上皮細胞が胆管を形成する過程において重要なことがわかる¹⁶⁾。前述したC/EBP α のノックアウトマウスでは、Hnf6/OC-1の発現上昇が認められることから、C/EBP α によるHnf6/OC-1の負の制御が示唆された¹⁴⁾。一方で、筆者らが肝芽細胞特異的にC/EBP α の機能抑制を行ったところ、予想外にも、Hnf6/OC-1の発現が低下し、同時に胆管上皮細胞への分化が促進された¹³⁾。この結果は、肝芽細胞においてはC/EBP α がHnf6/OC-1を正に制御することを意味している。ここでHnf6/OC-1のノックアウトマウスをよく見てみると、正常マウスに比べ、肝芽細胞から分化する胆管上皮細胞の数が増加していることに気づく¹⁶⁾。これらの結果は、肝芽細胞ではC/EBP α がHnf6/OC-1を正に制御することで、胆管上皮細胞への分化を抑制していることを示している。以上の結果から導き出された考えは以下ようになる。まず、C/EBP α の発現が低下した肝芽細胞ではHnf6/OC-1の発現が低下し、胆管上皮細胞への分化が方向づけられる。その後、胆管上皮細胞へ

と運命づけられた細胞では、何らかのシグナルによりHnf6/OC-1の発現が上昇し、胆管上皮細胞の成熟化や胆管の組織形成が促進される。このように、Hnf6/OC-1は、発現する細胞の分化レベルの違いでその機能や発現制御機構が異なるものと推測される。

筆者らは、独自に開発した肝芽細胞の分離法とクローナルな解析系(一つ一つの細胞を個別に解析する手法)を用いて^{17,18)}、それまで全く知られていなかった肝芽細胞におけるT-box転写因子の役割について解析を行った。その結果、17個あるT-box転写因子の中で、Tbx3だけが肝芽細胞で強く発現していることを見いだした。そこで次に、Tbx3ノックアウトマウスの胎仔肝臓を用いて解析を行ったところ、Tbx3ノックアウトマウスの胎仔肝臓はとても小さく、肝上皮細胞の増殖が強く抑制されていた。また、肝細胞の数は激減していたが、胆管上皮細胞の数は相対的に増加していた。そこで、これらの表現型が肝芽細胞の機能異常によるものか否かを調べるべく、Tbx3ノックアウトマウスの胎仔肝臓から肝芽細胞を分離し、その増殖能と分化能を解析した。その結果、Tbx3ノックアウトマウス由来の肝芽細胞のコロニー形成能は著しく低下しており、また、肝細胞へはほとんど分化せず、胆管上皮細胞へ優位に分化した。さらに、Tbx3は*p19^{ARF}*の発現を抑制することで肝芽細胞の増殖と肝細胞への分化を促進し、逆にTbx3による*p19^{ARF}*の抑制が減少もしくは停止すると肝芽細胞は増殖を止め胆管上皮細胞に分化することが判明した。以上の結果から、Tbx3は*p19^{ARF}*の抑制を介して肝芽細胞の増殖と分化を制御することにより、肝臓の発生を進める上で必須の役割を担っていることが明らかとなった¹⁹⁾。

隣接する心臓や間質組織の刺激により前腸内胚葉中に生まれた肝芽細胞は、一時的に腸管様の円柱状構造を作り出し、その構造が不完全な層状構造へと変化しながら間質組織の中へ潜り込むように移動していく。ホメオドメイン型転写因子の一つ、Hexのノックアウトマウスでは、肝芽細胞が層状構造を作ることができないことから、Hexは肝芽細胞の初期移動過程で重要な役割を担っていることがわかる²⁰⁾。一方、別のホメオドメイン型転写因子、Prox1のノックアウトマウスでは、肝芽細胞による層状構造の形成は認められるものの、E-カドヘリンの発現上昇などが原因となって、間質組織への移動が阻害される²¹⁾。また、前述したHnf6/OC-1とOC-2とのダブルノックアウトマウスにおいても、細胞接着や細胞移動に関与するE-カドヘリンやトロンボスポンジン-4などの発現異常により、層状構造から先の移動が阻害される²²⁾。以上の結果から、肝芽細胞による層状構造の形成にはHexが、層状構造から間質組織への移動にはProx1、Hnf6/OC-1、OC-2が必要であることがわかる。

3. 肝細胞分化を誘導するマスター因子の同定と iHep 細胞の作製

ある細胞の分化を制御する転写因子は、それらの発現もまた別の転写因子によって制御されていることから、転写制御のカスケードをさかのぼっていくと最上位の転写因子にたどり着くと考えられる。これら最上位に座する転写因子は、細胞運命のマスター因子と呼ばれ、それぞれの細胞種に個別のマスター因子が存在すると考えられてきた。この概念を後押しする研究の一つが、1987年に報告された筋細胞のマスター因子、MyoDの発見である²³⁾。この研究では、線維芽細胞にMyoDを発現させるだけで、線維芽細胞に筋細胞の運命プログラムを誘導することができた。そして、これを契機として、筋細胞以外の細胞でもマスター因子の探索が活発になっていった。ところが、各種それぞれの細胞の分化に重要な転写因子が数多く発見されたにも関わらず、筋細胞分化におけるMyoDのようなマスター因子が同定されることはなかった。そのため、マスター因子の概念そのものにも疑問の目が向けられ、研究もまた下火になっていった。そんな中、線維芽細胞にOct4, Sox2, Klf4, c-Mycという四つの転写因子を発現させることで、線維芽細胞が人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)へと変化することが報告された²⁴⁾。再生医療の実現に向けた潮流の中でiPS細胞が重要な位置を占めることは言うまでもないが、同時に、iPS細胞の誕生は、「細胞運命を規定するマスター因子は確かに存在する」こと、そして「マスター因子は一つである必要はなく、複数の因子がコアネットワークを形成することが重要である」ことを示し、細胞の運命転換とマスター因子の概念に大きな影響を与えた(図1)。そして、これを境にして、神経や心筋、肝臓など、特有の機能をもった細胞の運命を規定するマスター因子の探索が再燃したのである。その結

マスター因子のセットによる
コアネットワーク形成

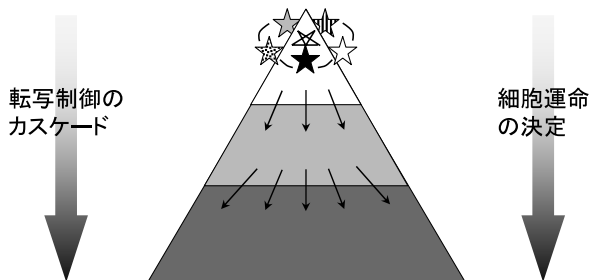


図1 マスター因子を筆頭とした転写制御カスケードによる細胞運命決定
複数のマスター因子(図中の星形)がコアネットワークを形成して細胞運命を制御するモデルの概略図。

果として、最近では、特定の転写因子セットを利用した細胞運命の直接的なリプログラミング(ダイレクトリプログラミング)が多くの細胞種で可能になりつつある²⁵⁻²⁹⁾。

上述したように、肝臓の組織形成過程において肝細胞分化に重要な転写因子は数多く発見された。しかしながら肝細胞分化を誘導するマスター因子として機能するものは明らかになっていなかった。そこで筆者らは、肝細胞分化のマスター因子をスクリーニングするために、筆者らのこれまでの研究や他の公開データから、肝臓の発生過程において肝細胞の分化に関連する12個の転写因子を抽出した。レトロウイルスを用いてこれら12因子を同時にマウス胎仔線維芽細胞(MEF)に導入すると、肝細胞マーカーであるアルブミンや α -フェトプロテイン、及び、上皮細胞マーカーであるE-カドヘリンの発現が強く誘導された。そこで次に、12因子のうち必須の因子を抽出するために、12因子から1因子を除いたウイルスをそれぞれ用意して解析を行った。その結果、Hnf4 α を除いたときのみ、肝細胞マーカーの発現誘導が強く阻害されることが判明した。そこで、Hnf4 α とその他の1因子、計2因子をMEFに導入したところ、Hnf4 α & Foxa1, Hnf4 α & Foxa2, Hnf4 α & Foxa3の三つの組み合わせにおいてのみ肝細胞マーカーや上皮細胞マーカーの発現が強く誘導された。さらに、これらの遺伝子セットを導入したMEFをコラーゲンや肝細胞増殖因子とともに培養すると、およそ1ヶ月後にはMEFが上皮様形態をもった細胞に変化することが明らかとなった。筆者らは、これらの上皮様細胞をiHep細胞(induced hepatocyte-like cell)と名づけた³⁰⁾。

MEFから作製されたiHep細胞は、そのほとんどがE-カドヘリン、アルブミンともに陽性であった。また、iHep細胞はグリコーゲンの蓄積や低比重リポタンパク質(LDL)の取り込み、アルブミンの分泌、アンモニア代謝と尿素合成、シトクロムP450活性、インドシアニングリーンの取り込みと排出、脂質代謝、薬物代謝などの肝細胞に特有の機能を有しており、肝細胞と同様に細胞間をタイトジャンクションで連結して毛細胆管を形成していた。さらに、iHep細胞は肝機能を発揮する一連の酵素群をコードする遺伝子も発現していた。一方、生体内におけるiHep細胞の解析では、肝機能不全で死に至る高チロシン血症モデルマウスの肝臓にiHep細胞を移植すると、肝細胞と同様に、iHep細胞は損傷を受けた高チロシン血症モデルマウスの肝臓組織を再構築し、肝機能を補助することで、マウスの致死率を大幅に減少させることが可能であった。以上から、iHep細胞は肝細胞のもつ形態的・機能的特徴を有する細胞であることが明らかとなった³⁰⁾。

そこで次に、筆者らは、iHep細胞を用いた治療モデルの可能性を検証すべく、高チロシン血症モデルマウスのMEFから作製したiHep細胞に対し、欠損遺伝子を導入し

て遺伝的な肝機能疾患の治療を行った。その後、これらの細胞を高チロシン血症モデルマウスの肝臓に移植したところ、移植した細胞は正常細胞と同じように損傷を受けた肝臓組織を再構築可能なことが判明した。この結果は、遺伝的な肝疾患をもつ患者自身の線維芽細胞を用いて iHep 細胞を作製し、生体外における遺伝子治療を経てから肝臓へ移植することで、肝臓を機能的に再生させて治療することが可能な新しい治療モデルを提示しているといえる³⁰⁾。

筆者らは、MEF から iHep 細胞を作製することに成功したことから、続いて、成体マウスの皮膚から抽出した線維芽細胞 (MDF) から iHep 細胞を作製を試みた。その結果、MEF と同様に、MDF に対して Hnf4 α と Foxa (Foxa1, Foxa2, Foxa3 のいずれか一つ) を導入することで、培養下において肝細胞の特徴を有し、高チロシン血症モデルマウスの肝臓へ移植後に損傷を受けた肝臓組織を再構築することが可能な iHep 細胞を作製することができた。このことから、iHep 細胞は、マウス胎仔線維芽細胞だけでなく、成体マウスの皮膚に由来する線維芽細胞からも同様に誘導可能なことが明らかとなった³⁰⁾。

4. iHep 細胞研究の今後の展開

筆者らは、たった二つの転写因子を線維芽細胞に発現させるだけで、iPS 細胞を経由することなく、線維芽細胞から肝細胞の性質をもった細胞を直接作製することに成功した。これらの転写因子は肝細胞の運命を決定するマスター因子と考えられ、肝細胞分化を促す複雑な転写因子ネットワークの根幹に位置するものと考えられる (図 2)。二つの転写因子が細胞内でどのような変化を引き起こし、細胞の運命転換を誘導して肝細胞を作り出すのか、そのメカニ

ズムは非常に興味深い。一方、筆者らの行った研究はヒト iHep 細胞の作製に向けた基盤科学となることは言うまでもなく、ヒトで iHep 細胞が作製されれば、肝疾患に対する細胞移植や人工肝臓への応用が期待できる。また、創薬研究において、薬の効果や毒性を評価するためのツールとして iHep 細胞が利用される可能性も十分に考えられる。

線維芽細胞から iHep 細胞を作製する研究については、これまでに別のグループからも報告がなされている³¹⁾。しかしながら、興味深いことに、それぞれの研究を比較するとその作製方法には大きな違いがあることがわかる。筆者らは導入遺伝子の組み合わせとして Hnf4 α と Foxa という 2 因子を使用した。別のグループでは Gata4, Hnf1 α , Foxa3 という 3 因子を線維芽細胞に導入し、かつ、がん抑制因子である p19^{ARF} の欠損もしくは発現抑制を行う必要があった。さらに、筆者らの方法で作製した iHep 細胞は 90% 近くが肝細胞の特徴を示したのに対し、別グループの方法では 20% ほどしか肝細胞の特徴を示さなかった。この違いは、恐らく導入因子の働きの違いによるものと考えられる。今後、それぞれの方法で導入された因子が線維芽細胞にもたらす影響について解析が進むことで、導入因子の役割や作製された iHep 細胞の差が明確になっていくものと思われる。ちなみに、iHep 細胞だけでなく、線維芽細胞から心筋細胞様の細胞 (induced cardiomyocyte : iCM 細胞) を誘導する際にも用いられる Gata4 は、転写因子の機能に加えて標的遺伝子領域のエピジェネティックな制御を担う因子でもある²⁸⁾。また、Hnf4 α は、転写因子としてだけでなく、核内受容体としてもよく知られた因子である。したがって、線維芽細胞に導入された因子は、転写因子として機能することに加え、細胞の運命転換においてよ

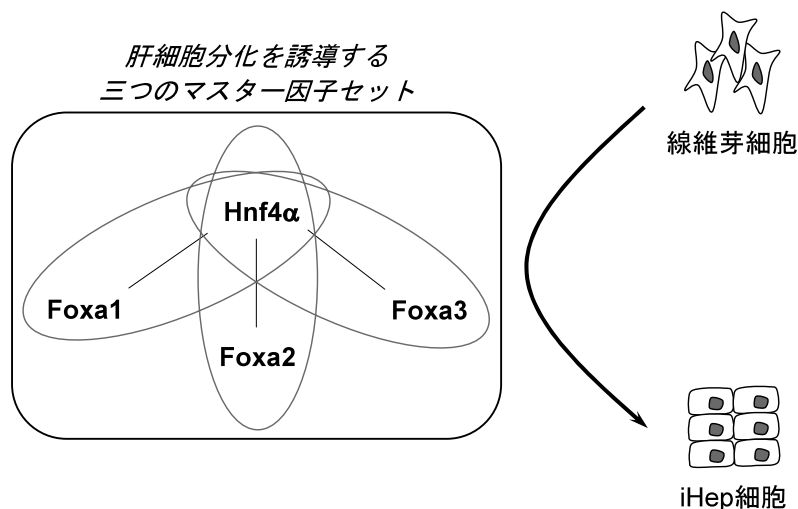


図 2 肝細胞分化を誘導する三つのマスター因子セット

2 種類の転写因子 (Hnf4 α と Foxa1, Foxa2, Foxa3 のいずれか一つ) の三つの組み合わせのそれぞれを線維芽細胞に発現させると、線維芽細胞から肝細胞の性質をもった細胞 (iHep 細胞) を直接作製することができる。

り広範な機能的役割を有することが予想される。いずれにせよ、簡便な方法で皮膚の線維芽細胞から作製できるiHep細胞は、ヒトに応用された場合、機能的な肝細胞としてさまざまな医療応用が期待できる。

文 献

- 1) Zaret, K.S. (2002) *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 499–512.
- 2) Scarpelli, D.G. & Rao, M.S. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2577–2581.
- 3) Lee, K.D., Kuo, T.K., Whang-Peng, J., Chung, Y.F., Lin, C.T., Chou, S.H., Chen, J.R., Chen, Y.P., & Lee, O.K. (2004) *Hepatology*, **40**, 1275–1284.
- 4) Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., & Grompe, M. (2003) *Nature*, **422**, 897–901.
- 5) Vassilopoulos, G., Wang, P.R., & Russell, D.W. (2003) *Nature*, **422**, 901–904.
- 6) Lee, C.S., Friedman, J.R., Fulmer, J.T., & Kaestner, K.H. (2005) *Nature*, **435**, 944–947.
- 7) Costa, R.H., Kalinichenko, V.V., Holterman, A.X., & Wang, X. (2003) *Hepatology*, **38**, 1331–1347.
- 8) Li, J., Ning, G., & Duncan, S.A. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 464–474.
- 9) Tian, J.M. & Schibler, U. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 2225–2234.
- 10) Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W.D., Savatski, L., Adamson, J.W., Ning, G., Kaestner, K.H., Rossi, J.M., Zaret, K.S., & Duncan, S.A. (2003) *Nat. Genet.*, **34**, 292–296.
- 11) Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M., & Gonzalez, F.J. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 1393–1403.
- 12) Tomizawa, M., Garfield, S., Factor, V., & Xanthopoulos, K.G. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 1–5.
- 13) Suzuki, A., Iwama, A., Miyashita, H., Nakauchi, H., & Taniguchi, H. (2003) *Development*, **130**, 2513–2524.
- 14) Yamasaki, H., Sada, A., Iwata, T., Niwa, T., Tomizawa, M., Xanthopoulos, K.G., Koike, T., & Shiojiri, N. (2006) *Development*, **133**, 4233–4243.
- 15) Inoue, Y., Inoue, J., Lambert, G., Yim, S.H., & Gonzalez, F.J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 44740–44748.
- 16) Clotman, F., Lannoy, V.J., Reber, M., Cereghini, S., Cassiman, D., Jacquemin, P., Roskams, T., Rousseau, G.G., & Lemaigre, F.P. (2002) *Development*, **129**, 1819–1828.
- 17) Suzuki, A., Zheng, Y., Kondo, R., Kusakabe, M., Takada, Y., Fukao, K., Nakauchi, H., & Taniguchi, H. (2000) *Hepatology*, **32**, 1230–1239.
- 18) Suzuki, A., Zheng, Y.W., Kaneko, S., Onodera, M., Fukao, K., Nakauchi, H., & Taniguchi, H. (2002) *J. Cell Biol.*, **156**, 173–184.
- 19) Suzuki, A., Sekiya, S., Büscher, D., Izpisua Belmonte, J.C., & Taniguchi, H. (2008) *Development*, **135**, 1589–1595.
- 20) Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Martinez Barbera, J.P., & Zaret, K.S. (2006) *Dev. Biol.*, **290**, 44–56.
- 21) Sosa-Pineda, B., Wigle, J.T., & Oliver, G. (2000) *Nat. Genet.*, **25**, 254–255.
- 22) Margagliotti, S., Clotman, F., Pierreux, C.E., Beaudry, J.B., Jacquemin, P., Rousseau, G.G., & Lemaigre, F.P. (2007) *Dev. Biol.*, **311**, 579–589.
- 23) Davis, R.L., Weintraub, H., & Lassar, A.B. (1987) *Cell*, **51**, 987–1000.
- 24) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) *Cell*, **126**, 663–676.
- 25) Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., & Melton, D. A. (2008) *Nature*, **455**, 627–632.
- 26) Feng, R., Desbordes, S.C., Xie, H., Tillo, E.S., Pixley, F., Stanley, E.R., & Graf, T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6057–6062.
- 27) Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C., & Wernig, M. (2010) *Nature*, **463**, 1035–1041.
- 28) Ieda, M., Fu, J.D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B.G., & Srivastava, D. (2010) *Cell*, **142**, 375–386.
- 29) Szabo, E., Rampalli, S., Risueño, R.M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, A., Levadoux-Martin, M., & Bhatia, M. (2010) *Nature*, **468**, 521–526.
- 30) Sekiya, S. & Suzuki, A. (2011) *Nature*, **475**, 390–393.
- 31) Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Xiang, D., Liu, C., Hu, Y., Wang, X., & Hui, L. (2011) *Nature*, **475**, 386–389.