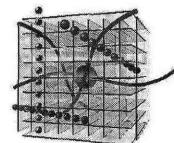


心筋細胞分化とマイクロ RNA (幹細胞の心筋分化とマイクロ RNA)

Tomohide Takaya ◎ 高谷智英

Koji Hasegawa ◎ 長谷川浩二

国立病院機構京都医療センター展開医療研究部



Summary

きわめて分裂能が乏しい心筋細胞の傷害を伴う心疾患には薬物療法では限界があり、その抜本的な治療法として再生医療に大きな期待が寄せられている。心筋再生療法を実現化するには、幹細胞の心筋分化機構の解明が必須である。これまで、万能性幹細胞である胚性幹(ES)細胞の心筋分化が世界中で研究されてきたが、近年、人工多能性幹(iPS)細胞の樹立や、体細胞から心筋細胞への形質転換といった目覚ましい発見が続き、再生医療のストラテジーも大きく変化しつつある。同時に、これら幹細胞の維持・増殖・分化・リプログラミングにマイクロ RNA(microRNA; miRNA)が密接に関与していることが明らかになってきた。本稿では、心筋分化を中心に幹細胞とmiRNAについて概説する。

Key words

- ◎マイクロ RNA ◎心筋分化
- ◎ES 細胞 ◎再生医療
- ◎iPS 細胞

はじめに

心筋細胞は胎生期には活発に増殖を続けて心臓を形成するが、生後間もなく増殖が止まるため、収縮機能不全(心不全)、とくに心筋梗塞や心筋症などの心筋傷害を伴う症例の根治はきわめて困難である。心不全に対する β 遮断薬やアンジオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme; ACE)阻害薬による薬物治療では短期予後の改善を認めるが、重症心不全患者の5年生存率は50%を下回っている。この状況を克服するため、幹細胞から分化させた心血管細胞で患部を補い新生する再生療法が世界中で研究・検討されてきた。再生医療に用いる細胞資源には、骨髄由来細胞や血管内皮前駆細胞などの体性幹細胞や、胚性幹(embryonic stem; ES)細胞や人工多能性幹(induced pluripotent stem; iPS)細胞といった万能性幹細胞が考えられている。また最近では、体細胞を心筋細胞などの目的とする細胞に直接形質転換する研究も進んでいる。

このような流れと並行して、近年、マイクロ RNA(microRNA; miRNA)が幹細胞の維持・増殖・分化・リプログラミングに果たす重要な役割が急速に明

らかになってきた。以下、ES 細胞の心筋分化を中心に、幹細胞と miRNA の関連について概説する。

ES 細胞の自己複製・多分化能と miRNA

着床前受精卵(胚盤胞)の内部細胞塊に由来する ES 紹細胞は、三胚葉のすべてに分化できる多分化能(pluripotency)とともに、未分化状態を維持したまま無限に自己を複製する(self-renewal)能力を併せもつ¹⁾。したがって、大量培養した ES 紹細胞の適切な分化誘導が可能になれば、さまざまな領域で再生医療の細胞資源として用いることができる。

発生・分化における miRNA の機能を調べるため、RNase III 遺伝子 *Dicer1* や二重鎖 RNA 結合タンパク質遺伝子 DiGeorge syndrome critical region gene (*Dgcr8*) 8 をノックアウト(KO)し、miRNA の合成が網羅的に阻害されたマウスや ES 紹細胞が作出されている。*Dicer1* KO マウスは E7.5 までに胚性致死を示し、多能性因子であるオクタマー結合転写(*octamer-binding transcription factor*; *Oct*) 4 の発現も認められない²⁾。同様に、E8.5 から心筋特異的に *Dicer1* が KO されるトランジェニックマウスも、E12.5 までに心臓形成不良による心不全性の致死に至る³⁾。*Dicer1* KO ES 紹細胞では *Oct4* の発現が認められるが、分裂能に著しい欠陥があり、胚様体(embryoid body; EB)形成による分化誘導後も内胚葉および中胚葉マーカーを発現せずに 8 日目で増殖が停止する⁴⁾⁵⁾。これらの結果は、miRNA が心臓発生を含む細胞の増殖・分化に必須であることを示している。*Dgcr8* KO ES 紹細胞の表現型は *Dicer1* の KO と若干異なり、EB 形成 16 日以後も分化と増殖が続く⁶⁾。*Dgcr8* KO ES 紹細胞は *Oct4* や *Nanog* を発現することから、いくつかの miRNA は多能性因子を抑制することで ES 紹細胞の分化を促進すると考えられる。

実際、心筋分化誘導にも用いられるレチノイン酸によって発現が亢進する miR-134, miR-296, miR-470 は、Sox 転写因子(*Sox transcription factor*; *Sox*) 2,

Nanog, *Oct4* を標的とすることで ES 紹細胞の分化を促進する⁷⁾。また、miR-145 は *Oct4*, *Sox2*, Krüppel 様転写因子(*Krüppel-like transcription factor*; *Klf*) 4 を直接標的とし、ES 紹細胞の自己複製を阻害して分化を亢進する⁸⁾。miR-145 は、未分化な細胞では *Oct4* による抑制を受けているが、分化の進行に伴って発現が増加する。

逆に、未分化 ES 紹細胞特異的に発現する miRNA 群の多くは、EB 形成などで誘導される分化とともに発現が減少する⁹⁾。たとえば、ES 紹細胞特異的な miR-290 クラスターは、網膜芽細胞腫様タンパク質 p130 (retinoblastoma-like protein2[p130]; *Rbl2*) を標的とすることで間接的に DNA のメチル化を制御しているが、これらの miRNA 量は分化の進行とともに減衰する¹⁰⁾¹¹⁾。

今後、幹細胞をより効率よく目的の細胞に分化させるには、miRNA 依存的に制御される自己複製能や多分化能の解除が必要となるかもしれない(図 1)。

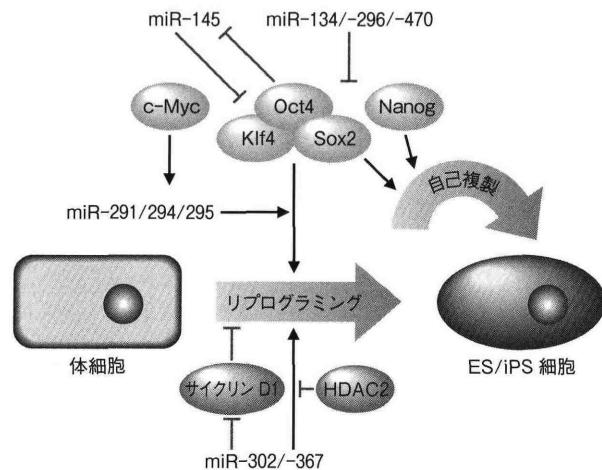


図 1 ES 紹細胞の自己複製、iPS 紹細胞へのリプログラミングと miRNA

ES 紹細胞の増殖、多分化能の維持、体細胞から iPS 紹細胞へのリプログラミングに関係する miRNA とその標的遺伝子。miRNA は一般的に複数の遺伝子を標的とし、またひとつの遺伝子が複数の miRNA によって制御を受ける場合もある。幹細胞における転写制御ネットワークの実態はさらに複雑であろうと考えられる。

心臓の発生・形成と miRNA

これまでの心臓発生の研究から、*Nkx2.5*, *GATA4*, *Tbx5*, 筋細胞エンハンサー因子(*myocyte enhancer factor*; *MEF*)2, 血清応答因子(*serum response factor*; *SRF*)など多数の転写因子が、心筋前駆細胞や心臓の形態形成に必須の遺伝子として同定されている¹²⁾。これらはES細胞の心筋分化においても重要な役割を果たすことが明らかにされているが、骨格筋細胞における*MyoD*のようなマスター遺伝子は現在に至るまで発見されていない。心臓・心筋においては、複数の転写因子・調節因子のネットワークによる遺伝子発現制御が、発生・分化のプログラムを遂行していると考えられている。これに加えて近年、心臓発生や心筋分化におけるmiRNAのかかわりが明らかになってきた(図2)。

心臓の発生にもっとも重要なのは、心筋・骨格筋細胞で特異的かつ高レベルに発現するmiR-1/-133ファミリーである。ポリリストロニックに転写されるmiR-1/-133aクラスターは2つあり、前駆心房で豊

富なmiR-1-1/-133a-2と、心室特異的なmiR-1-2/-133a-1が存在する。心筋細胞におけるmiR-1/-133aクラスターの発現はMEF2とSRFによって直接の制御を受ける。ほかに、別の遺伝子座から転写されるmiR-206/-133bクラスターがあるが、これらは骨格筋特異的に機能する。

miR-1はヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase; HDAC)4を標的とし、その下流にあるMEF2を抑制することでフィードバックを果たすのに加え、*heart and neural crest derivatives-expressed protein 2*(*Hand2*[*dHand*])を標的として心臓形成を抑制的に制御する。miR-133はSRFを標的としてフィードバックを実現しているほか、サイクリンD2を標的として心筋増殖を抑制する¹³⁾¹⁴⁾。miR-1-2KOマウス、miR-133a-1/-2ダブルKOマウスはともに心室中隔欠損を呈し、後期胚もしくは新生児の段階で死に至る³⁾¹⁵⁾。また、βミオシン重鎖(myosin heavy chain; MHC)プロモーター下でmiR-1もしくはmiR-133aを過剰発現するマウスは心筋の増殖が阻害されて胚性致死を示す¹⁵⁾¹⁶⁾。これらの結果から、miR-1/-133が発生過程において心筋細胞の分裂・増殖や心臓形成に必須であることは明らかである。

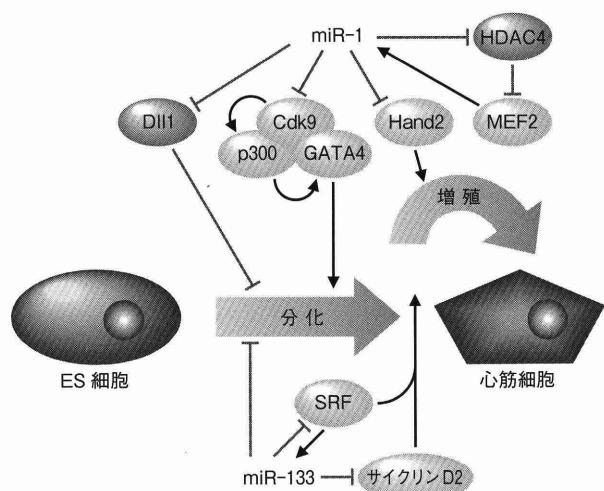


図2 心臓発生、ES細胞の心筋分化とmiRNA
心臓発生とES細胞の心筋分化で重要な役割を果たすmiR-1/-133とその標的遺伝子。miR-1/-133はその標的遺伝子によってフィードバック制御を受ける。

ES細胞の心筋分化とmiRNA

ES細胞の心筋分化は、発生学と同時に病態生理学的なアプローチからも研究が行われてきた。血行動態的負荷などの刺激によって心筋細胞が病的に肥大する際、遺伝子の発現パターンが成人型から胎児型に変化する。この間、ヒストンアセチル基転移酵素(histone acetyl transferase; HAT)p300によるGATA4のアセチル化が亢進し、心房性ナトリウム利尿因子(atrial natriuretic factor; ANF)などの胎児型心筋遺伝子の発現が促進される¹⁷⁾¹⁸⁾。p300/GATA4はサイクリン依存性キナーゼ(cyclin-dependent kinase; Cdk)Cdk9と結合し、Cdk9のリン酸化を受けて転写活性が亢進する¹⁹⁾。最近、p300/GATA4/Cdk9複合体がES細胞

の心筋分化においても機能していることが明らかになった²⁰⁾.

心筋肥大反応は miR-1/-133 による調節を受けるが²¹⁾²²⁾、では転写因子群同様、未分化な細胞の運命決定においても miR-1/-133 は機能しているのだろうか。

miR-1/-133 は未分化 ES 細胞ではほとんど発現していないが、二次元平面培養による分化誘導に伴い、時間経過とともに発現量が増加する。miR-1 または miR-1/-133 を強制発現させた ES 細胞では、自発的な心筋分化が抑制される²³⁾。分化誘導 8 日目において、miR-1 を発現する ES 細胞で、*Nkx2.5* および α -MHC の発現量が対照群と比較して有意に低下し、ANF の発現も減少する傾向が認められる。同様に、miR-133 を導入した ES 細胞でも *Nkx2.5* の発現レベルが有意に下がり、 α -MHC と ANF も減少傾向を示す。

C2C12 骨格筋芽細胞では、miR-1 が *HDAC4* を、miR-133 が *SRF* の 3'非翻訳領域(untranslated region; UTR)を標的とすることが報告されているが²⁴⁾、ES 細胞で行われたレポーター解析では、これらのタンパク質の減少は確認されていない。RNA 分解あるいは翻訳阻害において、ES 細胞と C2C12 細胞では異なる機構がはたらいている可能性も考えられる。ES 細胞においては、miR-1 が *Cdk9* の 3'UTR を標的とすること、miR-1 の過剰発現によって *Cdk9* の核内タンパク質量が減少することが確認されている。したがって、miR-1 による ES 細胞の心筋分化抑制効果は、*Cdk9* の翻訳阻害がもたらす p300/GATA4/Cdk9 依存的な胎児型心筋遺伝子の発現低下によるものであると考えられる。

ES 細胞に HDAC 阻害薬トリコスタチン A (trichostatin A; TSA)を投与すると、恐らくは p300 を介するヒストンや GATA4 のアセチル化が亢進し、心筋遺伝子の発現量や自律拍動する心筋細胞コロニーの数が増加する²⁵⁾²⁶⁾。TSA の投与で miR-1/-133 の発現量も低下することが認められるが、この TSA 依存的な抑制は複数の組織で発現する miR-24 にははたらかないことから、何らかの選択性・特異性の存在が示唆さ

れる。その分子機構は未解明だが、低分子による miRNA の制御が可能になれば新たな薬剤候補になり得るだろう。

一方、EB 形成による分化誘導では、心筋分化における miR-1/-133 のはたらきについて、二次元平面培養による自発的な分化とは異なる結果が報告されている²⁷⁾。miR-133 の強制発現が心筋分化を抑制するという結果は両者で共通するが、EBにおいては、miR-1 は Notch リガンドであるデルタ様(*Delta-like*; *Dll*)-1 を標的的とすることで心筋分化を促進するはたらきを示す。

平面培養と EB 形成における相違の原因のひとつは、細胞間の接着や相互作用の違いによるものかもしれない。ES 細胞の集団は発生時の胚における細胞間相互作用を正確に再現しているわけでは決してない。ショウジョウバエの miR-1 も *Dll*-1 ホモログを標的とするが、中胚葉特異的に miR-1 を過剰発現させると心筋前駆細胞の数が減少し、心臓の形態形成に異常が生じる²⁸⁾。*Dll*-1 は Notch を介した細胞間の情報伝達に機能するため、細胞がおかれた状況によって miR-1 の影響も異なってくると考えられる。

同様に、平面培養と EB 形成においては遺伝子発現の時間的経過も異なる。たとえば miR-1 の発現量は、平面培養では分化誘導 8 日目まで増加を続けるが、EB では形成 6 日目にピークを迎える。また、miR-1 の標的である *Cdk9* の結合因子 GATA4 の発現パターンも両者で異なる。miRNA は決まった遺伝子を機械的に標的としているのではなく、シグナルのフィードバックや競合、細胞の微小環境の影響を受けてその機能を発揮する。したがって、miRNA を用いて、あるいは標的として幹細胞の分化を制御するには、培養・分化誘導法の検討や最適化が必要になるだろう。

体細胞のリプログラミングと miRNA

幹細胞研究の目覚ましい進展に伴い、心血管再生医療のストラテジーも日進月歩で進化している。とくに、

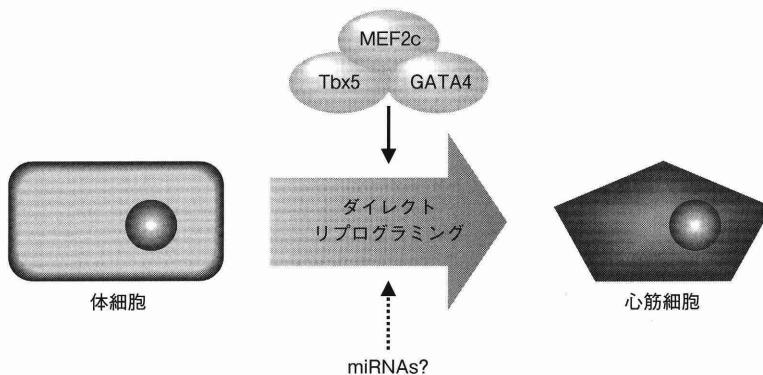


図 3 体細胞から心筋細胞への直接的な形質転換

線維芽細胞に GATA4/MEF2c/Tbx5 を導入することで、自律的に拍動する心筋細胞へと直接的に形質転換することができる。体細胞から iPS 細胞へのリプログラミングに miRNA が関与していることから、心筋細胞などへのダイレクトリプログラミングにも miRNA が機能していることが考えられる。

体細胞をリプログラミングする知見と技術は長足の進歩を遂げている。線維芽細胞などの体細胞に複数の転写因子(Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc など)を導入して作出される iPS 細胞は、ES 細胞と同様の自己複製能および多分化能をもつ万能性幹細胞である²⁹⁾⁻³¹⁾。さまざまな iPS 細胞の作製方法が提唱されているが、癌遺伝子を含む転写因子の外挿や不十分な樹立効率など、いずれも臨床応用を前に解決すべき課題を抱えている。これらの問題を克服するため、miRNA を用いたアプローチが試みられている(図 1)。

未分化 ES 細胞特異的な miR-290 クラスターのサブセットである miR-291-3 p/-294/-295 を体細胞へ導入すると、Oct4/Sox2/Klf4 によって誘導される iPS 細胞へのリプログラミング効率が高まる³²⁾。この効果は c-Myc 存在下では得られないこと、c-Myc が miR-290 クラスターのプロモーター領域に結合することから、iPS 細胞樹立における c-Myc の貢献の一部は miRNA の発現促進を介したものであることが示唆される。

また、miR-302/-367 クラスターを強制発現させるだけで、短時間かつ高効率に体細胞を iPS 細胞へリプログラミングできるという結果も報告されている³³⁾。

Oct4/Sox2 によって制御される miR-302 は ES 細胞で高レベルに発現し、サイクリン D1 を標的として細胞周期を G₁ 期から S 期へと進ませる³⁴⁾。転写因子によるリプログラミング同様、miR-302/-367 による体細胞の初期化も、バルプロ酸による HDAC2 の抑制によって著明に亢進する。幹細胞の維持・分化において miRNA がクロマチンのリモデリングに関与することは少し述べたが、その全体像や詳細については今後の研究が待たれる。

樹立された iPS 細胞は基本的に、ES 細胞に用いられる手法で心血管細胞へと分化誘導することができる³⁵⁾³⁶⁾。しかし、異なる方法や体細胞から作出された複数の iPS 細胞株間では、分化効率に違いがみられる場合がある。たとえば、一部の iPS 細胞株はほかの ES/iPS 細胞株と比較して心筋分化効率が低く、TSA による心筋分化促進作用にも部分的な抵抗性を示す³⁷⁾。この問題を解決する方法のひとつとして、体細胞を目的の細胞に直接リプログラミングすることが考えられる。すでに、GATA4/MEF2c/Tbx5 を導入することで、心臓および皮膚の線維芽細胞を自律拍動する心筋細胞へと形質転換できることが報告されている(図 3)³⁸⁾。

miRNA によって体細胞が iPS 細胞へとリプログラミングされることを考えると、体細胞から別種の体細胞への直接的な形質転換においても、miRNA が重要な役割を担っていることは想像に難くない。今後、miRNA の分子機構がより一層明らかにされることで、高効率、簡便、迅速な心血管細胞への分化、あるいはリプログラミング手法が確立され、心血管疾患に対する再生医療への途が開かれることが期待される。

◎References

- 1) Evans MJ, Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292** : 154-156, 1981
- 2) Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al : Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35** : 215-217, 2003
- 3) Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al : Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* **129** : 303-317, 2007
- 4) Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, et al : Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* **19** : 489-501, 2005
- 5) Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, et al : Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 12135-12140, 2005
- 6) Wang Y, Medvid R, Melton C, et al : DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* **39** : 380-385, 2007
- 7) Tay Yvonne, Zhang J, Thomson AM, et al : Micro RNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455** : 1124-1128, 2008
- 8) Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, et al : Micro RNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* **137** : 647-658, 2009
- 9) Suh MR, Lee Y, Kim JY, et al : Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* **270** : 488-498, 2004
- 10) Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, et al : MicroRNAs control *de novo* DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* **15** : 259-267, 2008
- 11) Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, et al : A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol* **15** : 268-279, 2008
- 12) Srivastava D : Making or breaking the heart : from lineage determination to morphogenesis. *Cell* **126** : 1037-1048, 2006
- 13) Cordes KR, Srivastava D : MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circ Res* **104** : 724-732, 2009
- 14) Liu N, Olson EN : MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell* **18** : 510-525, 2010
- 15) Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, et al : microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* **22** : 3242-3254, 2008
- 16) Zhao Y, Samal E, Srivastava D : Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436** : 214-220, 2005
- 17) Yanazume T, Hasegawa K, Morimoto T, et al : Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Mol Cell Biol* **23** : 3593-3606, 2003
- 18) Takaya T, Kawamura T, Morimoto T, et al : Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **283** : 9828-9835, 2008
- 19) Sunagawa Y, Morimoto T, Takaya T, et al : Cyclin-dependent kinase-9 is a component of the p300/GATA4 complex required for phenylephrine-induced hypertrophy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **285** : 9556-9568, 2010
- 20) Kaichi S, Takaya T, Morimoto T, et al : Cyclin-dependent kinase 9 forms a complex with GATA4 and is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiomyocytes. *J Cell Physiol* **226** : 248-254, 2011
- 21) Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al : Micro RNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* **13** : 613-618, 2007
- 22) Sayed D, Hong C, Chen IY, et al : MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hyper-

- trophy. *Circ Res* **100** : 416-424, 2007
- 23) Takaya T, Ono K, Kawamura T, et al : MicroRNA-1 and microRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells. *Circ J* **73** : 1492-1497, 2009
 - 24) Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al : The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* **38** : 228-233, 2006
 - 25) Kawamura T, Ono K, Morimoto T, et al : Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J Biol Chem* **280** : 19682-19688, 2005
 - 26) Hosseinkhani M, Hasegawa K, Ono K, et al : Trichostatin A induces myocardial differentiation of monkey ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* **356** : 386-391, 2007
 - 27) Ivey KN, Muth A, Arnold J, et al : MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **2** : 219-229, 2008
 - 28) Kwon C, Han Z, Olson EN, Srivastava D : Micro RNA-1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 18986-18991, 2005
 - 29) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676, 2006
 - 30) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007
 - 31) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318** : 1917-1920, 2007
 - 32) Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blelloch R : Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* **27** : 459-461, 2009
 - 33) Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, et al : Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* **8** : 376-388, 2011
 - 34) Card DA, Hebbar PB, Li L, et al : Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **28** : 6426-6438, 2008
 - 35) Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* **118** : 498-506, 2008
 - 36) Zwi L, Caspi O, Arbel G, et al : Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation* **120** : 1513-1523, 2009
 - 37) Kaichi S, Hasegawa K, Takaya T, et al : Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovasc Res* **88** : 314-323, 2010
 - 38) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al : Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142** : 375-386, 2010