

丹井海人、5401065C
分子細胞生理学講座/矢野元准教授

責任指導教員による確認

本レポートの作成は、提出者本人が行い、研究不正に該当する剽窃、偽造、捏造を行っていないことを確認しました。

指導教員自署

謝辞

本研究遂行にあたりご指導いただきました、矢野元准教授、三好翔子先輩（6回生）に感謝申し上げます。

タイトル

ナチュラルキラー細胞による腫瘍細胞排除を促進する、頭頸部扁平上皮がん細胞内因子発現変化の網羅的検索

要約

近年、がん微小環境（TME）は原発巣形成のみならず転移においても重要と認識されている。本研究グループは、化学療法の選択肢が限られる頭頸部がんにおけるリンパ節転移機構を解析してきた。その過程で、がん進行に関連する二因子（NHE1/LOXL2）の二重ノックダウン（dKD）により、腫瘍細胞がナチュラルキラー（NK）細胞により排除されやすくなることを見出した。トランスクリプトーム解析の結果、dKD 細胞では創傷治癒シグナルの活性化、部分的 EMT、ECM 再構築、炎症性サイトカイン放出、ならびに高代謝・酸化ストレス状態の亢進が観察された。これらの変化により、NK 細胞に対する感受性が著しく増強される可能性が示唆された。

緒言

近年のがん研究においては、がん微小環境（TME）の重要性が、原発巣の形成における重要性に加えて、転移においても広く認識されるに至っている。私が参加した研究グループは、他領域に比して比較的化学療法の選択肢が少ない頭頸部がんを対象とし、そのリンパ節転移の分子機構を追求して来ていた。この研究の中で最近、がん進行と関連することを本グループで見出した二因子の発現を抑制した腫瘍細胞がナチュラルキラー細胞からの排除を受けやすくなる、と考えられる結果を得ていた。この二因子抑制が腫瘍細胞にいったいどのような変化を及ぼすことでナチュラルキラー細胞からの排除を受けやすくなるのかを探索するため、網羅的解析を行った。わたしはこの解析に参加したので以下に報告する。

(背景)

当研究室でこれまでに、高転移性ヒト頭頸部扁平上皮がん細胞（HNSCC）の舌への移植により、顎下リンパ節への転移を解析するマウスモデルを樹立し、解析に供してきた。移植原発巣や転移した腫瘍細胞の量を測定する系を整備することで、転移を定量することが可能となった。

この系を用いてリンパ節転移に関与する因子を検索し、複数の因子の関与を見出した。細胞内 pH の調節を担う Na^+ / H^+ 交換輸送体 1 (Na^+ / H^+ exchanger 1 : NHE1)、および細胞外マトリックス再編成を担う Lysyl Oxidase Like 2 (LOXL2) をそうした検索から見出したが、実際のヒト舌がんにおいてもこれらの発現亢進が確認された。これら二因子それぞれの発現を抑制した HNSCC を作成して上記の測定系にかけるといずれもリンパ節転移が減弱したことから、これらの因子がたしかにがん転移に寄与することが確認された。そこでさらに、これら二因子を並列に発現抑制（double knockdown : dKD）すること

で相加的あるいは相乗的な転移抑制が期待できると考え、上記のマウスモデル系にかけて検討を行ったところ、予想外に移植原発巣の形成不全を見出した。このことは各因子をそれぞれ単独で発現抑制 (knockdown : KD) した細胞の移植においては観察されなかったことから、二つの因子の機能を失ったことが組み合わさったことで、この移植原発巣形成不全に至ったと考えられた。

このことの原因を探求したところ、KD 細胞たちの培養下における生育性や接着性において有意な変化を観察しなかったことから、宿主組織内において、効率的な排除を受けていると考えられた。宿主として用いているマウスはヌードマウスであることから、T リンパ球系が不全である。したがって腫瘍細胞の排除に主体的に関与しているものがナチュラルキラー (NK) 細胞である可能性について検討した。まず腫瘍細胞移植組織を観察したところ、CD56 陽性 / CD3 陰性の NK 様細胞の動員が観察され、NK 細胞の関与を想定して矛盾がないことが確認された。さらにヒト NK 細胞株 NK92MI と各 KD 細胞の共培養により、NK 細胞による腫瘍細胞の殺傷に対する KD の効果を検討したところ、NHE1 KD 細胞において生存する腫瘍細胞が減少した。この結果は *in vivo* の結果と少し矛盾する。すなわち、NK 細胞からの排除され易さのみに注目すると、NHE1 KD 細胞においても移植原発巣形成が不全となることが想定されるのに、移植実験においては dKD 細胞においてのみ移植原発巣形成不全が観察される。このことは NHE1 KD による腫瘍細胞の変化に加えて LOXL2 KD による変化が相加的に作用することが、*in vivo* における NK 細胞との関わりが移植腫瘍細胞の効果的な排除において必要であることを示している。

次に我々は、dKD によるどのような腫瘍細胞の変化が NK 細胞を働きやすくするか探索し、これまでに、NHE1 KD に伴う PD-L1 の減少と、LOXL2 KD に伴う細胞がコラーゲン沈着の減少を観察している。PD-L1 は NK 細胞の PD-1 分子と共役することで NK 細胞機能を抑制することが知られている。さらに細胞外基質 (ECM) コラーゲンへの NK 細胞の結合が LAIR-1 と呼ばれるコラーゲン受容体を介して行われ、この受容体が ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif) をその分子内に持つことから、コラーゲンへの接着が NK 細胞機能に対して抑制的に作用すると考えられている。つまり、dKD 細胞においては、その NK 細胞との関わりにおいて、PD-L1 / PD-1 系、および ITIM シグナルの動員が併せて失われることで、親株の腫瘍細胞が行う NK 細胞機能抑制をできなくなり、移植原発巣において効果的に排除されたと考えられた。しかしながら、NHE1 KD がどのような機序で PD-L1 発現の減少に至るのか、また LOXL2 KD に伴うコラーゲン環境の変化がどのように起こるのか、などは不明なままである。NK 細胞をがん治療に用いるための試みは、すでに CAR (Chimeric Antigen Receptor) -NK の開発として進んでおり、おおきな期待が寄せられている。

これに対してわれわれの立場は、NK 細胞に働きかけるというものでなく、NK 細胞から排除されやすいように腫瘍細胞側に働きかける、というものであり、CAR-NK と共

存・併用することで、さらに効果的な NK 細胞治療を目指すことができる可能性を秘めている。そこで、今般の dKD を契機・陽性対照として、どのような変化を腫瘍細胞に誘導すれば、NK 細胞からの排除をうけ易くできるのかを検索することとした。

手法として、dKD に伴って腫瘍細胞に起こった変化を網羅的に検索することとし、まず次世代シーケンシングによる mRNA 発現解析により、遺伝子発現プロファイルを取得し、親株腫瘍細胞と比較することとした。

実験方法

トランスクリプトーム解析

トランスクリプトームの定量および発現変動解析は、RaNA-seq クラウドプラットフォーム (Prieto and Barrios, 2019) を用いて実施した。

1) 定量解析

トランスクリプトの発現量は、RaNA-seq に実装されている Salmon アルゴリズム (Patro et al., 2017) を用いて定量した。パラメータはデフォルト設定を使用し、ペアエンドモードで解析を行った。

2) 網羅的遺伝子発現解析 (Differentially Expressed Genes : DEG)

発現変動解析には DESeq2 (Love, Anders, and Huber, 2014) を使用した。検定には Wald 検定を用い、フィッティングタイプはパラメトリック (parametric fit) を選択した。発現変動遺伝子 (DEGs) は、Benjamini-Hochberg 法による多重検定補正後の q-value (False Discovery Rate (FDR)) が 0.05 未満、かつ $|\log_2 \text{fold change}|$ が 1.0 より大きいという基準を満たすものとして同定した。

2) DAIVD を用いたエンリッチメント解析

発現変動遺伝子 (DEGs) の生物学的機能を特定するため、DAVID データベース (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) を用いて、Gene Ontology (GO) および KEGG パスウェイのエンリッチメント解析を実施した。解析の結果、Benjamini-Hochberg 法による q-value が 0.05 未満となったタームを、統計的に有意に濃縮された機能として特定した。

3) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) によるエンリッチメント解析

遺伝子セットレベルでの発現変動解析は、RaNA-seq クラウドプラットフォーム (Prieto and Barrios, 2019) に実装されている GSEA モジュールを用いて実施した。具体的な解析には、内部で高速な事前ランク付け遺伝子セットエンリッチメント解析アルゴリズムを実装した R パッケージ (Sergushichev, 2016) が使用された。リファレンス遺伝子

セットデータベースには、Molecular Signatures Database (MSigDB) に含まれる、Gene Ontology (GO)、REACTOME、および KEGG の各コレクションを使用した。GSEA の入力として、全遺伝子を DESeq2 の出力に基づき算出されたランキング統計量に基づいてランク付けしたリストを使用した。統計的有意性の基準は、Nominal p-value < 0.05 かつ q-value < 0.05 を満たす遺伝子セットとした。

4) Ingenuity Pathway Analysis (IPA) によるパスウェイ解析

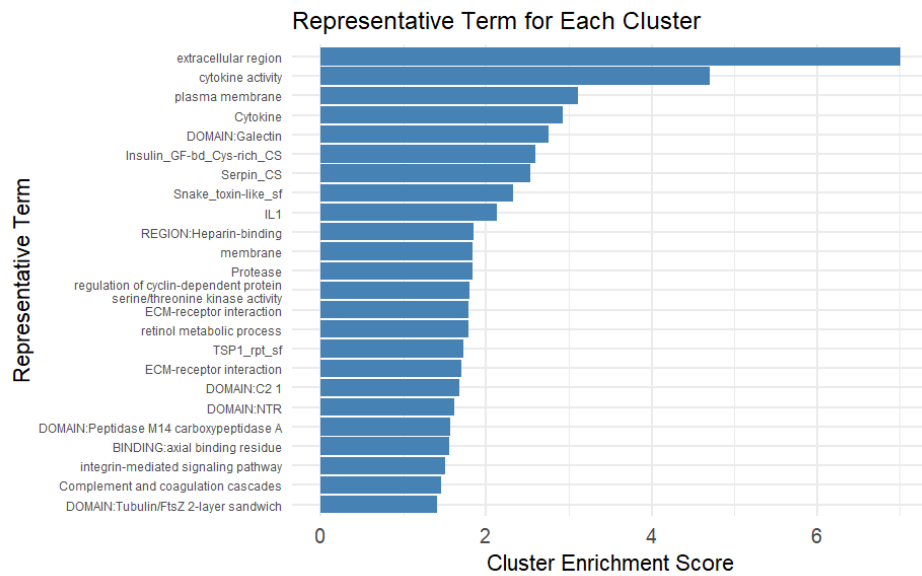
パスウェイ解析および機能ネットワーク解析には、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を使用した。各遺伝子の識別子、Fold change、および p 値を含むデータセットを IPA にインポートし、コア解析 (Core Analysis) を実施した。解析に用いられたデータベースのバージョンは Content version 150276282 (Release Date: 2025-09-04) である。統計的有意性は、Fisher の正確検定によって計算された p 値により評価した。解析結果から、主要な Canonical Pathways (標準的パスウェイ) および上流制御因子 (Upstream Regulators) を特定した。パスウェイや制御因子の活性化状態を予測するため、activation z-score を指標として使用し、その絶対値が 2.0 より大きい場合 ($|z\text{-score}| > 2.0$)、統計的に有意な活性化または抑制と判定した。

結果 (Results)

1. dKD による遺伝子発現変化の網羅的解析および機能アノテーション解析による腫瘍微小環境のリモデリング示唆

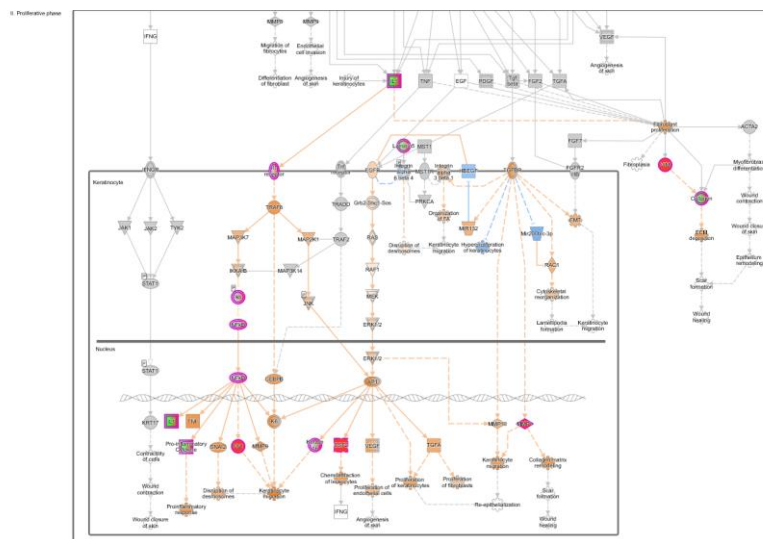
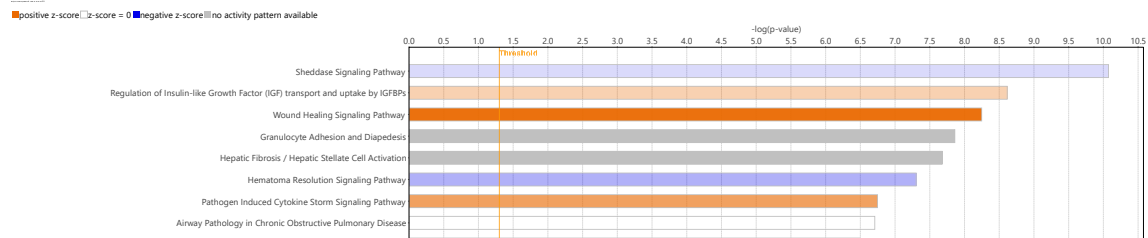
本研究ではトランスクリプトーム解析 (RNAseq 解析) の結果、False Discovery Rate (FDR) < 0.05 および $|\log \text{Fold Change} (\log \text{FC})| > 1.0$ の基準を満たす 5832 個の差次的発現遺伝子 (DEG) が同定された。これらの DEG を階層的クラスタリングで可視化した結果、Enrichment Score (ES) > 1.3 を満たす 24 個の有意なクラスターが同定された。最も高い濃縮を示したクラスター (Cluster 1, ES=7.01) は、「Extracellular region (細胞外領域)」および「Secreted (分泌)」に関連する遺伝子群で構成されていた。次いで、「Cytokine activity (サイトカイン活性)」 (Cluster 2, ES=4.71)、「Plasma membrane (細胞膜)」 (Cluster 3, ES=3.11)、「Cytokine」「Cellular response to LPS (LPS 刺激応答)」 (Cluster 4, ES=2.93) などのクラスターが確認された。さらに、構造的変化を示唆する「ECM structure (細胞外マトリクス (ECM) 構造)」 (Cluster 14, ES=1.79) や「Focal adhesion (接着斑)」 (Cluster 17, ES=1.70) において濃縮を示しており、dKD 細胞では劇的な微小環境のリモデリングが生じていることが示唆された。

Top Enriched Clusters (Score >= 1.3)



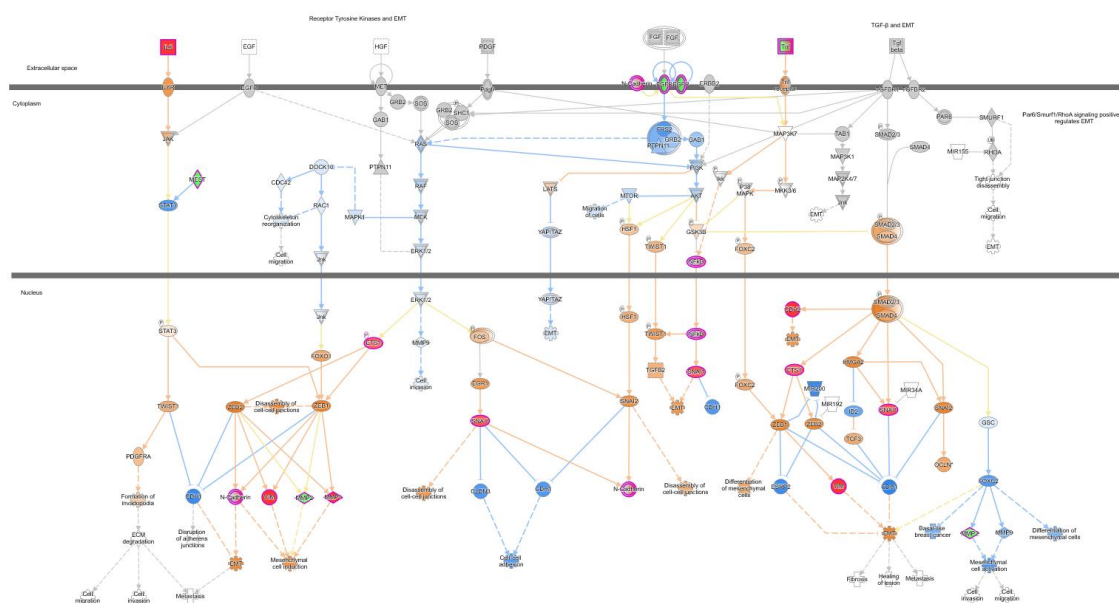
2. “Wound Healing” シグナルの活性化に伴う部分的 EMT および ECM 再構築

これら多岐にわたる遺伝子変動を統括するメカニズムを探るため、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いたパスウェイ解析を行った結果、“Wound Healing Signaling Pathway” (創傷治癒シグナル経路) の有意な活性化 (z score 2.86) が同定された。



詳細な解析結果から、dKD 細胞はこのプログラムの下で「部分的上皮間葉転換 (Partial EMT)」とも呼ぶべき形質転換と、ECM の再構築を協調的に引き起こしていることが示唆された。

第一に、EMT の指標となるカドヘリン・スイッチが確認された。上皮マーカーである *E-cadherin (CDH1)* の減少 (logFC -0.43) に加え、密着結合因子 *Claudin-1 (CLDN1)* が劇的に低下 (logFC -2.57) し、一方で間葉系マーカーである *N-cadherin (CDH2)* (logFC +2.67) や *Vimentin (VIM)* (logFC +3.73) の顕著な上昇が認められた。転写因子 *SNAIL1* (logFC +1.17) や *ZEB1* (logFC +0.69) の上昇もこれに合致する。しかしながら、上皮性骨格である *Cytokeratins (KRT14)* (logFC +1.52), *KRT16* (logFC +2.26) 等) は消失せず逆に発現上昇を示しており、かつ典型的な浸潤関連因子である *MMP2* (logFC -1.21) や *S100A4* (logFC -1.51) の発現は低下していた。これらの所見は、dKD 細胞が完全な間葉系細胞へと転換したのではなく、上皮的特性の一部を保持したまま間葉系形質を獲得する「部分的 EMT」の状態にあることを示している。



第二に、この細胞形質の変化と並行して、細胞外環境の物理的な再構築が進行していた。Cluster 1 および Cluster 14 の解析からは、*MMP1* (logFC +1.52) や *ADAMTS1* (logFC +2.63) といった分解酵素の上昇による物理的障壁の解除と、*Fibronectin (FNI)* (logFC +1.56) の上昇による間質性マトリクスの形成が同時に起きていることが示された。すなわち、dKD 細胞では創傷治癒プログラムの活性化により、細胞自身の接着性が変化 (部分的 EMT) すると同時に、周囲の物理的障壁が分解・再構築 (ECM リモデリング) されていることが示唆された。

3. 炎症性サイトカインの放出と免疫回避機構の破綻

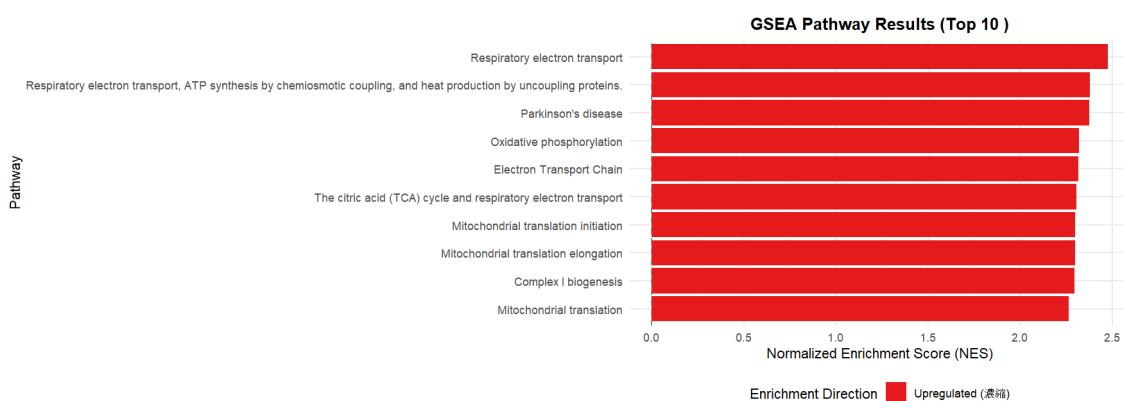
物理的な環境変化に加え、免疫学的環境も劇的に変化していた。Cluster 2/4 の解析では、*CXCL8 (IL-8)* (logFC +1.20) や、*IL24* (logFC +3.33)、*IL6* (logFC +1.59) などの炎症性サイトカイン/ケモカイン群が爆発的に発現上昇していた。このサイトカインの放出は、GSEA 解析によって裏付けられ、"Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)" 経路の有意な濃縮 (NES=1.81) が確認された。

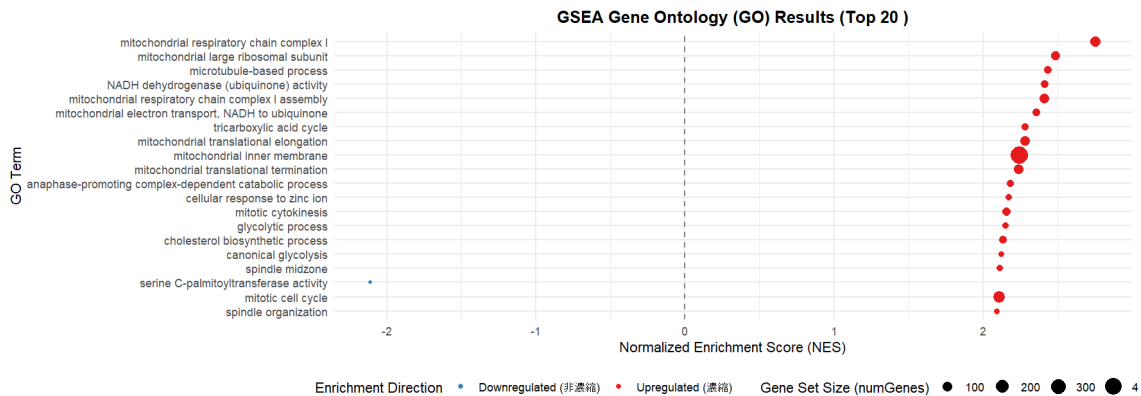
一方で、癌細胞が通常用いる免疫回避機構は崩壊していた。NK 細胞の活性化を抑制する *Galectin-3 (LGALS3)* (logFC-0.64) の発現低下に加え、IPA 解析からは抗原提示に関わる MHC Class I 分子群の機能抑制が予測された。また、NK 細胞の活性化受容体リガンドである *MICB* や *CD70* (logFC +1.83)、*ULBP2* (logFC +0.62) の上昇、活性化受容体 (*ULBP2*) の切断を担う *ADAM17* (logFC -0.36) の減少も確認された。これらの結果は、dKD 細胞が能動的に攻撃を誘発する状態にあることを示している。

4. dKD 細胞における高代謝・酸化ストレス状態の亢進

GSEA の結果から、dKD 細胞は極度の代謝ストレス状態にあることが示された。酸化的リン酸化 (NES=2.32)、電子伝達系 (NES=2.47)、Tricarboxylic acid cycle (TCA 回路) (NES=2.28) といったエネルギー代謝経路の著しい活性化が認められた。

これに伴い、活性酸素種 (ROS) を消去する抗酸化酵素の誘導を示す "Superoxide dismutase activity" (NES=1.93) の上昇も確認され、dKD 細胞が過剰な代謝状態に伴う酸化ストレス下にあることが示唆された。





考察 (Discussion)

「創傷治癒様プログラム」が招く物理的・免疫学的脆弱性

本研究の結果は、NHE1/LOXL2 の dKD が、「創傷治癒シグナル」に類似したプログラムを稼働させ、癌細胞を部分的 EMT 状態へと誘導することで、NK 細胞に対する感受性を劇的に高めることを示唆している。

1. 部分的 EMT と ECM リモデリングによる「浸潤の場」の提供

dKD 細胞は、*VIM* や *FN1* の高発現に見られるような間葉系形質を獲得しつつも、*KRTs* の保持や *MMP2* の低下に見られるように、完全な悪性転換 (Complete EMT) には至っておらず、部分的 EMT にとどまっていると考えられる。

部分的 EMT とは、細胞が完全に間葉系細胞へと移行せず、上皮細胞と間葉系細胞の両方の特性を同時に保持するハイブリッドな表現型を指している²。この概念は、上皮間葉可塑性 (Epithelial-Mesenchymal Plasticity; EMP) とも定義されており、細胞が上皮状態と間葉状態の間の二元的なスイッチとして存在するのではなく、動的に相互変換可能なスペクトラムとして存在するという新しい知見を反映している。

しかしながら、この dKD 細胞で観察された部分的 EMT 様の形質は、頭頸部扁平上皮がんの患者腫瘍の単一細胞 RNA-seq 解析によって特定された、特定の部分的 EMT プログラムとは、その分子機構において重要な相違点を持つことが示唆される。

Cell 論文で定義された頭頸部扁平上皮がんの部分的 EMT プログラムは、ECM 関連遺伝子 (*VIM* や *ITGA5* など) のアップレギュレーションを特徴とする一方で、古典的な EMT 転写因子である *ZEB1/2*、*TWIST1/2*、*SNAIL1* の発現は検出されないことを重要な特徴としている。これに対し、我々の dKD 細胞では、間葉系マーカー (*VIM*、*FN1*) および上皮マーカー (*KRTs*) ハイブリッドな発現を保ちながらも、RNA-seq 解析の結果、古典的な EMT 転写因子である *SNAIL1* および *ZEB1* の発現増加が同時に確認されている。したがって、dKD 細胞で観察された部分的 EMT 様の形質は、上皮マーカーと間葉系マーカーのハイブリッドな発現を保持している点では一般的定義に合致するもの

の、古典的な EMT 転写因子である SNAI1 および ZEB1 の発現増加を伴っているという点で、Cell 論文で定義された頭頸部扁平上皮がんにおける特定の部分的 EMT プログラムとは違った独自のメカニズムによって駆動されている可能性が高い。

さらに、*CLDN1* 等の細胞間接着の崩壊と *MMP1* による基底膜成分の分解も伴っていることから ECM の軟化が引き起こされている可能性がある。これは、NK 細胞などのエフェクター細胞にとって、物理的障壁が排除され標的細胞へアクセスしやすい環境が形成されたことが考えられる。さらに劇的な発現上昇を認めた FN1 は、NK 細胞の浸潤を可能にする因子として知られている。FN1 は NK 細胞の遊走能を大幅に高めるとともに、CD11b/Src/ β -カテニン経路を介して ERK 活性化を含むシグナル経路を作動させ、生存を維持する働きがある。そのため、dKD 細胞では NK 細胞がより浸潤しやすい環境が再構築されていると考えられる。

通常、EMT は癌の転移・浸潤を促進するが、本モデルにおける部分的 EMT は、強固な防御壁を捨て去りながらも強力な逃避能 (*MMP2*等) を獲得しきれていない「無防備な過渡期状態」に細胞を留まらせている可能性があり、これが高い NK 感受性の一因であると推測される。

2. SASP シグナルによる能動的な免疫応答の誘発と防御の解除

細胞は EMT を経験し間葉系形質を獲得する過程で、腫瘍微小環境 (TME) を炎症性および免疫抑制的に改変する可溶性因子を分泌する。この EMT に伴う分泌表現型は、老化関連分泌表現型 (SASP) の IL-6 や IL-8 といった炎症性サイトカインの放出を特徴としている。

GSEA 解析により "Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)" 経路の有意な濃縮 (NES=1.81) が確認されたことは、dKD 細胞で見られた炎症性サイトカインの爆発的な産生が、単なる創傷治癒反応の一部ではなく、間葉系化によって引き起こされた SASP 類似の能動的な免疫細胞誘引シグナルであると解釈できる。

さらに決定的な要因として、dKD 細胞では免疫回避の主要因子である MHC Class I 関連分子や Galectin-3 の発現が低下していた。つまり、dKD 細胞は創傷治癒様プログラムによって物理的なバリアを自ら破壊し、免疫細胞を呼び寄せ、かつ最後の砦である免疫チェックポイント分子による防御も失っている。この多層的な「脆弱性」の獲得が、NHE1/LOXL2 阻害がもたらす抗腫瘍効果の本質であると考えられる。

3. 代謝リプログラミングと酸化ストレスによる「攻撃許可」

dKD 細胞における代謝リプログラミングは、NHE1 の欠失に起因する細胞内酸性化ストレスへの適応反応であり、これが NK 細胞に対する免疫原性を獲得させる主要なメカニズムであることが強く示唆される。

GSEA 解析で認められた酸化的リン酸化 (NES=2.32) や電子伝達系 (NES=2.47) の著

しい活性化は、NHE1 欠失による細胞内酸性化ストレス に抗うための代謝的な過剰補償であると解釈でき、結果としてミトコンドリアの過負荷は活性酸素 (ROS) の増大 (Superoxide dismutase activity の上昇, NES=1.93) を引き起こしたと考えられる。

この酸化ストレス応答は、MHC クラス I 様タンパク質 (MICA、MICB、ULBP1-6) などの NK 細胞活性化リガンドの発現を正に制御する共通経路として知られる DNA 損傷応答主要なシグナルの一つである。

先行研究に基づくと、ROS の蓄積は、Ataxia telangiectasia, mutated (ATM) および ATM- and Rad3-related (ATR) キナーゼによって開始され、下流の Chk1/2 キナーゼを介してシグナルが伝達される DDR 経路を活性化する。この ATM/ATR-Chk1/2 経路は、MICB や ULBP2 を含む NKG2D リガンドの転写レベルでの発現誘導を引き起こす。

したがって、dKD 細胞では、酸性化ストレスに起因する代謝的過負荷が DNA 損傷応答を活性化させ、その結果細胞の異常を免疫系に警告するシグナルが発現誘導された可能性が高い。

(展望)

本研究では、トランスクリプトーム解析により dKD 細胞における劇的な遺伝子発現変動が明らかになった。今後の研究としては、これらの結果が細胞レベルでも同様に生じているか、qPCR やイムノブロットィング、フローサイトメトリーを用いて確認する必要がある。さらに、今回は NK 細胞に着目したが、dKD 細胞が T 細胞など他の免疫細胞に対してどのような影響を与えるかについても共培養実験等を通じて検討し、本治療戦略の臨床応用に向けたメカニズムの全容解明を目指したい。

参考文献

1. Prieto C, Barrios D. RaNA-Seq: Interactive RNA-Seq analysis from FASTQ files to functional analysis. *Bioinformatics*. 2019 Nov 15;btz854. doi: 10.1093/bioinformatics/btz854. Epub ahead of print. PMID: 31730197.
2. Verstappe J, Berx G. A role for partial epithelial-to-mesenchymal transition in enabling stemness in homeostasis and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2023 May;90:15-28. doi: 10.1016/j.semcancer.2023.02.001. Epub 2023 Feb 10. PMID: 36773819.
3. Puram SV, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell* 2017 Dec 14;171(7):1611-1624.e24. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.044. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29198524; PMCID: PMC5878932.
4. Somersalo K, Saksela E. Fibronectin facilitates the migration of human natural killer cells. *Eur J Immunol*. 1991 Jan;21(1):35-42. doi: 10.1002/eji.1830210107. PMID: 1703963.

5. Zhang T, et al. Fibronectin maintains survival of mouse natural killer (NK) cells via CD11b/Src/beta-catenin pathway. *Blood*. 2009 Nov 5;**114**(19):4081-8. doi: 10.1182/blood-2009-05-219881. Epub 2009 Sep 8. PMID: 19738028.

6. Dominguez C, et al. Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor. *Semin Cancer Biol*. 2017 Dec;**47**:177-184. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.08.002. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28823497; PMCID: PMC5698091.

7. Cerboni C, et al. The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D and DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. *Front Immunol*. 2014 Jan 7;**4**:508. doi: 10.3389/fimmu.2013.00508. PMID: 24432022; PMCID: PMC3882864.

8. Gasser S, et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005 Aug 25;**436**(7054):1186-90. doi: 10.1038/nature03884. Epub 2005 Jul 3. PMID: 15995699; PMCID: PMC1352168.