

Thesis

Tumor Necrosis Factor- α のマウス肝細胞アポトーシス抑制作用における Inhibitor of Apoptosis Proteins の関与

埼玉医科大学内科学消化器・肝臓内科部門

菅原 通子

共同研究者：名越 澄子（埼玉医科大学内科学消化器・肝臓内科部門）

善本 隆之（東京医科大学内科学難病治療研究センター）

持田 智（埼玉医科大学内科学消化器・肝臓内科部門）

藤原 研司（独立行政法人労働者健康福祉機構横浜労災病院）

Inhibitory Action of Tumor Necrosis Factor- α on Hepatocyte Apoptosis may Depend on Inhibitor of Apoptosis Proteins in Mice

Kayoko Sugawara (Gastroenterology & Hepatology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

【Background and Aims】 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) produced by activated macrophages in the hepatic sinusoids regulates the development of massive liver necrosis, and also acts as a cytokine to induce liver regeneration. It is well known that TNF- α binding to its receptor activates caspase cascade resulting in apoptosis, whereas this apoptosis is inhibited by NF κ B, an endogenous transcriptional factor activated by TNF- α . Moreover, inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) are accelerated in the transcription by NF κ B, and can bind to the caspases to inactivate caspase cascade. In mice given a small amount of TNF- α , liver injury is not induced, but massive liver necrosis occurs following hepatocyte apoptosis after TNF- α administration in mice pretreated with d-galactosamine (GalN), a transcription inhibitor. In the present investigation, the relation of this inhibitory action of TNF- α on hepatocyte apoptosis to IAPs was studied using this model and other mouse models. **【Methods and Results】** With the following models, the hepatic expressions of IAPs were evaluated as IAP-1, IAP-2, XIAP and survivin mRNAs by RT-PCR. Hepatocyte apoptosis was determined by TUNEL method. 1) When mice received TNF- α , IAP-1 and IAP-2 were up-regulated in the liver from 1 to 5 hr with their peaks at 1 hr, but the expressions of XIAP and survivin were at the control levels until 8 hr. However, pretreatment with GalN before 30 min showed apoptosis in half of hepatocytes at 8 hr after TNF- α administration, with IAP-1 and IAP-2 expressions at the control levels at 1 hr. 2) Serum TNF- α concentration was increased later than 1 hr after endotoxin dosing in mice pretreated with *P. acnes*, but hepatocyte apoptosis was absent until 8 hr. Hepatic expressions of IAP-1 and IAP-2 were increased forming their peaks at 2 hr, but hepatic expressions of XIAP and survivin were unchanged until 8 hr. 3) IAP-1, IAP-2 and XIAP expressions were not changed from 10 min to 5 days after 70% liver resection, whereas survivin expression was increased at 36 and 48 hr after the operation. **【Conclusions】** The inhibitory action of TNF- α on hepatocyte apoptosis may be produced via IAP-1 and IAP-2. However, hepatocytes during liver regeneration may be protected from apoptosis through different mechanisms, especially by action of survivin.

Keywords: apoptosis . hepatocyte. TNF- α . IAPs. NF κ B.

緒言

近年、肝の壊死、線維化、および再生におけるマクロファージの働きが注目されている。特に、肝で活性化したマクロファージが放出するTNF- α は、肝細胞壊死と肝再生に重要な役割を果たしている¹⁾。

TNF- α はI型TNF- α 受容体(TNFR)と結合すると、Fas-associated death domain(FADD)を介してカスパーゼ・カスケードを活性化し、アポトーシスを誘導する一方で、異なる経路によりNF κ Bを活性化する²⁾。肝細胞では、通常TNF- α によるアポトーシスが起こりにくい¹⁾、NF κ Bの活性化を阻害すると、少量のTNF- α でもアポトーシスに至ることが知られている^{3,4)}。これらの観察から、NF κ Bの活性化により転写が促進される因子がアポトーシスのシグナル伝達を阻害し、細胞死から肝細胞を保護していると考えられてきた。

Inhibitor of apoptosis proteins(IAPs)は、種々の細胞においてアポトーシスを阻害するが、それらは活性化NF κ Bによって誘導される^{5,6)}。IAPsはN末端に約70のアミノ酸からなるBaculovirus IAP repeatドメインを有し、このモチーフが様々な刺激により誘導されるアポトーシスの抑制に必須であるとされている⁷⁾。ヒトでは8種類のIAPsが存在する。IAPsはカスパーゼと結合することによりカスパーゼの活性化を阻害する。IAPsに属すIAP-1, IAP-2, およびXIAPはカスパーゼ3, カスパーゼ7, プロカスパーゼ9と、survivinはカスパーゼ3, カスパーゼ7と結合する^{7,8)}。

一方、マウスでは肝障害を誘導しない少量のTNF- α でも、あらかじめ転写阻害作用のあるd-galactosamine(GalN)を投与しておく、広汎な肝壊死を惹起する(GalN/TNF- α モデル)⁹⁾。この障害肝モデルではTNF- α によるNF κ Bの活性化にGalNの投与は影響しないことから¹⁰⁾、GalNの作用は、活性化したNF κ Bにより促進されるアポトーシス抑制因子の発現を阻害していると推定される。

また、死菌の*Propionibacterium acnes*(*P. acnes*)を前投与したラットにエンドトキシンを投与すると、活性化した肝マクロファージが類洞内皮細胞を破壊し、類洞内にフィブリンが沈着して広汎な肝細胞壊死が生じる(*P. acnes*/エンドトキシンモデル)¹¹⁾。このモデルにおいては、血中TNF- α 値が一過性に上昇し¹¹⁾、エンドトキシンと同時に抗TNF- α 抗体を投与すると肝障害が抑制されることが判明しており¹²⁾、これらから、TNF- α は類洞内皮細胞を障害した結果、フィブリン沈着をきたすと考えられる。

さらに、70%部分肝切除後のマウスの残存肝ではsham術後に比べて、抗Fas抗体の投与によりアポトーシスに至る肝細胞の数が少ないことが報告されている¹³⁾。部分肝切除後の早期に血中TNF- α 値は

上昇し¹⁴⁾、肝再生促進に関与していると考えられているが、正常マウスにあらかじめTNF- α を投与しておく、Fasを介した肝細胞アポトーシスが抑制されることから¹³⁾、部分肝切除後に増加するTNF- α は、アポトーシスに抑制的に作用している可能性がある。

本研究では、TNF- α の抗アポトーシス作用とIAPsの肝における発現を、GalN/TNF- α モデルと*P. acnes*/エンドトキシンモデル、および部分肝切除後のマウスを用いて検討した。

方法

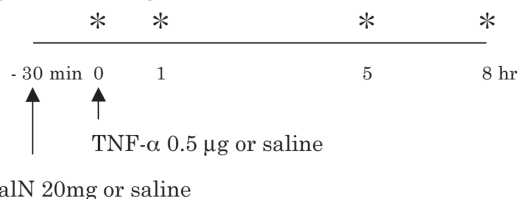
1. 実験計画(Fig. 1)

6週齢の雄BALB/cマウスを実験に供し、血液と肝の採取はエーテル麻酔下で行った。

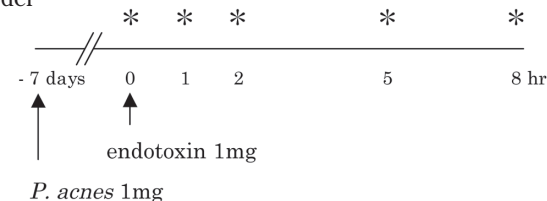
血中TNF- α 値とalanine aminotransferase(ALT)活性をキット(Genzyme Corp., MA と Iatron Lab., Tokyo)で測定し、摘出肝は10%ホルマリン固定、または液体窒素で凍結後-80°C保存した。マウスの飼育および実験に際しては、埼玉医科大学動物実験指針を遵守した。

- 1) 実験1: 22匹に20 mgのGalNまたは生食を腹腔内投与し、その30分後に0.5 μ gのTNF- α または生食を静注した。血液と肝をTNF- α 投与1, 5, または8時間後に採取した。
- 2) 実験2: 15匹に死菌*P. acnes* 1 mgを静注し、その7日後に1 mgのエンドトキシンを静注した。血液と

Experiment 1. D-galactosamine (GalN)/ TNF- α model



Experiment 2. *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)/endotoxin model



Experiment 3. Partial hepatectomy (Hx) model

* at 0, 10, and 30 min and 1, 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, and 120 hr



Fig. 1. Experimental designs. *: The blood and liver were collected.

肝をエンドトキシン投与の直後, 1, 2, 5, または 8時間後に採取した.

3) 実験3: 22匹にエーテル麻酔下で70%部分肝切除を行い, 血液と肝を手術の直後, 10分, 30分, 1, 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, または120時間後に採取した.

2. 肝組織像の観察と肝細胞のアポトーシスおよび mitotic indexの算定

ホルマリン固定した肝をパラフィン包埋して切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン染色した上で, 肝組織像を鏡視した. Mitotic indexは, 各切片につき3,000個以上の肝細胞を算定した. また, アポトーシスの数はTUNEL法(Integren Co., NY)を用いて, 各切片につき1,000個以上の肝細胞で算定した.

3. RT-PCRによるIAPs発現量の評価

凍結肝組織からRNAを抽出し, cDNAをキット(GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., MD)により合成した. Table 1に用いたprimerの配列を示す. PCRは94°Cを40秒, 60°Cを20秒, 72°Cを40秒の順に25-30サイクルで反応させた.

結果

1) GalN / TNF- α モデル

Fig. 2に示したように, 生食のみ投与した対照マウスでは肝におけるIAP-1とIAP-2の発現は認められなかったが, TNF- α を投与すると1時間後をピークとして5時間後まで発現が増強し, 8時間後には対照群のレベルに戻った. XIAPとsurvivinの発現は8時間後までに変化は見られなかった.

30分前にGalNを投与しておく, TNF- α 投与1時間後のIAP-1とIAP-2の発現は対照レベルにまで抑制された. 肝細胞アポトーシスと肝壊死像, および血中ALT値の上昇は, TNF- α 投与マウスでは見られなかったが, GalNを前投与したマウスでは, TNF- α 投与5時間後と8時間後に肝細胞アポトーシス, 肝壊死像, 血中ALT値の上昇の何れも認められた(Table 2).

2) *P. acnes* / エンドトキシンモデル

マウスに*P. acnes*を投与すると7日後の血中TNF- α

Table 1. Primer sequences for inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT)

mRNA	Sequences	Product size (bp)
IAP-1	5'GCTTACTCGATGCAGAAGACG3' 5'TTCTGTTTCACAGCATTGCAC3'	199
IAP-2	5'GCCACCTAGTGTTCCTGTTCA3' 5'CAACAAACTCCTGACCCTTCA3'	200
XIAP	5'ACTTGAGGTCCTGATTGCAGA3' 5'AGTGACCAGATGTCCACAAGG3'	193
surviving	5'CAGATCTGGCAGCTGTACCTC3' 5'ATGCTCCTCTATCGGGTTGTC3'	210
HPRT	5'GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG3' 5'GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT3'	352

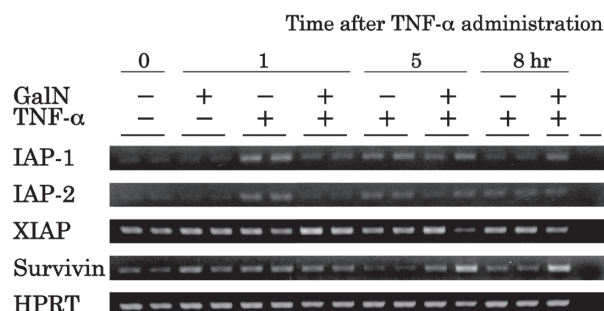


Fig. 2. mRNA expressions of IAP-1, IAP-2, XIAP, survivin and HPRT, in the liver of d-galactosamine (GalN) and/or TNF- α -treated mice. The right lane of each panel shows negative control without cDNA.

Table 2. Serum ALT activity and hepatocyte apoptosis in the d-galactosamine (GalN) / TNF- α model

Group	No. of mice	Time of killing (hr) ^a	ALT (IU/l)	Apoptotic hepatocyte (%)
saline / saline	2	1	29, 37	0
GalN / saline	2	1	30, 63	0
saline / TNF- α	3	1	57 \pm 49 ^c	0
GalN / TNF- α	3	1	36 \pm 11	0
saline / TNF- α	3	5	40 \pm 4	0
GalN / TNF- α	3	5	1741 \pm 1025*	26.0 \pm 13.1*
saline / TNF- α	3	8	72 \pm 25	0
GalN / TNF- α	1 ^d	8	4243	50.7

*p<0.05 vs saline / TNF- α group as control by student's *t*-test.

^a Time after administration of TNF- α .

^c Mean \pm SD. ^d Two mice died before collection of blood and liver.

値とALT活性は正常値であったが、さらにエンドトキシンを投与すると、その1時間後の血中TNF- α 値は著明に上昇し、2時間以降は次第に低下した (Table 3).

ALT活性はエンドトキシン投与後8時間目に投与前に比べて有意に上昇したが、肝細胞の壊死とアポトーシスは8時間目までは観察されなかった。

Fig. 3に示したように、*P. acnes*を投与したマウスでは、肝におけるIAP-1とIAP-2の発現はエンドトキシン投与の1時間後から増強し、2時間後にピークに達した。XIAPとsurvivinの発現は8時間後まで変化は見られなかった。

3) 部分肝切除後の再生肝モデル

Fig. 4に示したように、肝におけるIAP-1, IAP-2, XIAPの発現は、部分肝切除後120時間目まで変化は見られなかったが、survivinの発現は36時間目と48時間目に増強した。

肝細胞のmitotic indexは、術後2日目にピークに達し、以後次第に低下した (Fig. 5). 血中TNF- α 値は術後24時間目にのみ上昇 (90または190 pg/ml) したが、それ以前またはそれ以降120時間目までは低値 (26 pg/ml以下) であった。

考 察

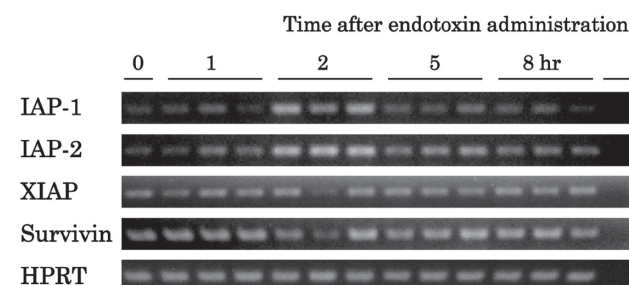
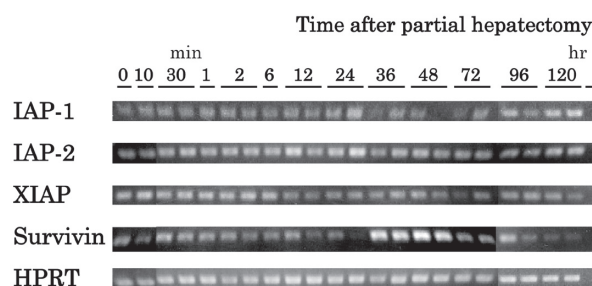
TNF- α の受容体にはI型とII型がある。TNF- α はI型TNF- α 受容体と結合するとアポトーシスを誘導するとともに、異なる経路を介してNF κ Bを活性化することにより、アポトーシスを抑制する作用もあることが知られている²⁾。本研究は、その機序を知る目的で、マウスの肝において活性化したNF κ Bがカスパーゼ・カスケードを阻害するIAPsを誘導するモデルを作成し、それらが肝細胞アポトーシスを抑制する可能性を検討したものである。

TNF- α をマウスに投与すると、肝におけるIAP-1とIAP-2の発現が一過性に増強したが、GalNを前

Table 3. Serum TNF- α concentration and ALT activity in the *P. acnes* / endotoxin model

Time after endotoxin injection (hr)	TNF- α (pg/ml)	ALT (IU/l)
0	34 \pm 17 ^a	28 \pm 16
1	12367 \pm 6772*	28 \pm 17
2	1417 \pm 1533	47 \pm 8
5	228 \pm 175*	72 \pm 44
8	120 \pm 17*	194 \pm 92*

^a Mean \pm SD of three mice. *p<0.05 vs 0 hr by *t*-test.

**Fig. 3.** mRNA expressions of IAP-1, IAP-2, XIAP, survivin and HPRT, in the liver of *P. acnes* and endotoxin-treated mice. The right lane of each panel shows negative control without cDNA.**Fig. 4.** mRNA expressions of IAP-1, IAP-2, XIAP, survivin and HPRT, in the liver of partially hepatectomized mice. The right lane of each panel shows negative control without cDNA.

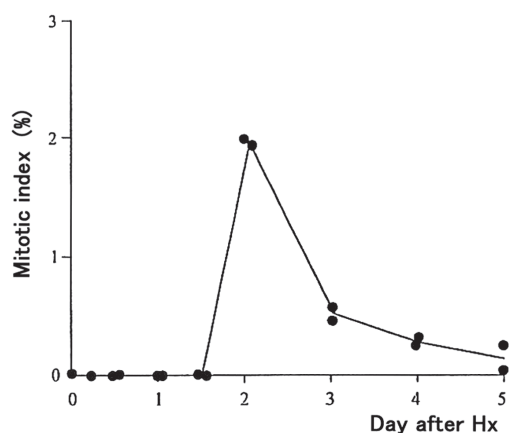


Fig. 5. Mitotic index of hepatocytes in mice after partial hepatectomy (Hx).

投与すると、このTNF- α の増強作用は抑制された。*P. acnes* /エンドトキシン投与マウスの肝においてもIAP-1とIAP-2の発現が増強したが、これらマウスのうち、肝細胞アポトーシスが観察されたのは、GalN / TNF- α 投与マウスのみであった。一方、survivinの発現は両モデルの肝においては変化しなかったが、部分肝切除後の残存肝において増強した。

TNF- α を投与したマウスには肝細胞アポトーシスが認められず、転写阻害作用のあるGalNを前投与するとアポトーシスが誘導されたことから、マウスの肝細胞においては抗アポトーシス作用をもつ蛋白の転写を阻害すると、TNF- α はアポトーシスを誘導すると考えられた。また、GalN / TNF- α モデルでの肝におけるIAP-1とIAP-2発現の動態から (Fig. 2), 両IAPsはTNF- α によるアポトーシスの誘導を調節する蛋白と推定された。この推察は、これまでに報告された実験結果からも支持される。すなわち、肝細胞において、TNF- α はNF κ Bを活性化し、この活性化を抑制するとアポトーシスが誘導され³⁾、活性化したNF κ Bは様々な細胞系におけるIAP-1, IAP-2, およびXIAPの発現を増強すると報告されている^{5,6)}。また、Wang CY.らは、線維肉腫細胞系においてNF κ Bにより誘導されたアポトーシスがIAP-1, IAP-2, TNFR-associated factor (TRAF) 1, およびTRAF2を導入することにより抑制されることを観察している⁶⁾。さらに、IAP-1とIAP-2はカスパーゼ・カスケードの下流に位置するカスパーゼ3とカスパーゼ7を阻害することも証明されている⁷⁾。

Bcl-2ファミリーに属するBcl-X_LとBfl-1もアポトーシスを抑制し、その上、NF κ Bは両者の転写を促進するとされるが^{15,16)}、その一方で、TNF- α を投与しても肝におけるBcl-X_LのmRNAと蛋白レベルは変わらなかったとの報告もある¹⁰⁾。さらに、GalNの前投与の有無に拘わらず、TNF- α を投与すると肝におけるBfl-1のmRNAレベルは増加していたとの観察があり¹⁰⁾、

従って、GalN / TNF- α モデルにおいては、これらの蛋白が肝細胞アポトーシスに関与している可能性は少ないと推定される。また、GalNはredox homeostasisの破綻を介してアポトーシスを誘導する可能性を示した報告もある^{10,17)}。IAPsとredox homeostasisとの関係について、今後さらに検討する必要がある。

Table 3とFig. 3に示したように、*P. acnes* /エンドトキシンモデルにおいて、血中TNF- α 値はエンドトキシン投与の1時間後に上昇し、さらに、その1時間後の肝におけるIAP-1とIAP-2の発現が著明に増強した。このモデルではTNF- α が類洞内皮細胞を障害し、その結果、類洞内にフィブリンが沈着し、広汎肝壊死が惹起されることを考慮すると、内因性のTNF- α が肝におけるIAP-1とIAP-2の発現を促進しているものと考えられる。一方、部分肝切除後5日までの残存肝では、IAP-1とIAP-2の何れの発現も増強していなかった。手術24時間後の血中TNF- α 値は上昇していたが、その値は*P. acnes* /エンドトキシンモデルにおけるピーク時の15分の1以下であった。肝切除後の残存肝においては、抗Fas抗体を投与しても、正常肝に比べて肝細胞のアポトーシスはごくわずかしき起こらないと報告されている¹³⁾。また、NF κ Bの活性化を抑えたマウスに部分肝切除を行うと肝細胞アポトーシスが起ることも報告されている¹⁸⁾。しかし、肝細胞特異的にNF κ Bを抑制すると、部分肝切除後にアポトーシスは認められないとの報告もある³⁾。再生肝モデルにおける肝細胞アポトーシスの抵抗性については、異なる視点から今後検討する必要がある。

部分肝切除の36時間後と48時間後の残存肝において、survivinの発現が著明に増強していた (Fig. 4)。Mitotic indexは手術後48時間目に増加し、以後次第に低下した (Fig. 5)。Survivinは特に細胞サイクルのG2/M期において細胞分裂とアポトーシスの抑制に関与するとされている^{19,20)}。SurvivinはNF κ Bの活性化とは異なる抗アポトーシス作用を発揮することから、その作用点については細胞増殖との関わりから検討する必要がある。

本研究は、in vivoで肝細胞アポトーシスと肝におけるIAP-1とIAP-2の発現との関係を観察した初めての実験結果である。肝細胞アポトーシスに係わるIAP-1とIAP-2の詳細な機序は不明であるが、本実験によりTNF- α により誘導されるIAP-1とIAP-2が肝細胞アポトーシスを抑制している可能性が示唆された。また、肝再生過程にある肝細胞においては異なる機序により肝細胞アポトーシスが抑制されている可能性があり、その調節因子の1つとしてsurvivinが挙げられよう。

結 論

肝細胞アポトーシスに係わるIAP-1とIAP-2の詳細な機序は不明だが、本実験によりTNF- α により誘導

されるIAP-1とIAP-2が肝細胞アポトーシスを抑制している可能性が示唆された。しかし、肝再生過程にある肝細胞においては、異なる機序により肝細胞アポトーシスが抑制されている可能性があり、その調節因子の1つとしてsurvivinが考えられた。

文 献

- 1) Tilg H, Diehl AM. Mechanisms of disease: Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000;343:1467-76.
- 2) Natori G, Costanzo A, Guido F, Moretti F, Levrero M. Apoptotic, non-apoptotic, and anti-apoptotic pathways of tumor necrosis factor signaling. *Biochem Pharmacol* 1998;56:915-20.
- 3) Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. Hepatocyte-specific inhibition of NF- κ B leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 2002;110:193-202.
- 4) Yang X, Bialik S, Jones BE, Iimuro Y, Kitsis RN, Srinivasan A, et al. NF- κ B inactivation converts a hepatocyte cell line TNF- α response from proliferation to apoptosis. *Am J Physiol* 1998;275:C1058-66.
- 5) Stehlik C, Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp, J. Nuclear factor (NF)- κ B-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *J Exp Med* 1998;188:211-6.
- 6) Wang C-Y, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF- κ B antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP-1 and c-IAP-2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-3.
- 7) Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:239-52.
- 8) Shin S, Sung B-J, Cho Y-S, Kim H-J, Ha N-C, Hwang J-I, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001;40:1117-23.
- 9) Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol* 1995;146:1220-34.
- 10) Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Yamada Y, Imose M, Nozawa Y, et al. Possible involvement of reactive oxygen species in d-galactosamine-induced sensitization against tumor necrosis factor- α -induced hepatocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 2001;187:374-85.
- 11) Arai M, Mochida S, Ohno A, Ogata I, Fujiwara K. Sinusoidal endothelial cell damage by activated macrophages in rat liver necrosis. *Gastroenterology* 1993;104:1466-71.
- 12) Nakagawa J, Hishinuma I, Hirota K, Miyamoto K, Yamanaka T, Tsukidate K, et al. Involvement of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of activated macrophage-mediated hepatitis in mice. *Gastroenterology* 1990;99:758-65.
- 13) Takehara T, Hayashi N, Mita E, Kanto T, Tatsumi T, Sasaki Y, et al. Delayed Fas-mediated hepatocyte apoptosis during liver regeneration in mice: Hepatoprotective role of TNF- α . *Hepatology* 1998;27:1643-51.
- 14) Shiratori Y, Hongo S, Hikiba Y, Ohmura K, Nagura T, Okano K, et al. Role of macrophage in regeneration of liver. *Dig Dis Sci* 1996;41:1939-46.
- 15) Chen C, Edelstein LC, Gelinas C. The Rel/NF- κ B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x_L. *Mol Cell Biol* 2000;20:2687-95.
- 16) Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- κ B that blocks TNF α -induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:382-7.
- 17) Pierce RH, Campbell JS, Stephenson AB, Franklin CC, Chaisson M, Poot M, et al. Disruption of redox homeostasis in tumor necrosis factor-induced apoptosis in a murine hepatocyte cell line. *Am J Pathol* 2000;157:221-36.
- 18) Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns KE, Schoonhoven R, Grisham JW, et al. NF κ B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 1998;101:802-11.
- 19) Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-4.
- 20) Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1999;1:461-6.