

原 著

Survivinの甲状腺濾胞上皮細胞増殖および分化に対する影響

鈴木 美穂

Role of Survivin on the Proliferation and Differentiation of Thyroid Epithelial Cells

Miho Suzuki (Department of Endocrinology and Diabetes, Institute of Internal Medicine, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Survivin is one of the IAP (inhibitor of apoptosis proteins), which is expressed during embryonic development, but is not expressed in terminal differentiated adult tissue. Overexpression of survivin is observed in a variety of human tumors including thyroid cancers. We examined the role of survivin on the proliferation and differentiation of thyroid epithelial cells. Rat thyroid epithelial cell line FRTL-5 was stably transfected with human sense and antisense survivin genes. FRTL-5 cells transfected with a survivin sense gene (S cells) proliferated without TSH. In the presence of TSH, the proliferation of S cells was significantly faster than that of cells transfected with an empty vector (E cells) or cells transfected with a survivin antisense gene (AS cells). The proliferation of AS cells were retarded as compared with that of E cells. Western blot analysis demonstrated that phosphorylation of Rb protein at serine 795 was enhanced in S cells. Activation of E2F-1 was also enhanced in S cells as demonstrated by gel shift assay. Northern blot analysis showed that expression of Pax-8 mRNA was significantly enhanced in S cells, and was significantly decreased in AS cells. Expression of thyroglobulin (Tg) and TSH receptor (TSHR) mRNA was decreased in AS cells. There was no significant change in TTF-1 and TTF-2 mRNA expression. These observations suggest that survivin enhances the proliferation of thyroid epithelial cells through activation of E2F-1, and also enhance the expression of Pax-8, which then affect the expression of thyroid specific proteins. Survivin appears to play an important role in the proliferation as well as differentiation of thyroid epithelial cells.

Keywords: Survivin, thyroid cancer, cell cycle, differentiation, Rb protein, E2F-1, Pax-8, Tg, NIS, TSHR

J Saitama Med School 2004;31:33-39

(Received November 28, 2003)

緒 言

Survivin遺伝子は、胎生期の細胞や様々な癌細胞など増殖能を持つ細胞で発現が確認されている¹⁾。また、Survivin遺伝子は、細胞増殖の促進因子として働きアポトーシスを抑制するIAP (Inhibitor of apoptosis protein) familyの一員として知られ²⁻⁵⁾、BIR (Baculoviral IAP repeat) ドメイン一つのみで存在する⁶⁻⁸⁾。Survivinの発現は細胞周期に依存しており、G2/M期の紡錘糸での発現が多く認められる⁹⁻¹¹⁾。survivinが癌細胞¹²⁻¹⁶⁾や成長期の細胞に特異的に発現していることから、survivinには細胞増殖や分化に何らかの関与があると考えられる¹³⁾。

甲状腺細胞は、分化の過程で様々な特異的遺伝子や蛋白質の発現を認めている。Pax-8, thyroid

transcription factor-1 (TTF-1), thyroid transcription factor-2 (TTF-2) などの転写因子は、thyroglobulin (Tg), thyroid peroxidase (TPO), TSHレセプター (TSHR), Na-I symporter (NIS) などの甲状腺特異的蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域に結合し、それらの転写を促進する遺伝子調節蛋白質として知られている。分化能の低下した甲状腺腫瘍では、これらの分化マーカーの発現が低下していることが報告されている¹⁷⁾。

我々は甲状腺癌細胞及び正常ラット甲状腺濾胞上皮細胞株 (FRTL-5) を用い、survivin遺伝子による細胞増殖能及び分化能について検討した。

材料及び方法

細胞培養

甲状腺癌細胞株 (8505C, WRO, FRO) は、Ham's F12K (SIGMA, Missouri, USA) に10% ウシ胎児血清

(JRH BIOSCIENCES, Kansas, USA) を加えた培養液にて、37℃、5% CO₂下で培養した。ラット甲状腺濾胞上皮細胞株 (FRTL-5) の培養には、1 mU/ml TSH (SIGMA), 1 μg/ml インスリン (SIGMA) を加えた培養液を使用した。甲状腺癌細胞株は、ウシ胎児血清除去24時間後、96 well culture dish (IWAKI, 東京, Japan) に100,000個/wellずつまき、培養後クリスタルバイオレット法にて生細胞数を計算した。同様に、FRTL-5は、TSH存在、非存在の培養液を使用してクリスタルバイオレット法にて生細胞数を計算した。

Transfection

Survivin geneの全長をBLASTより検索し、XbaIとBamHIの制限酵素配列を持つ以下のprimerを設定した。(FW) 5'-CTCTAGACCGCCAGATTTGAA-TCGCGG-3', (RV) 5'-CGGATCCTGGTGCAGCCAC-TCTGGGAC-3', polymerase chain reaction (PCR) 法にて甲状腺癌細胞より survivin 遺伝子を増幅し、ゲル回収後、pcDNA 3.1 (Invitrogen, California, USA) にクローニングし、Survivin geneのセンスストランド (open reading frame) を発現する survivin sense vector 及び逆相きのアンチセンスストランドを発現する antisense vector を作製した。これらのvector 及び empty vector を、8505CとFRTL-5にTransFast20 (Promega, West Indiana, USA) を使用してtransfectionを行った。2×10⁶で10 cm culture dish (IWAKI) に細胞を培養し、10 μgのsense-, antisense-, empty-vectorをtransfectionし、48時間後に400 μg/mlのG418 sulfate (Promega) を添加し、transfectionされた細胞を選択的に培養した。

Western blot

survivinをtransfectionした細胞について、survivin、リン酸化 Rb 蛋白の発現量をWestern blot法¹³⁻¹⁴⁾を用いて検討した。

80%コンフルエントに達した細胞よりタンパク質を抽出し、DCプロテインアッセイ試薬 (BIO RAD, California, USA) を使用して蛋白質量を測定した。50 μgのタンパク質をSDSポリアクリルアミドゲルで泳動後、第一抗体として抗survivin抗体 (R&D Systems Inc., Minnesota, USA), 抗phosphoRb (serine 895) 抗体 (Cell Signaling Technology Inc., Massachusetts, USA) を使用し、4℃で16時間反応した後、第二抗体としてAnti-rabbit Ig, HRP-Linked Whole Ab (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) を使用し、室温で90分反応させた。ECLTM Western Blotting detection Reagents (Amersham Biosciences) を用いてHRP反応にて抗原抗体反応を検出した。

cAMP assay

FRTL-5に1 mU/mlのTSH, 2.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (SIGMA) を添加し、培養2時間後に上清及び細胞を回収した。上清及び細胞中のcAMP (pmol/ml) はヤマサ醤油 (銚子, 千葉) のキットにて測定した。同時にDNA量 (g/l) を測定し補正を行った。

Electrophoretic Mobility Shift Assay

80%コンフルエントに達した細胞から抽出した10 μgのタンパク質を用い、[γ-³²P] ATP (Amersham Biosciences) でラベルした E2F-1 consensus oligonucleotides (Santa Cruz Biotechnology Inc., California USA), およびGel Shift 5× Buffer (Promega) を室温で反応させ、1×TBE (0.05 M Tris, 0.05 M Boric acid, 1M EDTA・2Na), 5% アクリルアミドゲルにて、160 mV, 1時間泳動した。又同時に、10 μgのタンパク質、[γ-³²P] ATPでラベルしたE2F-1 consensus oligonucleotides, Gel Shift 5× Bufferを室温で反応させたのち、E2F-1 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology) を添加し、37℃、30分反応後泳動を行った。ゲルドライヤーにて80℃、20分処理し、-80℃で3時間露光させた¹⁸⁻²⁰⁾。

Northern blot

80%コンフルエントに達した細胞よりISOGEN (ニッポンジーン, 東京, Japan) を使用してtotal RNAを抽出した。さらにtotal RNA 250 μgからOligotexTM-dT30 (Takara, 東京, Japan) を使用してmRNAに精製し、1% アガロースゲルで泳動後エチジウムブロマイドで染色し、Gene Screen Plus Hybridization Transfer Membrane (Perkin Elmer Life Science Inc., Massachusetts, USA) に転写した。rat pax-8, rat TTF-1, rat TSHR, rat Tg, rat NISのprobeを作製した。以下に使用したprimerを示す。rat pax-8 (FW) 5'-ATGCCTCACAACTCGATC-AGA-3', (RV) 5'-TCCGGATGATTCTGTTGATGG-3', rat TTF-1 (FW) 5'-AGTAGCGAGGCTTCGCCTTC-3', (RV) 5'-TGTCCTGTAAGCTGCGAGCGG-3', rat Tg (FW) 5'-GCTACATTAACAGCAA-3', (RV) 5'-TTGCACTGGACAGGCATAA-3', rat NIS (FW) 5'-AAGTTCCTGTGGATGTGCG-3', (RV) 5'-TCACACCGTTGGAGAGC-3', rat TSHR (FW) 5'-AAATCCGGAACACCAGAAGC-3', (RV) 5'-GCTTTTGTAGAGTCCAGGTG-3'。これらのprimerを作製し、RT-PCRにて増幅後pGEM-T Easy Vector (Promega) にTA cloningした。EcoRI (Takara) で切断し、cDNAを回収してT7 QuickPrimeTM Kit (Amersham Biosciences) にて[α-³²P]dCTP (Amersham Biosciences) にてラベルし、68℃でハイブリダイゼーションした。洗浄後-80℃で3時間露光させた。

統計計算

標本間比較にはStudent-Newman-Keuls (SNK) 検定を用い、危険率5%未満を有意水準とした。

結 果

FRTL-5細胞, 甲状腺癌細胞でのsurvivinの発現

pcDNA3.1にsurvivin遺伝子をクローニングし, survivin sense vector, antisense vectorを作製した。これらのvectorをFRTL-5にトランスフェクションし, survivin蛋白の発現をWestern blot法で確認した (Fig. 1)。empty vectorとantisense vectorをトランスフェクションした細胞 (各々E及びAS) では, survivin蛋白質は発現していなかった。sense vectorのトランスフェクション細胞 (S) では, survivin蛋白質の過剰発現を認めた。

甲状腺癌細胞におけるsurvivin蛋白の発現をWestern Blot法で検討したところ, 細胞増殖能の早いFRO及び8505Cでsurvivin蛋白質の発現を認めた (Fig. 1)。

survivinによる細胞増殖の調節

FRTL-5を96穴のマイクロプレートに100,000個の細胞をまき, 48時間37℃で加温後クリスタルバイオレット法にて細胞数を検討した (Fig. 2)。FRTL-5細胞は, TSH存在下のみで増殖するため, S, AS, E細胞をTSH存在, 非存在下の条件で培養して検討した。S細胞ではTSH非存在下でも増殖を認め, TSH存在下でも対照のE細胞に比して有意の増殖促進を認めた。AS細胞では, TSH存在下あるいは非存在下でもE細胞に比して有意の増殖能の低下は認めなかった。

ヒト甲状腺癌細胞株8505Cにおいても各vectorをトランスフェクトし検討した (Fig. 3)。8505CのS細胞では細胞増殖能は有意に促進し, AS細胞で増殖能の有意の低下を認めた。

またFRTL-5細胞においてTSH刺激によるcAMP産生は, S細胞にてAS細胞に比し有意に増加した (Fig. 4)。AS細胞では, E細胞に比しても有意にcAMP産生の低下を認めた。

Rb 蛋白, E2F-1の発現

Western blotにてFRTL-5のS細胞では, TSH存在, 非存在下にもリン酸化Rb (serine 795) の発現増加を認めた (Fig. 5)。TSH存在下ではAS細胞やE細胞に比して強くリン酸化の促進が認められた。また, Rbのリン酸化とともにElectrophoretic Mobility Shift AssayにてE2F-1のDNA結合増加を認めた (Fig. 6)。

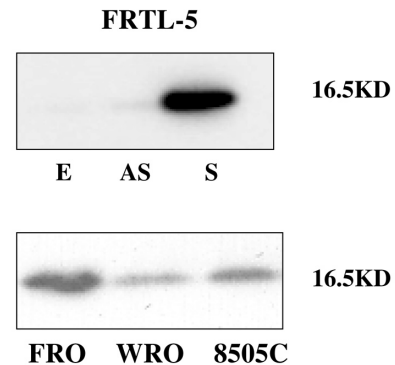


Fig. 1. Upper panel: Rat thyroid epithelial cell line FRTL-5 was stably transfected with a human survivin sense (S) and an antisense (AS) genes. Overexpression of survivin protein was observed in S cells, but not AS and E (an empty vector) cells. Lower panel: The expression of survivin protein in thyroid cancer cell lines (FRO, WRO, 8505C) was prominently observed.

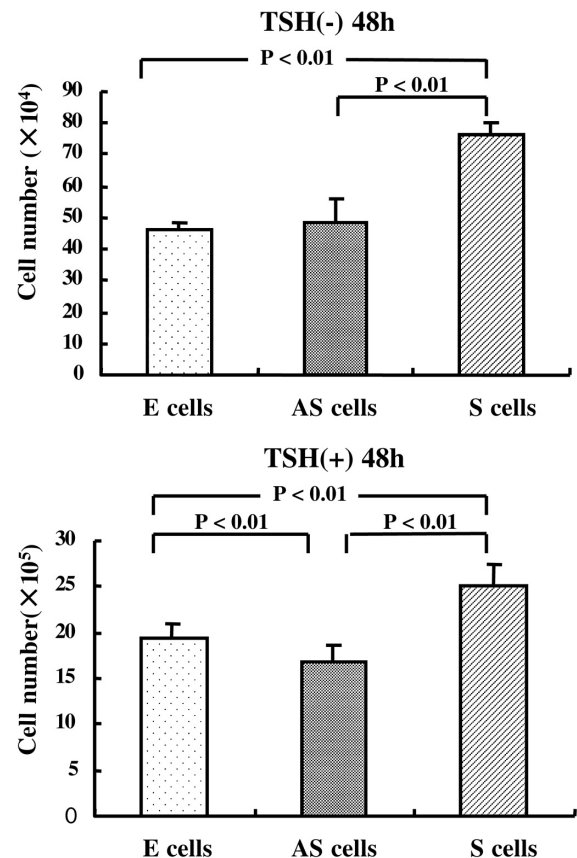


Fig. 2. Upper panel: FRTL-5 cells transfected with sense survivin gene (S cells) proliferated even in the absence of TSH. Lower panel: In the presence of TSH, the proliferation of S cells was significantly faster than that of cells transfected with empty vector (E cells). The proliferation of FRTL-5 cells transfected with antisense survivin gene (AS cells) was retarded as compared with that of E cells.

甲状腺特異遺伝子の発現

FRTL-5での甲状腺特異的遺伝子の発現をNorthern Blot法で確認し (Fig. 7), 相対比較のためcyclophilinに対して標準化して, 棒グラフに表した (Fig. 8). AS細胞において, Pax-8, Tg, TSHRの発現低下を認めた. S細胞では, Pax-8の発現増加を認めたが, その他の甲状腺特異遺伝子の発現には, 明確な変化を認めなかった.

考 案

増殖する細胞は, 分裂する前に細胞量を増やし肥大化する成長という過程を経てから, 細胞分裂期へと移

行して行く. 細胞の成長が間に合わずに最小の閾値までに大きさが達していない場合には, G1期またはG2期の特異的なチェックポイントで細胞周期を停止させる²¹⁾. しかし細胞成長は, 細胞分裂周期の進行とは無関係であるとも報告されており, 細胞周期の進行に異常をもたらすような変異であっても, 細胞成長を停止させないものが報告されている²²⁾. ここでは甲状腺濾胞上皮細胞での細胞増殖と, 細胞分化の関連性について検討した.

IAPはバキュロウイルスのゲノム中に発見され, N末端に約70アミノ酸からなる繰り返し構造BIRを持ち, C末端にRINGフィンガーと呼ばれるZnを結合す

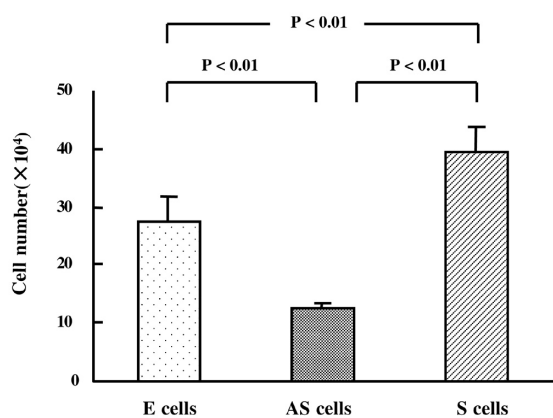


Fig. 3. 8505C thyroid cancer cells transfected with a survivin sense gene proliferated faster than those transfected with an empty vector or with a survivin antisense gene.

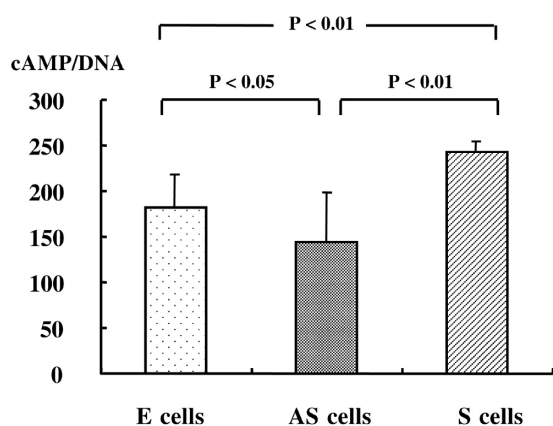


Fig. 4. In the presence of TSH, FRTL-5 cells transfected with a sense survivin gene (S cells) produced significantly more cAMP than FRTL-5 cells transfected with an antisense survivin gene (AS cells). AS cells produced significantly less cAMP as compared with FRTL-5 cells transfected with an empty vector (E cells).

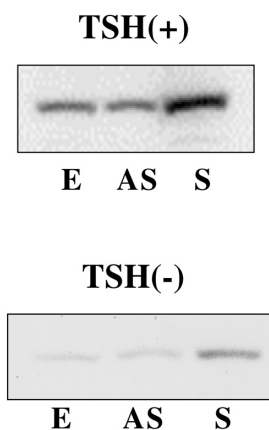


Fig. 5. The expression of phosphorylated Rb protein at serine 795 in FRTL-5 transfected with survivin sense (S), antisense (AS) genes, and empty vector (E) in the presence or absence of TSH.

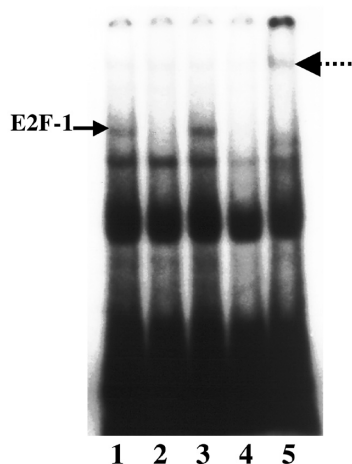


Fig. 6. Electrophoretic mobility shift assay showed enhanced E2F-1 DNA binding activity in FRTL-5 cells transfected with survivin sense gene (lane 3) as compared with cells transfected with an empty vector (lane 1) or a survivin antisense gene (lane 2). The DNA binding of E2F-1 was inhibited with cold E2F-1 oligonucleotides (lane 4) and was supershifted by anti-E2F-1 antibodies (lane 5).

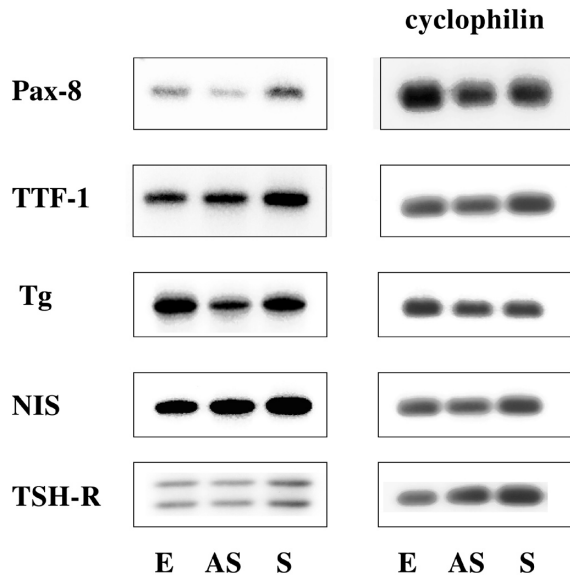


Fig. 7. A typical northern blot of Pax-8, TTF-1, Thyroglobulin (Tg), Na-I symporter (NIS), TSH receptor (TSHR) as well as cyclophilin in FRTL-5 cells transfected with an empty vector (E), a survivin antisense (AS) and sense genes (S).

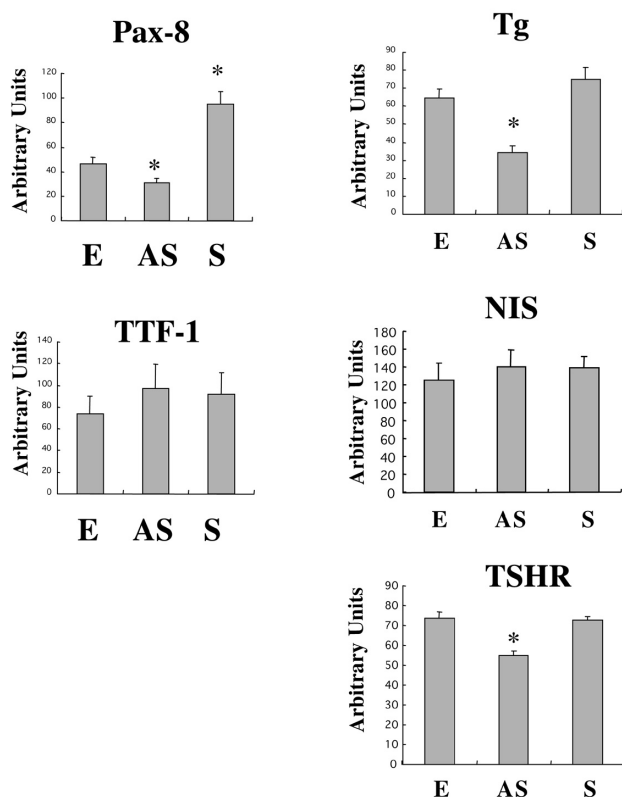


Fig. 8. The expression of thyroid specific genes such as Pax-8, TTF-1, Thyroglobulin (Tg), Na-I symporter (NIS), TSH receptor (TSHR) as well as cyclophilin in FRTL-5 cells transfected with an empty vector (E), a survivin antisense (AS) and a sense gene (S). Data represent the mean $\pm$ SD from three experiments. *, $p < 0.01$.

るドメインが存在する。IAPはBIRドメインを通して caspase 活性を阻害することによりアポトーシスを阻害する。そして、ユビキチン共役ドメイン (UBC) や RING フィンガードドメインを通して自己分解を調節するが、survivin は BIR 1 つのみで存在している。BIR 分子が紡錘体や中央体に位置し、細胞分裂に重要な役割を持つことが推察されているが、統一した見解は得られていない。

Survivin の発現は正常な臓器においてはほとんど認められず、細胞分裂の激しい癌細胞に多く発現が認められる¹⁾。Survivin 遺伝子は胎児期の腎、肝では発現を認めるが、胎児期の肺、脳での発現は少ない。成人の組織では胸腺と胎盤以外のリンパ節、脾、膵、腎、骨格筋、肝、肺、脳、心臓では全く発現が認められていない¹²⁾。また、正常肝細胞では発現を認めないものの、肝細胞癌では、RT-PCR 法にて survivin 遺伝子の発現が確認されている²³⁾。データは示さないが、ヒト甲状腺乳頭癌細胞でも、Northern Blot 法にて survivin の発現を認めた。又、癌細胞だけでなく、Basedow 病、甲状腺腺腫、腺腫様甲状腺腫、濾胞腺腫などの、良性疾患であっても増殖能力の高い細胞では、survivin 遺伝子の発現を認めた。これらの腫瘍では、Tg 産生や TSHR を発現していることが知られており、survivin 遺伝子が、分化能を保持させたまま増殖能を亢進させていると考えられた。

survivin 遺伝子過剰発現により TSH 依存性の FRTL-5 細胞は、TSH 非依存性に増殖した。TSH の添加により細胞中の cAMP が S 細胞で増加し、AS 細胞で低下していたことから、survivin 遺伝子が直接的あるいは間接的に TSH 刺激による cAMP 産生を増加させることが、細胞増殖を促進させる機序の一つであると考えられた。興味深いことに、TSH 存在下での FRTL-5 でも認められたが、antisense gene を組み込んだ癌細胞 8505C ではより顕著に増殖が抑制された。これは Fig. 1 に示すように元々の細胞における survivin 発現が癌細胞では高く、survivin の抑制が細胞増殖抑制により明瞭に働いたと考えられる。すなわち、survivin の発現抑制にて癌細胞増殖を抑制できる可能性を示唆している。一方で、survivin を FRTL-5 に過剰発現させることで、Rb 蛋白は TSH 非存在下でもリン酸化され、E2F-1 の発現が増加した。Rb 蛋白は、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) によって細胞周期特異的リン酸化を受け、転写因子 E2F が遊離される。遊離した E2F は活性型となって作用し、細胞は DNA 複製、S 期へと移行する。Rb 蛋白はこのリン酸化によって増殖抑制能を失い、細胞増殖を促進する。survivin の過剰発現が、Rb リン酸化-E2F 活性化を介して細胞増殖を促進させていることが示唆された。

甲状腺特異遺伝子の発現

一般に癌化によって増殖能が亢進した状態では、分化能が低下すると考えられる。Survivinも、癌化した細胞にその発現が報告されていることから、分化能を抑制させることが予想された。しかし、survivinの発現によっても甲状腺特異的遺伝子であるPax-8, Tg, NIS, TSHRの発現は保持され、survivinの抑制によって幾つかの甲状腺特異遺伝子の発現が抑制された。特に、Pax-8の発現はsurvivinを抑制すると低下し、その転写活性に支配されるTgの発現も低下した。survivin geneは、胎生期の細胞にも発現していることから、分化能は抑制せず保持した状態で増殖能を促進させることが示唆され、未分化細胞への誘導作用は弱いと考えられる。分化能を保持したまま増殖能を促進させることは、甲状腺良性腫瘍やBasedow病における甲状腺濾胞上皮細胞の増殖に関与していることが考えられる。甲状腺濾胞上皮細胞が癌化するには、survivin遺伝子の過剰発現のみならず、他の因子の関与が必要であると思われる。

結 論

Survivin geneの発現により、FRTL-5はTSH非依存的な細胞増殖能を獲得し、その機構にRbリン酸化-E2F活性化が関与していると考えられた。Survivin遺伝子が過剰発現しても甲状腺濾胞上皮細胞の分化を抑制する作用は少ないと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲いただきました片山茂裕教授に感謝いたします。また、直接御指導いただきました飯高誠前教授、ならびに御協力いただきました鈴木徳子助手に深謝いたします。

引用文献

- Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998;152:43-9.
- Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2000;276:3238-46.
- Gotz R. Regulation of neuronal cell death and differentiation by NGF and IAP family members. *J Neural Transm Suppl* 2000;60:247-59.
- Ogasawara T, Hatano M, Otaki M, Sekita N, Kobayashi K, Miyazaki M, et al. A novel homologue of the TIAP/m-survivin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:207-11.
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-59.
- Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.
- Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM. Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 1995;83:1253-62.
- Reed JC, Bischoff JR. BIRing Chromosomes through Cell Division-And Survivin' The Experience. *Cell* 2000;102:545-8.
- 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.
- Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000;19:3225-34.
- Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 2000;113:4363-71.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21.
- Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001;92:271-8.
- Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001;70:249-54.
- Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000;96:1921-5.
- Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, Kandimalla ER, Agrawal S, Shafit-Zagardo B. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *J Neurochem* 2001;79:426-36.
- Battista S, Martelli ML, Fedele M, Chiappetta G, Trapasso F, De Vita G, et al. A mutated p53 gene alters thyroid cell differentiation. *Oncogene* 1995;11:2029-37.

- 18)Adelmant G, Gilbert JD, Freytag SO. Human translocation liposarcoma-CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP)homologous protein(TLS-C HOP)oncoprotein prevents adipocyte differentiation by directly interfering with C/EBP beta function. J Biol Chem 1998;273:15574-81.
- 19)Helin K, Lees JA, Vidal M, Dyson N, Harlow E, Fattaey A. A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. Cell 1992;70:337-50.
- 20)Yee AS, Raychaudhuri P, Jakoi L, Nevins JR. The adenovirus-inducible factor E2F stimulates transcription after specific DNA binding. Mol Cell Biol 1989;9:578-85.
- 21)Conlon I, Raff M. 動物の成長過程における組織の大きさの制御機構. 西塚泰美, 岸本忠三監修. 細胞生物学 Selected Reviews. 東京: 中山書店; 2001. p. 40-56.
- 22)Hanahan D, Weiberg RA. 癌の特徴. 西塚泰美, 岸本忠三監修. 細胞生物学 Selected Reviews. 東京: 中山書店; 2001. p. 83-104.
- 23)Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 2000;31:1080-5.