

学位申請論文

Survivin は E2A-HLF 融合転写因子の 下流で白血病化に関与する

獨協医科大学 小児科学

奥谷真由子

要旨 t(17;19) 急性リンパ性白血病 acute lymphoblastic leukemia (t(17;19)⁺ ALL) は E2A-HLF の抗アポトーシス能により白血病化する。t(17;19)⁺ ALL は survivin が高発現し、E2A-HLF ドミナントネガティブ変異 dominant negative (dn) の導入で survivin の発現が抑制される一方、t(17;19) を有しない ALL (t(17;19)⁻ ALL) 細胞に E2A-HLF を導入すると survivin が高発現した。Survivin は t(17;19)⁺ ALL では全細胞周期で高発現していた。レポーターアッセイで E2A-HLF は survivin プロモーターの細胞周期関連領域を制御していた。t(17;19)⁺ ALL 細胞に survivin (dn) を導入すると全細胞周期でアポトーシスが生じた。以上の結果から E2A-HLF が細胞全周期において survivin を発現誘導し白血病化に関与していることが示唆された。

Key Words : survivin, E2A-HLF, t(17;19)⁺ ALL, アポトーシス, 細胞周期非依存的発現

緒言

t(17;19) 急性リンパ性白血病 acute lymphoblastic leukemia (t(17;19)⁺ ALL) は転座により E2A-HLF 融合転写因子 (E2A-HLF) を生じ、予後は極めて不良である¹⁾。E2A-HLF は E2A の転写活性化領域と HLF のベーシック・ロイジンジッパー領域 (bZIP) を有する。E2A-HLF の転写活性化領域の変異体ドミナントネガティブ (dominant negative, dn) は t(17;19)⁺ ALL にアポトーシスを生じさせることが報告されている²⁾。E2A-HLF は Baf-3, FL5.12 細胞といった IL-3 依存性マウス B 前駆細胞より IL-3 を除去した後もアポトーシスを抑制し続けることがわかっており、サイトカインシグナル伝達経路を介したアポトーシス抑制によって白血病化に関与していると考えられる²⁾。Baf-3 細胞の IL-3 除去長期培養には Ras の活性化が必要であること³⁾、E2A-HLF に対応する生理的 bZIP 転写因子 E4BP4 は Ras-phosphatidylinositol (PI) 3-kinase と Ras-Raf-MAPK を介して誘導されること³⁾、E2A-HLF の下流遺伝子 annexin II は Baf-3 細胞で Ras 経路を介して発現調節され

ることより⁴⁾、E2A-HLF の下流遺伝子は Ras シグナル伝達経路を介してアポトーシスを抑制している可能性が高い。E2A-HLF の下流遺伝子として inhibitor of apoptosis ファミリーに属する survivin が t(17;19)⁺ ALL の抗アポトーシスに関与していることを、本研究では証明した。

Survivin は IL-3 除去後も Baf-3 細胞のアポトーシスを長期に抑制し⁵⁾、c-H-ras は Ras/PI3-kinase と Ras-Raf-MAPK を介して survivin の発現を誘導している⁶⁾。Survivin は細胞周期依存的に発現するという特徴を有する^{5,7)}。これは転写開始点近傍の cell cycle-dependent element (CDE) と cell cycle homology region (CHR) により G1 期の発現が抑制されて、G2/M 期に選択的に発現するためである⁸⁾。Survivin は 34 番目のスレオニン (Thr34) が mitotic kinase CDC2-cyclin-B1 によりリン酸化され活性化する⁹⁾。このリン酸化部位の欠失した変異体 Thr34→Ala (survivin-T34A) を発現誘導すると多くの腫瘍細胞株でアポトーシスが生じることが報告されている^{7,9)}。E2A-HLF により誘導された survivin が B 前駆細胞のアポトーシス機構を破綻させ白血病を生じるという可能性が示唆されたので報告する。

方法

Survivin, survivin-T34A のクローニング

Survivin cDNA はヒト B 前駆性 ALL 株 REH より RT-

平成 18 年 11 月 1 日受付, 平成 18 年 12 月 15 日受理
別刷請求先: 奥谷真由子

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
獨協医科大学 小児科学

PCR法で作成した。シーケンシングでヒト survivin (GenBank no. XM_037198) の塩基配列との一致を確認した。Survivin-T34Aはsite-directed mutagenesis法にて得られた1.6 kbのヒト survivin cDNAを用いた。

細胞株培養と cell survival assay

ヒト $t(17;19)^+$ ALL細胞株 (UOC-B1, YCUB-2, HAL-O1, Endo-kun) と $t(17;19)^-$ 白血病細胞株 (Nalm-6, REH, RS4;11, Jurkat, 920, HL-60, NB-4) は10%牛胎児血清 (FBS) 含有RPMI1640培養液で培養した。Nalm-6/E2A-HLF細胞は、Nalm-6にE2A-HLFを組み込んだpMT-CB6⁺ (F.Rauscher III博士より供与) をトランスフェクションしたものである。このコンストラクトでは、亜鉛 (Zn^{2+}) 添加 (Zn^+) でE2A-HLFが誘導される²⁾。対照としてNalm-6にpMT-CB6⁺ベクターのみを導入したNalm-6/pMTを用いた。UOC-B1/E2A-HLF (dn) 細胞はE2AのAD1転写活性化領域の欠如とHLFのDNA結合領域の変異を有するE2A-HLF (dn) をUOC-B1に導入した細胞である²⁾。UOC-B1, Endo-kun, REHとJurkat細胞にpMT-CB6⁺ survivin-T34AあるいはpMT-CB6⁺ベクターのみを導入した細胞をそれぞれUOC-B1/survivin (dn), UOC-B1/pMT, Endo-kun/survivin (dn), Endo-kun/pMT, REH/survivin (dn), REH/pMT, Jurkat/survivin (dn), Jurkat/pMTとした。

ノーザンブロットとイムノブロット法

1 μ gのmRNAを1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブランにブロットし、ハイブリダイゼーションは常法を用いた。イムノブロット法は細胞をRIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% sodium deoxycholate) を用いて蛋白を抽出した。SDS-PAGEを実施し、PVDFメンブランにブロット後、常法を用いて1次抗体と反応させ、2次抗体はHRP-anti-rabbitまたはHRP-anti-mouse免疫グロブリンを用いた。

エルトリエーション

カウンター・フロー・セントリフューガル・エルトリエーション (CFE) 法はSRR6Yエルトリエーションシステムと4.5 mlチャンバーを用いた (Hitachi Koki, Tokyo, Japan)。白血病細胞株 $1 \sim 2 \times 10^8$ 細胞を1% FBS入りPBS 50 mlに浮遊し、4℃にてローター速度2000 rpmで流速16~28 ml/minで分画した¹⁰⁾。細胞周期はpropidium iodide (PI) 染色しフローサイトメトリー法にて測定した。

細胞生存率および細胞死の評価

アポトーシスはAnnexinV-FITCを用いてフローサイトメトリー法で解析した。Caspase 阻害剤は20 μ M z-VAD-fmk (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) を使用した。Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling (TUNEL) はApo-BrdU TUNEL Assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いてフローサイトメトリー法で測定した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ヒト胎盤よりヒト survivin 5'近傍の開始コドンを含む領域をPCR法にてクローニングしpGL3-basicベクター (Promega, Madison, WI) に組み込み、それぞれpGL3-124, pGL3-190, pGL3-265, pGL3-480, pGL3-675と名付けた。pGL3-124 mut1は2つCDE (-6と-12) の変異を有し、pGL3-124 mut2は2つCDE (-6と-12) に加えてCHR (-42) に変異を有し、pGL3-190 mut1はCDE (-171) に変異を有する。Nalm-6/E2A-HLF細胞 (1×10^6) に各pGL3-survivinプロモーターコンストラクトとpRL-TKを19:1の比率でLipofectamine 2000を用いて同時に導入し、24時間後に亜鉛を添加してE2A-HLFを誘導した。Zn-, Zn+でDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を用いて測定した。

細胞内 Apoptosis Inducing Factor (AIF) の観察

常法にて細胞を処理し、1次抗体は抗AIF抗体、2次抗体はFITCラベル抗ヤギIgGを用いた。核は4, 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) で染色し、Olympus A80蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

結 果

$t(17;19)^+$ ALLでの survivin 高発現

4つの $t(17;19)^+$ ALL細胞株 (UOC-B1, YCUB-2, HAL-O1, Endo-kun) では survivin mRNA と蛋白は (図1, 1段, 3段1~4列), $t(17;19)^-$ 白血病細胞株に比較して発現が強く (5~9列), survivin高発現な急性前骨髄球性白血病細胞 acute promyelocytic leukemia (APL) 株NB-4¹¹⁾ と同程度であった。 $t(17;19)^+$ ALLでは survivinは転写段階で調節されていると思われるが (1~4列), $t(17;19)^-$ 白血病細胞株ではmRNAと蛋白発現量が一致せず、転写後調節が示唆された (5~9列)。

E2A-HLFの survivin 発現調節

E2A-HLFが survivin を誘導しているかを検討した。Nalm-6/E2A-HLFに Zn^+ でE2A-HLFを誘導後 (図

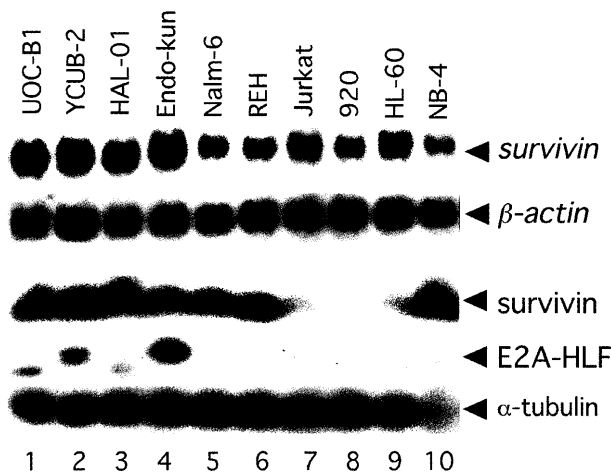


図1 ヒト白血病細胞株の survivin 発現. (上2段) poly (A) +RNA のノーザンブロット. Survivin, β -actin 各プローブでハイブリダイズした. (下3段) イムノブロット. Survivin, E2A-HLF, α -tubulin の特異抗体で検出した. 1~4列: $t(17;19)^+$ ALL 細胞株; 5~9列: $t(17;19)^-$ 白血病細胞株. 10列: APL 細胞株

2A, 4段) 24時間で survivin mRNA が約10倍上昇し (1段), 蛋白も12時間後から上昇した (3段). 対照 Nalm-6/pMT では Zn による変化がなかった (7列と8列).

次に, E2A-HLF (dn) を用いて survivin 発現を検出した. UOC-B1/E2A-HLF (dn) は Zn + 24時間で survivin mRNA が, Zn + 12時間で survivin 蛋白はそれぞれ低下した (図2B, 1, 3, 4段, 1~6列). Zn を除去すると48時間以内に survivin 発現は回復した (1, 3, 4段, 7~9列). 以上より E2A-HLF が survivin を誘導していると考えられた.

E2A-HLF 誘導 survivin の細胞周期非依存的発現

CFE法にて, 各細胞周期を分画した. 各細胞周期の純度はG0/G1で90%以上, S期で80%以上, G2/M期で90%以上であった (図3A). $t(17;19)^-$ ALL (REH, RS4:11, Jurkat, Nalm-6) において survivin は G2/M 期優位に発現していた (図3B, 1~12列と図3D). 特に REH は G2/M 期で G1 あるいは S 期に比して約6~8倍高発現していた. Jurkat は G1 期, S 期と G2/M 期で survivin の発現量の差は少なかった. 一方, $t(17;19)^+$ ALL の4細胞株では survivin は全細胞周期で高く発現していた (図3Cと3D). Nalm-6/E2A-HLF で E2A-HLF を誘導した後, survivin の発現は Nalm-6 に比べて G1 期, S 期で発現が増加したが, G2/M 期では同程度であった (図3B, 10~15列と3D).

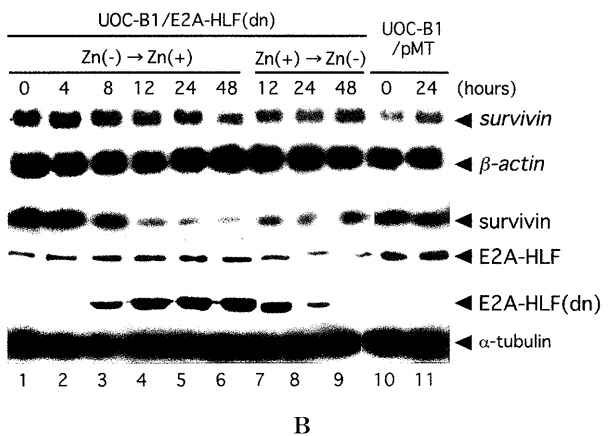
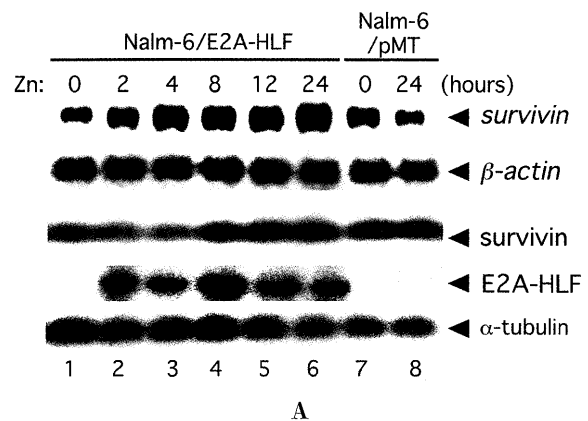


図2 E2A-HLF による survivin の誘導. (A) Zn 添加で E2A-HLF が発現誘導される Nalm-6 細胞 (Nalm-6/E2A-HLF) と対照 Nalm-6/pMT に各時間 100 μ M Zn を添加し培養した. (B) Zn 添加で E2A-HLF (dn) が発現する UOC-B1 [UOC-B1/E2A-HLF (dn)] と対照 UOC-B1/pMT に各時間 100 μ M Zn を添加し培養した. (上2段) poly (A) +RNA のノーザンブロット. Survivin, β -actin 各プローブでハイブリダイズした. (下3段) イムノブロット. Survivin, E2A-HLF, α -tubulin の特異抗体で検出した.

E2A-HLF による survivin プロモーターの活性上昇

E2A-HLF による survivin の細胞周期非依存的発現の機構を検討した. pGL3 に survivin の種々のプロモーター領域を組み込んだ各コンストラクトを Nalm-6/E2A-HLF に導入しルシフェラーゼ活性を測定した (図4). Zn-時 Nalm-6/E2A-HLF のルシフェラーゼ活性は pGL3-190 で最大で pGL3-124 の6倍に及んだ. 一方, より長い survivin のプロモーターを導入すると pGL3-190 より明らかに低下した. 以上から -124~-190 にエンハンサーが, -190 より上流にレプレッサーが存在する可能性が示唆された. Zn を添加すると各ベクターのルシフェラーゼ活性は一様に Zn- の約3倍活性が増加

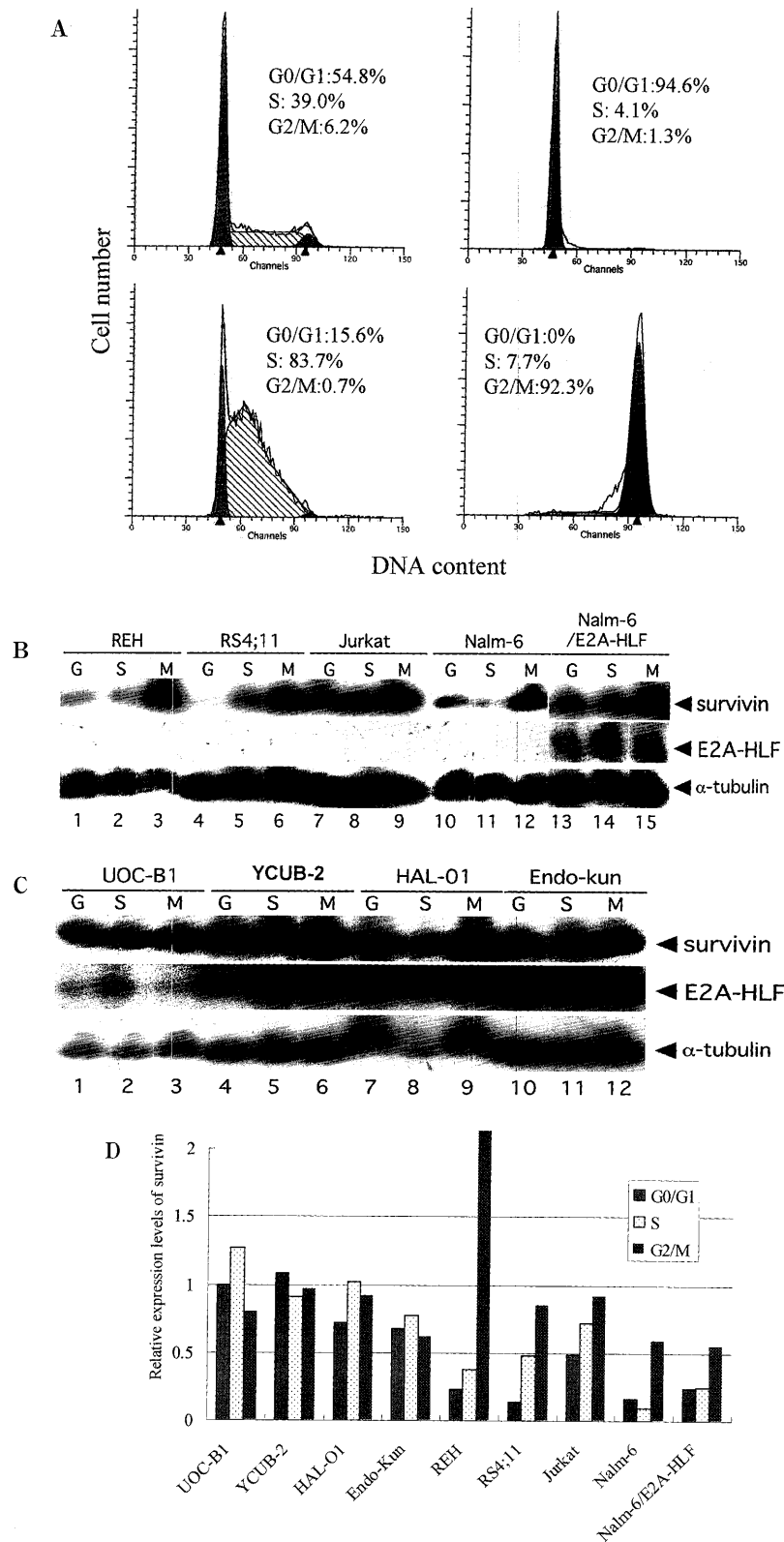


図 3 ヒト白血病細胞株における survivin の細胞周期依存性・非依存性発現。CFE 法で各細胞周期を分画した。(A) PI 染色後の、フローサイトメトリー法による DNA ヒストグラム。左上：分画前、右上：G0/G1 分画、左下：S 分画、右下：G2/M 分画。(B) (C) $t(17;19)^-$ ALL (B) と $t(17;19)^+$ ALL (C) の G0/G1 分画 (G), S 分画 (S), G2/M 分画 (M) において免疫プロットで survivin, E2A-HLF, α -tubulin 蛋白を検出した。(D) 図 3 (B) (C) の発現量をオートラジオグラフィーで測定し, survivin/ α -tubulin 比を算出し, UOC-B1 の G0/G1 分画を 1 とし相対的発現量を示した。

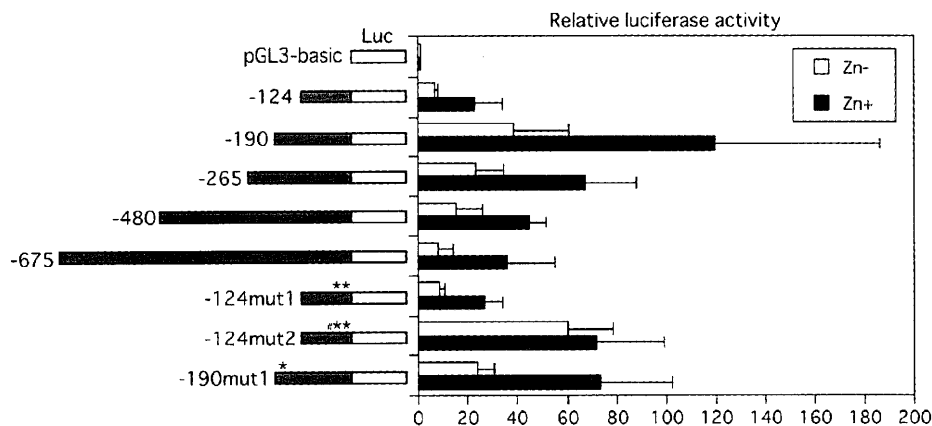


図4 $t(17;19)^-$ ALL細胞株に導入したE2A-HLFによる survivin プロモーターの活性化. Nalm-6/E2A-HLFに pRL-TK ベクターと pGL3-survivin プロモーターコンストラクト (左)を同時に導入し, Zn⁻ (白棒), Zn⁺ 24時間 (黒棒)で培養した. ホタルルシフェラーゼ活性/ウミシイタケルシフェラーゼ活性 (導入効率の対照)を算出した. プロモーターを導入していないホタルプラスミドのルシフェラーゼ活性を1とした. 3回の実験の平均値, エラーバーは標準偏差を示した. (#)はCHRの変異を(*)はCDEの変異を示す.

した (図4). E2A-HLFは survivinの転写をこの領域に存在するシス・エレメントを介して誘導していると考えられた.

次に細胞周期依存性のシス・エレメントの変異体を作成しルシフェラーゼ活性を測定した. CDE-6とCDE-12の変異体pGL3-124mut1の活性は, Znの有無にかかわらずpGL3-124とほぼ同様の結果であったが, CDE-6・CDE-12とCHR-42の変異体pGL3-124mut2ではZn⁻でpGL3-124の10倍, Zn⁺では3倍に活性が増加した (図4). CDE-171の変異体pGL3-190mut1はpGL3-190に比べ活性が2分の1に低下した (図4). 以上よりCDE-6とCDE-12は転写に無関係で, CHR-42がサイレンサー, CDE-171がエンハンサーであることが示された.

$t(17;19)^+$ ALLにおける survivinの特異的阻害によるアポトーシス

E2A-HLFによる survivin誘導が $t(17;19)^+$ ALLの生存に不可欠であることを証明するため, dn機能を有する survivin-T34Aを導入した. UOC-B1/survivin (dn)とEndo-kun/survivin (dn)にZnを添加して24時間後には著明に annexin V陽性細胞の増加が認められた (図5A). 対照のUOC-B1/pMTとEndo-kun/pMTでは陽性細胞は20%以下であった (図5A). $t(17;19)^-$ ALL (REHとJurkat)に survivin-T34Aを導入してもアポトーシスの有意な増加は認められなかった (図5A).

UOC-B1/survivin (dn)とEndo-kun/survivin (dn)

について, TUNEL法とPI染色を施行した後フローサイトメトリーで解析した. 両細胞とも survivin-T34A誘導12時間後に全細胞周期でTUNEL陽性となった (図5B). 一方, REH/survivin (dn)ではアポトーシスを生じず, Jurkat/survivin (dn)ではG2/M期にのみアポトーシスを生じた (図5C).

$t(17;19)^+$ ALLの survivin-T34Aによる caspase 依存的・非依存的細胞死

Survivinによるアポトーシスの抑制における caspaseの関与を検討した. UOC-B1/survivin (dn)細胞ではZn+48時間後にわずかにcaspase-3とpoly (ADP-ribose) polymerase (PARP)の活性化が生じ (図6A), Caspase-9の活性化は陽性対照 (etoposide添加Jurkat)と同程度にZn+36時間後に認められた (図6A). 一方, REH/survivin (dn)ではcaspaseの活性化が認められず (図6B), アポトーシスの誘導も起こらなかった. したがって, survivin (dn)導入によるアポトーシスの一部はcaspaseの関与が示唆された. また, 汎caspase阻害剤z-VAD-fmkは部分的にアポトーシスを抑制した (図6C).

Survivinの抑制による急速なミトコンドリアの反応としてcaspase非依存的にDNA断片化とチトクロームcの遊離機能を持つAIFの関与を検討した. UOC-B1/survivin (dn)ではZn⁻のときAIFは核周辺に存在していたが (図7のA, A'), Zn添加後12時間では核内に移行し, それに伴いアポトーシスに特徴的な細胞収縮やク

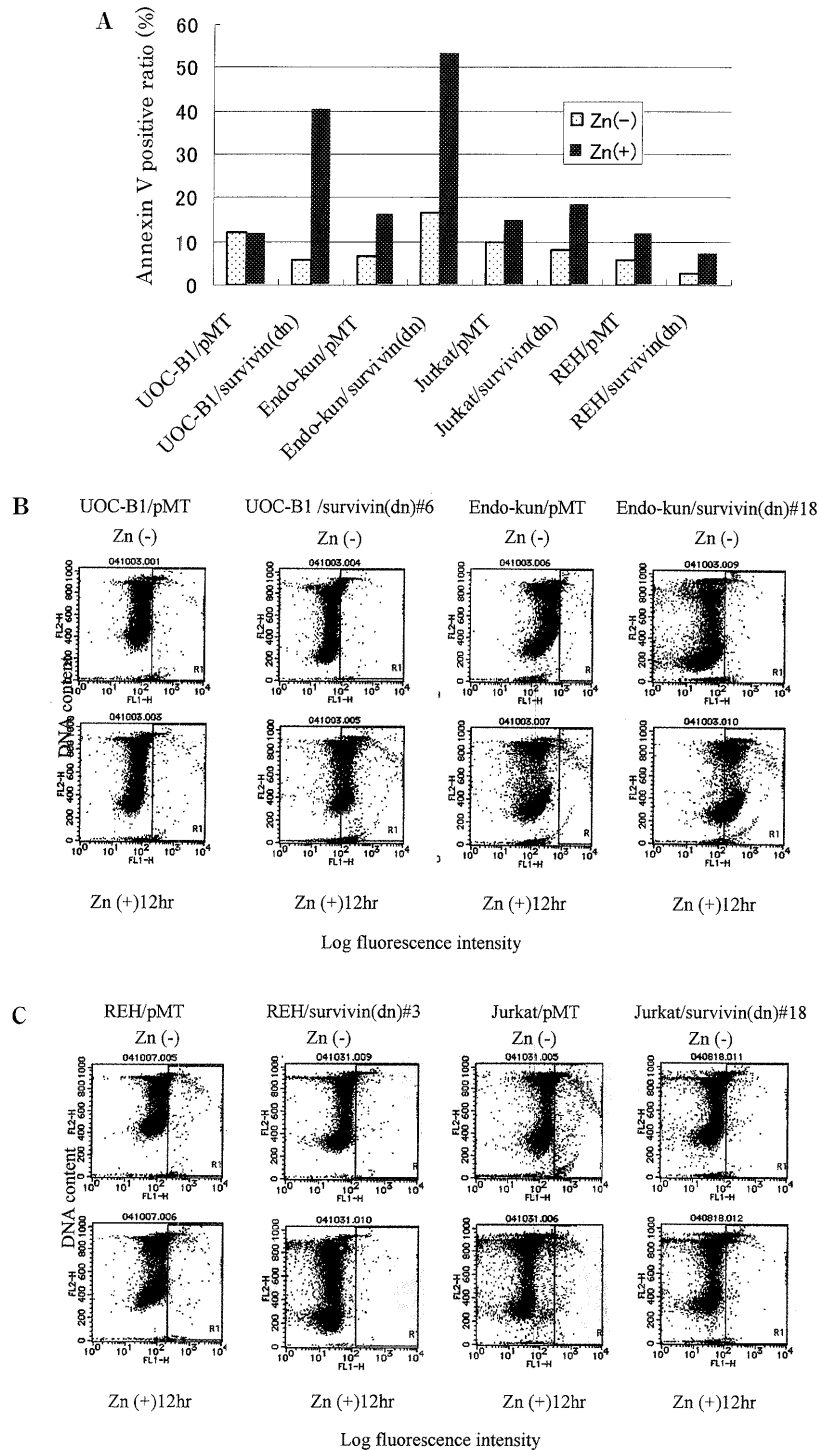


図 5 ALL細胞株での survivin-T34A 高発現の影響. Zn 誘導性の survivin-T34A を導入した UOC-B1, Endo-kun, Jurkat, REH 細胞 (それぞれ UOC-B1/survivin (dn), Endo-kun/survivin (dn), REH/survivin (dn), Jurkat/survivin (dn)) を対照の UOC-B1/pMT, Endo-kun/pMT, REH/pMT, Jurkat/pMT と比較した. (A) Zn- と $100 \mu\text{M}$ Zn+ で 24 時間培養した細胞を annexin V-FITC と PI で同時染色し, フローサイトメトリーで測定した. (B) (C) Zn- と $100 \mu\text{M}$ Zn+ で 24 時間培養した細胞を PI 染色と terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 反応による 5-bromo-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (BrdUTP) ラベルを施行後, フローサイトメトリーで測定した. BrdUTP による末端ラベル DNA を横軸に, DNA の PI 染色を縦軸に示した. 垂直なラインの右方はアポトーシスを示す.

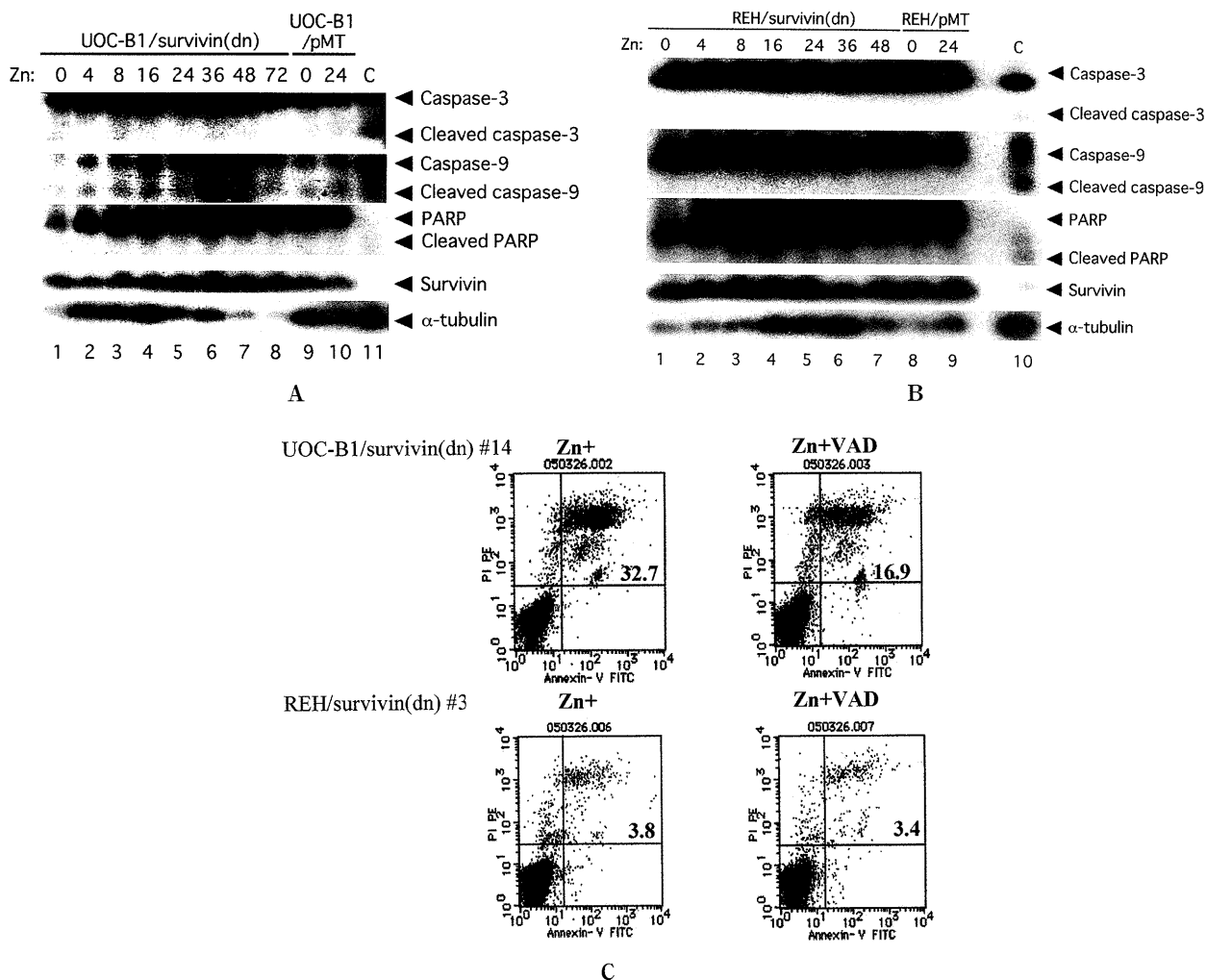


図6 Survivin (dn) 発現による caspase の活性化と caspase 阻害剤の影響. (A) (B) UOC-B1/survivin (dn), UOC-B1/pMT (A) と REH/survivin (dn), REH/pMT (B) は各時間 100 μ M Zn を添加し培養した. 陽性対象: C, Jurkat 細胞の etoposide 処理である. イムノプロットで caspase-3, caspase-9, PARP, survivin, α -tubulin を検出した. (C) UOC-B1/survivin (dn), REH/survivin (dn) に対しての 20 μ M の caspase 阻害剤 z-VAD-fmk の有無で 1 時間処理後, 100 μ M Zn を添加し培養した.

ロマチンの濃縮が認められた (図7のB, B'). z-VAD-fmk 添加で核近傍に AIF は残存していたが, 形態変化を認め, AIF の核内移行は z-VAD-fmk により AIF の核内移行は不完全に抑制されたことが示唆された (図7のC, C'). UOC-B1/pMT では Zn+ でも AIF は核内に移行しなかった (図7のE, E'). これらの結果は t(17;19)⁺ ALL において survivin の抗アポトーシス機能の一部は AIF のミトコンドリアから核内への移行の抑制を介して生じることが示唆された.

考案

E2A-HLF によるアポトーシス抑制経路における下流

遺伝子は未だ確定していない^{1,2,4}). 今回 t(17;19)⁺ ALL で survivin が細胞周期非依存的に高発現し, E2A-HLF (dn) で survivin 発現が抑制されること, t(17;19)⁻ ALL の Nalm-6 に E2A-HLF を導入すると全細胞周期性に survivin 発現が増加すること, survivin-T34A による survivin 機能の抑制の結果 t(17;19)⁺ ALL で全細胞周期にわたるアポトーシスを生じたことより, t(17;19)⁺ ALL では E2A-HLF による survivin の高発現が生存に不可欠であることが示された.

t(17;19)⁻ ALL は G2/M 期優位に survivin が発現していたが, その発現優位性は細胞株で異なっていた. Jurkat の G1 期発現増加の理由は強力なサイレンサーで

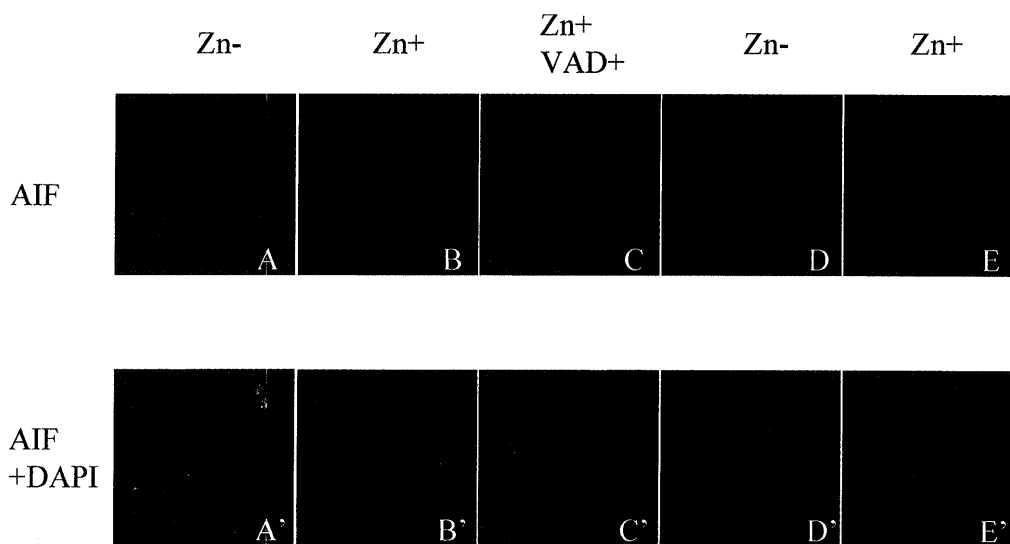


図7 Survivin-T34AによるAIFの核内移行.

UOC-B1/survivin (dn) (パネルA~C')とUOC-B1/pMT (パネルD~E')はZn- (パネルA, A', D, D'), 100 μ M Zn+ (パネルB, B', C, C', E, E'), 20 μ M z-VAD-fmk添加 (パネルC, C')で12時間培養した. 細胞は抗AIF抗体で免疫染色した. 核をDAPIで同時染色した (パネルA'~E').

あるCHR-42近傍の-31のCホモ接合がGになったためであると報告されている (図3D)¹²⁾. しかし, t(17; 19)⁺ ALL 4株ではUOC-B1とHAL-O1では-31はCのホモで, YCUB-2とEndo-kunはGのホモと一定でなく, 細胞全周期発現はE2A-HLFによる誘導であることが示唆された.

レポーターアッセイよりE2A-HLFはCDE-6とCDE-12の変異に影響されなかった. CHR-42の変異はE2A-HLFの有無にかかわらず活性が等しく上昇した. これはNalm-6においてE2A-HLFがG1とS期のCHR-42のサイレンサー機構を部分的に抑制していたためと考えられる. t(17; 19)⁺ ALLではE2A-HLFが完全にCHR-42のサイレンサー機能を抑制し, 細胞周期非依存性発現が生じていたと考えられた (図3B, 3C). E2A-HLFが直接CHR-42に結合しているとは証明はできなかった. E2A-HLFがCHR-42に結合する細胞周期依存性転写抑制因子と拮抗する転写活性化因子を誘導するか, E2A-HLFの下流遺伝子がこの転写抑制因子を修飾し機能を抑制しているかが考えられる. この下流の転写抑制因子の同定がE2A-HLFのsurvivinの全細胞周期発現機構の究明には重要である¹⁴⁾.

Survivinはcaspase依存・非依存性にアポトーシスを抑制する¹⁵⁾. 非依存的な経路の一つにAIFがある. AIFはcaspase阻害剤で抑制されない核内移行とDNA断片化機能を有する¹³⁾. t(17; 19)⁺ ALLへのsurvivin-T34A導入によるアポトーシスにおいてcaspase活性化

はannexin VやTUNELによるアポトーシスの検出より遅れた (図5A, 5B) ことから2次的な活性化の可能性がある. 一方, AIFのミトコンドリアからの核内移行とアポトーシス様形態変化は早く観察され, E2A-HLFにより全細胞周期に誘導されたsurvivinによるAIFの核内移行阻しがt(17; 19)⁺ ALLの生存を支持する重要なプロセスの一つと考えられる.

E2A-HLF融合転写因子を有するB前駆細胞性白血病は長期生存例がない^{1,4)}. Survivinは正常細胞に発現せず腫瘍細胞特異的に発現し, t(17; 19)⁺ ALL細胞の生存に不可欠であることから, survivinに対する標的治療は, このALLに有効な治療法になる可能性がある. Survivin antisense, survivin特異的cytotoxicT細胞, shepherdinの臨床応用が待たれる^{16,17)}.

結 語

E2A-HLF融合転写因子は下流遺伝子survivinを細胞全周期で発現誘導し, アポトーシスを抑制し白血病化に関与している.

謝 辞 稿を終えるにあたり, 本研究に対し終始ご指導賜りました小児科学教室有阪治教授に深甚なる感謝の意を表します.

文 献

- 1) Seidel MG and Look AT. : E2A-HLF usurps control

- of evolutionarily conserved survival pathways. *Oncogene*, **20** : 5718-5725, 2001.
- 2) Inaba T, Inukai T, Yoshiwara T, et al : Reversal of apoptosis by the leukemia-associated E2A-HLF chimeric transcription factor. *Nature*, **382** : 541-544, 1996.
 - 3) Kuribara R, Kinoshita T, Miyajima A, et al : Two distinct interleukin-3-mediated signal pathways, Ras-NFIL3 (E4BP4) and Bcl-xL, regulate the survival of murine pro-B lymphocytes. *Mol Cell Biol*, **19** : 2754-2762, 1999.
 - 4) Matsunaga T, Inaba T, Matsui H, et al : Regulation of annexin II by cytokine-initiated signaling pathways and E2A-HLF oncoprotein. *Blood*, **103** : 3185-3191, 2004.
 - 5) Li F : Survivin study : what is the next wave ? *J Cell Physiol*, **197** : 8-29, 2003.
 - 6) Sommer KW, Schamberger CJ, Schmidt GE, et al : Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. *Oncogene*, **22** : 4266-4280, 2003.
 - 7) Altieri DC : Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, **3** : 46-54, 2003.
 - 8) Li F and Altieri DC : Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J*, **344** : 305-311, 1999.
 - 9) O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, et al : Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97** : 13103-13107, 2000.
 - 10) Kikuchi J, Furukawa Y, Iwase S, et al : Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation : involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization. *Blood*, **89** : 3980-3990, 1997.
 - 11) Xu ZX, Zhao RX, Ding T, et al : Promyelocytic leukemia protein 4 induces apoptosis by inhibition of survivin expression. *J Biol Chem*, **279** : 1838-1844, 2004.
 - 12) Xu Y, Fang F, Ludewig G, et al : A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol*, **23** : 527-537, 2004.
 - 13) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397** : 441-446, 1999.
 - 14) Zhu W, Giangrande PH and Nevins JR : E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J*, **23** : 4615-4626, 2004.
 - 15) Carter BZ, Kornblau SM, Tsao T, et al : Caspase-independent cell death in AML : caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis. *Blood*, **102** : 4179-4186, 2003.
 - 16) Li F and Ling X. Survivin study : an update of "what is the next wave"?. *J Cell Physiol*, **208** : 476-486, 2006.
 - 17) Altieri DC : Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks : the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther*, **5** : 478-482, 2006.