

ヒト膀胱上皮細胞における Aurora-A 遺伝子の過剰発現と中心体の異常複製, 染色体異常の研究

田中規幹

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子遺伝学
(指導: 清水憲二教授)

Aurora-A/STK15/BTAK overexpression induces centrosome amplification, chromosomal instability, and transformation in human urothelial cells

Noriyoshi Tanaka

Department of Molecular Genetics, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan
(Director : Prof. K. Shimizu)

Aurora-A/STK15/BTAK kinase encoding gene, located on chromosome 20q13, is frequently amplified and overexpressed in human cancers. Sen *et al.* previously demonstrated that Aurora-A amplification and overexpression are associated with aneuploidy and clinically aggressive bladder cancer (J Natl Cancer Inst (2002) 94, 1320-1329). To examine if this association is the direct result of Aurora-A gene amplification and overexpression, an immortalized human urothelial cell line (SV-HUC) was infected with an adenoviral Aurora-A-green fluorescent protein (Ad-Aurora-A-GFP) fusion construct inducing ectopic expression of the resulting fusion protein. Controls included mock-infected and adenoviral-GFP infected cells. Ectopic expression of transduced Aurora-A did not alter the doubling time of the SV-HUC cells but significantly increased the number of cells with multiple centrosomes displaying aneuploidy and increased colony formation in soft agar. This is the first report demonstrating that overexpression of Aurora-A induces centrosome anomalies together with chromosomal instability and malignant transformation-associated phenotypic changes in immortalized human urothelial cells, thus supporting the hypothesis that this gene plays an important role in the development of aggressive bladder cancer.

キーワード: オーロラキナーゼ-A (Aurora-A), 中心体 (centrosome), 染色体不安定性 (chromosomal instability), 膀胱癌 (bladder cancer)

緒 言

1960年から2000年における日本を含む主要5カ国では男性膀胱癌死亡者数は10万人当たり200人と低いが、近年は増加の傾向にある¹⁾。また、腫瘍切除後も再発率が非常に高いことが知られていることより、膀胱癌発生機序の基盤的研究が重要な課題となっている。

以前の研究で、膀胱癌には多彩な遺伝子の変異がみられることや早期癌は進行癌よりも遺伝的な変異がほとんどみられないことが報告されている^{2,3)}。in vitroでの膀胱上皮細胞の形質転換は染色体20q13.2の増幅に関連しており、

この染色体にある遺伝子の増幅と高発現が膀胱癌発生の早期に重要な役割を担っているのではないかと示唆されていた⁴⁾。一方、細胞内総核酸量の定量分析や、DNA増幅または欠損を同定するための特異的なプローブを用いるFISH法 (Fluorescence in situ hybridization: 蛍光 in situ ハイブリッド形成法) により、膀胱癌の診断を目的とした異数性染色体について研究がなされている^{5,6)}。MD AndersonのSenらのグループは、以前、16症例の膀胱癌患者より採取した癌細胞を20q13.2に位置するAurora-A遺伝子の特異的なプローブでFISH分析を行なったところ、その遺伝子の増幅を発見した⁷⁾。更にAurora-A遺伝子の増幅は腫瘍の悪性度と染色体異数性に相関していた。このことは、Aurora-A遺伝子の増幅が臨床的に悪性を示す異数体細胞への変化を引き起こし、膀胱癌発生に重要な役割を担っている可能性を示している。バイラー医科大学のGoepfertらのグループは、ラットに発ガン物質を投与したところ正常

平成18年8月7日受理
〒880-0052 宮崎市丸山2-112-1
プレストピアなんば病院
電話: 0985-32-7170 FAX: 0985-20-1319
E-mail: n.tanaka@breastopia.org

乳腺組織に Aurora-A 遺伝子の発現がみられたと報告している⁸⁾。また、げっ歯類とヒトにおける腫瘍関連遺伝子の連鎖分析と一倍体地図を用いた解析により Aurora-A 遺伝子が同定された⁹⁾。

これらのデータに基づき、ヒト正常膀胱上皮細胞が癌化する過程で高発現された Aurora-A 遺伝子は、悪性を示す異数体細胞の出現と形質転換を導く重要な遺伝因子ではないかという仮説を立てた。本研究では、腫瘍性のないヒト膀胱上皮細胞株に Aurora-A 遺伝子発現アデノウイルスを感染させ、その細胞表現型を分析して上記の仮説を検討した。Aurora-A 遺伝子発現アデノウイルス感染細胞では、軟寒天培地中でのコロニー形成数、異数体の発生頻度および3個以上の中心体を持つ細胞数が有意に増えていた。以上の結果は、ヒト膀胱上皮細胞の悪性を示す形質転換に Aurora-A 遺伝子の高発現が遺伝子的に深く関わっていることを示唆する初めての結果である。またこれらの結果は、膀胱癌の発生において Aurora-A 遺伝子が重要な役割を担っている事を示した基盤的データであり、これまでに報告された臨床の結果を十分裏付けるものであった。

材料と方法

1. 細胞

The Simian virus 40 (SV40) を用いて継代培養されたヒト由来の正常膀胱上皮細胞 (The Simian virus 40 (SV40) immortalized human urothelial cell line SV-HUC, ウィンスコンスン大学の C. A. Reznikoff より提供) をペニシリン, ストレプトマイシン, 1%牛胎児血清アルブミン, インシュリン, ヒト由来トランスフェリン, ハイドロコルチゾン, L-グルタミン, デキストロースと非必須アミノ酸を加えた Ham's F-12 medium (GIBCO, Grand Island, NY) で培養した¹⁰⁾。

2. 発現ベクター

Aurora-A 遺伝子と緑色蛍光タンパク質発現アデノウイルス (Adenovirus Aurora-A-green fluorescence protein (Ad-Aurora-A-GFP)) は、前述のように pEGFP-Aurora-A の Eco47V-BamHI 断片を pCA14 の EcoRV-BglI に挿入後、それをアデノウイルスに導入して作成した¹¹⁾。cDNA を導入していないアデノウイルスコントロール (Adenovirus control (Ad-CTR)), および緑色蛍光タンパク質を導入したアデノウイルス (Adenovirus green fluorescence protein (Ad-GFP)) は、それぞれ既報のように作成した¹²⁾。組み換えアデノウイルスの作成法と力価測定方法 (50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) 法) は既報のように行なった¹¹⁾。

3. 細胞増殖測定

96ウエルマイクロプレートの各1ウエル当りに 3×10^3 個の細胞 (100 μ l) をそれぞれ24ウエルずつ分注した。mock, Ad-CTR, Ad-Aurora-A-GFP を培養液で希釈し感染多重度 (multiplicity of infection (MOI)) 5 で感染させた。1%グルタルアルデヒド溶液で細胞を固定し、0.5%クリスタルバイオレットのメタノール溶液で染色した。プレートにソレソン溶液 (0.025M sodium citrate, 0.025M citric acid in 50% methanol) を (100 μ l) 添加し、540nm 波長の吸光度を測定した¹³⁾。

4. ウエスタンブロッティング

6ウエルマイクロプレートに培養したそれぞれの細胞にアデノウイルスを感染させた。感染後4日目までの各日ごとに、細胞溶解液 (10mM Tris-HCl (pH 7); 140mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0.5% Nonidet P-40; 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 5 mM dithiothreitol) を用いてタンパク質を抽出した。14,000 g 10分間、遠心分離し上清を抽出した後、Bradford 色素結合法でタンパク質濃度測定を行なった。それぞれ抽出したタンパク質を12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) で電気泳動分離し、その分離したタンパク質を孔径0.2マイクロメートルのニトロセルロース膜に転写緩衝液 [1 \times Tris Gly transfer buffer (25 \times Tris Gly transfer buffer; Invitrogen, Carlsbad, CA), 5% v/v methanol] 下で転写した。転写された膜をブロッキング液 (5%スキムミルクを含む Tris-buffered saline (TBS)-T (10mM Tris-HCl (pH 7.4); 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20) 下で2時間ブロックした。5%スキムミルクを含む PBS-T 溶液で希釈した一次抗体 (rabbit polyclonal anti-Aurora-A antibody) で反応後、5%スキムミルクを含む PBS-T 溶液で洗浄し、二次抗体 (goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG, 1:2,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) と室温1時間で反応させた。同様に洗浄後、検出試薬 ECL-Plus (Enhanced Chemoluminescence-PLUS, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) を用いてバンドをX線フィルムに感光させた。

5. 蛍光免疫染色

Poly-L-lysine 処理したカバーガラス上の細胞を100%メタノールで -20°C 5分間固定した。その後、PBS (phosphate-buffered saline) 緩衝液で2回洗浄後、PBS で希釈した5%ヤギ血清 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で室温1時間、ブロッキングを行なった。ブロッキング液で希釈した抗 γ -チューブリン抗体 (anti- γ -tubulin mouse antibody, Sigma Chemical Corp, St. Louis, MO; 1:2,000希釈) で室温1時間反応させた。PBS で3回洗

浄後、同様に抗テキサスレッドコンジュゲート抗体 (Texas Red-conjugated anti-mouse antibody, Vector Laboratories ; 1 : 500希釈) を反応させた。PBS で3回洗浄後、DNA に結合する蛍光色素 DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) を室温10分間反応させた。蛍光用封入剤 (Perma-Fluor, Lipshaw/Immunon ; Pittsburgh, PA) を用いてカバーガラス上の細胞をスライドガラスに封入した。CCD (charged-coupled device) 機能を備えたニコン蛍光顕微鏡で、Adobe Photoshop software (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA) 下に撮影した。それぞれ500個の細胞を観察し、3個以上の中心体を持つ細胞を中心体複製異常としてカウントした。

6. In situ 蛍光ハイブリッド形成法 (FISH, Fluorescence in situ hybridization) と核 DNA 量の分析

Ad-GFP と Ad-Aurora-A-GFP にそれぞれ感染させた分裂間期の細胞の第3, 7, 17番染色体をそれぞれに特異的な標識プローブ (Vysis Inc., Abbott Park, IL) を用いて分析した⁶⁾。蛍光顕微鏡で200個の核の蛍光標識結合部位の数量分析を行った。コントロールとして腎癌患者から採取した膀胱上皮細胞を用いた。高解像度 CCD 機能を備えた Leica DMRXA 蛍光顕微鏡で撮影した。核 DNA インデックスは、既報のようにフォイルゲン反応を用いて染色体染色を行ない、末梢リンパ球に対する mock, Ad-GFP と Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞の核 DNA 量の比率をフローサイトメトリーで比較分析した⁶⁾。DNA インデックス1.2以上を異数体と分類した。

7. 軟寒天コロニー形成試験

SV-HUC 細胞を mock, Ad-GFP および Ad-Aurora-A にそれぞれ感染させ、その1日後、1プレート当たり 1×10^4 個のそれぞれの細胞を UM-UC-3 細胞培養上清を含む軟寒天と混合し60mmプレートに5枚ずつ播き、37°Cで14日間細胞培養容器で培養した¹⁴⁾。プレートは週に2回、倒立顕微鏡で4倍または10倍の倍率で観察した。第1週に細胞小

塊が観察された。UM-UC-3 細胞培養上清のみのコントロールでは UM-UC-3 細胞の混入はなかった。プレートに播いた2週間後に、30細胞以上で形成されたコロニーの数をプレートごとに記録した。この実験は独立して2回繰り返して行った。

8. 統計分析

2群間分散分析 (ANOVA) 法と Wilcoxon 法の片側検定法を行なった。p-value < 0.05 を有意差ありとした。

結 果

1. Aurora-A タンパク質の発現と細胞増殖測定

ヒト正常膀胱上皮細胞 SV-HUC に導入された Aurora-A 遺伝子のタンパク質発現を調べるためにウエスタンブロットを行なった。抗 Aurora-A 抗体を用いて解析すると Adenovirus Aurora-A-green fluorescence protein (Ad-Aurora-A-GFP) 感染細胞において Aurora-A-GFP タンパク質のバンドが検出された (図1)。Mock および cDNA を導入していない Adenovirus control (Ad-CTR) 感染細胞より抽出したタンパク質からはバンドは検出されなかった。Aurora-A-GFP タンパク質のバンドが検出された感染後1日目から4日目における細胞増殖速度を調べたところ、各細胞間で細胞増殖速度の差はみられなかった (図2)。SV-HUC 細胞の細胞倍加時間は、約48時間であった。

2. 蛍光免疫染色

Aurora-A 高発現による中心体への影響について蛍光顕微鏡を用いて解析を行なった。まず中心体の構成成分である γ -tubulin を抗 γ -tubulin 抗体で検出後、GFP マーカーの緑色蛍光を指標に Aurora-A-GFP 融合タンパク質の局在を観察した。図3Aで(a)は、抗 γ -tubulin 抗体による中心体の位置を、(b)は Aurora-A-GFP 融合タンパク質の局在を示している。Aurora-A-GFP 融合タンパク質は中心体部位に局在すること、Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞には中心体を2個持つ細胞と3個以上持つ細胞が存在することが

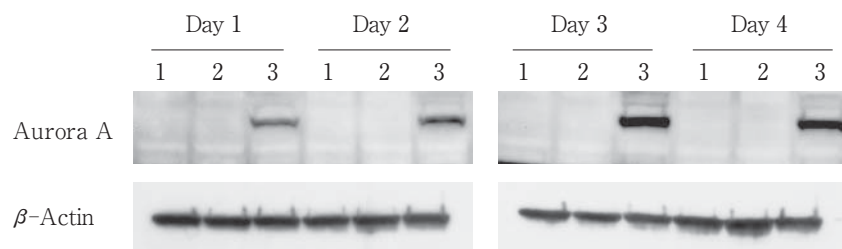


図1 ヒト正常膀胱上皮細胞 SV-HUC における Aurora-A タンパク質の発現確認
アデノウイルスベクター感染による遺伝子導入1日目から4日目の細胞からタンパク質を抽出後、抗 Aurora-A 抗体を用いたウエスタンブロットにて Aurora-A タンパク質の発現確認を行なった。レーン1；Mock コントロール (ウイルス非感染) 細胞, レーン2；5 MOI での Ad-control (cDNA を導入していないアデノウイルスコントロール) 感染細胞, レーン3；5 MOI での Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞。ローディングコントロールとして抗 β -actin 抗体を用いて β -actin の比較を行なった。

観察された(図3A)。そこで各細胞の中心体数をカウントしたところ、Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞は mock や Ad-GFP 感染細胞と比較して3個以上の中心体を持つ細胞が有意に多く観察され、遺伝子導入3日後では対照の約6倍に達した($p=0.0014$, $p=0.0085$, 図3B)。

3. In situ 蛍光ハイブリッド形成法(FISH, Fluorescence in situ hybridization) と核 DNA 量の分析

Aurora-A 遺伝子発現と染色体異数化の関連を検討するために、染色体特異的なセントロメアプローブを用いて、Ad-GFP と Ad-GFP-Aurora-A 感染細胞における第3, 7, 17番染色体の FISH 分析を行った(図4)。通常の2倍体染色体は不連続の2つのスポットが観察されたが、3個以上のスポットは染色体の異数性を表していると思われる(未発表データ)。Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞では、第3染色体のトリソミーまたはそれ以上の異数性染色体を持った細胞数の割合は感染1日後で24%、2日後で35%、3日後で34%、4日後で52%であった。同様に第7染色体ではそれぞれ36%、39%、43%、63%、第17染色体ではそれぞれ10%、18%、12%、45%であった。一方、コントロールの Ad-GFP 感染細胞では、第3染色体では8~23%の頻度であった。この Aurora-A 遺伝子導入細胞で3スポット以上の染色体が検出される細胞の増加傾向は4回の繰

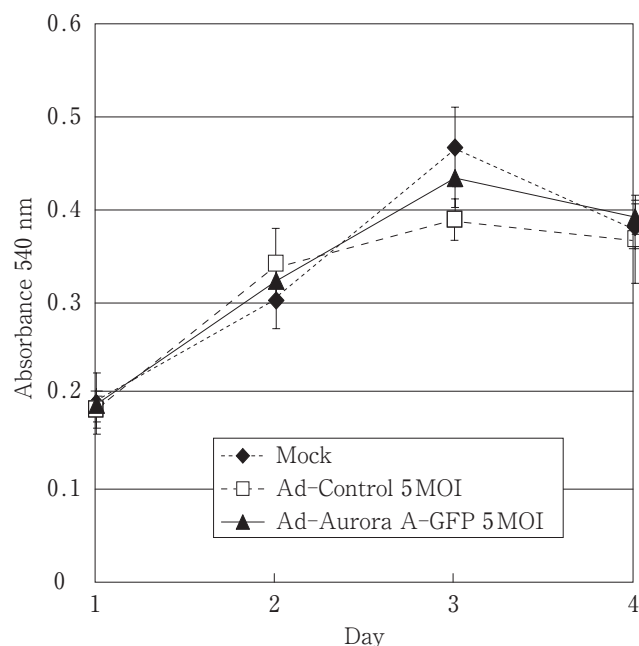


図2 Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞の細胞増殖
アデノウイルスベクター感染細胞 3×10^3 個を24ウエルずつに播き、4日目までの細胞増殖をクリスタルバイオレット染色と540 nmの吸光度で測定した。Mock; Mock コントロール細胞, Ad-control 5 MOI; 5 MOI での Ad-control 感染細胞, Ad-Aurora A-GFP 5 MOI; 5 MOI での Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞。Day は感染後の日数を示している。

り返し実験を通して常に観察された。Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞の核 DNA インデックス分析によると、4日間で3~5%の異数性染色体細胞の出現頻度が観察されたが、Mock と Ad-GFP 感染細胞では0.2~0.3%の出現頻度であった(未発表データ)。以上のデータより、ヒト膀胱上皮細胞への Ad-Aurora-A-GFP 感染による Aurora A 遺伝子高発現は染色体の異数性を引き起こすことが強く示唆された。

4. 軟寒天コロニー形成試験

足場非依存的に生存または分裂増殖する能力は、形質転換された細胞の一つの性質である。そこで Aurora-A 遺伝子を高発現させた細胞の足場非依存的増殖能を軟寒天コロニー形成試験にて検討した(図5A)。Mock と Ad-GFP 感染細胞では、コロニー数に有意な差はみられなかった。一方、Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞は mock に対し約2.3倍、Ad-GFP 感染細胞に対し約1.7倍多くのコロニーを形成し、統計的に有意な差を認めた(図5B)。また Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞が形成したコロニーは、Ad-GFP 感染細胞のコロニーより大きなサイズが観察された(図5A)。

考 察

近年、様々なタイプのヒト癌において中心体の異常複製の報告がなされ始めている¹⁵⁻¹⁹。中心体の異常複製がみられると染色体の分配が正常に行なわれなくなり、結果的に異数体となると考えられている。BTAK としても知られる

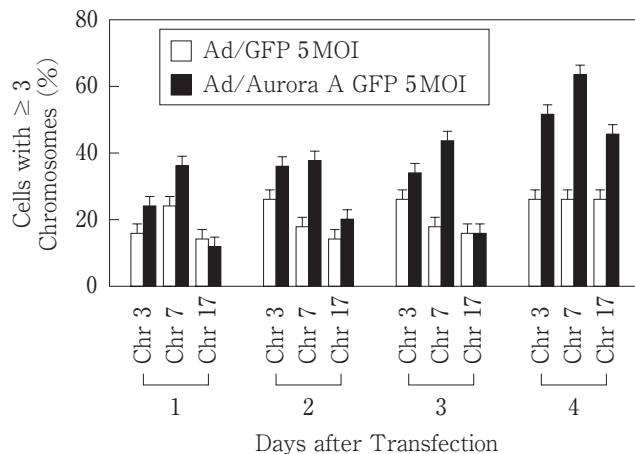


図4 Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞における異数性染色体の発生頻度

ウイルス感染後4日目までの細胞を第3, 第7及び第17染色体特異的のプローブを用いて FISH 分析を行ない、各200個の細胞のうちトリソミーまたはそれ以上の染色体を持った細胞の割合を計測した。Ad-GFP 5 MOI; 5 MOI での Ad-GFP 感染細胞, Ad-Aurora A-GFP 5 MOI; 5 MOI での Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞。

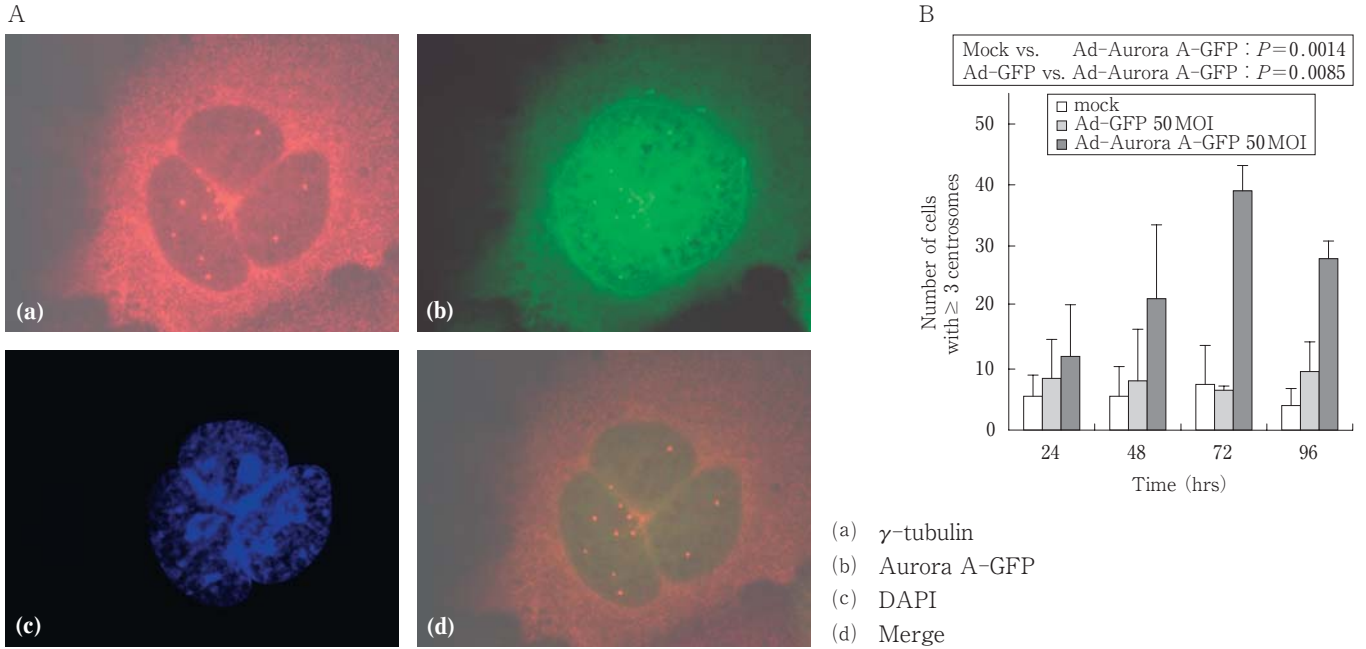


図3 Aurora-A-GFP 遺伝子導入による異数体細胞の出現

A；ウイルス感染細胞における中心体の位置と Aurora A の局在を蛍光顕微鏡で観察した。(a)は抗 γ -tubulin 抗体 (赤色) による中心体の位置, (b)は Aurora-A-GFP 融合タンパク質 (緑色) の局在を, (c)は DAPI (青色) で核を, (d)は(a)~(c)の重ね合わせ (Merge) を示している. Mock；Mock コントロール細胞, Ad-GFP 50 MOI；50 MOI での Ad-GFP 感染細胞, Ad-Aurora A-GFP 50 MOI；50 MOI での Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞. B；それぞれ500個の細胞を蛍光顕微鏡で観察し, 3個以上の中心体を持つ細胞の割合を示した. ANOVA 解析により Mock と Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞の比較では $p=0.0014$, Ad-GFP と Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞の比較では $p=0.0085$ であった (ANOVA test).

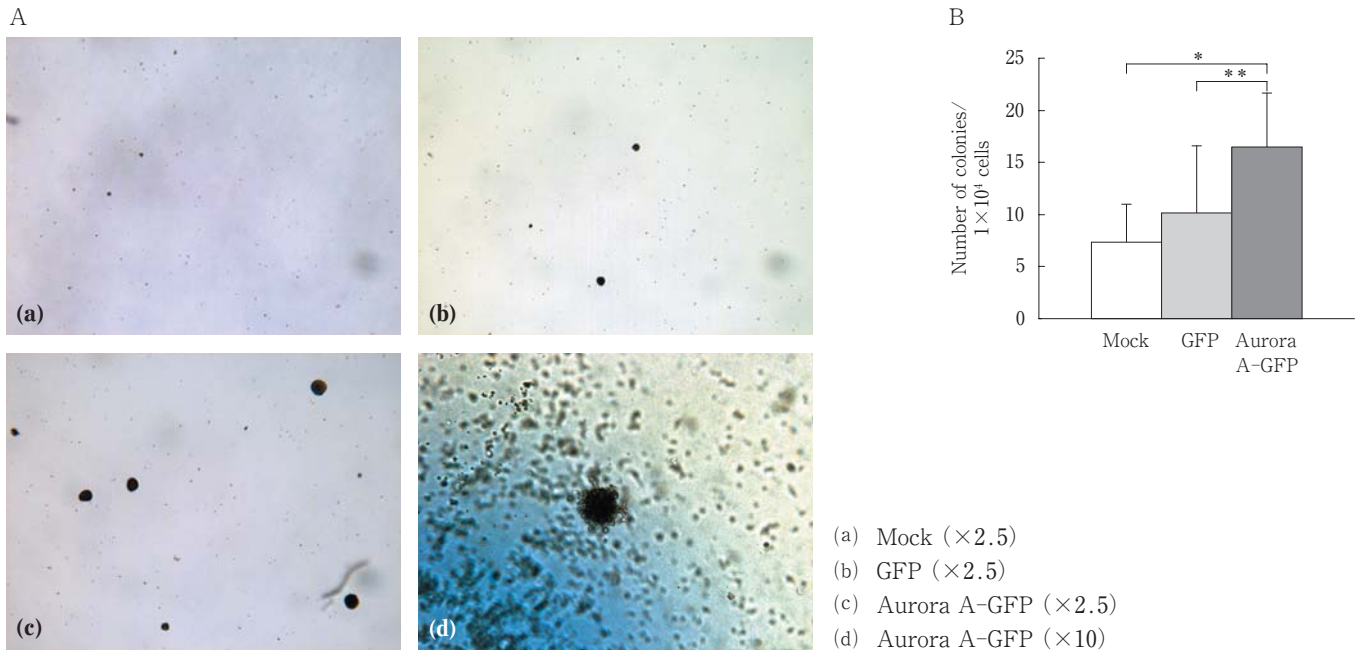


図5 Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞の軟寒天培地での足場非依存的増殖能

A；ウイルス感染細胞 (1×10^4 細胞) を軟寒天培地で2週間培養後のコロニー像。(a)Mock コントロール細胞 ($\times 2.5$ 倍), (b)50 MOI での Ad-GFP 感染細胞 ($\times 2.5$ 倍), (c)50 MOI での Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞 ($\times 2.5$ 倍), (d)50 MOI での Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞 ($\times 10$ 倍). B；ウイルス感染細胞 (1×10^4 細胞) を各5プレートの軟寒天培地で培養し, 2週間後に30細胞以上で形成された細胞塊をコロニー形成とし集計した. この実験は, 2回繰り返して行った. (* $p < 0.001$; Wilcoxon test による mock と Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞の有意差検定, ** $p = 0.01$; Wilcoxon test による Ad-GFP と Ad-Aurora-A-GFP 感染細胞の有意差検定.

Aurora-A 遺伝子は中心体に関連したセリン・スレオニンキナーゼをコードしており、多様なヒト癌種で高発現が観察されることより Aurora-A 遺伝子の高発現が癌細胞の発生機序に重要な役割を担っていると考えられている¹⁶⁾。Sen らのグループは以前、Aurora-A 遺伝子の高発現は臨床的に低分化で異数体のみられる膀胱癌と強く相関を示す事を報告した⁷⁾。そこで、異数体のような遺伝的不安定な状態と Aurora-A 遺伝子の高発現の関連をより詳しく検討する目的の為に本研究を行なった。まず、非腫瘍性のヒト膀胱上皮株化 SV-HUC 細胞に Aurora-A 遺伝子をアデノウイルスで感染導入した。Aurora-A 遺伝子が高発現した SV-HUC 細胞の増殖速度は、コントロールに比べてほとんど差がみられなかった。しかし、Aurora-A 遺伝子を導入された細胞は、中心体数、異数体出現頻度、軟寒天コロニー形成数などが有意に多く観察された。特に、染色体特異的なセントロメアプローブを用いた FISH 解析では、遺伝子導入後 4 日後におよ半数の細胞が染色体異数性を示した。これらの結果より、Aurora-A 遺伝子が高発現することによって、ヒト由来の膀胱上皮細胞は、染色体異数性を含む悪性形質転換の表現型を示したと考えられた。そして、Aurora-A 遺伝子が強力に発現すれば、より悪性の膀胱癌となることが強く示唆された。Aurora-A の具体的な作用機序はまだはっきりしていないが、Aurora-A 遺伝子が過剰発現すると DNA ダメージを受けた際に G 2 チェックポイントで細胞周期を停止する事ができず、結果的に染色体の不安定性を増す事が報告されている²⁰⁾。また、Aurora-A 遺伝子の過剰発現は、紡錘体機能障害薬剤による紡錘体の欠如の状態でさえ細胞周期チェックポイントを乗り越えて細胞分裂を進めてしまうことが明らかになった²¹⁾。これらの結果より癌細胞での染色体の異数性発生に Aurora-A 遺伝子の過剰発現が関係していることが示唆されたが、G 2 チェックポイントで停止できなくなる現象に直接関与するターゲット遺伝子はまだ明らかになっていない。現在のところ、Aurora-A 遺伝子が p 53 の機能をダウンレギュレーションする^{22, 23)} ことやテロメラーゼ活性をアップレギュレーションする²⁴⁾ ことが報告されている。今回報告した Aurora-A 遺伝子が過剰発現しているヒト膀胱上皮細胞は、悪性を呈する形質転換のメカニズムを探求するのに相応しいモデルとして研究応用されると期待している。

謝 辞

本稿作成に当たり、ご指導ならびに御校閲を頂いた岡山大学 理事・副学長清水信義先生、胸部腫瘍外科（第二外科）伊達洋至教授、分子遺伝学 大内田守助教授、共同で実験およびご指導を頂いた MD

Anderson 癌センター泌尿器科 Grossman 教授ならびに同分子病理学 Sen 教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) Marugame T and Kaneko S : Cancer Statistics Digest, Comparison of Bladder Cancer Mortality in Five Countries : France, Italy, Japan, UK and USA from the WHO Mortality Database (1960-2000) . Jpn Clin Oncol (2005) **35**, 357-360.
- 2) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Sauter G, DeVries S, Kerschmann R, Carroll P and Waldman F : Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer (1995) **12**, 213-219.
- 3) Richter J, Jiang F, Gorog JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ and Sauter G : Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. Cancer Res (1997) **57**, 2860-2864.
- 4) Savelieva E, Belair CD, Newton MA, DeVries S, Gray JW, Waldman F and Reznikoff CA : 20q gain associates with immortalization : 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. Oncogene (1997) **14**, 551-560.
- 5) de la Roza GL, Hopkovitz A, Caraway NP, Kidd L, Dinney CP, Johnston D and Katz RL : DNA image analysis of urinary cytology : Prediction of recurrent transitional cell carcinoma. Mod Pathol (1996) **9**, 571-578.
- 6) Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, Kahn P, Chao R, Yore L, Zadra J, Burzon D, Osher G, Bridge JA, Anderson S, Johansson SL, Lieber M, Soloway M and Flom K : Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. J Urol (2002) **168**, 1950-1954.
- 7) Sen S, Zhou H, Zhang RD, Yoon DS, Vakar-Lopez F, Ito S, Jiang F, Johnston D, Grossman HB, Ruifrok AC, Katz RL, Brinkley W and Czerniak B : Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. J Natl Cancer Inst (2002) **94**, 1320-1329.
- 8) Goepfert TM, Adigun YE, Zhong L, Gay J, Medina D and Brinkley WR : Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. Cancer Res (2002) **62**, 4115-4122.
- 9) Ewart-Toland A, Briassouli P, de Koning JP, Mao JH, Yuan J, Chan F, MacCarthy-Morrogh L, Ponder BA, Nagase H, Burn J, Ball S, Almeida M, Linardopoulos S and Balmain A : Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. Nat Genet (2003) **34**, 403-412.
- 10) Christian BJ, Loretz LJ, Oberley TD and Reznikoff CA : Characterization of human uroepithelial cells immortalized in vitro by simian virus 40. Cancer Res (1987) **47**, 6066-6073.
- 11) Tanaka M and Grossman HB : Connexin 26 gene therapy of

- human bladder cancer : Induction of growth suppression, apoptosis, and synergy with cisplatin. *Hum Gene Ther* (2001) **12**, 2225-2236.
- 12) Davies MA, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R, Koul D, Bookstein R, Stokoe D, Yung WK, Mills GB and Steck PA : Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res* (1998) **58**, 5285-5290.
- 13) Tanaka M, Koul D, Davies MA, Liebert M, Steck PA and Grossman HB : MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells. *Oncogene* (2000) **19**, 5406-5412.
- 14) Grossman HB, Wedemeyer G, Ren L, Wilson GN and Cox B : Improved growth of human urothelial carcinoma cell lines. *J Urol* (1986) **136**, 953-959.
- 15) Moritz KB and Sauer HW : Boveri's contributions to developmental biology-a challenge for today. *Int J Dev Biol* (1996) **40**, 27-47.
- 16) Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR and Sen S : Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* (1998) **20**, 189-193.
- 17) Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Malhotra R, Liotta L and Doxsey SJ : Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res* (2001) **61**, 2212-2219.
- 18) Jiang F, Caraway NP, Sabichi AL, Zhang HZ, Ruitrok A, Grossman HB, Gu J, Lerner SP, Lippman S and Katz RL : Centrosomal abnormality is common in and a potential biomarker for bladder cancer. *Int J Cancer* (2003) **106**, 661-665.
- 19) Kawamura K, Izumi H, Ma Z, Ikeda R, Moriyama M, Tanaka T, Nojima T, Levin LS, Fujikawa-Yamamoto K, Suzuki K and Fukasawa K : Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. *Cancer Res* (2004) **64**, 4800-4809.
- 20) Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y, Sasayama T, Kuninaka S, Mimori T, Tamaki N, Kimura M, Okano Y and Saya H : Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells* (2002) **7**, 1173-1182.
- 21) Anand S, Penrhyn-Lowe S and Venkitaraman AR : AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* (2003) **3**, 51-62.
- 22) Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA and Sen S : Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* (2004) **36**, 55-62.
- 23) Liu Q, Kaneko S, Yang L, Feldman RI, Nicosia SV, Chen J and Cheng JQ : Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *J Biol Chem* (2004) **279**, 52175-52182.
- 24) Yang H, Ou CC, Feldman RI, Nicosia SV, Kruk PA and Cheng JQ : Aurora-A kinase regulates telomerase activity through c-Myc in human ovarian and breast epithelial cells. *Cancer Res* (2004) **64**, 463-467.