

## The 23rd Lung Cancer Workshop

### 肺癌における microRNA の異常と意義

長田啓隆<sup>1,2</sup>

#### MicroRNA Abnormalities and Their Roles in Lung Cancers

Hiroataka Osada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Molecular Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute, Japan; <sup>2</sup>Department of Cancer Genetics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan.

**ABSTRACT** — **Objective.** MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs, thought to be involved in physiologic and developmental processes by negatively regulating expression of target genes. We assessed alterations of expressions of miRNAs in lung cancers. **Methods.** We examined the expression of miRNAs using Northern blot and quantitative RT-PCR. We also studied the functions of miRNAs using miRNA expression constructs and antisense oligonucleotides. **Results.** We found reduced expression of the *let-7* family in lung cancers and significantly shorter survival after potentially curative resection in cases with reduced *let-7* expression. We also found marked overexpression of the *miR-17-92* cluster in lung cancers. Introduction of the expression construct of the *miR-17-92* cluster enhanced lung cancer cell growth, whereas inhibition of two members of *miR-17-92* cluster, *miR-17-5p* and *miR-20a*, with antisense oligonucleotides induced apoptosis selectively in lung cancer cells overexpressing *miR-17-92*. **Conclusion.** Our studies suggest that reduced expression of the *let-7* family and marked overexpression of the *miR-17-92* cluster may play roles in the development of lung cancers. These findings contribute towards better understanding of the anti-oncogenic roles of the *let-7* family and oncogenic roles of *miR-17-92*, which might ultimately lead to future translation into clinical applications.

(JLCC. 2009;49:894-901)

**KEY WORDS** — Lung cancer, microRNA, let-7, miR-17-92

Reprints: Hiroataka Osada, Division of Molecular Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute, 1-1 Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya 464-8681, Japan (e-mail: hosada@aichi-cc.jp).

**要旨** — **目的.** microRNA (miRNA) は約 22 塩基の non-coding RNA で標的遺伝子の発現を抑制し、発生・分化の制御など種々の生物学的機能を果たしている。我々は肺癌に於ける miRNA の異常と、肺癌の発症・進展への関与を検討した。**研究計画.** 癌に関連する可能性が考えられる miRNA 群を選択し、正常肺・肺癌検体における miRNA の発現を比較検討した。また、miRNA やアンチセンスオリゴを細胞内導入し、miRNA の機能を検討した。**結果.** let-7 ファミリーが肺癌で高頻度に発現低下し、その発現低下が予後不良因子であることが判明した。また、miR-17-92 クラスターの過剰発現が見出された。この miR-17-92 クラスターの強制発現で増殖促進

が見られ、一方、アンチセンスオリゴによる発現抑制が、miR-17-92 クラスターを強発現している肺癌細胞株特異的に増殖抑制・細胞死誘導を引き起こした。**結論.** let-7 ファミリーが癌抑制遺伝子として、また、miR-17-92 クラスターが癌遺伝子として機能しており、これら miRNA の異常が、肺癌の発症・進展に深く関与することが示唆された。他の miRNA の癌への関与も報告され、今後 miRNA 発現解析の癌の診断・予後予測への応用や、miRNA を用いた治療・miRNA を標的とする治療などの開発が期待される。

**索引用語** — 肺癌, microRNA, let-7, miR-17-92

<sup>1</sup>愛知県がんセンター研究所分子腫瘍学部; <sup>2</sup>名古屋大学連携大学院細胞工学講座。  
別刷請求先: 長田啓隆, 愛知県がんセンター研究所分子腫瘍学

部, 〒464-8681 名古屋市千種区鹿子殿 1-1 (e-mail: hosada@aichi-cc.jp).

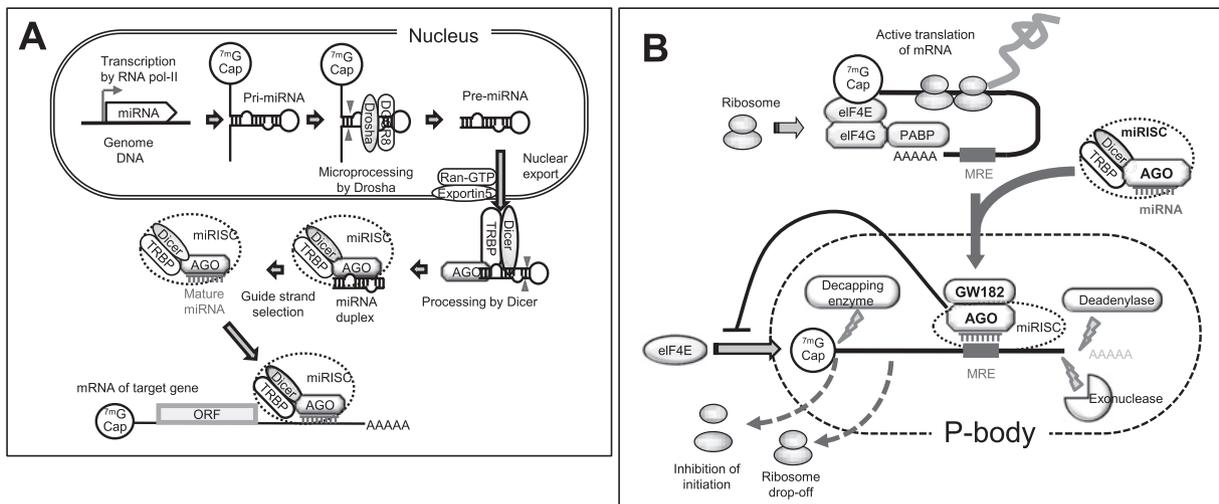
1) はじめに

microRNA (miRNA) は、non-coding RNA の一つであり、初めに長い RNA 鎖として転写され、複雑なプロセスを経て 21~23 塩基長の一本鎖 RNA となり、RNAi と類似の機構で標的遺伝子の発現を抑制する。初めに発見された miRNA は線虫の lin-4, let-7 であり、線虫の幼虫から成虫へと成長する段階の時系列を司るシグナル変異群の中から同定された。その後ウイルス、植物を含め多くの生物で発見され、種間で強く保存されており、発生・分化などにおいて重要な役割を果たすことが判明してきている。<sup>1,2</sup> 現在ヒトで 650 個以上の miRNA が database に登録されて、総数はさらに増えると思われる。一方、各々の miRNA は 100 個以上の標的遺伝子が予測されているので、全遺伝子の約 3 割が何らかの miRNA による制御を受けると考えられている。

miRNA の発現と作用機序について Figure 1A に示す。miRNA は pri-miRNA と呼ばれる長い RNA 鎖として転写され、核内で RNase の Drosha により切断され pre-miRNA となり、次に細胞質に移行し RNase の Dicer によりさらに切断され、約 22 mer の mature miRNA となる。その時同時に argonaute (AGO) を中心とする蛋白複合体 miRISC に取り込まれる (Figure 1A)。miRISC は、miRNA 配列に相補的な配列 MRE を持つ標的遺伝子

mRNA に結合して、標的遺伝子の発現抑制作用を果たす。その抑制作用は、Figure 1B に示すように翻訳抑制・RNA 分解など複雑な機構が関与する。遺伝子の mRNA は Figure 1B 上のように、eIF4E, eIF4G などと PABP を介して、5' 側の cap 構造と 3' 側の poly(A) tail とが結合した構造を取り、この構造を介して ribosome をリクルートして蛋白翻訳が行われる。miRISC は、3'-UTR に存在する MRE 特異的に標的遺伝子 mRNA に結合し、miRISC 中の AGO が eIF4E の cap 構造への結合を抑制し、蛋白翻訳が阻害される。さらに AGO と結合する GW182 を介して、mRNA サーベイランス機構でも機能する P-body へ mRNA-miRISC 複合体が移行し、decapping 酵素や deadenylase により、cap 構造や poly(A) tail が削られ、mRNA 自体の分解も誘導される。このような複雑な機構で翻訳抑制・mRNA 分解が誘導され、標的遺伝子の発現が抑制される<sup>2</sup> (Figure 1B)。

このような標的遺伝子の発現抑制を主な作用とする miRNA の生物学的機能を解明するためには、当然各々の miRNA の標的遺伝子群の同定が必要である。miRNA の 5' 側から 2 nt~7 nt の 6 mer の配列に相補的配列が、通常の遺伝子の 3'-UTR で強く保存されており、miRNA が標的遺伝子 mRNA を認識する上で重要であると考えられ、「seed」配列と呼ばれている。この「seed 配列」に基づき、標的遺伝子群の予測プログラムがいくつか報告



**Figure 1.** miRNA biogenesis and silencing mechanisms. **A.** miRNAs are initially transcribed as long primary miRNAs (pri-miRNAs) and cleaved at hairpin-stems by the Drosha/DGCR8 microprocessor complex, resulting in pre-miRNAs in the nucleus. After nuclear export, pre-miRNAs are cleaved into miRNA duplexes by Dicer/TRBP, and the guide strands of the duplexes are incorporated into miRISC. **B.** miRNAs suppress translation at the initiation and elongation steps, and also induce deadenylation, decapping and degradation of target mRNAs within P-bodies (GW-bodies). miRISC: miRNA-induced silencing complex, AGO: argonaute, TRBP: TAR (HIV-1) RNA binding protein, DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8, MRE: miRNA recognizing element, eIF: eukaryotic translation initiation factor, PABP: poly (A) binding protein, P-body: processing body.

されている。また、網羅的プロテオーム解析により miRNA の標的蛋白を同定する研究も進められている。<sup>3</sup>

このように miRNA は種間で保存され、広範な標的遺伝子群の発現を制御し、発生・分化などに関与する非常に重要な生物学的機能を果たしていると考えられる。我々のグループは、癌遺伝子などの細胞増殖促進・細胞死阻害などに関係する遺伝子を標的として、癌の発症進行を抑制する miRNA や、逆に癌抑制遺伝子などを標的として、癌の発症進行を促進する miRNA が存在し、それら miRNA の様々な異常が、実際の癌の病態に関与するのではないかと考えて、肺癌における miRNA の異常を検討してきた。その結果、肺癌に於いて、癌抑制性 miRNA の let-7 ファミリーや、癌促進性 miRNA の miR-17-92 クラスターの異常が重要な意義を持つことを見出した。それらの結果を中心に癌における miRNA の異常を総論的に報告する。

## 2) 癌抑制性 miRNA : let-7 ファミリー

最初に、肺癌と正常肺とで発現差異のある miRNA を検索したところ、線虫で同定された let-7 ファミリーが、正常肺では豊富な発現を示す一方、肺癌で高頻度に発現低下を起こしていることを見出した。let-7 ファミリーは多数のメンバーを持つが、皆ほぼ同様に肺癌で発現抑制が見られた (Figure 2A)。let-7 ファミリーの発現に基づきクラスター解析すると、肺癌が let-7 ファミリーの発現正常群と低下群の 2 個のクラスターに分かれ、発現低下群では、外科切除後の予後が不良であることが判明した (Figure 2B)。また、多変量解析にて、let-7 発現低下は病期と独立した予後不良因子であることも見出した。さらに、肺癌細胞株 A549 に let-7 を強制発現させると、細胞増殖が抑制されることも明らかにした。<sup>4</sup> その後、Yanai-hara ら、<sup>5</sup> Yu ら<sup>6</sup> も、肺癌における miRNA の網羅的発現解析により、let-7 が予後に関与することを報告している。

このように癌における高頻度な発現低下や細胞増殖抑制作用が見られることから、let-7 ファミリーは重要な癌抑制遺伝子として機能すると考えられる。実際、癌遺伝子の RAS や HMGA2 が標的遺伝子として報告されている。<sup>7,8</sup> 最近、変異 K-RAS トランスジェニックマウスで発症した肺癌に対して let-7 が増殖抑制・細胞死誘導を引き起こすことも報告されている。<sup>9</sup> また、癌遺伝子 Myc と相互に抑制的に働くことが示唆されている<sup>10</sup> (Figure 3)。

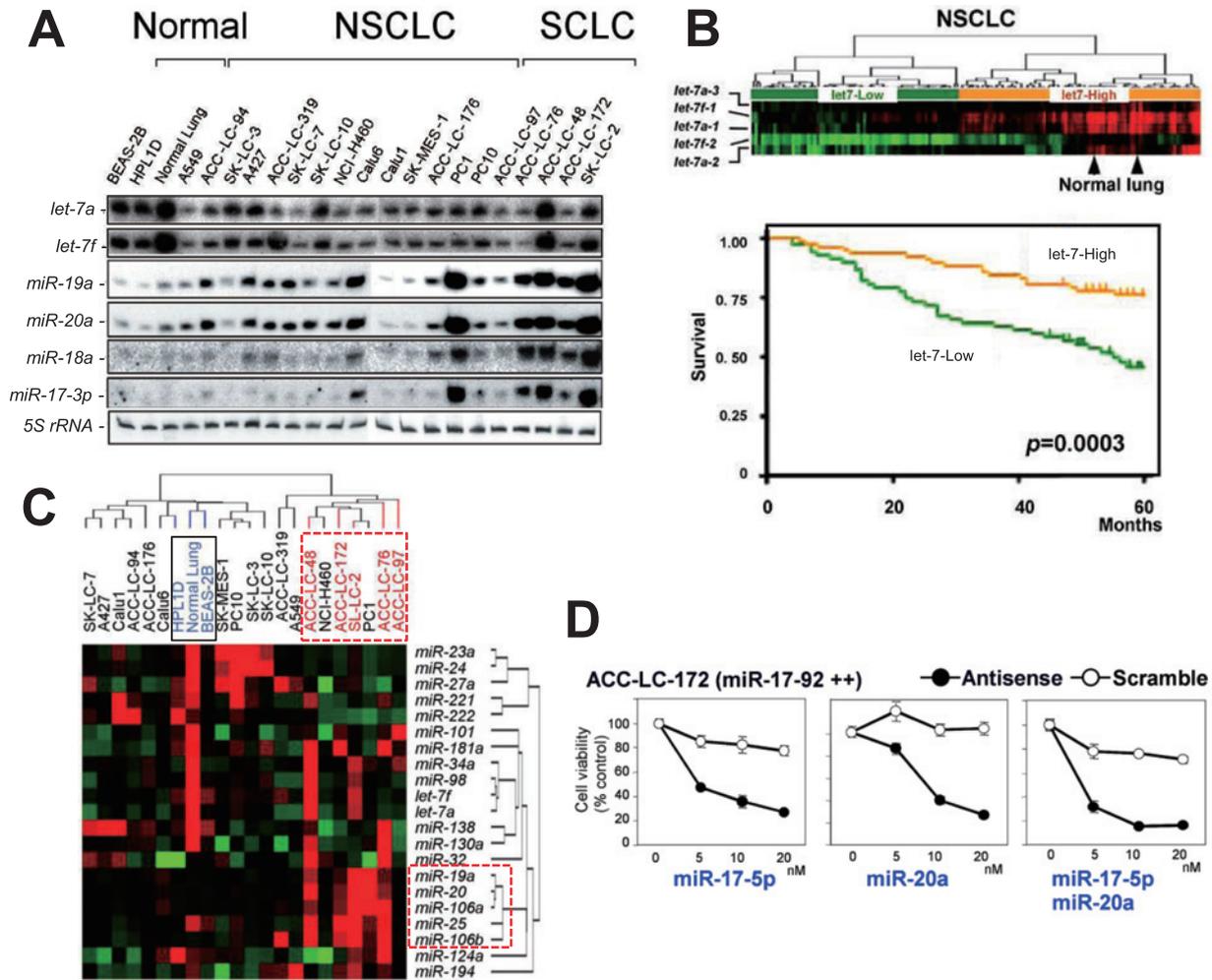
前述のように、let-7 は線虫の発生段階の時系列を司るシグナル内で機能しており、RNA 結合蛋白 lin-28 が let-7 に抑制的作用することが知られていた。最近、ES 細胞などの未分化細胞に於いては Lin28 が発現し、mature

let-7 は発現していないことが知られ、さらに Lin28 が let-7 の loop 部分に結合し、Drosha によるプロセッシングを阻害し、mature let-7 の発現が抑制されることが判明した。<sup>11</sup> let-7 は細胞分化を促進すると考えられ、一方 Lin28 は let-7 の発現を抑制して未分化能の維持に関与していると考えられる。興味深いことに、Lin28 相同遺伝子 Lin28B が癌で発現亢進することが知られ、Lin28B の発現亢進により let-7 の発現が低下し、細胞分化が阻害され、癌化の発症に関与していることが示唆される。

## 3) 癌促進性 miRNA : miR-17-92 クラスター

次に、重要な癌遺伝子・癌抑制遺伝子などを標的遺伝子とするような miRNA 群を多数選択し、ノザン法にて miRNA の発現を検討した。すると、肺癌の中で小細胞癌を中心に著明に発現亢進する miRNA を認めた<sup>12</sup> (Figure 2A)。クラスター解析で、これら発現亢進する miRNA は共通した発現亢進パターンを示し、同一クラスターに分類された (Figure 2C)。ファミリー間のクロスハイブリなどを検討した結果、染色体 13q31.3 部位に局在する C13orf25 遺伝子の intron 内に存在し、7 個の miRNA (miR-17-5p・miR-17-3p・miR-18a・miR-19a・miR-20a・miR-19b・miR-92a) から成る polycistronic な miR-17-92 クラスターが発現亢進していることが判明した。この発現亢進の機序としては、サザン法解析により、肺癌細胞株に於いてこの領域の遺伝子増幅が見られた。さらにこの miR-17-92 クラスターを強制発現させると肺癌細胞の増殖を促進し、肺癌に於いて癌遺伝子として機能していることが示唆された。<sup>12</sup> 次に逆に miR-17-92 クラスターを強発現している肺癌細胞株に対して、クラスター内の miR-17-5p・miR-20a に対するアンチセンスオリゴを導入し miRNA の発現を抑制すると、増殖抑制・細胞死誘導が見られた<sup>13</sup> (Figure 2D)。このアンチセンス効果は miR-17-92 を強発現している肺癌細胞株に特異的であり、強発現のない肺癌細胞株ではこのような効果は見られなかった。また、クラスター内の他の miRNA に対するアンチセンスではこのような効果は見られず、クラスターの中で miR-17-5p, miR-20a が癌遺伝子として機能する miRNA であることが判明した。以上の検討から、miR-17-92 クラスターを強発現している肺癌細胞が、miR-17-5p, miR-20a に対する「依存性」を持ち、これら miRNA が肺癌の治療標的となる可能性が強く示唆された。<sup>13</sup> また興味深いことに、C13orf25 の intron 内で miR-17-92 クラスターの 3' 側に増殖抑制部位 C2 が存在し、この C2 部位を含まず、miR-17-92 クラスターのみを含む transcripts が肺癌細胞で発現していることも見出している。<sup>13</sup>

この 13q31 領域は、B 細胞性リンパ腫の CGH アレイ

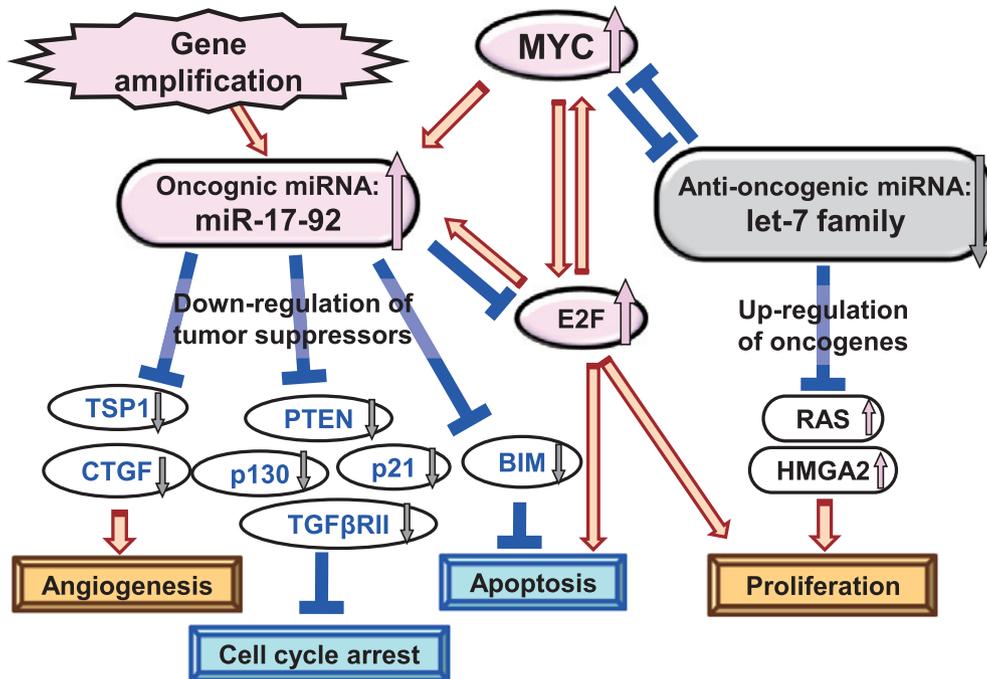


**Figure 2.** Altered expression of *let-7* family and *miR-17-92* cluster miRNAs in lung cancers. **A.** Northern blot analysis of miRNAs in lung cancer cell lines. Note the reduced expression of *let-7a* and *let-7f* in lung cancer cell lines in contrast with their abundant expression in normal lung and two normal human lung epithelial cell lines, BEAS-2B and HPL1D. Note also marked overexpression of *miR-17-92* cluster miRNAs, *miR-19a*, *miR-20a*, *miR-18a*, and *miR-17-3p*. **B.** Hierarchical clustering and Kaplan-Meier survival curves based on expression of *let-7* isoforms. (Upper) Results of unsupervised hierarchical clustering of 143 non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cases. (Lower) Kaplan-Meier survival curves for NSCLC patients who were classified into *let-7*-Low or *let-7*-High clusters. The difference in postoperative survival was highly significant ( $p=0.0003$  by log-rank test). **C.** Unsupervised hierarchical clustering analysis highlights overexpression of miRNAs of *miR-17-92* cluster and its paralogous clusters mainly in small-cell lung cancer cell lines (enclosed with dashed lines). Normal lung tissues and the two immortalized human lung epithelial cell lines, BEAS-2B and HPL1D, are enclosed with a solid line. **D.** MTT assay showing significant growth inhibition by antisense oligonucleotide treatment against *miR-17-5p* and/or *miR-20a* in a lung cancer cell line ACC-LC-172 overexpressing *miR-17-92* cluster.

解析で染色体増幅があり, C13orf25 遺伝子が増幅の責任遺伝子として報告されていた。その後我々の検討と同時期に, この C13orf25 遺伝子内に miR-17-92 クラスターが存在し, この miRNA クラスターが Eμ-Myc トランスジェニックマウスで, B 細胞リンパ腫の発生を促進し, 癌遺伝子として機能することが報告された。<sup>14</sup> また, 癌遺伝子 Myc がこの miR-17-92 クラスターの発現を誘導し, さらにクラスター内の miR-17 と miR-20 が細胞増殖に

関与する転写因子 E2F1 の発現を抑制すると報告された。<sup>15</sup> その後 E2F ファミリーも miR-17-92 クラスター発現を誘導していることが報告され, Myc と E2F ファミリーがフィードバックループを形成し, miR-17-92 の発現を繊細に調節していると考えられる<sup>10,16</sup> (Figure 3)。

この miR-17-92 クラスターは, PTEN, p21, p130, TGFβRII, E2F, BIM, CTGF, TSP1 など多くの癌抑制遺伝子を標的遺伝子とし, これら標的遺伝子群の発現抑



**Figure 3.** A schematic model showing the molecular mechanisms of miRNA-involved cancer pathogenesis. *let-7* family miRNAs are considered as tumor suppressor genes, while *miR-17-92* cluster miRNAs function as oncogenes. Note an autoregulatory feedback loop between E2F factors and *miR-17-92* cluster miRNAs and double feed-forward loop between E2F, MYC, and *miR-17-92* cluster miRNAs. TSP1: thrombospondin 1, CTGF: connective tissue growth factor, PTEN: phosphatase and tensin homology, p130: retinoblastoma-like 2 p130, p21: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A p21, TGFβRII: transforming growth factor-β receptor II, BIM: bcl-2 interacting mediator, HMGA2: high mobility group AT-hook 2.

制を介して、我々が肺癌で確認したような細胞増殖促進・細胞死阻害などの作用を果たすと考えられる (Figure 3)。また、miR-17-92 クラスターのノックアウトマウスで肺の発生異常が生じ、<sup>17</sup> 一方、miR-17-92 のトランスジェニックマウスで気道上皮の増殖促進が誘導されることが報告され、<sup>18</sup> 正常な肺発生過程でも重要な促進的機能を持つことが報告された。このように、miR-17-92 クラスターは肺の発生と癌化に深く関与する miRNA であることが認識されてきている。

#### 4) その他の miRNA の異常

##### (a) miR-15a/miR-16-1

Calin らは CLL で高頻度に欠失する 13q14 領域を解析し、30-kb 長のホモ欠失領域内に miR-15a/miR-16-1 が存在することを報告した。<sup>19</sup> miR-15a と miR-16-1 は相同のファミリーであり、B-CLL 患者の 65% 以上でこれらの miRNA の欠失あるいは発現低下が見られ、B-CLL の発症に深く関与していると考えられる。その標的遺伝子としては癌遺伝子 BCL2 などが考えられている。

##### (b) miR-34

代表的癌抑制遺伝子である p53 が miR-34 ファミリーを直接的に発現誘導し、その miR-34 ファミリーが、CDK6, Cyclin E2, E2F3, c-MET, BCL2 など重要な遺伝子群を標的として発現抑制し、p53 の下流シグナルの伝達分子として細胞周期・アポトーシス・細胞老化などの制御にかかわることが報告された。<sup>20</sup> miR-34 ファミリーは種々の癌で欠失や発現低下が見られ、癌発症に関与すると考えられる。

##### (c) miR-21

miR-21 は肺癌、乳癌など多くの癌で共通して発現が亢進していることが報告されており、重要な癌促進性 miRNA と考えられている。<sup>21</sup> 細胞増殖促進・細胞死阻害作用が報告され、また、薬剤抵抗性への関与や転移促進作用も報告されている。miR-21 のターゲットとして癌抑制遺伝子 PTEN, PDCD4 が同定されている。

##### (d) miR-155

リンパ腫形成を促進する non-coding RNA として BIC 遺伝子が報告され、その後 BIC 遺伝子中の種間で保存された領域に miR-155 が含まれていることが判明した。<sup>22</sup>

**Table 1.** Alterations of miRNAs Expression in Human Malignancies

Altered miRNA	Locus	Cancer types *	Target genes
Down-regulated miRNAs (candidate tumor suppressor genes)			
<i>let-7</i> family	multiple	lung	RAS, HMGA2, MYC, Lin28
<i>miR-15a/16-1</i>	13q14.3	CLL, pituitary adenoma	BCL2
<i>miR-34a/b/c</i>	1p36.23/11q23.1	colorectal	CDK6, Cyclin E2, E2F3, MET, BCL2
<i>miR-29</i>	7q32.2	lung, CLL	TCL1, DNMT3A/3B
<i>miR-143/145</i>	5q32	colorectal, breast	MAPK7 (miR-143)
<i>miR-125b</i>	11q24/21q21	breast	Lin28
Up-regulated miRNAs (candidate oncogenes)			
<i>miR-17-92</i>	13q31.3	lung, lymphoma	E2F1, PTEN, RB2p130, p21, BIM, etc.
<i>miR-21</i>	17q23.2	glioblastoma, breast	PTEN, PDCD4
<i>miR-155/BIC</i>	21q21.3	lymphoma, breast, lung	TP53INP1
<i>miR-221/222</i>	Xp11.3	thyroid	KIT, CDKN1B
<i>miR-372/373</i>	19q13.42	testicular germ cell	LATS2

\* CLL, chronic lymphocytic leukemia; TCL1, T-cell leukemia/lymphoma 1A; DNMT, DNA methyltransferase; PDCD4, programmed cell death 4; TP53INP1, tumor protein 53-induced nuclear protein 1; CDKN1B, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B p27; LATS2, large tumor suppressor, homolog 2.

miR-155 はリンパ腫だけでなく、非小細胞肺癌や乳癌などでも発現亢進が見られ、重要な癌促進性 miRNA として多くの腫瘍発症に関与すると考えられる。Yanaiharara<sup>5</sup>により、miR-155 高発現と let-7a-2 低発現が重要な予後不良因子であることが報告されている。

### 5) miRNA の発現異常の分子機序

このような miRNA の制御異常の起こる機序として、染色体異常・エピジェネティック異常・転写制御異常などが報告されている。

#### (a) 染色体異常

miRNA の異常に染色体欠失・増幅の関与が高頻度にあると考えられる。Calin らは 186 個の miRNA を検討し、その半数以上が癌に関連して染色体欠失・増幅を示す、染色体不安定領域に位置していることを指摘している。<sup>23</sup> その後 Zhang らはアレイ CGH 解析を用いて、卵巣癌・乳癌・悪性黒色腫で高頻度に miRNA のコピー数の変化があることを見出し、さらにこれら 3 種の腫瘍で共通して異常を示す miRNA 群や、miRNA のコピー数の変化と発現との相関を報告している。<sup>24</sup> 前述のように、慢性リンパ性白血病の高頻度欠失領域 13q14.3 に存在する癌抑制性 miRNA の miR-15a/miR-16-1 や、肺癌・リンパ腫などで染色体増幅の見られる 13q31.3 に存在する miR-17-92 クラスターが、染色体異常を伴う miRNA として良く知られている。

#### (b) エピジェネティックな異常

miRNA の promoter 構造は不明な面も多いが、通常の遺伝子と同様に DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな異常も報告されている。癌抑制性

miRNA の let-7a-3 や miR-34b/miR-34c の DNA メチル化による発現抑制が報告されている。<sup>25</sup> また、癌遺伝子 BCL6 をターゲットとする癌抑制性 miRNA miR-127 のエピジェネティックな不活化も報告されている。<sup>26</sup> 一方 miRNA プロセッシングを行う Dicer が DNA メチル化に必須という報告があり、<sup>27</sup> miRNA 或いは他の non-coding RNA が DNA メチル化に関与している可能性が示唆される。

#### (c) その他の制御異常

miRNA は通常の遺伝子と同様に転写因子により発現調節される。興味深いことに、癌遺伝子 Myc は、miR-17-92 の発現を促進するが、let-7 を含む広範な miRNA の転写を抑制することも報告されている。<sup>10</sup> 我々は miRNA のプロセッシングに重要な Dicer の発現の低下が肺癌で見られ、その発現低下が肺癌において病期などとは独立した予後不良因子であることを示した。<sup>28</sup> その後、実験的にも Dicer を含めた miRNA プロセッシングの低下が広範な miRNA 発現の低下をきたし腫瘍形成能・浸潤能を増強することが報告された。<sup>29</sup> また前述のように Lin28 による let-7 のプロセッシングの阻害も報告されている。癌における miRNA の発現は全体的には、正常組織に比べて低下する傾向があり、このような癌遺伝子などによる miRNA の発現調節や、miRNA のプロセッシングの異常が、癌発症において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

### 6) まとめ

癌で発現低下や発現亢進が報告されている代表的 miRNA を Table 1 に示す。なお、最近の報告で、増殖時

の細胞では、静止期の細胞と異なり、MREを持つような長い3'-UTRが転写されず、MREを含まない短い3'-UTRを持つ transcripts が発現する傾向があることが見出された。<sup>30</sup> 細胞が元々このような miRNA の発現低下がなくても miRNA の制御から逃れられる機構を持っていることは興味深く、癌化に於いてもこの機構の関与が示唆される。

このように、miRNA は多数の遺伝子の発現を調節し、発生・分化や細胞増殖・細胞死などを制御する多様で複雑な機能を果たしており、miRNA の異常が癌の発症進行に関与することが明らかとなってきた。さらに miRNA は癌の診断や治療にも有用である可能性が認識されてきており、miRNA の研究は癌研究に於いて、今後益々重要なテーマとなると期待される。

## REFERENCES

- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350-355.
- Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2007;28:2-12.
- Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, Cao K, Matsuyama Y, Goto H, et al. Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res*. 2008;68:5540-5545.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004;64:3753-3756.
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9:189-198.
- Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*. 2008;13:48-57.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120:635-647.
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*. 2007;315:1576-1579.
- Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:3903-3908.
- Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. 2008;40:43-50.
- Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008;320:97-100.
- Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*. 2005;65:9628-9632.
- Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, Yanagisawa K, Hayashita Y, Ebi H, et al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene*. 2007;26:6099-6105.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435:828-833.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005;435:839-843.
- Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, et al. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem*. 2007;282:2135-2143.
- Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 2008;132:875-886.
- Lu Y, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Dev Biol*. 2007;310:442-453.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15524-15529.
- He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447:1130-1134.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2257-2261.
- Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:3627-3632.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2999-3004.
- Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9136-9141.
- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2008;68:4123-4132.
- Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by

- chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 2006;9:435-443.
27. Ting AH, Suzuki H, Cope L, Schuebel KE, Lee BH, Toyota M, et al. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68:2570-2575.
  28. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2005;96:111-115.
  29. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*. 2007;39:673-677.
  30. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science*. 2008;320:1643-1647.