

microRNA 発現異常と悪性リンパ腫*

田川 博之

秋田大学大学院医学系研究科 血液・腎臓・膠原病内科学講座

(平成 23 年 3 月 28 日掲載決定)

The roles of OncomiR in malignant lymphoma

Hiroyuki Tagawa

Department of Hematology, Nephrology and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : malignant lymphoma, microRNA, OncomiR, miRNA

はじめに

1993 年, のちに「microRNA」と呼ばれるようになる 20-24 塩基から構成される小分子の機能的 RNA が線虫の実験で初めて報告された。microRNA (以下 miRNA) は線虫から, 植物, 哺乳類に至るまでのあらゆる種に存在する。この機能的 RNA は mRNA からの蛋白翻訳を制御することで, 正常細胞の分化や増殖に重要な役割を担うことが明らかされている。ヒトでは現在 900 近くの miRNA が知られており, 蛋白をコードするヒトの遺伝子のほぼすべては miRNA によって制御され得るとされている。今世紀に入って各種の疾患と miRNA の関りも注目を浴びるようになった。がんでは, 2001-2002 年に慢性リンパ性白血病 (Chronic lymphocytic leukemia : CLL) の 13q14 欠損の標的遺伝子として *DLEU2* 遺伝子が報告された。2004 年に, びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma : DLBCL) で 13q31 のゲノム増幅の標的遺伝子として我々は *C13orf25* が同定した。これらの遺伝子は蛋白をコードしない (non coding) 遺伝子であるが, *DLEU2* には miR-15a, 16-1 (miR-15, 16) が, *C13orf25* には 6 つの miRNA (miR-17-92) が

存在し, これらの microRNA はゲノム欠損や増幅により発現低下, あるいは過剰発現をしていたことから, 異常発現により造腫瘍に関わると考えられた。その後, 固形がんにおける microRNA の発現異常が相次いで報告され, 今日では microRNA 発現異常とがん発症が密接な関わりを持つことが機能面からも次々と明らかにされている。本論文では, miRNA の正常の機能的役割からがんにおける役割に至るまでを我々の知見を中心に解説する。

1. miRNA

miRNA とは, 20-24 nucleotide からなる蛋白をコードしない RNA (non-coding RNA) である。miRNA は線虫において *lin-4* 遺伝子から転写される 22nt の non-coding RNA として 1993 年に発見された¹⁾。Ambros らは, *lin-4* は *lin-14* 蛋白を抑制し, 線虫細胞の分化に重要な働きをしていることを明らかにした¹⁾。

miRNA は miRNA 遺伝子そのものとしてゲノム DNA に存在するが, 時として蛋白をコードする他の遺伝子内にある場合がある。蛋白をコードする遺伝子と同様な転写機構で 5' 側にキャップ構造, 3' 末端にポリ A 構造を持つ pri-miRNA として転写される。そして Dorosha と呼ばれるリボヌクレアーゼ III により分解され 70-80 塩基のヘアピン構造をもつ pre-miRNA に分解された後, 核内から細胞質へ輸送蛋白 (Exportin 5) により輸送される。さらに細胞質内で Dicer と呼ばれるリボヌクレアーゼ III により切断され 20-24 塩基配列の成熟 (mature) miRNA となる²⁾。miRNA は

Correspondence : Hiroyuki Tagawa, M.D., Ph. D.
Department of Hematology, Nephrology and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondoh, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6116
Fax : 81-18-836-2613
E-mail : htagawa@doc.med.akita-u.ac.jp

*第 21 回秋田医学会学術賞

(8)

microRNA 発現異常と悪性リンパ腫

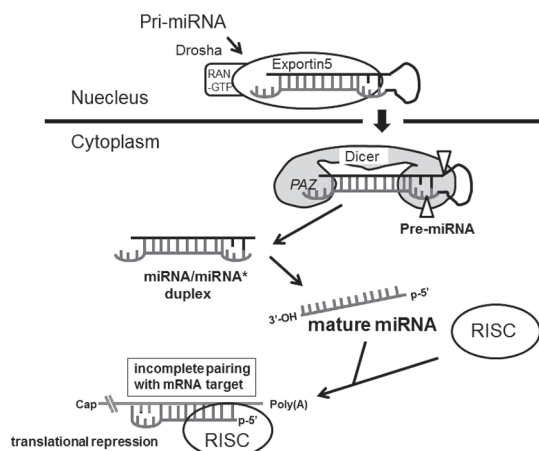


図1. miRNAの成熟経路と機能. Pri-miRNA→Pre-miRNA→mature miRNA. miRNA (赤色)はmiRNA RISC (RNA inducing silencing complex) 蛋白と複合体を作り、標的 mRNA (青色)の蛋白への翻訳を阻害する。

RISC (RNA inducing silencing complex) 蛋白と複合体を形成して siRNA のように標的分子の mRNA の相補配列に結合することによって、その標的遺伝子の mRNA を分解する場合がある。しかし殆どは、標的の sequence に部分的、不完全に結合して mRNA から蛋白への翻訳を阻害することにより、細胞の分化増殖等の調節をおこなう (図1)。miRNA は 6-8 塩基の「seed」と呼ばれる種をこえて保存される配列を持ち、その sequence が標的 mRNA の 3'-UTR (untranslated region) に存在する場合は、その seed 配列を中心として相補的に不完全結合する。Seed 配列を利用した miRNA 標的予測プログラムがいくつか存在し、Target Scan や Pictar が有名である^{3,4)}。miRNA はしばしば seed 配列以外の 1, 2 塩基の配列のみが異なる場合があり、ファミリーを形成する。たとえば、let-7 は 1-2 塩基の違いにより a-e までである。そのファミリーは染色体上の極めて狭い範囲にしばしばクラスターを形成している。ヒトでは数十のファミリーからなる約 900 の miRNA が現在知られており、毎年新たな miRNA が同定されており、その数は 3,000 程度にのぼると予想されている。

2. non coding RNA と miRNA

今日では miRNA の発現異常が多くのがんで知られ

ているが、がんにおける最初の報告は Croce らのグループによりなされた。2001 年に Dalla-Favera のグループは CLL における 13q14 欠損領域の詳細な探索によって non coding 遺伝子 *DLEU2* の発現低下を発見した⁵⁾。翌年 Croce らは 2002 年に CLL の 13q14 の共通欠損領域から miR-15, 16 の発現低下を報告した⁶⁾。miR-15, 16 は前述の *DLEU2* 遺伝子内に存在した。2003 年、バーキットリンパ腫 (Burkitt lymphoma) で miR-155 の sequence を含む *BIC* と呼ばれる non coding 遺伝子の過剰発現が報告された⁷⁾。*BIC* 遺伝子が miR-155 の pri-miRNA であることが翌年以降報告され、その発現異常がリンパ腫造腫瘍性に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。2004 年、我々は non coding 遺伝子 *C13orf25* が 13q31 のゲノム増幅により DLBCL を中心とする B 細胞リンパ腫で過剰発現することを報告した⁸⁾。これらの報告を根拠に、2004 年、Croce らは 1) miRNA は全ゲノムにわたって存在し、しばしばクラスターを形成する、2) miRNA の半数近くは、がんで異常を来すことの多いゲノム不安定領域 (fragile region) に存在する、ことを報告した⁹⁾。この論文の中で、彼らは miR-155 や miR-17-92 などの「がんで過剰発現する miRNA」は「がん抑制遺伝子・蛋白」の発現を下げ、miR-15, 16 などの「がんで異常に発現低下をする miRNA」は、「がん遺伝子・蛋白」の発現亢進をきたし造腫瘍に関わる可能性を指摘した (図2)。

3. OncomiR1 としての miR-17-92 クラスター

C13orf25/miR-17-92 は miR-17-5p, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92-1 の 6 つの miRNA からなる「microRNA polycistron」を遺伝子内にもち、miR-17, 20 からなる miR-17 と miR-19 の 2 つのファミリーに大別される。miR-17-92 クラスターが 13q31 のゲノム増幅により B 細胞リンパ腫で過剰発現する (図3A) ことは前述した。この報告に基づいて Hammond や Hannon らのグループが miR-17-92 を導入した恒常的に c-Myc を発現するマウス (E μ -Myc マウス) の胎児肝幹細胞を、放射線照射した骨髄致死的同マウスに骨髄移植し、腫瘍発生を観察した。結果、移植マウスでは、E μ -Myc マウスより早期に B 細胞白血病が生じた¹⁰⁾。彼らはがん遺伝子 (oncogene)、あるいはがん抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) のように機能する miRNA として「OncomiR」という呼称を提唱

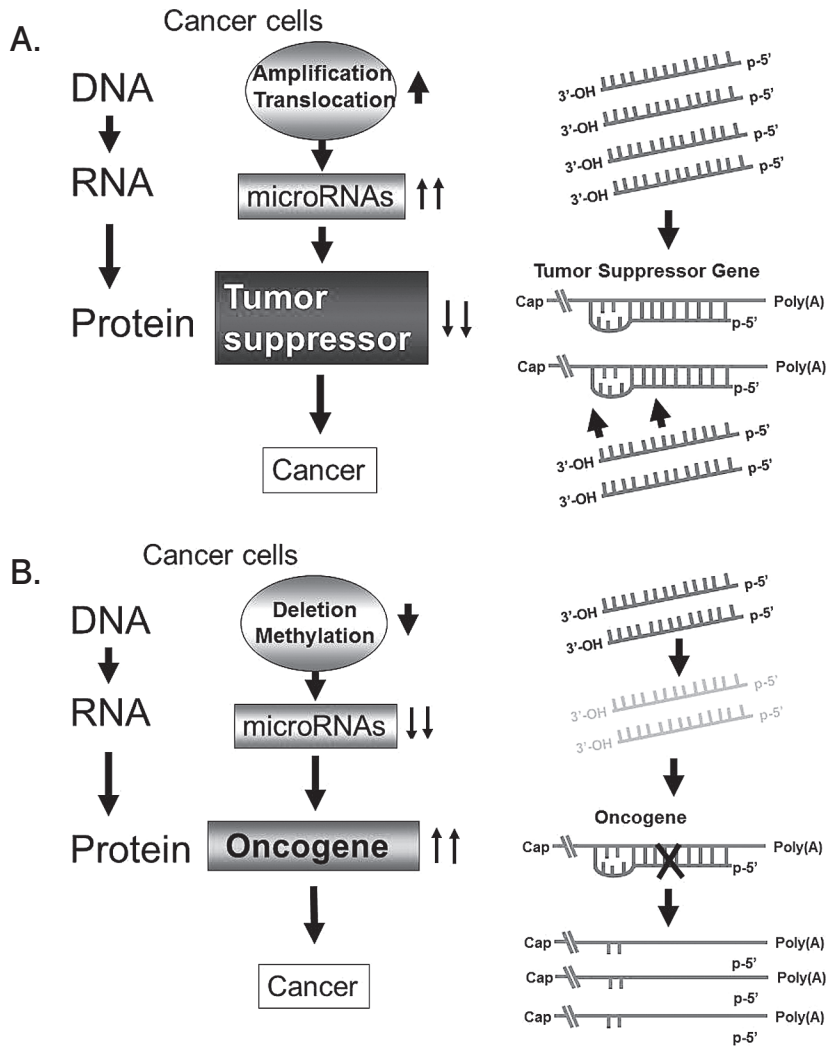


図2. OncomiR の機能の模式図。

A. がん遺伝子として働く場合。

B. がん抑制遺伝子として働く場合。

し miR-17-92 は OncomiR1 とされた。彼らは、miR-17-92 は単独の強制発現ではがんを生じさせることができず、c-Myc との協調により初めて造腫瘍効果をもつことを示した¹⁰⁾。

B 細胞リンパ腫で、miR-17-92 がどの蛋白を標的としているのか? に関する疑問は 2008-2009 年の間に次々と明らかにされた。2008 年になり、miR-17-92 は pro-pre B 細胞への分化に重要な働きをもつ遺伝子であることが Rajewsky や Jacks らのグループからあ

いついで報告された^{11,12)}。彼らは miR-17-92 が B 前駆細胞の分化の段階で「アポトーシス誘導蛋白」である Bim を抑制することを明らかにした。Jacks らは miR-17-92 のノックアウトマウスを作製し miR-17-92 の欠損により Bim が過剰発現し、B 細胞は pro-pre への細胞分化が阻害されること、Rajewsky らは miR-17-92 をリンパ組織特異的に発現させるトランスジェニックマウスを作製し、同マウスでは B 細胞の分化の過程で Bim の発現が抑制されリンパ球増殖性の病態をき

(10)

microRNA 発現異常と悪性リンパ腫

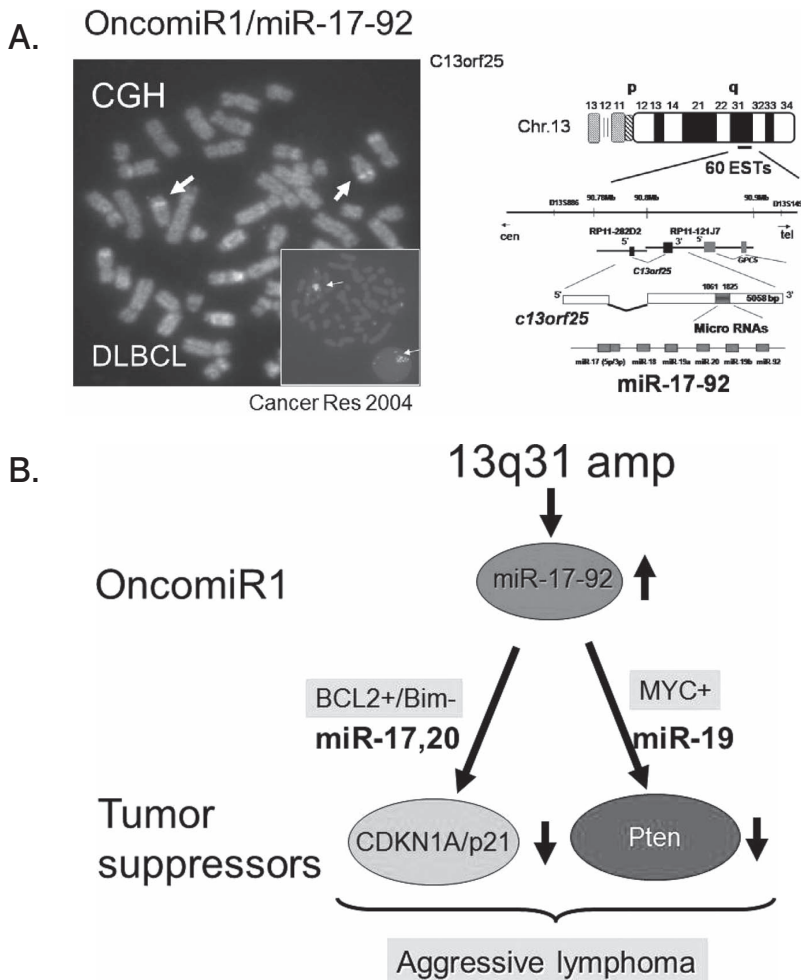


図3. OncomiR1/miR-17-92 と B リンパ腫での役割.

A. 13q31 ゲノム増幅領域 (矢印) から同定された C13orf25/miR-17-92.

B. miR-17-92 は p21 あるいは Pten を抑制する. また, first hit の遺伝子異常 (BCL2 や MYC) の違いにより標的が異なることが示唆される.

たすことを報告した^{11,12)}. これらの報告から miR-17-92 は Bim を抑制することにより Myc をはじめとするがん遺伝子・蛋白と協調して B 細胞リンパ腫の造腫瘍性に関与することが示唆された. しかし, マントル細胞リンパ腫 (MCL) 由来の Jeko-1 細胞株は 13q31 のゲノム増幅とそれに伴う miR-17-92 の過剰発現を来しているが, 2q13 のホモ欠損により *BIM* 遺伝子の発現がないことも知られている^{13,14)}. 従って, miR-17-92 が Bim とは異なる標的を持ちうるということが示唆された. 我々は, *BCL2* 転座陽性の DLBCL 由来

細胞株である SUDHL4 に対してレンチウイルスを用いて GFP-miR-17-92 を導入し, 安定に miR-17-92 が過剰発現する変異細胞株を得た. この変異細胞株を用いて遺伝子発現解析を行い, 1,000 以上の (miR-17-92 の) 標的候補遺伝子の中から 17 遺伝子が発現低下することを見出した. これら 17 遺伝子は, がん抑制遺伝子として *CDKN1A*, *p53DINP1*, *BTG2*, *TGFBR1* 等を含んでいた. *CDKN1A* はサイクリンキナーゼ抑制因子 (Cyclin kinase inhibitor) である p21 蛋白をコードする遺伝子である. その翻訳蛋白 p21 は p53 依存的

あるいは非依存的に CDK4/6 をリン酸化して細胞周期調節に関わり、主に G1-S 期を調整する。miR-17-92 が導入された SUDHL4 細胞株では p53 非依存性に p21 の発現が抑制された。この miR-17-92 導入細胞株では CDK4/6 の発現が上昇し、G1-S 期が増大し、細胞増殖能が亢進を来すことを明らかにした。さらに miR-17-92 が過剰発現している前述の Jeko-1 細胞株にたいしてアンチセンスオリゴ (antisense oligo nucleotide) を用いて miR-17-5p と miR-20a の発現を抑制すると p21 の発現の上昇、さらには CDK6 の発現の低下がみられ、G1 arrest が誘導された。しかし、miR-19 の発現を抑制しても p21 の発現量の変化は生じなかった。以上により B リンパ腫での miR-17-92 の標的は *CDKN1A/p21* であることが強く示唆された¹⁵⁾ (図 3B)。強い抗アポトーシスを有する腫瘍では、miR-17 ファミリーが細胞周期回転の亢進という付加的な機能を増強せしめることで、よりアグレッシブな病態になることが考えられた。

c-Myc 陽性の B 細胞リンパ腫では、miR-17-92 は *CDKN1A/p21* とは異なる標的を持つことも明らかにされた。E μ -Myc マウスでは、miR-17-92 を強制発現させると miR-19 ファミリーが、がん抑制遺伝子である *Pten* の発現量を下げて Akt-mTOR 経路を活性化し、がん細胞はアポトーシス抵抗性になることが He と Ventura のグループにより示された^{16,17)}。miR-17-92 はリンパ腫のサブタイプの違いにより異なる標的を持つことが示唆された。

4. NK 細胞腫瘍の遺伝子異常

NK 細胞リンパ腫・白血病は、WHO 分類によれば natural killer cell (NK: sCD3-CD56+TCR-) 由来の腫瘍である。EB ウィルス (EBV) 感染が腫瘍発症に重要な働きを持つことが考えられるが、詳細な腫瘍化メカニズムは不明である。アジア、メキシコ、南アメリカで好発し、アグレッシブな臨床病態を呈し、難治性の疾患である¹⁸⁾。その発症には EBV の感染が重要で、ほぼ全例で陽性であり、詳細な機能は明らかでないが NK 細胞腫瘍の発症に濃厚に関与しているであろう。「NK 細胞腫瘍」には NK/T-cell lymphoma, extranodal nasal type と aggressive NK-cell leukemia の 2 つの亜型があるが、これらは共通の本質的遺伝子異常をもつと推測される。DeVIC+ 放射線療法が従来の CHOP を中心とする化学療法などと比較して予後の改

善が見られるが、依然として難治性疾患である。疾患特異的遺伝子異常があると考えられて来ており、その探索の為に、比較ゲノム (Comparative genomic hybridization: CGH) 解析、FISH 解析などが行われてきたが 10-20% の症例で第 6 染色体長腕 (6q) の欠損がみられるという点を除いて、疾患特徴的なゲノム異常は見出されていない¹⁹⁾。6q 欠損の標的遺伝子として *PRDM1* と *AIM1* の点突然変異とメチル化が最近報告されている²⁰⁾。*PRDM1* は Blimp1 に翻訳され、B 細胞から形質細胞分化へ必須の蛋白であるが、その遺伝子は少数の細胞株と臨床検体で「nonsense mutation」が生じていて、6q 欠損と相まって *PRDM1* の発現が失活することにより、がん抑制遺伝子として機能する。*PRDM1* 欠損は DLBCL 報告されている。

我々は、miRNA の発現異常が多くの腫瘍で生じていることや、特徴的な転座異常・遺伝子異常が長らく不明であったという点から NK 細胞腫瘍を対象に miRNA の発現解析を行った。以下、我々は単一の疾患単位で遺伝子異常の明らかでなかった NK 細胞リンパ腫・白血病に対する miRNA 発現異常を同定したので紹介したい。

5. NK 細胞腫瘍での miRNA 発現異常と機能解析

miRNA の発現異常は、リンパ性腫瘍から次々と報告されている。しかし、それはほとんど B 細胞リンパ腫が主体であって T 細胞や NK/T 細胞由来のリンパ腫での報告ではない。NK 細胞腫瘍は単一疾患であるにもかかわらず、疾患特徴的な遺伝子異常が報告されていない。従って miRNA の何らかの異常が存在する可能性が考えられる為、miRNA の発現異常の有無を検討した。NK 細胞リンパ腫細胞株と正常対応細胞を使って、ノーザンプロット解析によるスクリーニングを行い、いくつかの過剰発現 miRNA 候補と発現低下を示す miRNA を見出した。miRNA は 20-24nt の短い RNA でありパラフィン標本から抽出した検体を用いてもデグラデーションせず遺伝子定量解析が可能である。我々はパラフィン切片から CD56 陽性領域をマイクロダイゼクションし、検体の腫瘍部分から RNA を抽出した。約 800 miRNA に対して、ノーザンプロット、定量 PCR、miRNA アレイを併用して網羅的に発現解析を行った。これらの解析により正常の NK 細胞の発現と比較すると患者検体、細胞株ともに miR-21 と miR-155 は著しく発現亢進していること、

(12)

microRNA 発現異常と悪性リンパ腫

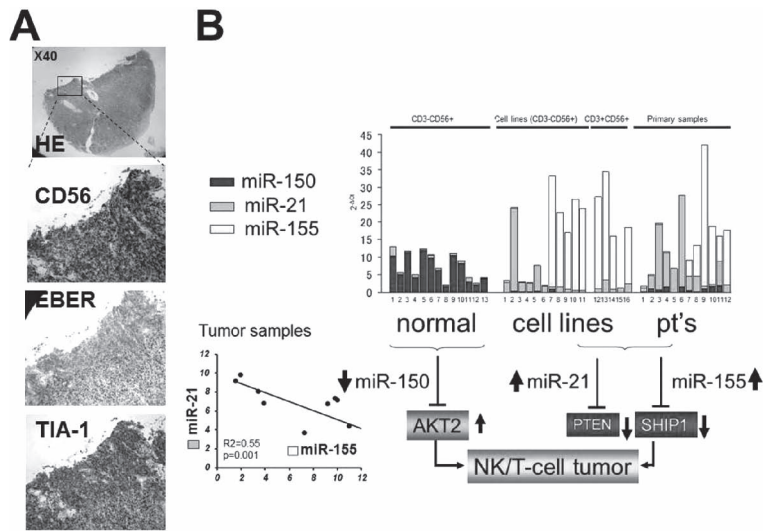


図4. NK/T cell lymphoma における miRNA 発現異常。
 A. CD56+ 領域をマイクロダイゼクション (micro-dissection) し、RNA 抽出を行い解析を行った。
 B. miR-21 と miR-155 の過剰発現と miR-150 の発現低下。Taqman 法による患者検体を含めた定量解析である。norm: 正常NK細胞。cell lines: NK腫瘍細胞株。Pt's sample: NK/T-cell lymphoma/leukemia 患者検体。miR-21 と miR-155 の発現は排他的相関関係を示した (B 左下)。

miR-150 が正常検体と比較して発現低下していることを見出した (後述)。細胞株と臨床検体の解析では、miR-21 と miR-155 の発現パターンはどちらも排他的相関関係 (mutually exclusive) を示した (図4)。

なぜ、miR-21 と miR-155 が発現亢進しているのか? 網羅的ゲノムコピー数解析が幾つか報告されているが、これらの miRNA の位置する染色体のゲノム増幅は報告されていないため、ゲノムコピー数増幅による可能性は極めて少ない。EBV 感染は発現亢進の可能性のひとつとして挙げられる。その根拠は B リンパ球で EBV 感染により不死化した細胞では miR-21 と miR-155 が増幅することが報告されている²¹⁾。

代表的な OncomiR である miR-21 と miR-155 が過剰発現していたことから、NK 細胞リンパ腫細胞株を用いて miRNA のノックダウンと遺伝子導入による機能解析を行った。NKL 細胞株は miR-21 が高発現しているためアンチセンスによる miR-21 ノックダウンアッセイを行った。その結果 PTEN と PDCD4 という2つのがん抑制蛋白の発現レベルが上昇することが確認された。逆に miR-21 を MOTN1 に導入するとこれらのがん抑制蛋白の発現は低下した (図5AB)。次に miR-155 の標的の探索を行った。miR-155 は「イノシトールリン脂質の脱リン酸化酵素」をコードする

SHIP1 遺伝子の 3'UTR に、種間で保存された seed 配列をもつことが予測されている³⁾。つまり miR-155 が *SHIP1* を標的とし、発現量を制御している可能性を示唆する²²⁾。PTEN と *SHIP1* 脱リン酸化酵素はそれぞれイノシトールリン脂質である PIP3 を PIP2 に、また PIP4 を PIP3 にそれぞれ脱リン酸化する酵素であるので、これらの酵素の発現低下により、リン酸化 AKT^{ser473} (pAKT) の発現量は上昇する。我々は SNK6 と MOTN1 細胞株で miR-155 の発現をノックダウンしたところ PTEN の発現量の変化なしに *SHIP1* の発現が上昇し、pAKT の発現量が低下した (図5CD)。miR-155 は実際、3'UTR に結合することにより *SHIP1* の発現を抑えるかという可能性を検証するため、ルシフェラーゼアッセイを行い、詳細は省くが、miR-155 が、*SHIP1* の 3'UTR に結合しうることが示された^{23,24)}。NK 細胞腫瘍では miRNA の発現異常によりがん抑制的蛋白である2つの脱リン酸化酵素の発現量の低下を通じて AKT の活性化を来すことが強く示唆された²⁴⁾。

前述したように NK リンパ腫で、miR-150 の発現が正常対応細胞と比較して、著しく発現が低下していることを見出した (図6AB)。miR-150 を、レンチウイルスベクターを用いて NK/T 細胞リンパ腫細胞株に導

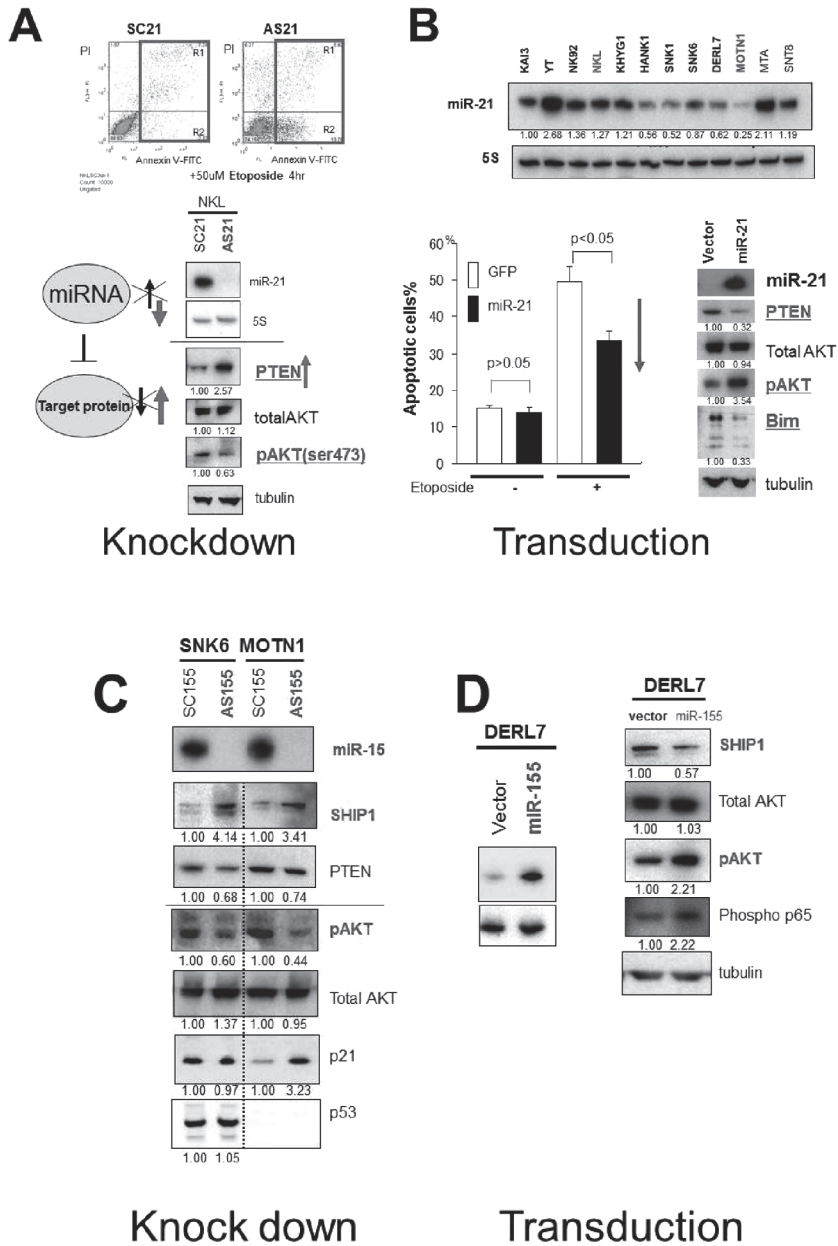


図5. miR-21 と 155 の標的蛋白の解析.

A. miR-21 のアンチセンスアッセイ. 上は FACS 解析. miR-21 ノックダウンでアポトーシス細胞が増えている. A 下: アポトーシスが誘導され, PTEN の発現量の上昇と pAKT の発現低下がみられる. SC: scramble (control), AS: antisense.

B. miR-21 導入. 右図は PTEN の発現低下と pAKT の発現量の上昇がみられる.

C. miR-155 のアンチセンス導入 (AS). SHIP1 は miR-155 アンチセンスの導入により発現量が上昇する. pAKT の発現量は低下する.

D. miR-155 導入: 遺伝子導入による miR-155 強制発現. SHIP1 の発現量低下と pAKT の発現量増加が見られる (文献 27 より一部引用).

(14)

microRNA 発現異常と悪性リンパ腫

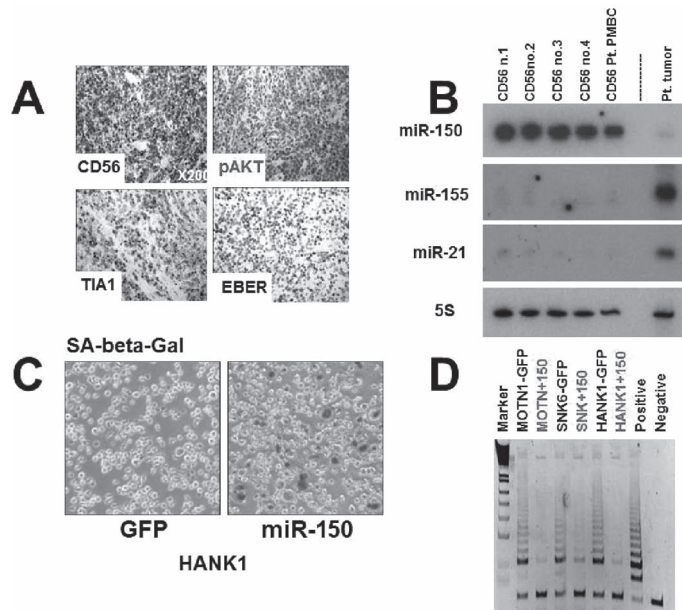


図 6. miR-150 の機能解析.

A. NK/T cell lymphoma, extra nodal nasal type の免疫染色.

B. miR-150 ノーザンプロット. 患者検体で miR-150 の発現低下, miR-155, 21 の発現上昇がみられる.

C. miR-150 導入によるセネッセンス誘導. GFP: control vector.

D. TRAP アッセイ (テロメラーゼ活性を測定する PCR). miR-150 導入によるテロメラーゼ活性の低下 (投稿中文献 28 より一部引用).

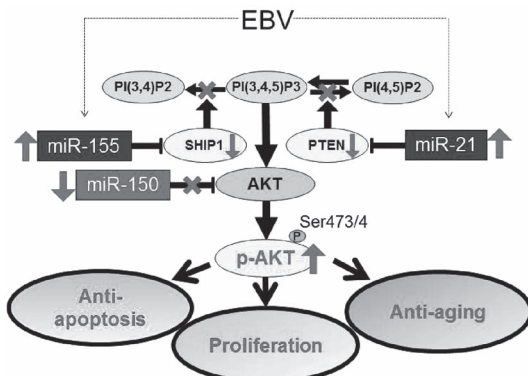


図 7. NK/T リンパ腫での miRNA 発現異常と AKT 活性化の模式図.

入すると, 導入された細胞株では, 図に示すように beta-gal で濃染される細胞が多数出現した, これは細胞老化を示すいわゆる目玉焼き細胞 (fried egg appearance) 様の細胞で, セネッセンスが誘導されたことを

意味する (図 6CD). miR-150 が導入された細胞株でのテロメラーゼ活性は著しく低下していた. 従って miR-150 は細胞老化に関与し, その発現低下は不死化に寄与すると考えられる²⁵⁾.

以上により, miR-21, miR-155, miR-150 の発現異常が, おもに AKT 経路の異常を介して細胞周期, アポトーシス, 細胞老化など様々な下流の遺伝子・蛋白の活性化あるいは非活性化を来し腫瘍化に関与すると考えられる (図 7). 最近, NK 細胞腫瘍の網羅的遺伝子発現解析の報告がなされた. Extra nodal NK/T-cell lymphoma, nasal type の網羅的遺伝子発現解析の報告がなされ PI3K-AKT 経路の活性化が生じることが報告されている²⁶⁾. この知見は, 我々の結果と矛盾しない.

おわりに

以上, miRNA の発現異常とリンパ腫の関わりについて概説した. miRNA の知識はがんの病態を理解す

るためには必須であると考えられる。実際、miRNAは最も重要な研究テーマの一つとして実際世界中の研究施設で精力的に研究されている。miRNA発現の診断への応用、miRNAそのものの治療薬への応用、新たな分子標的としてmiRNA研究が、がん診断治療へのブレイクスルーとなることが大いに期待される。

謝 辞

本研究は、秋田大学大学院医学系研究科 腫瘍制御内科 血液・腎臓・膠原病内科教室において行われた。当教室の澤田賢一教授を初めとする教室の諸先生方には貴重なアドバイスをいただきました。この場を借りて心から感謝いたします。

文 献

- 1) Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
- 2) Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- 3) Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., *et al.* (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, **115**, 787-798.
- 4) Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., *et al.* (2005) Combinational microRNA target predictions. *Nat. Genet.*, **37**, 495-500.
- 5) Migliazza, A., Bosch, F., Komatsu, H., *et al.* (2001) Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **97**, 2098-2104.
- 6) Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., *et al.* (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15524-15529.
- 7) Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., *et al.* (2004) High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **39**, 167-169.
- 8) Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., *et al.* (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2999-3004.
- 9) Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., *et al.* (2004) Identification and characterization of a novel gene, *C13orf25*, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.*, **64**, 3087-3095.
- 10) He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., *et al.* (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, **435**, 828-833.
- 11) Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., *et al.* (2008) Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17~92 family of miRNA clusters. *Cell*, **132**, 875-886.
- 12) Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., *et al.* (2008) Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with elevated miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat. Immunol.*, **9**, 405-414.
- 13) Tagawa, H. and Seto, M. (2005) A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia*, **19**, 2013-2016.
- 14) Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., *et al.* (2005) Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene *BIM*. *Oncogene*, **24**, 1348-1358.
- 15) Inomata, M., Tagawa, H., Guo, Y-M., *et al.* (2009) MicroRNA-17-92 downregulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood*, **113**, 396-402.
- 16) Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., *et al.* (2009) miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.*, **23**, 2839-2849.
- 17) Mu, P., Han, Y.C., Betel, D., Yao, E., Squatrito, M., Ogdowski, P., de Stanchina, E., D'Andrea, A., Sander, C. and Ventura, A. (2009) Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev.*, **23**, 2806-2811.
- 18) Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Campo, E., Pileri, S.A. and Swerdlow, S.H. (2008) Introduction and over review of the classification of the lymphoid neoplasms. In Swerdlow, A.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Thiele, J. and Vardiman, J.W.(eds.) World health classification of tumors.

Pathology & Genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Washington : IARC press, Lyon, pp. 158-178.

- 19) Nakashima, Y., Tagawa, H., Suzuki, R., *et al.* (2005) Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of natural killer cell lymphoma/leukemia : different genomic alteration patterns of aggressive NK-cell leukemia and extranodal NK/T lymphoma, nasal type. *Genes Chromosomes Cancer*, **19**, 247-255.
- 20) Iqbal, J., Kucuk, C., Deleeuw, R.J., *et al.* (2009) Genomic analyses reveal global functional alterations that promote tumor growth and novel tumor suppressor genes in natural killer-cell malignancies. *Leukemia*, **23**, 1139-1151.
- 21) Mrazek, J., Kreutmayer, S.B., Grasser, F.A., *et al.* (2007) Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e73.
- 22) O'Connell, R.M., Chaudhuri, A.A., Rao, D.S. and Baltimore, D. (2009) Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 7113-7118.
- 23) Yamanaka, Y., Tagawa, H., Takahashi, N., *et al.* (2009) Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood*, **114**, 3265-3275.
- 24) Watanabe, A., Tagawa, H., Yamashita, J., *et al.* The role of miR-150 as tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia* 2011 in press.
- 25) Coppo, P., Gouilleux-Gruart, V., Huang, Y., *et al.* (2009) STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Leukemia*, **23**, 1667-1678.
- 26) Huang, Y., de Reyniès, A., de Leval, L., *et al.* (2010) Gene expression profiling identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood*, **115**, 1226-1237.