

201010012B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

高速シーケンサーを用いた non-coding RNA まで包括された
トランスクリプトーム解析による新規安全性バイオマーカーの同定

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 土屋 創健

平成23（2011）年4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

高速シーケンサーを用いた non-coding RNA まで包括された
トランスクリプトーム解析による新規安全性バイオマーカーの同定

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 土屋 創健

平成23（2011）年4月

目 次

I. 総合研究報告

高速シーケンサーを用いた non-coding RNA まで包括されたトランスクリプトーム解析による新規安全性バイオマーカーの同定	-----	1
土屋 創健		

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11
--------------------	-------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷り	-----	14
-------------------	-------	----

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

高速シーケンサーを用いた non-coding RNA まで包括された
トランスクリプトーム解析による新規安全性バイオマーカーの同定

研究代表者 土屋 創健 京都大学大学院薬学研究科助教

研究要旨

近年、生理作用や病態発現に重要な役割を果たす機能性 non-coding RNA の存在が明らかとなり、non-coding RNA に着目した新たな生命科学研究に注目が集まっているが、現在までに non-coding RNA に着目したトキシコゲノミクスの研究報告は皆無である。そこで、ギガシーケンサーを用いて、non-coding RNA まで包括されたデジタルトランスクリプトーム解析を世界に先駆けてトキシコゲノミクスに適用し、薬物毒性予測における non-coding RNA の有用性を評価するとともに、薬物肝毒性に関わる新規安全性バイオマーカー、しいては肝細胞の細胞障害・細胞死を抑制するための治療標的分子候補の同定を試みた。

薬物肝毒性のモデルとしてトログリタゾンによる *in vitro* 細胞生存評価実験系を構築するとともに、non-coding RNA まで包括されたデジタルトランスクリプトームデータの取得法及び解析法を構築した。これらを適用して解析を行った結果、トログリタゾンの毒性容量において発現変動する転写物の半分以上は non-coding RNA に由来することを見いだした。さらに、バイオインフォマティクス解析からとりわけ肝毒性への関与が強く示唆された non-coding RNA である RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease (*RMRP*) の siRNA を用いたノックダウン実験を行ったところ、トログリタゾンによる薬物肝毒性の結果と合致して、*RMRP* siRNA の導入により細胞増殖の有意な低下が確認されたことから、*RMRP* は薬物肝毒性に関わる新規安全性バイオマーカー候補であるとともに肝細胞の細胞障害・細胞死を抑制するための治療標的分子候補であることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、transfer RNA や ribosomal RNA 以外のタンパク質をコードしない RNA、non-coding RNA が messenger RNA (mRNA) と同等数の 2 万種類以上転写されていることが明らかとなり、とりわけ、短鎖の non-coding RNA、microRNA が生理作用や病態発現に重要な役割を果たすことが見いだされ、non-coding RNA に着目した新たな生命科学研究が注目・展開されている。しかしながら、現在までに non-coding RNA に着目したトキシコゲノミクスの研究報告は皆無である。そこで本課題では、次世代型高速シーケンサーであるギガシーケンサーを用いて non-coding RNA まで包括したデジタルトランスクリプトーム解析を世界に先駆けて行い、薬物毒性予測における non-coding RNA の有用性を評価するとともに、薬物肝毒性に関わる新規安全性バイオマーカー、しいては肝細胞の細胞障害・細胞死を抑制するための治療標的分子候補の同定することを目的とする。

B. 研究方法

細胞培養：非動化 (56°C、30分) された 10% (v/v) fetal bovine serum 含有の Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma) を用い、コラーゲンコートディッシュにて 37°C、5% CO₂

の条件で HepG2 細胞を培養した。

WST-1 細胞増殖測定：WST-1 を基質とした Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 還元酵素の活性を指標に、細胞増殖を測定した。HepG2 細胞をトログリタゾン (vehicle (0.1% dimethylsulfoxide; DMSO), 1µM, 3µM, 100µM) で刺激し、各 0, 6, 12, 24 時間後に回収した。1x10⁴ cells の HepG2 細胞に飽和 WST-1 溶液 (Roche) を加え、37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間反応させた後、還元型 WST-1 (Formazan) の 460nm とバックグラウンド補正用の 650nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。ギガシーケンズデータの取得：各濃度のトログリタゾン (vehicle, 1, 100µM) で刺激した HepG2 細胞をそれぞれ 0, 6, 24 時間後に回収し、acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform 法を用いて、total RNA を抽出した。次に Ribominus (Invitrogen) を用いて ribosomal RNA の anti-sense プロブにより ribosomal RNA の除去を行い、アルコール沈殿による精製後、アルカリ加水分解法により RNA を断片化した。それらを Rneasy micro kit (Qiagen) を用いて精製し、RNA アダプターを 5' 側と 3' 側にそれぞれ特異的に連結させた。3' 側のアダプター内の配列に相補的なプライマーをアニールさせて逆転写反応により 1st

strand DNA を合成し、引き続いてアダプター部位の配列を標的とするプライマー配列を用いてPCR増幅を行って、ギガシーケンサーによる解析を行うために必要な平均鎖長約 200 bp の 2 本鎖 DNA を調製した。そこでギガシーケンサーを用いて、PCR 反応により *in situ* で個々の増幅産物に特異的なクラスターを形成させ、蛍光標識塩基を用いた 1 塩基伸長反応を用いることにより、76 塩基の配列を約 2,000 万種同時に解読した。その中から、transfer RNA や ribosomal RNA にアライメントされるものを除去し、さらにヒトゲノムにアライメントされたもののみを更なる解析に使用した。

網羅的な遺伝子発現解析：NCBI の UniGene や Ensembl, ncRNA. org にアライメントされたリードに関して、R を用いて階層的クラスタリング解析、相関係数の計算、principal component analysis を行った。

薬物肝毒性における RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease (*RMRP*) のノックダウン解析：*RMRP* の siRNA (Ambion) を HepG2 細胞に導入し、トログリタゾンの薬物細胞毒性における *RMRP* の機能・役割を調べた。遺伝子導入から 48 時間後に *RMRP* のノックダウンによる細胞増殖への影響を調べるため、WST-1 法を用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

本課題の包括的デジタルトランスクリプトーム解析は商業的に販売されているヒト培養細胞を対象としていることから、倫理面での問題は特にないものと判断される。また、本課題を遂行するにあたり、組換え DNA 実験を行うが、文部科学省並びに京都大学大学院薬学研究科施設の取り扱い規定に準拠し、組換え DNA 実験安全委員会の承認を得るとともに、研究機関等における組換え DNA 実験等の実施に関する基本指針に従う。

C. 研究結果

本研究プロジェクトでは non-coding RNA をトキシコゲノミクス解析に適用し、その有用性を評価するとともに新たな肝薬物毒性の安全性バイオマーカーを同定し、さらには薬物毒性の分子メカニズムを明らかにすることを主眼とする。そこで、薬物毒性を評価する上で最も重要な組織の一つである肝臓における薬物毒性発現の分子メカニズムを明らかにするとともに、non-coding RNA を包括したデジタルトランスクリプトームデータ解析の意義・有用性を評価するため、これまでに肝毒性を有する薬物として劇症肝炎などの肝障害を引き起こしたため臨床での使用が中止さ

れたトログリタゾン（チアゾリジン骨格を有するインスリン抵抗性改善薬、peroxisome-proliferator activated receptor γ のリガンド）と、*in vitro*での肝毒性評価系として広範囲の薬物において高頻度で使用されているヒト肝癌由来細胞株HepG2を用いて解析を行った。まず、肝細胞毒性の分子メカニズムを解明し、新規安全性バイオマーカーを同定するために最適な薬物処理時間・用量をWST-1法による細胞生存活性を指標に探索した。vehicle (0.1% DMSO)と比較してトログリタゾン 100 μM 刺激後12時間と24時間において有意な増殖の抑制が検出された。一方、EC50をこえるトログリタゾン1 μM で刺激してもvehicleと有意な差は検出されなかった。以上のことから、HepG2細胞に対するトログリタゾンの毒性用量としては100 μM 、薬効(非毒性)用量としては1 μM と定義した。

次に、従来までの既存のギガシーケンサーを用いた手法ではnon-coding RNAが解析できず、転写された方向がわからない（正確なマッピングができない）という問題があったことから、これらの問題を克服する手法の確立を行った。まずtotal RNAからtRNAやrRNAを除去する方法に関して、mRNAのみの解析に限定されるoligo-dTカラムを用いたpoly A-RNA

精製法を採用せず、新たにtRNAやrRNAに対するanti-sense probeを用いた除去法を構築・採用することにより、non-coding RNAとmRNAの両方が同時に解析可能となった。次に従来法では、まずRNAから2本鎖DNAを構築し、それから断片化を行って両末端にアダプターを付加していたため、転写方向性情報が失われていた。そこで、転写方向性を有するRNAの段階で、断片化を行い、5'側と3'側にそれぞれ特異的RNAアダプター連結させ、その後2本鎖DNAを作製する方法を新たに構築した。これらの結果から、non-coding RNAを包括し、転写方向性情報を有することで読まれたリードが正確にゲノムにアライメント出来る手法を確立した。そこで、上述の薬物肝毒性モデルにおける経時的(0、6、24 h)かつ用量依存的(vehicle、1、100 μM)なnon-coding RNA包括トランスクリプトームデータを取得した。

ヒトゲノムへのアライメント解析を行ったところ、ゲノムにアライメントされたリードの内、7割がUniGeneにヒットし、残りの3割は未同定の新規転写産物に由来することが示唆された。UniGeneにヒットしたリードの内、その8割以上がRefseq配列の転写開始からの終了までの領域のゲノムにアライメントされ、そのうちエクソン領域にアライメントされたのは

さらにその8割だった。従って、最終的にゲノムにアライメントされたリードの内45%が従来までのマイクロアレイを用いたトキシコゲノミクスの解析対象であった mRNA に由来し、残りの55%のリードは non-coding RNA に由来する可能性が示唆された。アライメントされる76塩基の配列情報を持つリードの割合はいずれのサンプルにおいても差がなかった。そこで uniGene のカテゴリーにおいて vehicle に対して毒性 (100 μ M) もしくは薬効 dose (1 μ M) で2倍以上発現変化した UniGene の数を調べるとそれぞれ 4,755、365 種類あり、そのうち mRNA に附属する UniGene はそれぞれ 2,311、99 種であった。従って、発現変動した UniGene の半分以上が non-coding RNA に由来している可能性が示唆された。

この UniGene のカテゴリーにおいて、non-coding RNA 包括トランスクリプトーム解析の再現性評価も含めたさらなる検討を行った。まず階層的クラスタリング解析を行った結果、non-coding RNA 包括トランスクリプトームデータは毒性と非毒性のデータを明確に分類した。また、再現性における相関係数はいずれのサンプルにおいても 0.99 であり、本法は高い再現性を有することが示唆された。そこで、これらの principal component

analysis を行ったところ、第二軸において毒性のサンプル群と非毒性のサンプル群のベクトルが分離され、この第二軸コンポーネントとトログリタゾンによる薬物毒性との強い相関が示唆された。この第二軸コンポーネントに強い影響力を有する UniGene は12個で、そのうち6つが mRNA に附属し、残りの6つは non-coding RNA であると考えられた。

加えて、より統合・整理されたデータベースである Ensembl の転写データ (ヒトにおいて mRNA と non-coding RNA の両方の情報を含有、36,692 転写物分) を用いて同様の解析を試みた。principal component analysis を行ったところ、先ほどと同様に第二軸において毒性のサンプル群と非毒性のサンプル群のベクトルが分離され、この第二軸コンポーネントとトログリタゾンによる薬物毒性との強い相関が示唆された。この第二軸コンポーネントに強い影響力を有する転写物は6個であり、そのうち4つが non-coding RNA であった。

これらの principal component analysis より薬物肝毒性への強い寄与が示唆された non-coding RNA の中から、リボソーム集合やテロメア機能、そしてアポトーシスや細胞周期の制御に関与することが報告されている RNA component of mitochondrial RNA

processing endoribonuclease (*RMRP*) に着目して機能解析を行った。*RMRP* の siRNA を用いて *RMRP* のノックダウンを行い、その際の細胞生存活性・増殖への影響を調べたところ、*RMRP* のノックダウンにより細胞生存活性・増殖の有意な低下が確認され、これはトログリタゾンによる薬物肝毒性の際に観察された結果と合致していた。

D. 考察

近年、数万種に及ぶ non-coding RNA の存在が見いだされたことから、これをトキシコゲノミクスに適用することでより高精度な毒性予測及び毒性発現分子メカニズムの解明が可能となることが予測されたが、現在までにトキシコゲノミクス分野における non-coding RNA の適用事例は皆無であった。そこで、本研究では、トログリタゾンで刺激した HepG2 細胞を肝毒性のモデルとして non-coding RNA 包括トランスクリプトーム解析を行った結果、mRNA と non-coding RNA の発現情報をデジタル情報として同時に取得できることにより、マイクロアレイを用いた解析では困難であった未同定の RNA の検出と各 RNA 内・間に渡る高精度なバイオインフォマティクス解析が可能となり、薬物毒性刺激により mRNA と同等数以上の non-coding RNA の発現量に変動していることを初

めて明らかにした。さらに non-coding RNA 包括トランスクリプトームデータは UniGene と Ensembl のいずれにアライメントした際にも principal component analysis により第二軸コンポーネントにおいて薬物肝毒性と非毒性のサンプルを明確に分類し、合わせて 10 種の non-coding RNA と 8 種の mRNA がトログリタゾンによる薬物毒性に強く関与している可能性と薬物毒性予測における non-coding RNA の有用性を強く示唆した。この選出されてきた mRNA には肝障害のマーカーとして報告されている遺伝子や、細胞外マトリックス成分で肝細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている遺伝子、さらには脂質代謝に関わる遺伝子などが含まれていた。一方、同様の手法により選出された 10 種の non-coding RNA のうち、*RMRP* のノックダウンによってトログリタゾンによる薬物肝毒性の結果が再現されたことから、non-coding RNA がトログリタゾンによる薬物毒性に実際に関与していることが明らかとなった。今後、*RMRP* は薬物肝毒性に関わる新規安全性バイオマーカーとして、そして肝細胞の細胞障害・細胞死を抑制するための治療標的分子として更に研究・開発が発展することが期待される。

non-coding RNA という新たな領域

にトキシコゲノミクス解析を適用することによって得られた本研究成果は、まさに世界に先駆けるものであり、今後、他の肝毒性を有する薬物や、薬品の種類を問わず発現し、現れる臨床症状も多様である腎毒性、薬物の毒性評価を進める上で最も予測し難い要因であるアレルギー毒性への本解析手法の適用によってさらなる薬物毒性メカニズムの解明や高精度な毒性予測手法の確立が可能になるものと期待される。

E. 結論

トログリタゾンを用いた肝毒性モデルにおいて、non-coding RNA が高感度・高精度な薬物毒性予測において有用であり、薬物肝毒性に強く関与していることが示唆された。とりわけ *RMRP* は薬物肝毒性に関わる新規安全性バイオマーカーの有力な候補であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuchiya S., Tachida Y., Segi-Nishida E., Okuno Y., Tamba S., Tsujimoto G., Tanaka S. and Sugimoto Y. Characterization of gene expression profiles for different types of mast cells pooled from mouse stomach subregions by an RNA amplification method.

BMC Genomics 10, 35, 2009.

2. Takano H., Nakazawa S., Shirata N., Tamba S., Furuta K., Tsuchiya S., Morimoto K., Itano N., Irie A., Ichikawa A., Kimata K., Nakayama K., Sugimoto Y. and Tanaka S. Involvement of CD44 in mast cell proliferation during terminal differentiation. *Lab. Invest.* 89, 446-455, 2009.

3. Tsuchiya S., Oku M., Imanaka Y., Kunimoto R., Okuno Y., Terasawa K., Sato F., Tsujimoto G. and Shimizu K. MicroRNA-338-3p and microRNA-451 contribute to the formation of basolateral polarity in epithelial cells. *Nucleic Acids Res.* 37, 3821-3827, 2009.

4. Sato F., Tsuchiya S., Terasawa K. and Tsujimoto G. Intra-platform Repeatability and Inter-platform Comparability of MicroRNA Microarray Technology. *PLoS One* 4, e5540, 2009.

5. Tsuchiya S., Fujiwara T., Sato F., Shimada Y., Tanaka E., Sakai Y., Shimizu K. and Tsujimoto G. MicroRNA-210 Regulates Cancer Cell Proliferation through Targeting

- Fibroblast Growth Factor Receptor-Like 1 (*FGFRL1*). *J. Biol. Chem.* 286, 420-428, 2011.
6. Imanaka Y., Tsuchiya S., Sato F., Shimada Y., Shimizu K., Tsujimoto G. MicroRNA-141 Confers Resistance to Cisplatin-induced Apoptosis by Targeting YAP1 in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J. Hum. Genet.* 56, 270-276, 2011.
 7. Sato F., Hatano E., Kitamura K., Myomoto A., Fujiwara T., Takizawa S., Tsuchiya S., Tsujimoto G., Uemoto S., Shimizu K. MicroRNA Profile Predicts Recurrence After Resection in Patients with Hepatocellular Carcinoma within the Milan Criteria. *PLoS One* 6, e16435, 2011.
 8. Sato F., Tsuchiya S., Meltzer S. and Shimizu K. MicroRNAs and Epigenetics. *FEBS J.* 278, 1598-1609, 2011.
2. 学会発表
1. Tsuchiya S., Oku M., Imanaka Y., Okuno Y., Terasawa K., Sato F., Shimizu K., Tsujimoto G. Micro-338 and micro-451 regulate localization of beta1 integrin into basolateral membrane. *Biochemistry and Molecular Biology* (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会), Kobe, Japan. Dec. 2008.
 2. Sato F., Tsuchiya S., Terasawa K., Tsujimoto G., Shimizu K. Reproducibility and Quantitative of microRNA microarray. *Biochemistry and Molecular Biology* (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会), Kobe, Japan. Dec. 2008.
 3. 佐藤史顕、土屋創健、嶋田裕、清水一治 : Polo-like Kinase 1 の食道癌細胞増殖能に於ける役割とmicroRNA-593*による転写後制御
第67回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2008年10月
 4. Tsujimoto G., Okuno Y., Terasawa K., Tsuchiya S. Comprehensive analysis of microRNA target networks. *The Uehara Memorial Foundation Symposium-2008*, Hyatt Regency

Tokyo Japan, June 30-July 2,
2008.

5. 土屋創健、佐藤史顕、藤原大、
嶋田裕、辻本豪三、清水一治：
microRNA-210の発現低下による
細胞周期停止機能の破綻を
介した食道扁平上皮癌細胞の
細胞増殖促進メカニズムの解
明
第54回日本人類遺伝学会大会
(東京) 2009年9月
6. 土屋創健、佐藤史顕、藤原大、
嶋田裕、辻本豪三、清水一治：
食道扁平上皮癌における
microRNA-210の発現低下と
それによる細胞周期停止解除
を介した細胞増殖亢進機構の
解明
第82回日本生化学会大会 (神
戸) 2009年10月
7. 今中由花子、土屋創健、佐藤史
顕、嶋田裕、清水一治、辻本豪
三：miR-X Contributes to
Cisplatin Resistance of
Esophageal Cancer cells.
第32回日本分子生物学会年会
(横浜) 2009年12月
8. 瀬木(西田) 恵里、坂井田真理、
土屋創健、杉本幸彦、奥野恭
史：マウス視床下部・室傍核に

おける電気けいれん療法モデ
ルを用いた網羅的遺伝子発現
解析

Neuro2010 (第33回日本神経科
学大会・第53回日本神経科学会
大会・第20回日本神経回路学会
大会合同大会) (神戸) 2010年9
月

9. Fumiaki Sato, Etsuro Hatano, Koji
Kitamura, Akira Myomoto,
Takeshi Fujiwara, Satoko
Takizawa, Soken Tsuchiya, Gozoh
Tsujiimoto, Shinji Uemoto,
Kazuharu Shimizu: MicroRNA
Profile Predicts Recurrence After
Resection in Patients with
Hepatocellular Carcinoma within
the Milan Criteria (マイクロ RNA
発現解析によるミラノ基準内肝
細胞がんの再発の予測)
第69回日本癌学会学術総会
(大阪) 2010年9月

10. Tsuchiya S., Fujiwara T., Sato F.,
Tsujiimoto G., Shimizu K.
miR-210 regulates cancer cell
proliferation through targeting
FGFRL1.
Biochemistry and Molecular
Biology (第33回日本分子生物学
学会年会・第83回日本生化学会大
会合同大会), Kobe, Japan. Dec.
2010.

11. Fujiwara T., Tsuchiya S., Sato F., Shimada Y., Tsujimoto G., Shimizu K. Bioinformatic identification of tissue specific microRNA targets by mRNA expression profiles. *Biochemistry and Molecular Biology* (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会), Kobe, Japan. Dec. 2010.

12. 土屋創健、佐藤史顕、嶋田裕、辻本豪三、清水一治：miR-210による新規標的遺伝子*RAB26*の翻訳阻害は食道扁平上皮癌の細胞増殖を抑制する
日本薬学会第131年会（静岡）
2011年3月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Tsuchiya S. , Okuno Y. and Tsujimoto G.	MicroRNAs and discovery of new targets.	Innocent i F.	<i>Genomics and Pharmacogenomics in Anticancer Drug Development and Clinical Response.</i>	Humana Press	Totowa, NJ, USA	2008	47-56
土屋創健 , 清水一治, 辻本豪三	高感度マイクロアレイ	油谷浩 幸	DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用の実際-基礎・最新技術、臨床・創薬応用への実際から今後の展開・問題点まで-	メディカル ドゥ	東京、 日本	2008	182-186
Tsuchiya S. , Terasawa K., Kunimoto R., Okuno Y., Sato F., Shimizu K. and Tsujimoto G.	Biogenesis and Function Mechanisms of Micro-RNAs and Their Role as Oncogenes and Tumor Suppressors	Nakanishi S., Kageyama R. and Watanabe D.	<i>Systems Biology - The Challenge of Complexity.</i>	Springer Press	東京、 日本	2009	183-189

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuchiya S. , Tachida Y., Segi-Nishida E., Okuno Y., Tamba S., Tsujimoto G., Tanaka S. and Sugimoto Y.	Characterization of gene expression profiles for different types of mast cells pooled from mouse stomach subregions by an RNA amplification method.	BMC Genomics	10	35	2009
Takano H., Nakazawa S., Shirata N., Tamba S., Furuta K., Tsuchiya S. , Morimoto K., Itano N., Irie A., Ichikawa A., Kimata K., Nakayama K., Sugimoto Y. and Tanaka S.	Involvement of CD44 in mast cell proliferation during terminal differentiation.	Lab. Invest.	89	446-455	2009
Tsuchiya S. , Oku M., Imanaka Y., Kunimoto R., Okuno Y., Terasawa K., Sato F., Tsujimoto G. and Shimizu K.	MicroRNA-338-3p and microRNA-451 contribute to the formation of basolateral polarity in epithelial cells.	Nucleic Acids Res.	37	3821-3827	2009
Sato F., Tsuchiya S. , Terasawa K. and Tsujimoto G.	Intra-platform Repeatability and Inter-platform Comparability of MicroRNA Microarray Technology.	PLoS One	4	e5540	2009

Tsuchiya S. , Fujiwara T., Sato F., Shimada Y., Tanaka E., Sakai Y., Shimizu K. and Tsujimoto G.	MicroRNA-210 Regulates Cancer Cell Proliferation through Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor-Like 1 (<i>FGFRL1</i>).	<i>J. Biol. Chem.</i>	286	420-428	2011
Imanaka Y., Tsuchiya S. , Sato F., Shimada Y., Shimizu K., Tsujimoto G.	MicroRNA-141 Confers Resistance to Cisplatin-induced Apoptosis by Targeting YAP1 in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	<i>J. Hum. Genet.</i>	56	270-276	2011
Sato F., Hatano E., Kitamura K., Myomoto A., Fujiwara T., Takizawa S., Tsuchiya S. , Tsujimoto G., Uemoto S., Shimizu K.	MicroRNA Profile Predicts Recurrence After Resection in Patients with Hepatocellular Carcinoma within the Milan Criteria.	<i>PLoS One</i>	6	e16435	2011
Sato F., Tsuchiya S. , Meltzer S. and Shimizu K.	MicroRNAs and Epigenetics.	<i>FEBS J.</i>	278	1598-1609	2011

4 MicroRNAs and Discovery of New Targets

*Soken Tsuchiya, PharmD,
Yasushi Okuno, PharmD, and
Gozoh Tsujimoto, MD*

CONTENTS

INTRODUCTION
BIOGENESIS OF MIRNAS
THE ROLE OF MIRNAS IN CANCER: DIAGNOSIS
AND DRUG DISCOVERY
PERSPECTIVE
ACKNOWLEDGEMENTS
REFERENCES

SUMMARY

MicroRNAs are endogenous short non-coding RNAs that regulate gene expression mainly at the post-transcriptional level by base pairing to the 3' untranslated region of target messenger RNAs. At present, hundreds of microRNAs have been identified in humans, and some of them have been revealed to play a critical role especially in the initiation, progression, and malignant potential of various cancers. In this chapter, we discuss the role of microRNAs in cancer and its potential application for cancer therapy.

Key Words: MicroRNA; non-coding RNA; translational suppression; cancer; oncogene; tumor suppressor gene; diagnosis; antisense oligonucleotide; drug discovery

From: *Cancer Drug Discovery and Development: Genomics and Pharmacogenomics
in Anticancer Drug Development and Clinical Response*
Edited by: F. Innocenti, DOI: 10.1007/978-1-60327-088-5_4, © Humana Press, Totowa, NJ

1. INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are evolutionarily conserved “non-coding RNA” molecules (~22 nucleotides). miRNAs regulate various physiological pathways such as differentiation, proliferation, and apoptosis by cleavage or translational suppression of target messenger RNAs (mRNAs) (1, 2, 3). Currently, over 400 human miRNAs have been identified and registered in the miRNA database miRBase (4), and they are predicted to regulate 30% of protein-encoding transcripts (5,6). Computational analysis estimates the presence of up to 1,000 miRNAs (7). Recently, miRNAs have been reported to work as oncogenes or tumor suppressor genes and be directly involved in the initiation, progression, and metastasis of various cancers (8,9,10). Therefore, this chapter focuses on the role that miRNAs play in cancer, and the use of miRNAs in drug discovery. Collection of evidence suggests that miRNAs can be potentially useful for understanding tumorigenesis and discovering novel strategies for cancer diagnosis and therapy.

2. BIOGENESIS OF miRNAs

The majority of miRNA genes are located in the introns of protein-coding genes or outside genes (11). Unlike *Drosophila*, most human miRNA genes exist sporadically, although some miRNAs are found as clusters (12,13,14).

miRNAs are generated in multiple steps (Fig. 1). Initially, miRNAs are transcribed by RNA polymerase II as long RNA precursors (pri-miRNAs) (15,16,17). Pri-miRNAs are usually several kilobases in length, and contain a 7-methyl guanosine cap structure and a poly(A) tail similar to protein-coding mRNAs. The transcribed pri-miRNAs are processed into precursors of approximately 70 nucleotides (pre-miRNAs) with a hairpin-shaped stem-loop secondary structure, a 5' phosphate and a two-nucleotide 3' overhang by the RNase III enzyme, Drosha, and a double-stranded-RNA-binding protein, DGCR8/Pasha (18,19,20). The pre-miRNAs are then transported to the cytoplasm by a member of the Ran transport receptor family, Exportin-5, in a Ran guanosine triphosphate-dependent manner (21,22). Pre-miRNAs exported in the cytoplasm are further processed by another RNase III enzyme, Dicer, and unwound by a helicase (23).

Finally, only one mature miRNA strand (guide strand) is incorporated into an RNA-induced silencing complex (RISC) that mediates cleavage or translational inhibition of target mRNAs, while the other strand (passenger strand) is quickly degraded (24,25,26). The stability of the base pairs at the 5' end of the duplex determines which strand is incorporated in RISC (27,28). RISC is composed of Dicer, Argonaute2 (Ago2), and the double-strand RNA binding protein, TRBP (26,29), and cleaves target mRNAs more efficiently by using pre-miRNAs rather than the duplex RNAs that do not have the stem-loop structure, suggesting that processing by Dicer may be coupled with assembly of the mature miRNA into RISC (26).

The incorporated miRNA guides the RISC to the complementary sequence in the 3' untranslated region (UTR) of target mRNAs. miRNAs base-pair to the 3'UTR of the target mRNA with perfect or near perfect complementarity, leading to the target mRNA degradation by Ago2, a component of RISC (30). On the contrary, partial base pairing between a miRNA and a target mRNA leads to translational silencing of a target mRNA

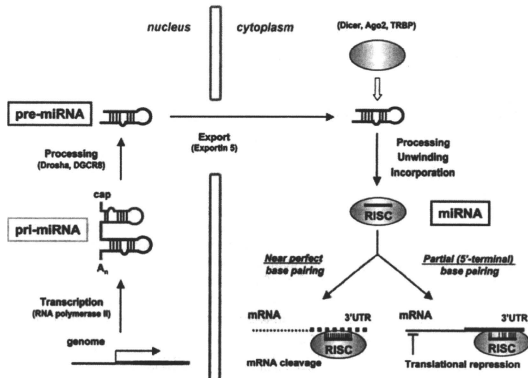


Fig. 1. Mechanism of biogenesis and function in miRNAs. A schematic diagram of miRNA biogenesis is shown. miRNAs are transcribed by RNA polymerase II and sequentially processed by drosha/DGCR8 and dicer. miRNA-loaded RISC causes the cleavage or translational silencing of target mRNAs.

without RNA degradation (31). In partial base pairing, the binding of some nucleotides in the 5' region of miRNAs has been indicated to be functionally important by systematic mutation experiments (32,33).

3. THE ROLE OF miRNAs IN CANCER: DIAGNOSIS AND DRUG DISCOVERY

miRNAs have distinct expression patterns among tissues and cells in different differentiation stages (34,35). Lim et al. (36) showed that over-expression of miR-124, a brain-specific miRNA, shifted the gene expression profile of HeLa cells toward that of the brain. Similarly, over-expression of muscle-specific miR-1 shifted the expression profile toward that of muscle. These results indicate that miRNAs play important roles in cell differentiation and characterization. Therefore, miRNAs are considered to have a significant influence on various disorders.

Recently, it has been reported that the expression of several miRNAs are altered in a variety of human cancers, suggesting potential roles of miRNAs in tumorigenesis (37). Calin et al. (38) showed that more than 50% of miRNAs were located in cancer-associated genomic regions or in fragile sites. In fact, miR-15a and miR-16 genes exist

as a cisgenic cluster at 13q14, which is deleted or down-regulated in most cases (~68%) of B-cell chronic lymphocytic leukemias (39).

Cimmino et al. (40) found that both these miRNAs negatively regulate the expression of B-cell lymphoma 2 (BCL2), which inhibits apoptosis and is present in many types of cancers including leukemias. In fact, overexpression of miR-15 and miR-16 in the MEG-01 cell line induces apoptotic cell death.

Alterations in the gene copy number of miRNAs are detected in a variety of human cancers (41,42,43). Zhang et al. (41) showed that miRNAs exhibited high-frequency genomic alterations in human ovarian, breast cancer, and melanoma using high-resolution array-based comparative genomic hybridization.

Hayashita et al. (42) found that the expression and gene copy number of the miR-17-92 cluster—composed of seven miRNAs—is increased in lung cancer cell lines, especially with small-cell lung cancer histology. Enforced expression of miRNAs included in this polycistronic cluster enhances cell proliferation in a lung cancer cell line. The increase in expression and gene copy number of miR-17-92 cluster was also found in B-cell lymphomas (43). The expression of miRNAs in this cluster is upregulated by c-Myc, whose expression and/or function is one of the most common abnormalities in human cancers, and miR-17-5p and miR-20a in this miR-17-92 cluster negatively regulate the expression of the transcriptional factor E2F1 (44).

Furthermore, it was indicated that miR-17-19b cluster included in miR-17-92 cluster inhibited apoptotic cell death, and accelerated c-Myc-induced lymphomagenesis in mice reconstituted with miR-17-19b cluster-over-expressed haematopoietic stem cells (43). In addition, the miR-17-92 cluster has been reported to augment angiogenesis in vivo by down-regulation of anti-angiogenic thrombospondin-1 and connective tissue growth factor in Ras-transformed colonocytes (45).

miR-155 was identified as a miRNA whose copy number and expression were up-regulated in several types of B-cell lymphomas (46). The miR-155 gene is located in the final exon of the B-cell integration cluster (BIC) non-coding gene, which is shown to accelerate the pathogenesis of c-Myc-associated lymphomas and leukemias, suggesting potential roles of miR-155 in B-cell lymphomas (47). Indeed, transgenic mice with miR-155 driven by the B-cell-specific E μ enhancer rapidly develop a polyclonal B-cell malignancy (48).

The up-regulated expression of miR-155 is also reported in breast, lung, colon, and thyroid cancer (49,50). However, the actual molecular mechanism of miR-155 remains unknown, although it is reported that miR-155 down-regulates the expression of the angiotensin II type I receptor (51).

As an antiapoptotic miRNA, miR-21 was recently identified to be up-regulated in human breast tumor tissues, glioblastoma tumor tissues, and malignant cholangiocytes (52, 53, 54). Inhibition of miR-21 by antisense oligonucleotides causes activation of caspases and induction of apoptotic cell death in a human breast cancer cell line and glioblastoma cell line (52,53). Furthermore, miR-21 inhibits gemcitabine-induced apoptotic cell death in cholangiocarcinoma cell lines by down-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), which positively regulates apoptosis via inhibition of PI 3-kinase signaling activation (54). The expression of miR-141 and miR-200b are also up-regulated in malignant cholangiocytes. Inhibitions of these miRNAs using miRNA-specific antisense oligonucleotides decreased proliferation