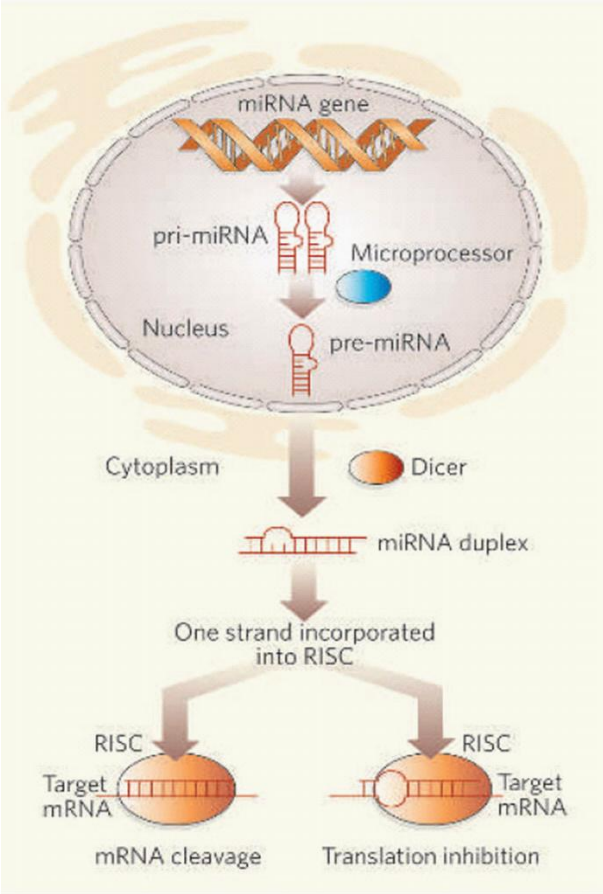
アジレントmiRNAマイクロアレイ

100ngのTotal RNAからの
網羅的miRNA発現プロファイリング

miRNAの発現



Cancer Genomics: Small RNAs with big impacts
from Nature 435: 745-746 (9 June 2005)

定義: 内在的に発現する22塩基前後のnon-coding RNA

- 相補的な配列をもつターゲットmRNAの転写後の遺伝子発現を調節（抑制的に制御）
- 約30%のヒト遺伝子は、miRNAによる調節を受けていると予想
- miRBase Release 16（September 2010)

  総登録数（前駆体）15,172,

  Human mature miRNA 1,223
- パワフルなシーケンシングの成果などにより、今も新規miRNAの同定が続いている

miRNAのプロファイリング手法の比較

Table 1 | Platform comparison for microRNA profiling

	qPCR	Microarray	Sequencing
Throughput time	~6 hours	~2 days	1–2 weeks
Total RNA required	500 ng	100–1,000 ng	500–5,000 ng
Estimated cost per sample, including reagents and supplies	$400 (754 human microRNAs queried per sample)	$250–$350 (at least 950 microRNAs queried per sample)	$1,000–$1,300 (theoretically, all microRNAs queried per sample)
Dynamic range detected	Six orders of magnitude	Four orders of magnitude	Five or more orders of magnitude
Infrastructure and technical requirements	Few	Moderate	Substantial

nature methods | VOL.7 NO.9 | SEPTEMBER 2010 | 687-692

既知のmiRNAを低コストで網羅的に検出し、迅速に発現差解析を行いたい

→マイクロアレイが最適！

アジレント miRNAアレイの特長

- **シンプルなダイレクトラベル化プロトコル**

  １日半でmiRNAプロファイルデータを取得

- **100ngのtotal RNA からラベル化スタート**

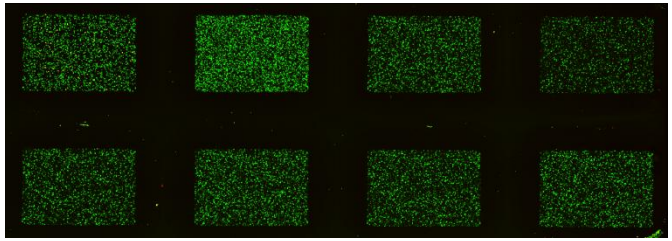
  small RNA の濃縮、精製不要

- **miRBaseに登録されているmature miRNAの選択的検出**

  高い配列選択性、サイズ選択性

- **ハイスループットを実現する8パックフォーマット**
- **高感度**： 検出感度 0.1 αmol
- **幅広いダイナミックレンジ**： ＞5桁
- **実験データの信頼性向上**

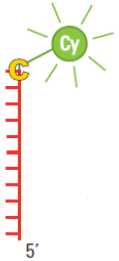
  繰り返しプローブ



シンプルなダイレクトラベル化プロトコル

Point1 :
Total RNAからラベル化
→small RNA精製・濃縮不要

Point2 :
逆転写・増幅無し
→内在性のmiRNAの末端に蛍光色素を結合させるだけ



Total RNA (100 ng) + Labeling Spike-In (optional)

↓ Phosphatase Treatment, incubate 30 minutes, 37°C

Dephosphorylated RNA*

↓ Add DMSO

↓ Heat, ice

↓ Assemble Labeling Reaction, incubate 2 hours, 16°C

Labeled RNA*

↓ Desalt with Spin Column (optional)

Desalted Labeled RNA*

↓ Dry sample with vacuum concentrator, approximately 2 to 3 hours (1 hour with columns), 45°C to 55°C

↓ Assemble Hybridization Mixture + Hyb Spike-In (optional)

↓ Heat, ice

↓ Hybridize 20 hours, 55°C, 20 RPM

↓ Wash, Scan

miRNA Profile

*The sample can be stored frozen at -80°C if needed.

手間が少ないだけでなく、**よりバイアスのないプロファイル**を得ることができる！！

ラベル化からハイブリまで必要な試薬をセット
Complete Labeling Reagent and Hyb kit

totalRNA中のmiRNAのラベル化からハイブリダイゼーションまで必要な試薬をComplete Kitとして提供

1キット：24アレイ分

miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb Kit	
Reagents (9 vials)	T4 RNA Ligase(27 µL)
	10X T4 RNA Ligase Buffer (90 µL)
	Calf Intestinal Phosphatase (22 µL)
	10X Calf Intestinal Phosphatase (90 µL)
	DMSO (180 µL)
	Nuclease-Free Water (450 µL)
	2X Hi-RPM Hybridization Buffer (22 µL)
	10X Gene Expression Blocking Agent (lyophilized pellet)
	Cyanine 3-pCp (81 µL)

RNA抽出から解析までトータルソリューションを提供

RNA 抽出 → **ラベル化** → **ハイブリダイゼーション** → **洗浄** → **スキャン、数値化 データ解析**

約 4 時間

20 時間

10 分 + α

8 分/スライド
全自動化

Absolutely RNA,miRNA 抽出キット

mRNAとmiRNAの両方を含む高純度Total RNAを精製

Complete Labeling Reagent and Hyb kit
miRNA Spike-in kit

シンプルで簡単な高感度エンドラベル化

totalRNA 必要量 100 ng

ハイブリチャンバー＆ガスケットスライド

totalRNA中のエンドラベル化されたmiRNAの全量がハイブリダイゼーションへ

調整済みの高品質洗浄バッファ ¥

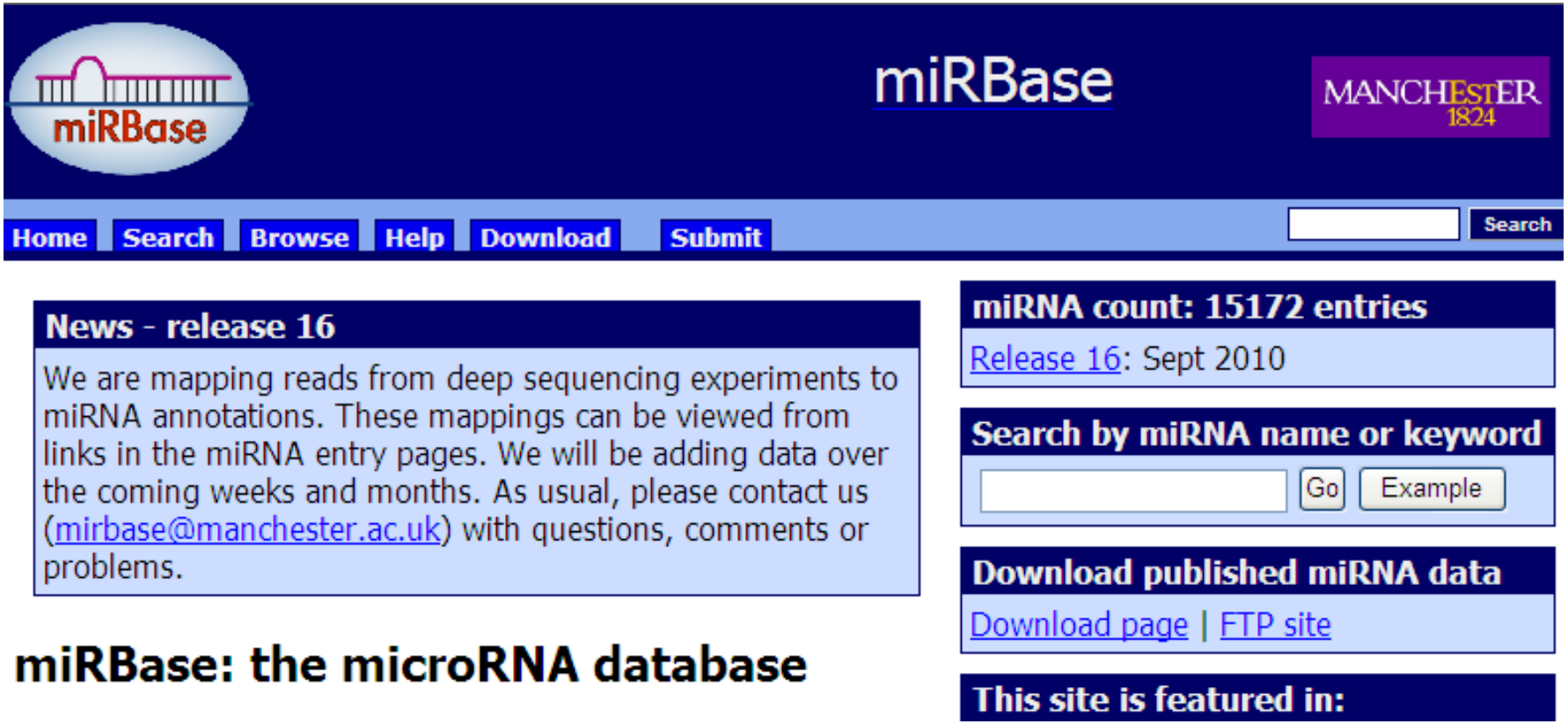
アジントスキャナー
全自動数値化ソフトウェア
Spike-inキットを使ったQCレポートを自動作成

GeneSpringによる統合解析

定量PCR（Mxシリーズ）によるバリデーション

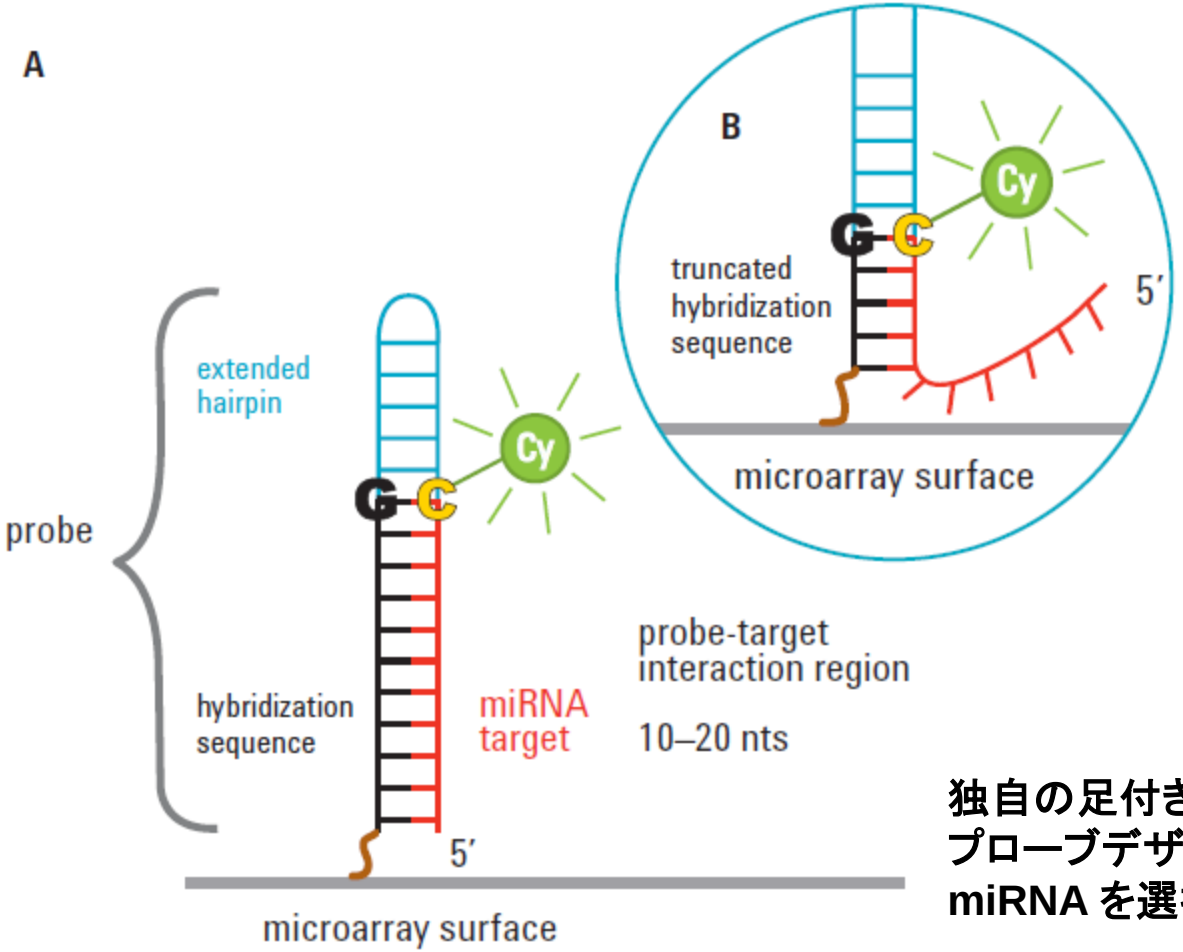
miRBaseの登録に基づいたプローブ設計

http://www.mirbase.org/



miRBaseの更新に伴って随時マイクロアレイもアップデート

独自デザインのプローブ　サイズ選択性
前駆体と区別してMatureなmiRNAのみを選択的検出



独自の足付き、ヘアピン付きの
プローブデザインにより、mature な
miRNA を選択的に検出

独自デザインのプローブ　配列選択性
相同性の高いmiRNA同士もよく区別して検出

miRNA	Sequence	#NT
hsa-let-7a	ugagguaguagguuguauagu**u**	22
hsa-let-7b	ugagguaguagguugu**g**u**g**gu**u**	22
hsa-let-7c	ugagguaguagguuguau**g**gu**u**	22
hsa-let-7d	**a**gagguaguagguug**c**auagu	21
hsa-let-7e	ugagguag**g**agguuguauagu	21
hsa-let-7f	ugagguaguag**a**uuguauagu**u**	22
hsa-let-7g	ugagguaguag**u**uugua**c**agu	21
hsa-let-7i	ugagguaguag**u**uugu**gcu**gu	21

	miRNA 7a	miRNA 7b	miRNA 7c	miRNA 7d	miRNA 7e	miRNA 7f	miRNA 7g	miRNA 7i
Probes 7a	100	4	39	0	0	1	0	0
Probes 7b	0	100	5	0	0	0	0	0
Probes 7c	1	30	100	0	0	0	0	0
Probes 7d	2	0	1	100	0	0	0	0
Probes 7e	2	0	0	0	100	0	0	0
Probes 7f	37	1	6	0	0	100	0	0
Probes 7g	0	0	0	0	0	0	100	1
Probes 7i	0	0	0	0	0	0	0	100

85 - 100%
70 - 84%
55 - 69%
40 - 54%
25 - 39%
10 - 24%
5 - 9%
0 - 4%
Grey Number

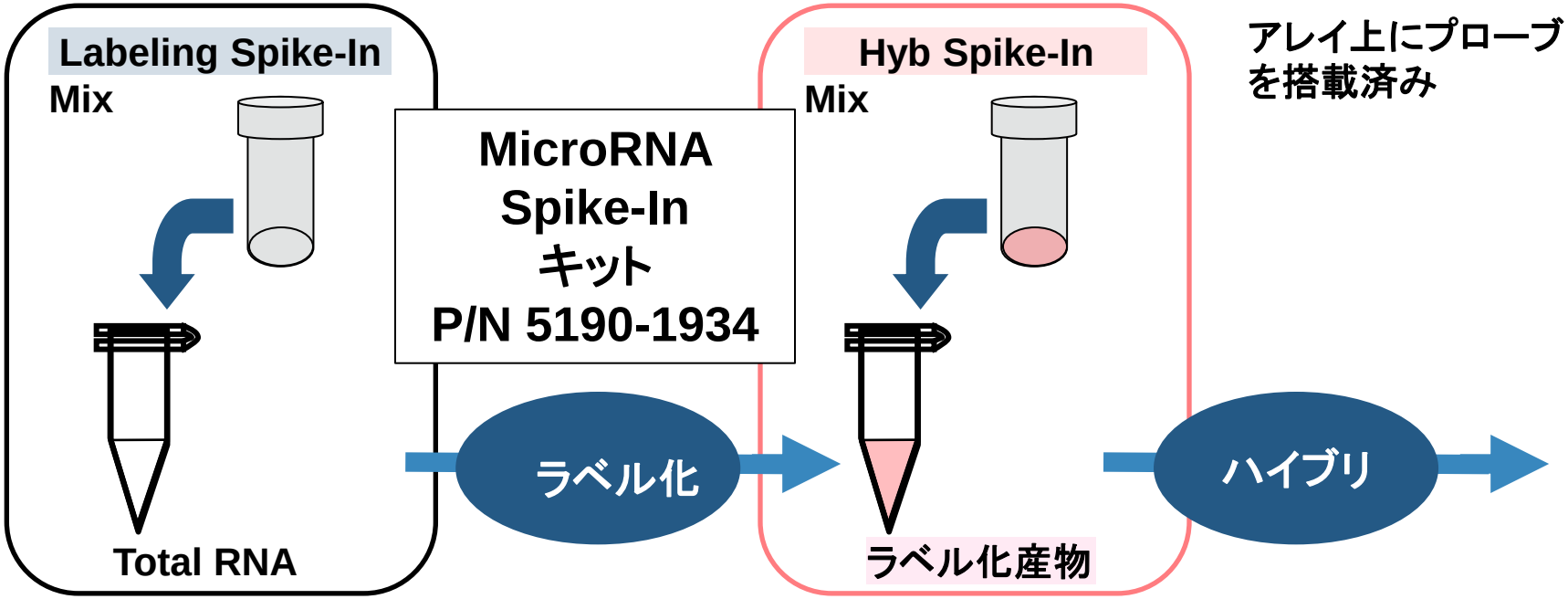
各miRNAをターゲットとしたプローブに、他のmiRNAがハイブリダイゼーションする程度

実験データの信頼性向上
アジレント miRNA アレイ用 Spike-inキット

（プロトコルversion2.2または1.7）

- **ラベル化用 Spike-in Mix**
  ラベル化＋ハイブリ実験が上手くいったかを評価

- **ハイブリ用 Spike-in Mix**
  ハイブリ実験が上手くいったかを評価



QC Report
miRNA Spike-inの測定結果の確認

Evaluation Metrics for miRNA_QCMT_29Sep09 :
Excellent (4) ; Good (2)

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
NEW IsGoodGrid	1.00	>1	NA	<1
AddErrorEstimateGreen	2.24	<5	5 to 12	>12
AnyColorPrcntFeatPopnOL	2.58	<8	8 to 15	>15
gNonCtrlMedPrcntCVBGSu...	7.26	0 to 10	10 to 15	<0 or >15
gTotalSignal75pctile	160.31			
NEW LabelingSpike-InSignal	3.47		>2.50	<2.50
NEW HybSpike-InSignal	4.39		>2.50	<2.50
NEW StringencySpike-InRatio	0.72			

♦ Excellent ♦ Good ♦ Evaluate

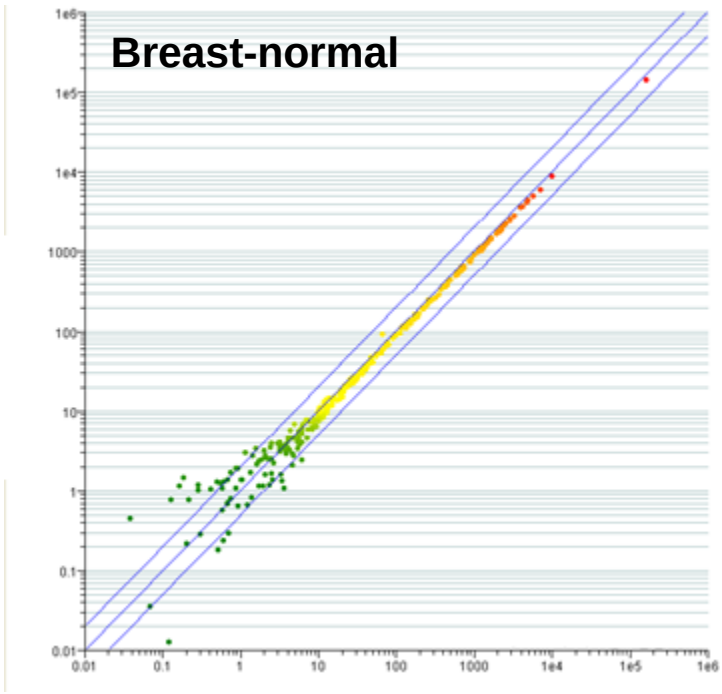
Feature Extraction v10.7 でアウトプット（最新バージョン）

3 Levels of Metrics

アジレントmiRNAマイクロアレイ　データの特徴

高い再現性、広いダイナミックレンジ

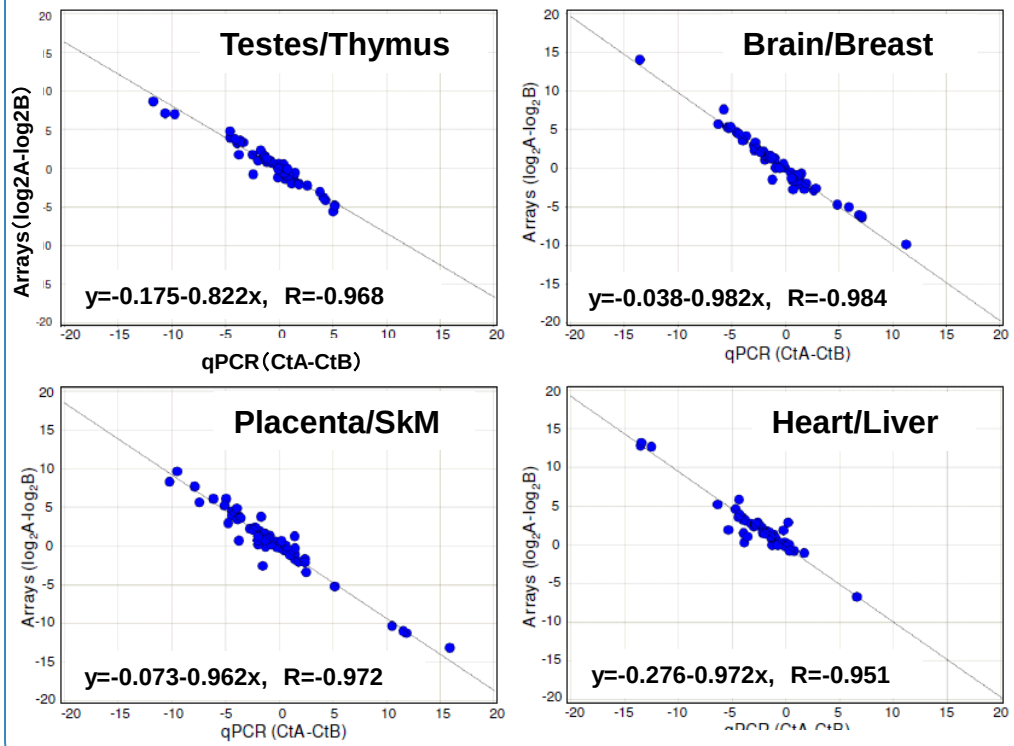
ヒト乳腺正常組織のmiRNAの発現
Self vs. self plot



Breast-normal

定量PCRとの高い相関

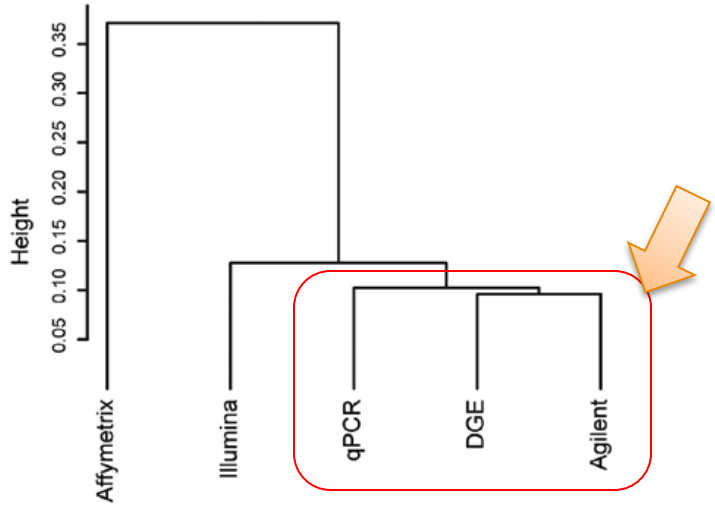
4種類の組織のペアについて、60のmiRNAの発現比を定量PCRとアジレントアレイで比較



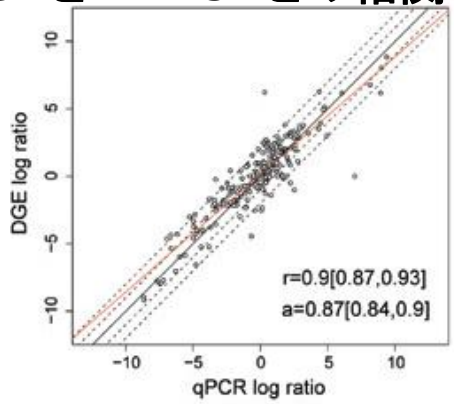
BMC Biotechnology 2008, **8**:69

アジレントmiRNAマイクロアレイ　データの特徴

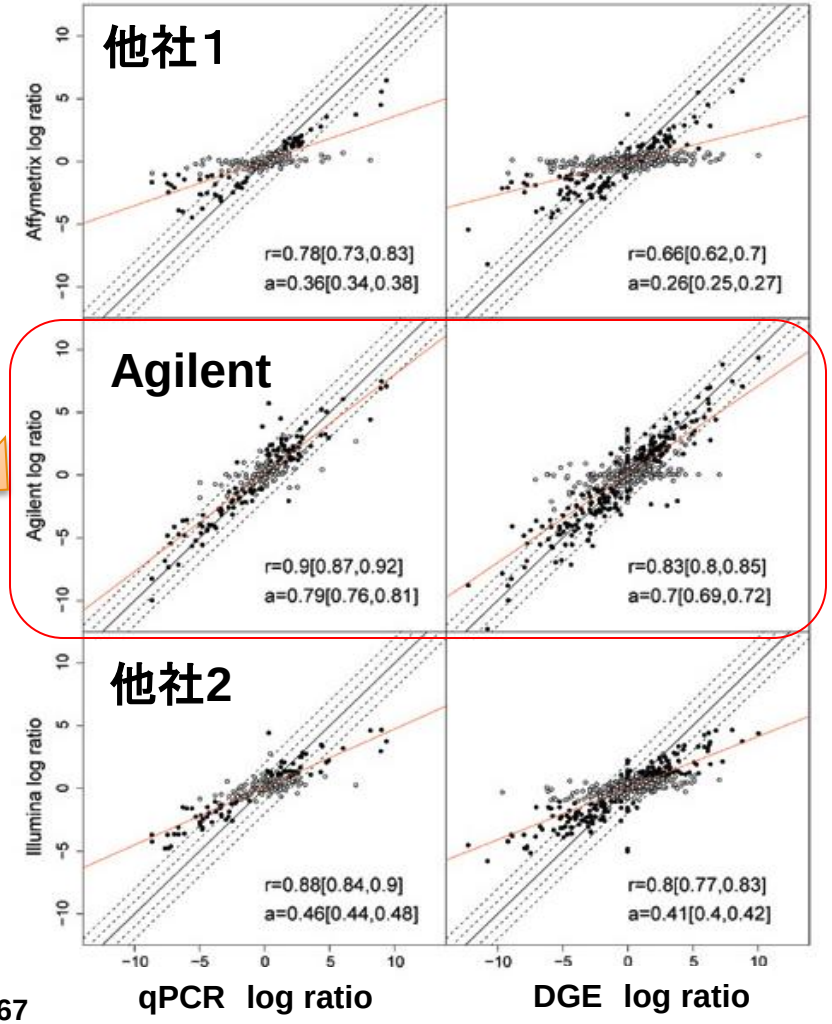
DigitalGeneExpressionとRT-PCRとの相関が高いのはアジレントアレイ



DGEとRT-PCRとの相関

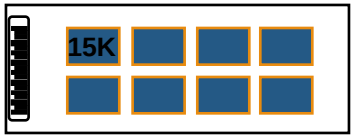


各社マイクロアレイデータとRT-PCR/DGEとの相関



BioTechniques 48:219-222 (March 2010) doi 10.2144/000113367

miRNA マイクロアレイ　現在の製品ラインナップ
ヒト・マウス・ラット



	miRBaseの バージョン	16.0	15.0	14.0	12.0	10.1	9.1
Human	miRBase mature miRNA数	1223	1100	904	866	733	470
	マイクロアレイ	Coming Soon（8×60K予定）		8×15K Rel.14.0 (029297)	8×15K Rel.12.0 (021827)	8×15K Rel.10.1 (019118)	8×15K Rel.9.1 (016436)
Mouse	miRBase mature miRNA数	1055	717	710	627	579	
	マイクロアレイ	Coming Soon	8×15K Rel.15.0 (029152)	8×15K Rel.14.0 (029298)	8×15K Rel.12.0 (21828)	8×15K Rel.10.1 (019119)	
Rat	miRBase mature miRNA数	680	387	388	350	351	
	マイクロアレイ	Coming Soon	8×15K Rel.15.0 (029200)			8×15K Rel.10.1 (019159)	

miRBaseに登録のあるヒト・マウス・ラット以外の生物もeArrayでカスタムアレイ作成可能！

miRBaseに登録のあるヒト・マウス・ラット以外の生物もeArrayでカスタムアレイ作成可能

できること

- miRBase16.0以前に登録されているmature miRNAに対して**アジレントがデザイン済みのプローブを選択**し、アレイに搭載する
- miRBase16.0以前に登録されている全ての生物のmiRNAに対応するプローブを、一つのアレイに混在させる

現在できないこと

- miRNAアレイ用のプローブを新規にデザインする
- 8x15K以外のフォーマットを選択する

注意）
全ての生物に対してカスタムアレイをデザインすることが出来ますが、
弊社提供のラベル化プロトコルでは、3’端にOH基を持たないmiRNA（植物など）をラベル化することが出来ません。

アジレントmiRNAマイクロアレイ用サンプルの調製法および品質確認について

推奨する total RNA 抽出法

2010年12月現在における推奨RNA抽出法

－Agilent Absolutely RNA miRNA Kit (400814)

－Invitrogen TRIZOL Reagent (15596-026)

－Qiagen miRNeasy Mini kit (217004)

－Applied Biosystem mirVana miRNA Isolation kit (AM1560)

※必ずsmall RNAが含まれるような抽出法を採用して下さい

※**Total RNAの抽出プロトコール**を使用し、

small RNAの濃縮、精製は行わないで下さい

※抽出方法が変わるとプロファイルに影響を与えるので、

1つのプロジェクトには、**同一の抽出方法**を使用して下さい

Absolutely RNA miRNA Kit

+ mRNA, miRNAをどちらも含んだ高純度Total RNAを精製可能なキット

+ 組織、細胞を出発材料に、カラムを使った簡単で迅速なプロトコル

Absolutely RNA® miRNA Kit
400814　50 preps

抽出された高純度RNA

マイクロアレイのサンプルとして

+遺伝子発現アレイ
+miRNAアレイ

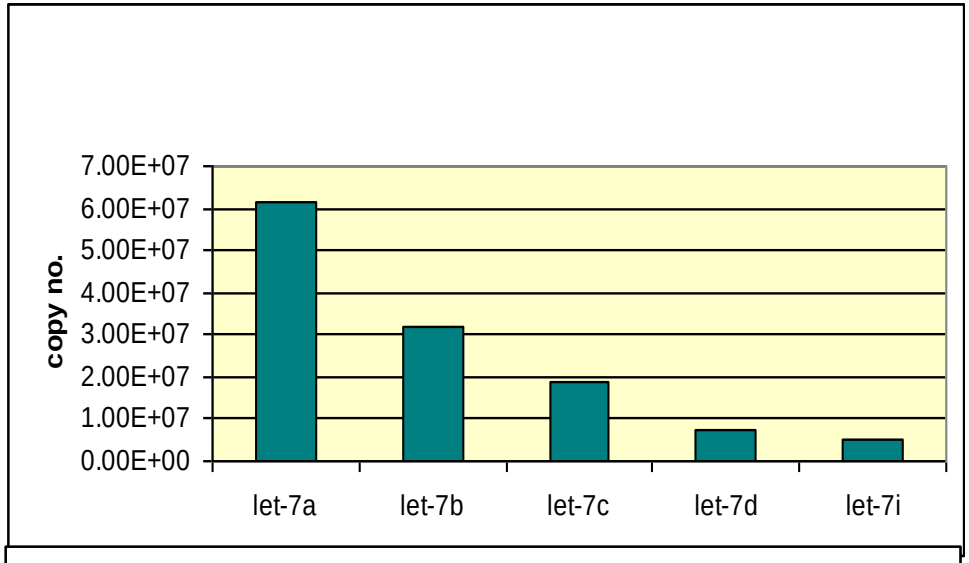
共通したサンプルを使用可能

リアルタイムPCRのサンプルとして

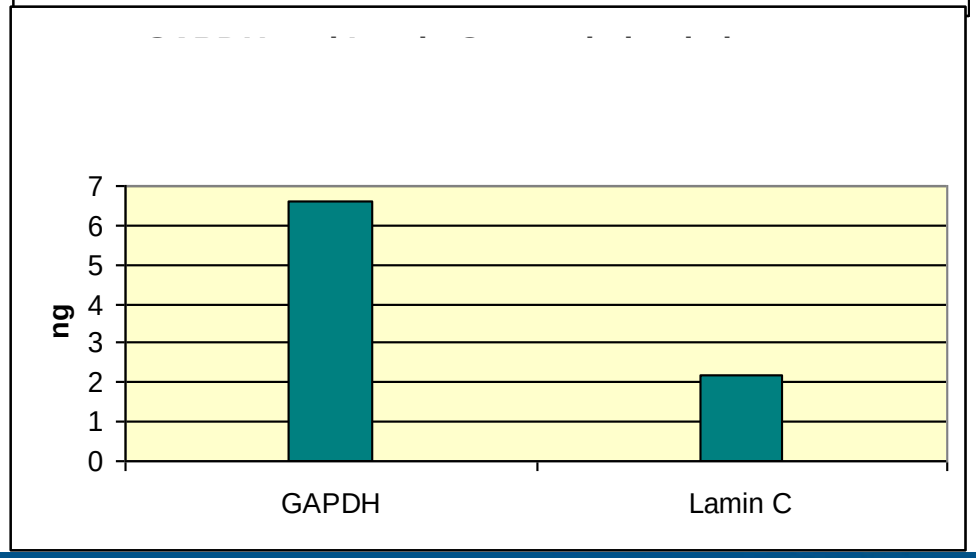
+遺伝子発現
+miRNA発現

Absolutely RNA miRNA Kit

抽出された Total RNAには、様々な発現量のmiRNAが含まれる



5種類のmiRNAを
リアルタイム定量
PCRで測定



2種類のmRNAを
リアルタイム定量
PCRで測定

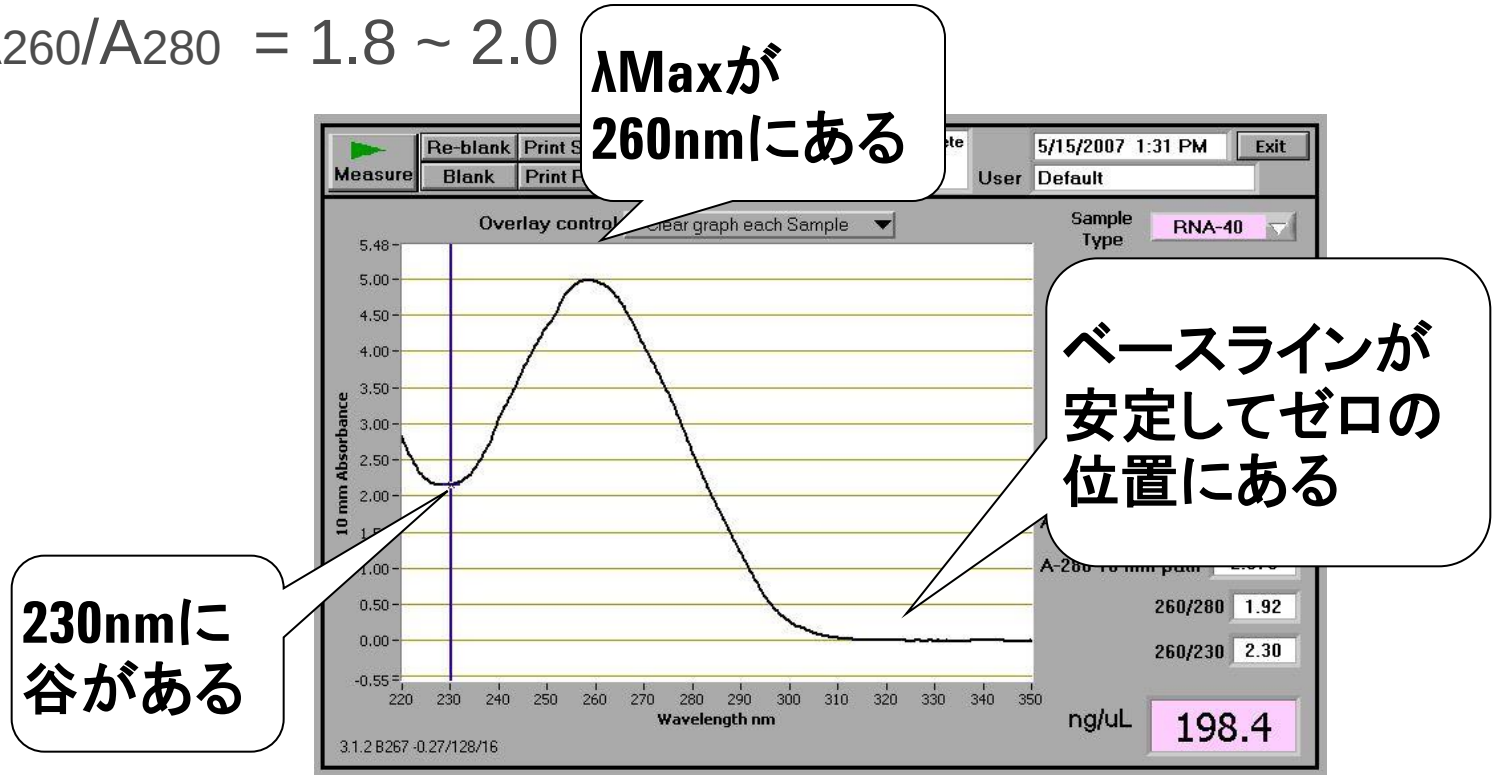
Total RNA Quality Check
ーUV-Visによる純度確認

•測定波長:　230nm, 260nm, 280nm

A_{260}　total RNA concentration

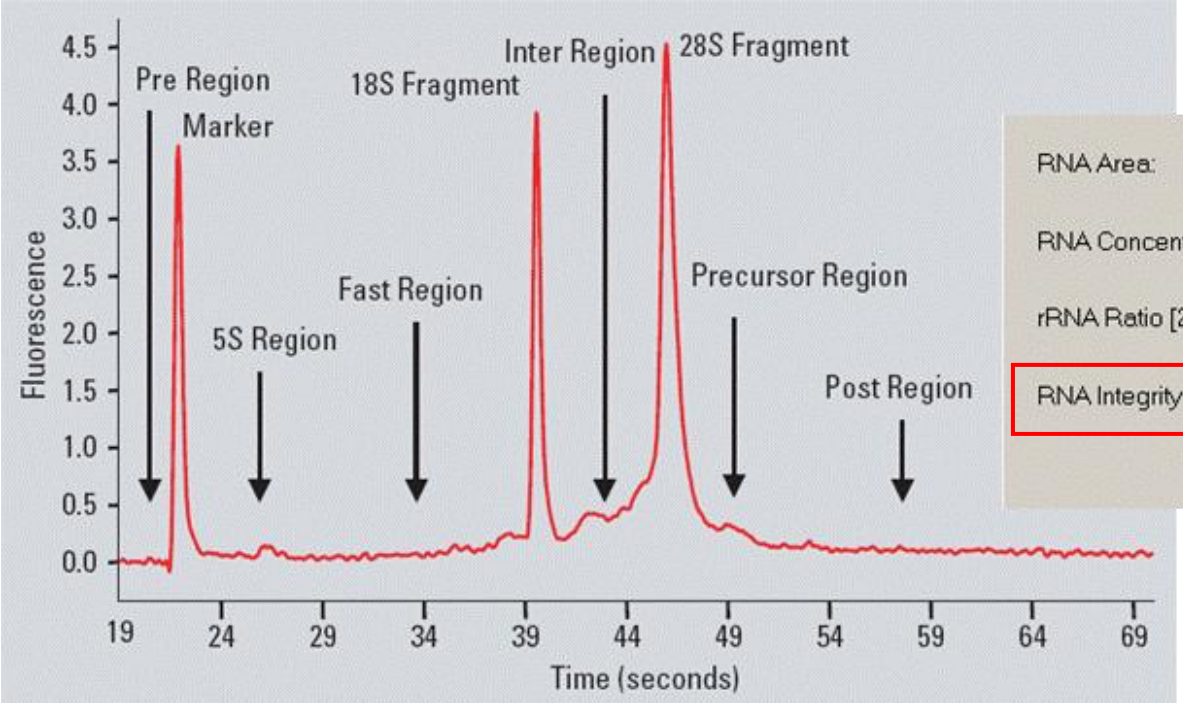
1 = 40 ng/ul　(RNA)

•Criteria: A_{260}/A_{280} = 1.8 ~ 2.0



Total RNA Quality Check　一電気泳動
Bio Analyzer RNA6000 Nano kit

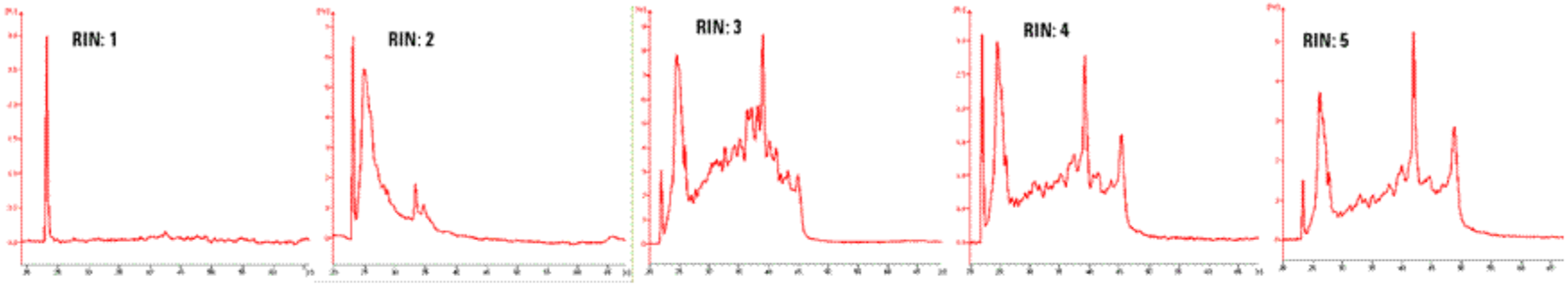
RIN = RNA Integrity Number



RNA Area:	61.6	
RNA Concentration:	102	ng/ul
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.2	
RNA Integrity Number (RIN):	7.9 (B.02.02)	

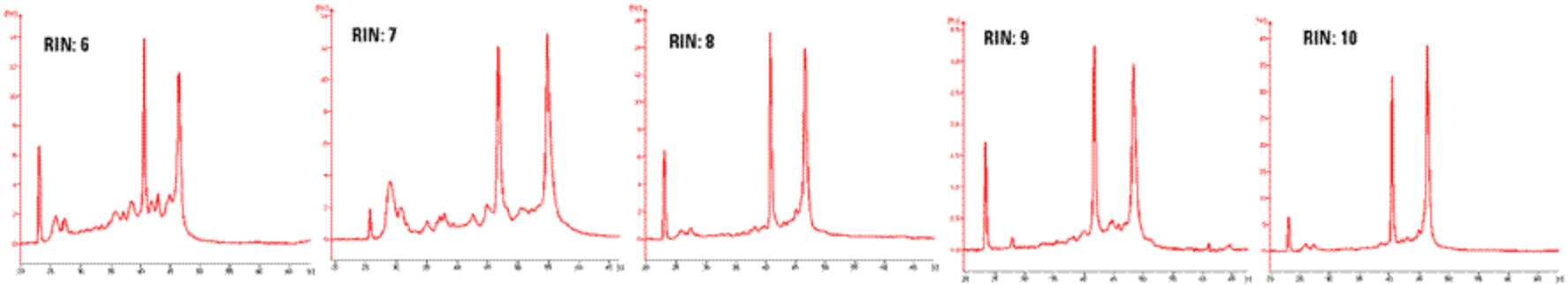
miRNAマイクロアレイのサンプルであっても、RNA6000 Nano Kitを使ってTotal RNAの分解具合をモニターすることを推奨

Total RNA Quality Check
Total RNAの分解とRIN



RIN: 1 RIN: 2 RIN: 3 RIN: 4 RIN: 5

Degradation



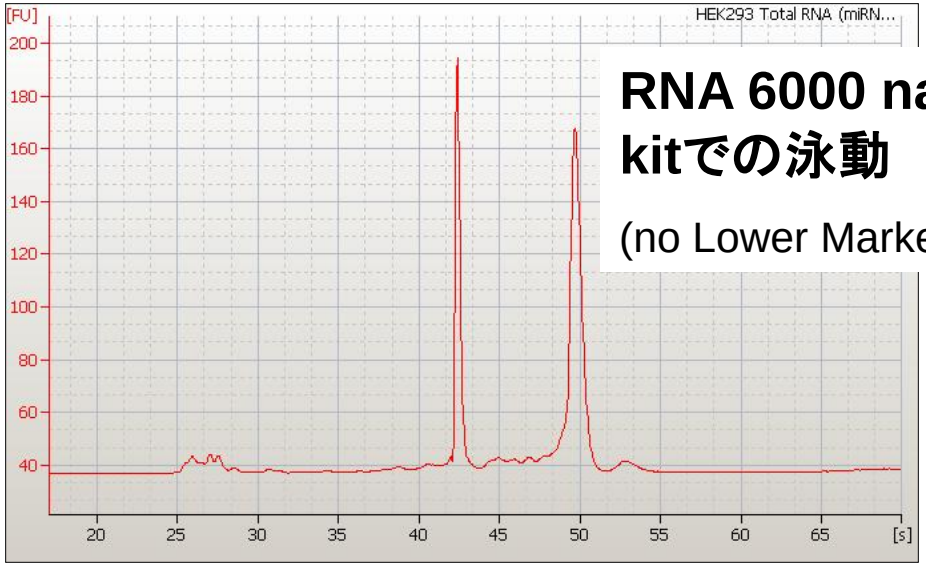
RIN: 6 RIN: 7 RIN: 8 RIN: 9 RIN: 10

Intact

Direct miRNA extraction (HEK 293 Cells)

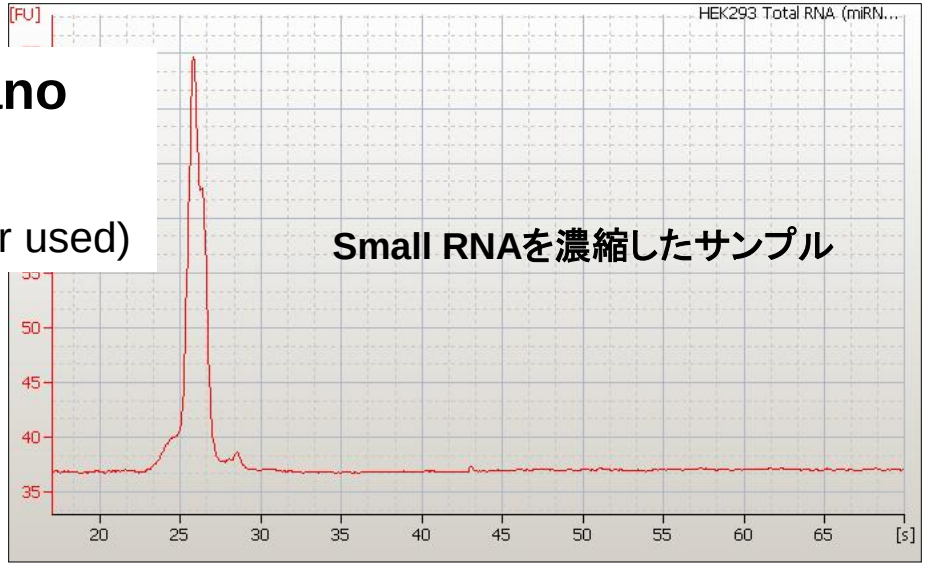
using Ambion “mirVana“ Kit and RNA 6000nano

RNA 6000nano kitでは、small RNA fraction の分析は可能であるが、分離能は十分でない。



RNA 6000 nano kitでの泳動

(no Lower Marker used)

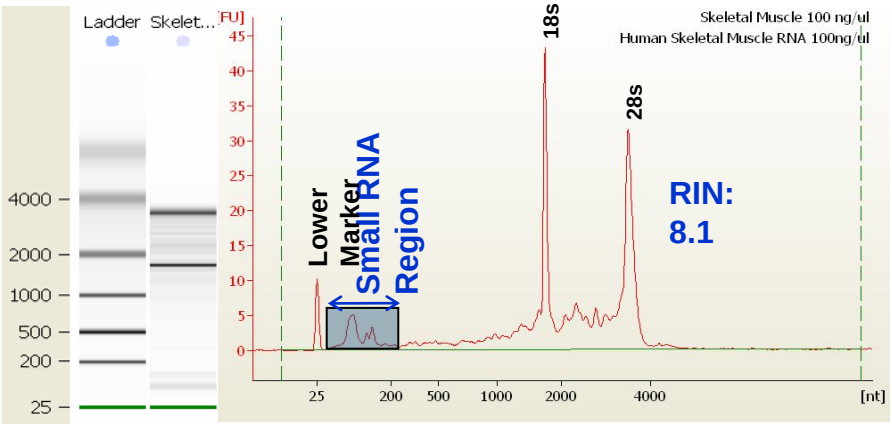


Small RNAを濃縮したサンプル

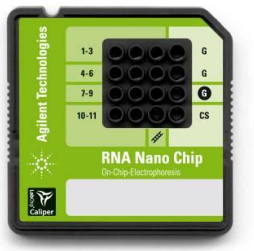
Small RNA kitは、Total RNAもしくはpurified sample中の

200nt以下の領域のCharacterizationのために開発されました

RNA6000nanoアッセイとSmall RNAアッセイの比較



RNA 6000Nano kit

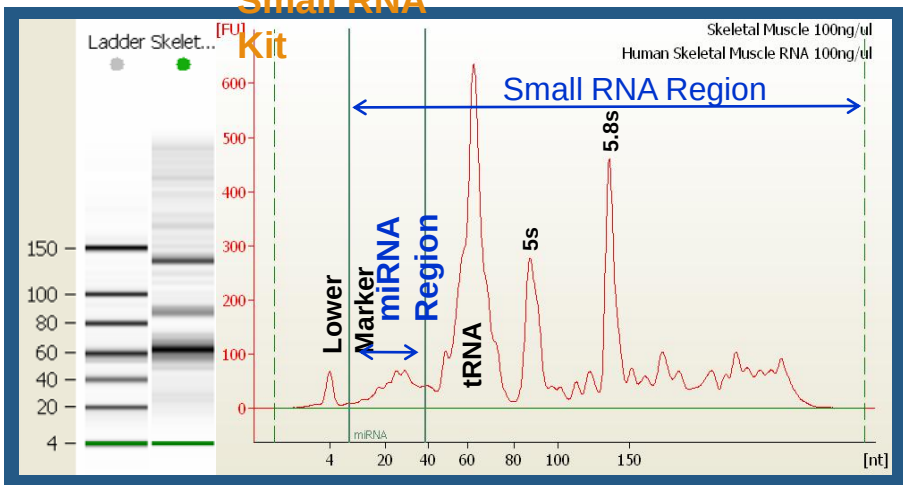


RNA 6000Nano

Size range: 25-6000nt

Results: Integrity, Total RNA amount, gDNA contamination

Small RNA Kit

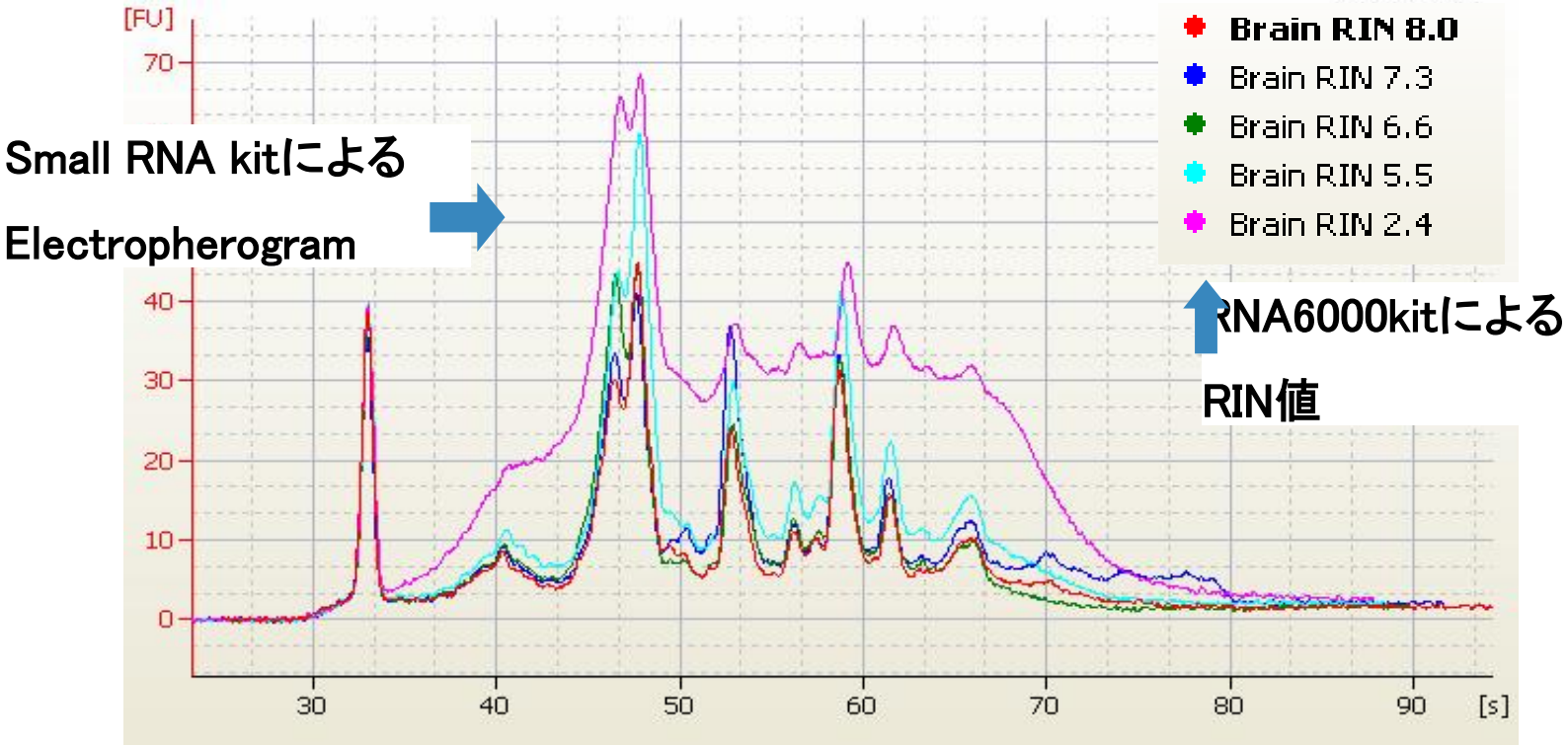


NEW! Small RNA
Size range: 6-150nt

Results: miRNA amount, Ratio and amount of other Small RNA

Total RNAの分解具合の影響

Total RNAを熱によって、段階的に分解した。RNA 6000kitを使って、**Integrity (RIN)**を測定後、Small RNA kitで分析を行った。**RIN6以下**のサンプルでは、ベースラインが上昇し、miRNA/small RNA量が過剰に見積もられる危険がある。



電気泳動では、『small RNA』か『分解物』かを判定することができない

➡ RNAのQCとしては、Total RNAの分解具合をチェックする必要がある

分解の進んだTotal RNAからのmiRNA発現プロファイリング

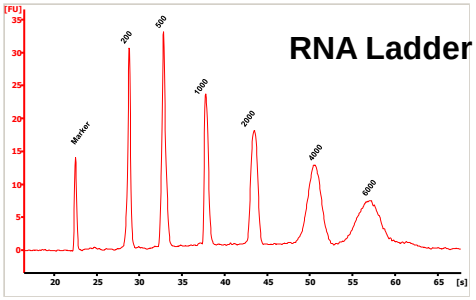
・熱による分解のmRNAとmiRNAへの影響
・RNaseによる分解のmRNAとmiRNAへの影響
・アジレントアレイによるFFPEサンプルの分析

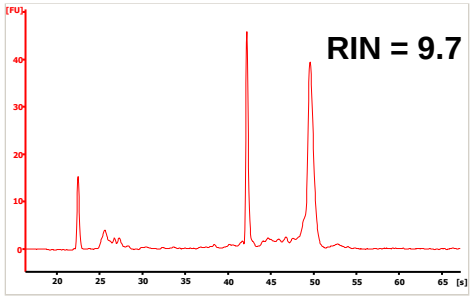
60℃の熱を一定時間かけることで人為的にRNAを分解

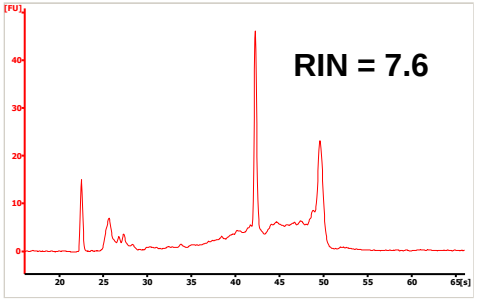
Sample : STRATAGENE MVP Total RNA
Human MDA-MB-453 Cells, Catalog Number : 540093
Heat Treatment: 60 ° C , X hr
RNA concentration: 250ng/uL
Volume : 9uL

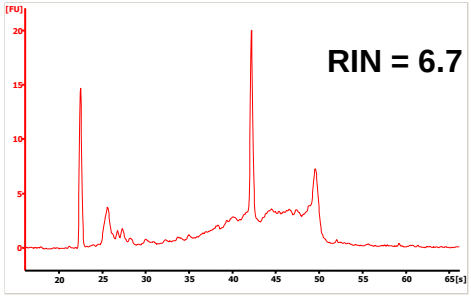
heating time (hour)	RNA Integrity Number (RIN)
0	9.7
3	7.6
4	6.7
6	4.1
12	2.2

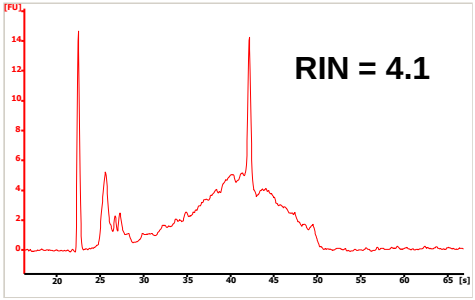
RNA分解の指標
RNA Integrity Number (RIN)

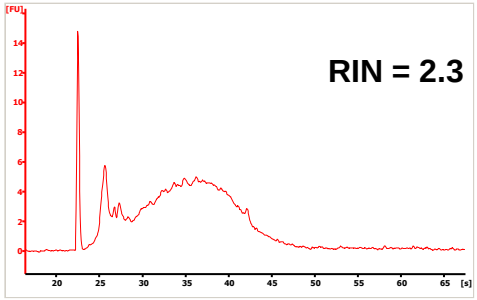




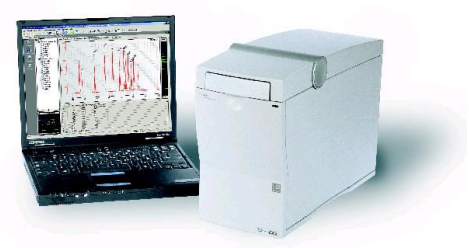








わずか1ulの量で
RNA分解度を判定
（感度　50-200 pg/uL）

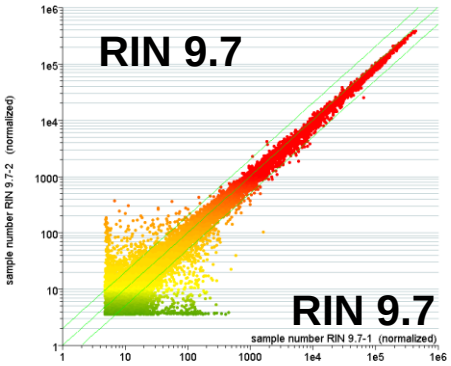


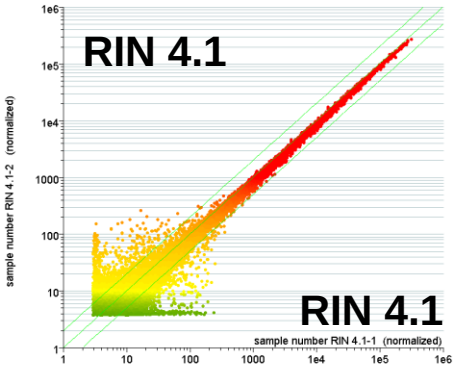
Agilent 2100 Bioanalyzer

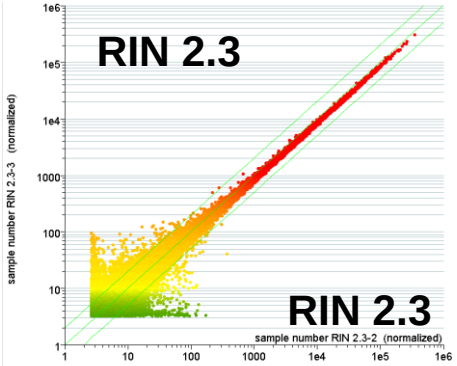
RNA6000　Chip

Technical replicatesの再現性は良好

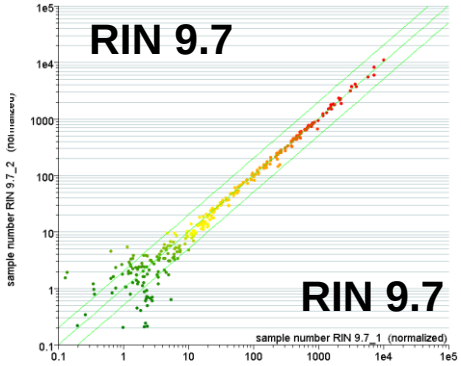
Gene Expression
n = 41,000

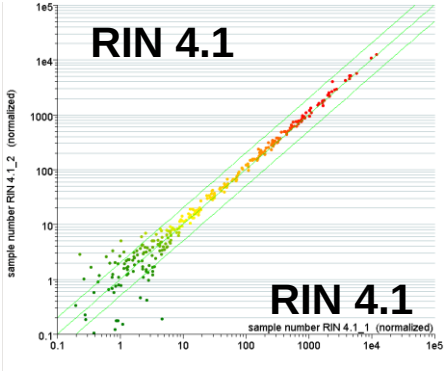


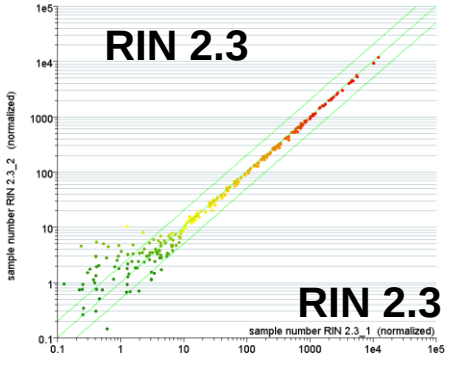




miRNA Expression
n = 470

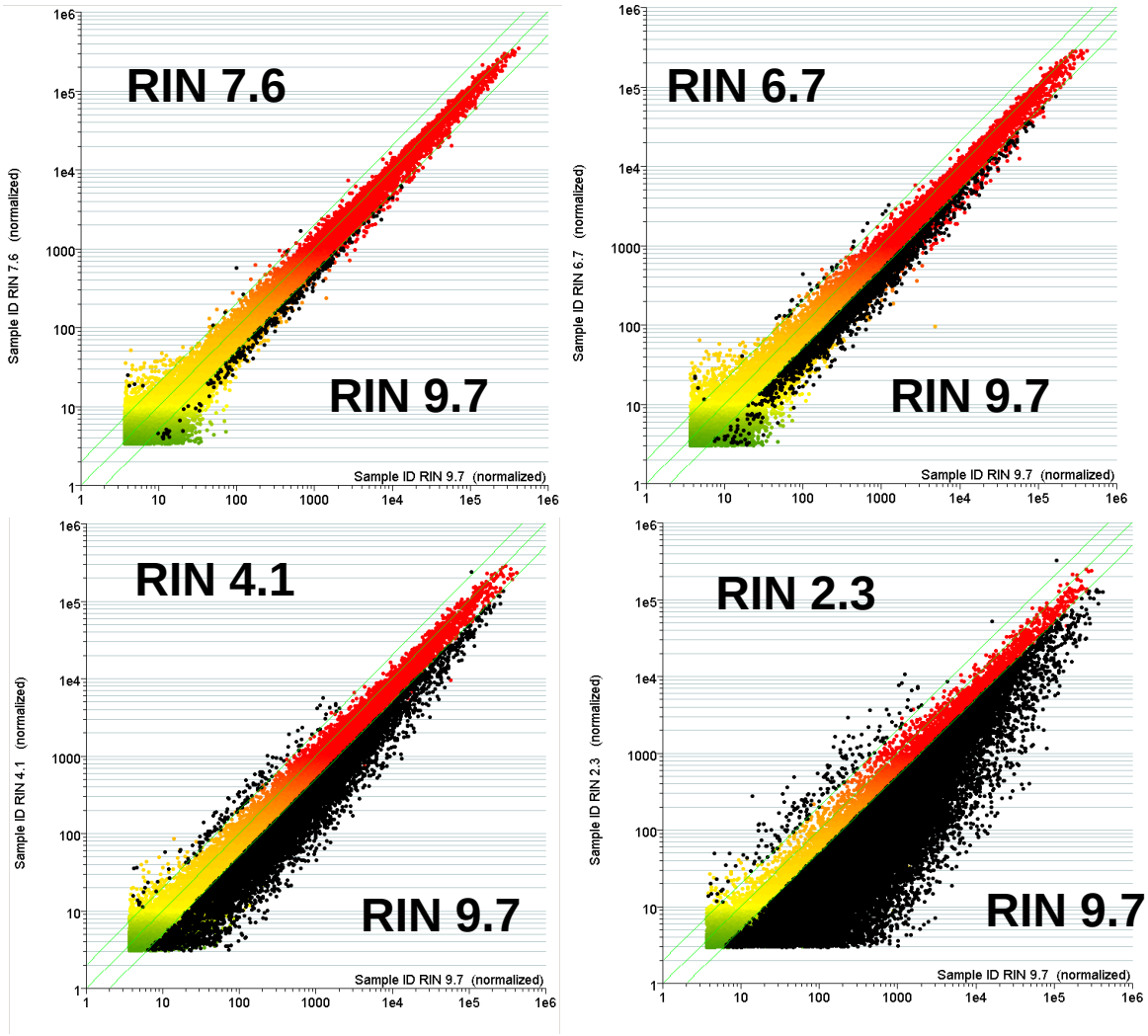






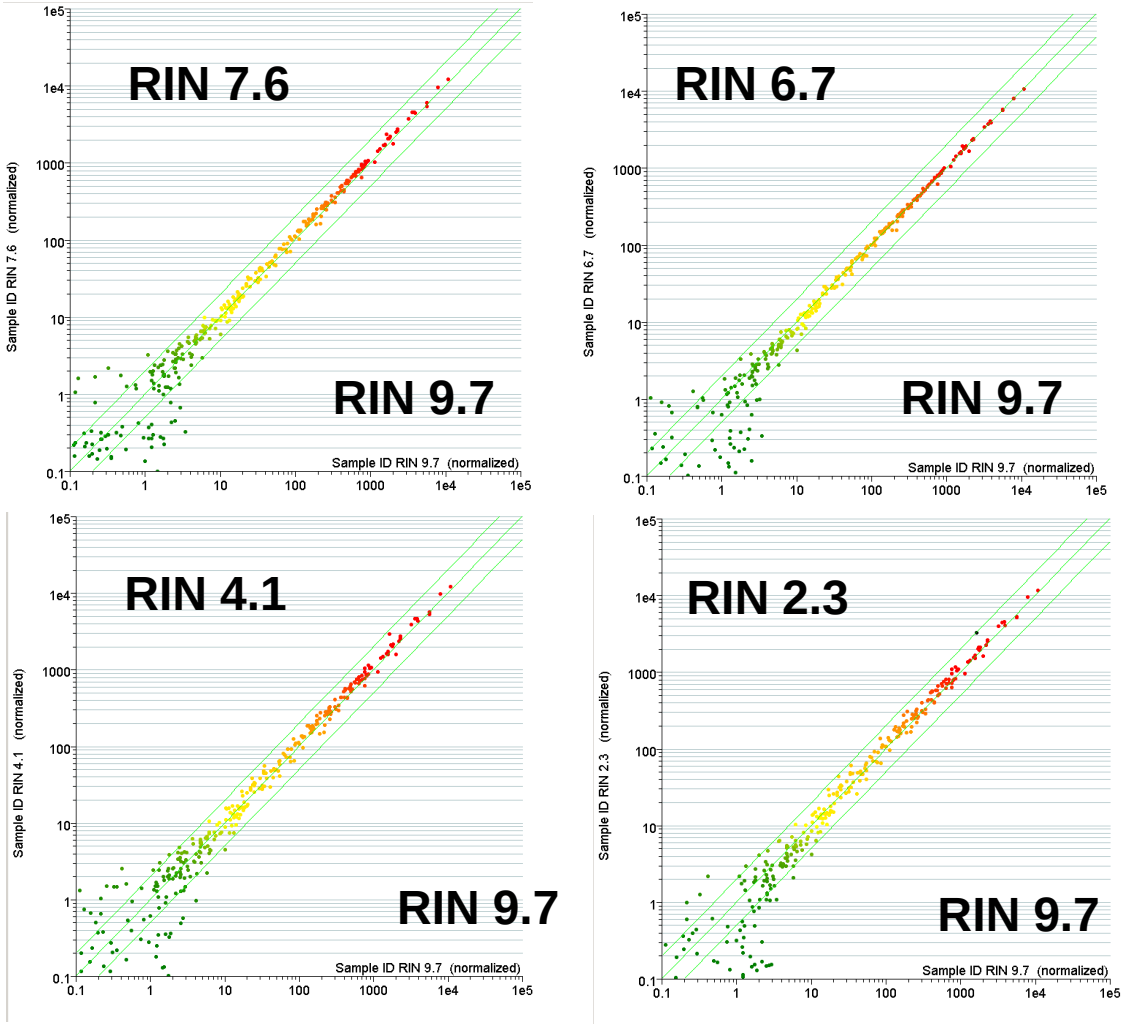
RNA熱分解が遺伝子発現プロファイルに与える影響

n = 41,000



RNA熱分解がmiRNA発現プロファイルに与える影響

n = 470



まとめ

miRNA発現プロファイルは、RNAの熱分解に対して比較的安定

RNA degradation by heating	the number of **genes** which signal intensity changed by degradation	% of all human genes (n = 41,000)	the number of miRNAs which signal intensity changed by degradation	% of all human miRNAs (n = 470)
RIN 9.7 vs. RIN 7.6	290	0.7	0	0.0
RIN 9.7 vs. RIN 6.7	2,175	5.3	0	0.0
RIN 9.7 vs. RIN 4.1	9,400	22.9	0	0.0
RIN 9.7 vs. RIN 2.1	23,384	57.0	2	0.4

Welch T-test, p-value < 0.05, FDR Fold Change above 2

miRNA発現プロファイルは、RNaseによる分解に対しても比較的安定

同一臨床検体の凍結処理（Fresh Frozen）とホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）処理の比較

Fresh-Frozen or FFPE samples

↓

Extraction of Total RNA containing miRNAs:
miRNeasy and miRNeasy FFPE Kits or
mirVana miRNA and RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kits

↓

Labeling and Hybridization:
Agilent Complete Labeling and Hyb Kit

↓

Washing:
Agilent GE Wash 1 and 2 Buffers

↓

Scanning and Feature Extraction:
Agilent Microarray Scanner and Feature Extraction

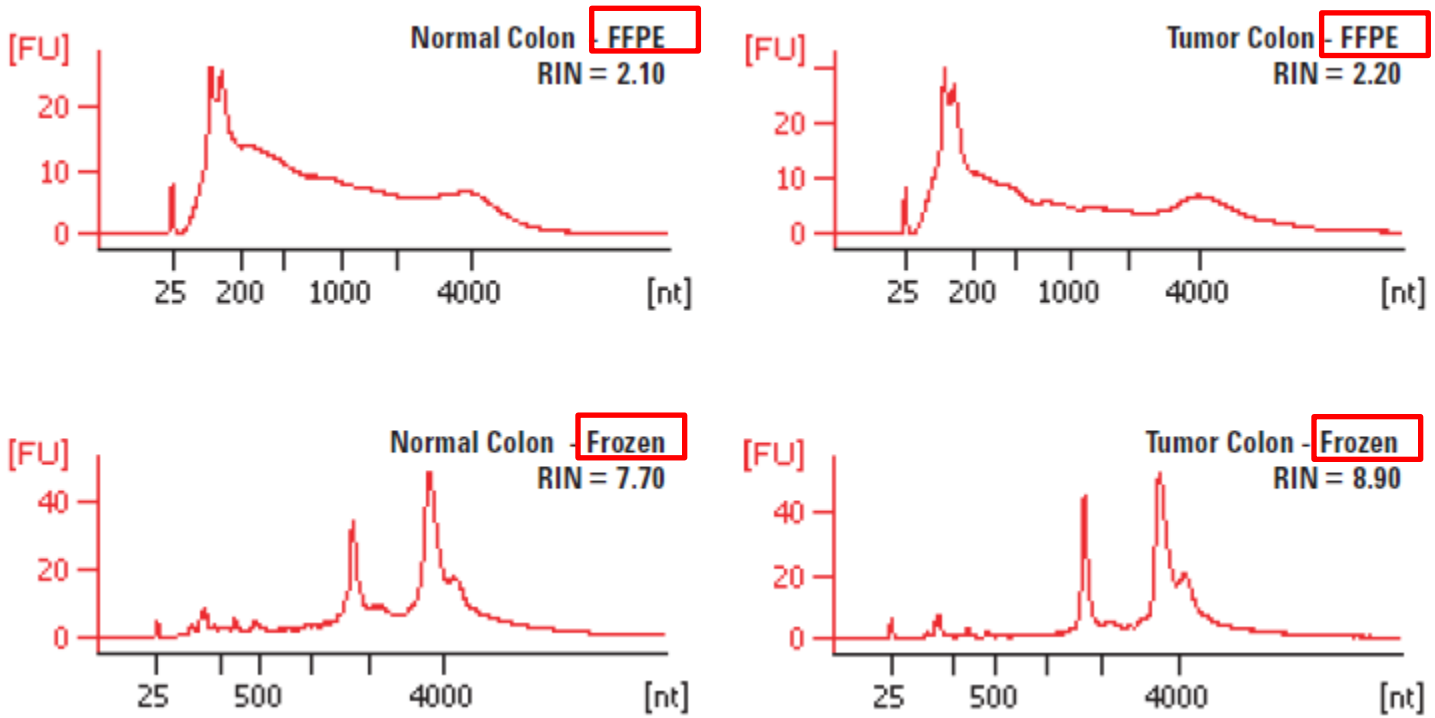
↓

Data Analysis: Genespring GX

マイクロアレイ実験は
アジレントの
標準プロトコル

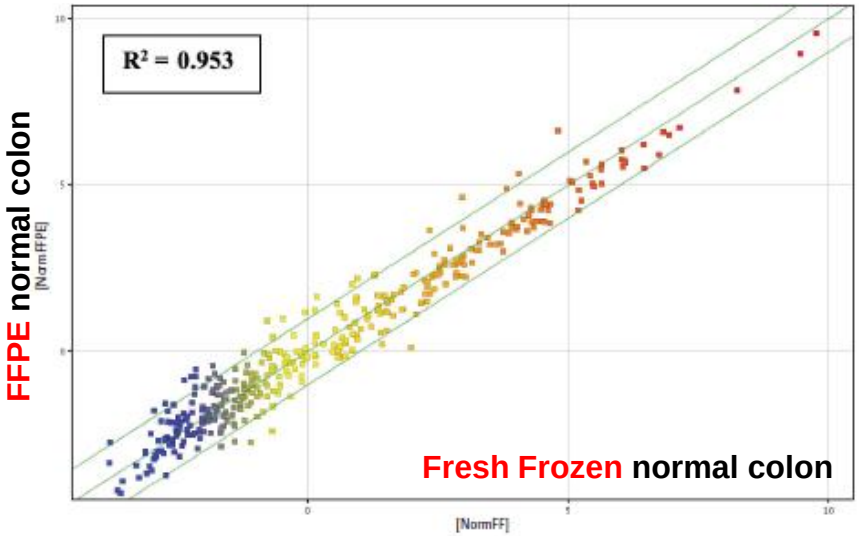
ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）処理によるRNA分解度の測定

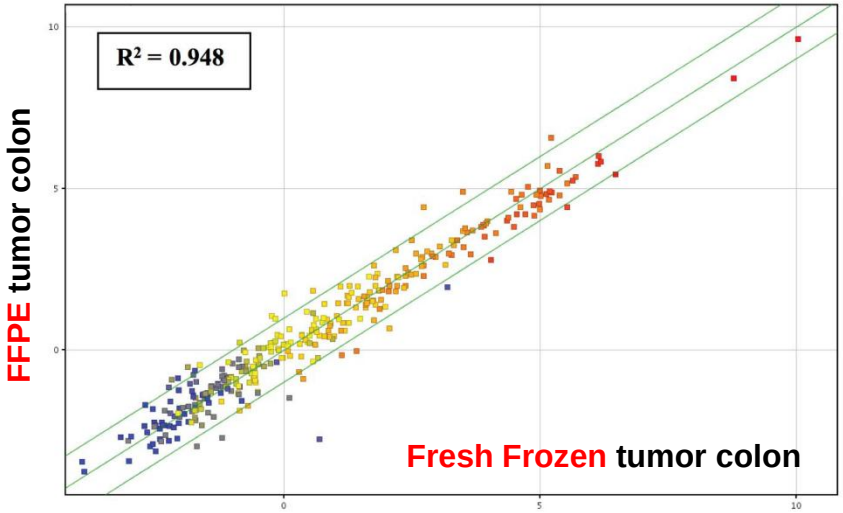
同一臨床検体のFresh FrozenとFFPEの比較



FFPEサンプルはTotal RNAが分解されている

同一サンプルの凍結処理（Fresh Frozen）とホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）処理のmiRNAプロファイリングの比較

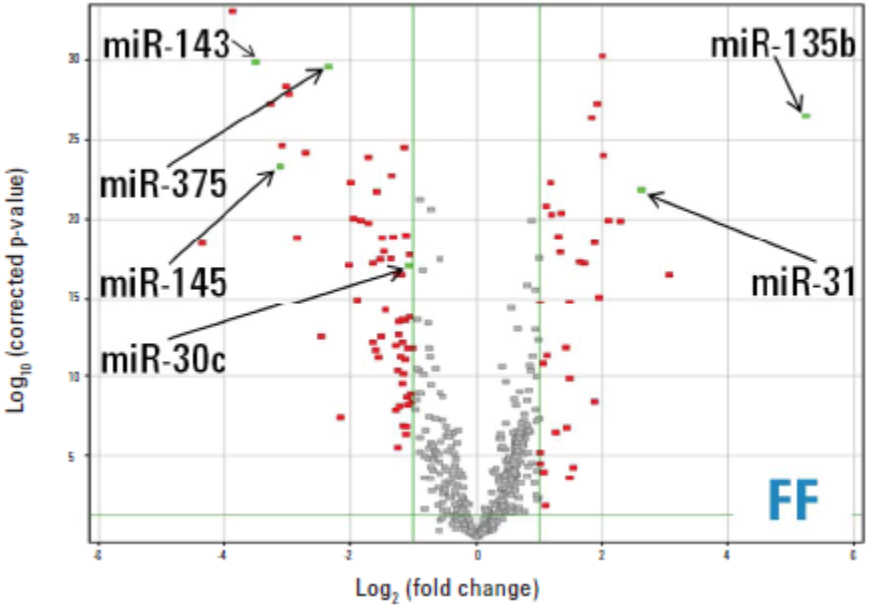




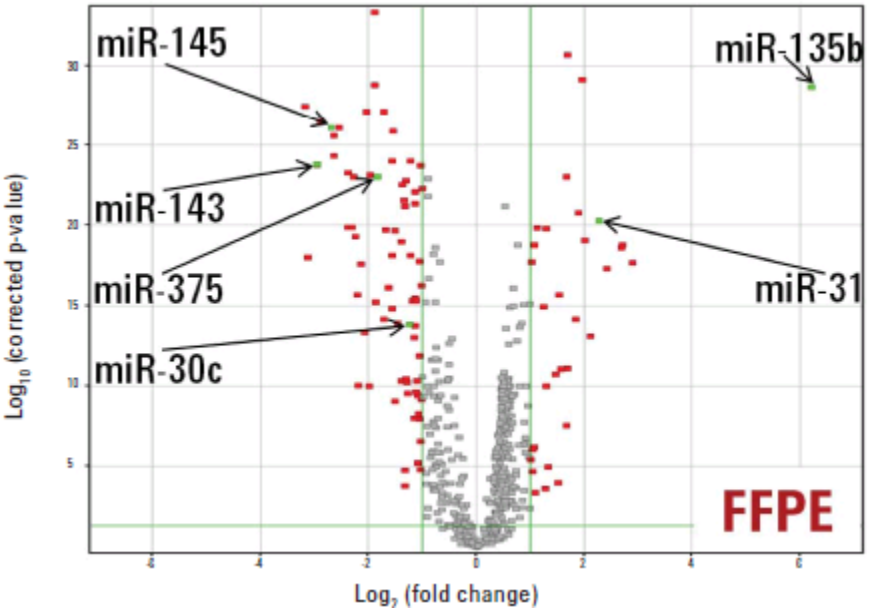
分解が進んだFFPEサンプルでも凍結サンプルと同等データが得られる

大腸がんにおけるmiRNAの発現
Fresh FrozenとFFPEサンプルの比較

Fresh Frozen



FFPE



corrected p-value 0.05, at least 2 fold change

FFPEサンプルからでも、癌で統計的有意差をもって発現変動するmiRNAの検出は可能である

miRNAとmRNAの統合解析例

Gene Expression + miRNA で分かること

- **<u>仮説</u>:着目している遺伝子の発現の亢進 (Up-regulation) や抑制 (Down-regulation) の主たる原因は、short non-coding RNA (i.e. miRNA) による制御である。**

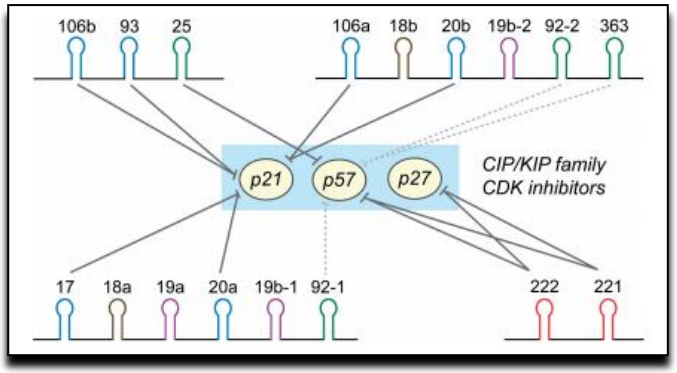
➢ 標的 mRNA の 3'-UTR への結合

- ➢ クラスター状の miRNA (e.g., miR-17-92)
- ➢ 多数 vs. 特異的 miRNA (e.g., miR-122)

➢ 対立する概念

- ➢ miRNA Decoy (e.g., miR-328)
- ➢ Decoy for miRNAs (e.g., PTENP1)

***Cell.* 2010 Mar 5;140(5):612-4.**
Nature 2010 June



ポリシストロニックな miRNA による機能調節（Agilent miRNA アレイで評価）
***Nucleic Acids Res*. 2009 Apr;37(5):1672-81.**
Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. Kim YK *et al.* より引用

miRNA の マイクロアレイデータ解析

変動する miRNA のスクリーニング

- 実験：比較する条件を設定、成熟 miRNA の発現量変化を取得

- 解析：網羅的な miRNA 発現のデータ
  → フィルタリング → 発現差 miRNA の抽出
  → クラスター状の (or シード配列一致) miRNA かどうか確認

miRNA + Gene Expression 組み合わせ解析

→ 標的（ターゲット）遺伝子群の予測
→ ターゲット遺伝子群の発現データを確認
→ エンリッチされた遺伝子セットのオントロジーや
パスウェイの同定

→ →特異的な制御を行っている miRNA の絞り込み

miRNA + mRNA 統合解析例

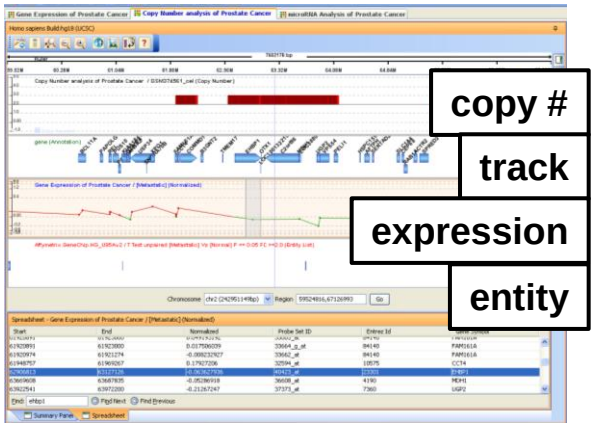
統合解析例：<u>ニューロブラストーマ数十検体</u>

- **GSE 16444** (Agilent Human miRNA Array Ver.2)
- **GSE 16237** (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array)

Agilent GeneSpring GX11 (GX11)
<u>GX11</u>：発現解析＆ゲノミクス

インタラクティブなゲノムブラウザを搭載
→ GXゲノムブラウザを活用した統合解析

miRNAのターゲット遺伝子を予測
→ GXに組み込まれたTargetScan機能の活用



GX11のゲノムブラウザ

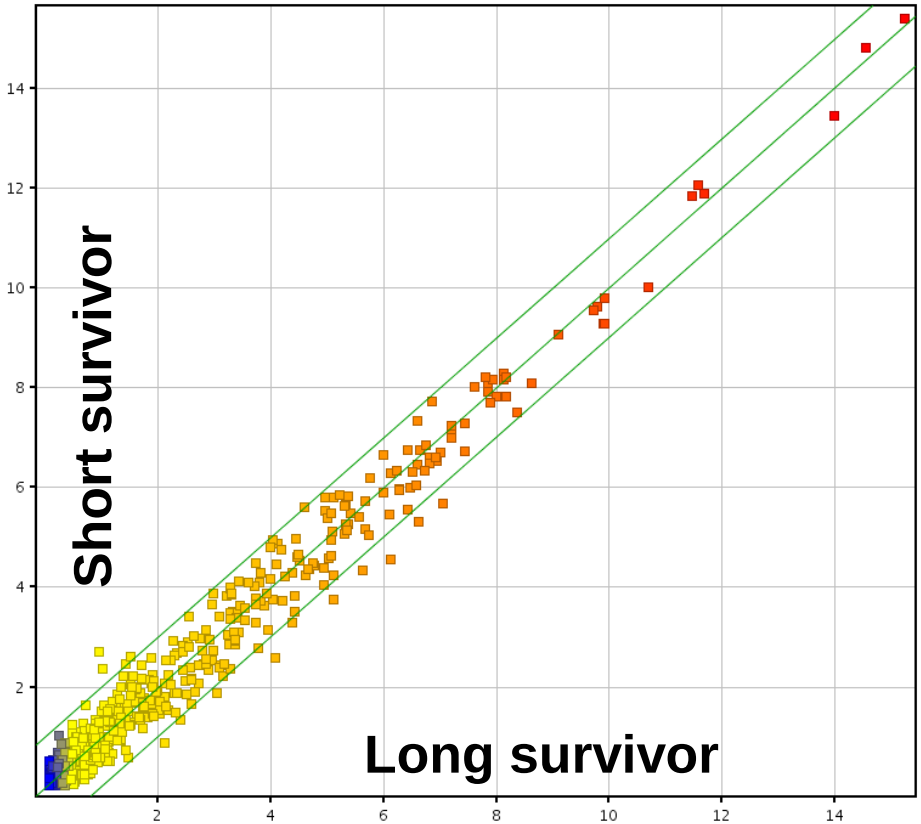
miRNAデータ解析- GSE16444

Series GSE16444	Query DataSets for GSE16444
Status	Public on Jun 27, 2009
Title	miRNA expression profiling in high-risk neuroblastoma
Organism	Homo sapiens
Experiment type	Non-coding RNA profiling by array
Summary	In the present study we evaluated the miRNA expression profile of 31 high risk, stage 4 neuroblastoma patients.
Overall design	We compared miRNA expression profiles of 14 long-survivors (alive with an overall survival time > 36 months) and 17 short-survivors (dead of disease within 36 months from diagnosis. Deaths due to toxicity were censored).
Contributor(s)	Scaruffi P, Stigliani S, Coco S
Citation(s)	Scaruffi P, Stigliani S, Moretti S, Coco S et al. Transcribed-Ultra Conserved Region expression is associated with outcome in high-risk neuroblastoma. *BMC Cancer* 2009 Dec 15;9:441. PMID: 20003513

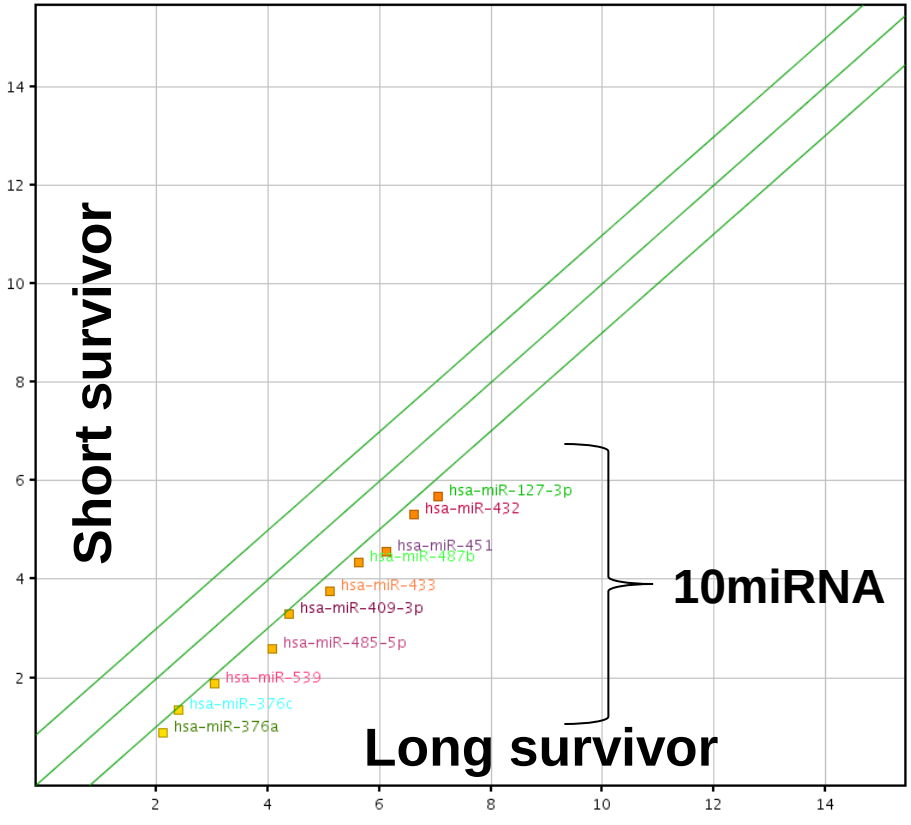
- アレイ：Agilent miRNA microarray ver.2
- Short survival < 36 month (N=17)
- Long survival > 36 month (N=14)

GEO(Gene Expression Omnibus)からアレイデータを取得

Long survivorで高発現なmiRNA

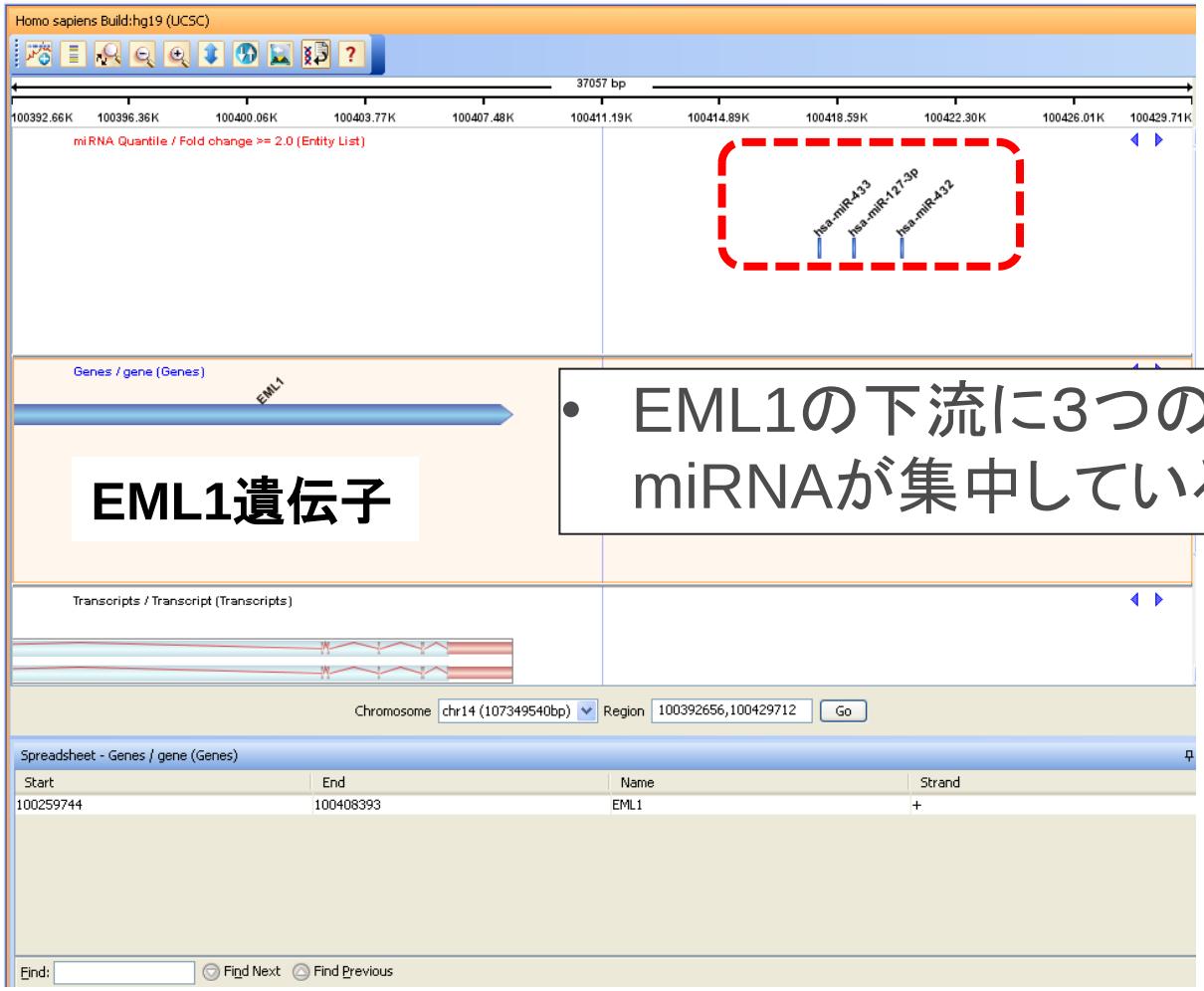


全miRNAをプロット



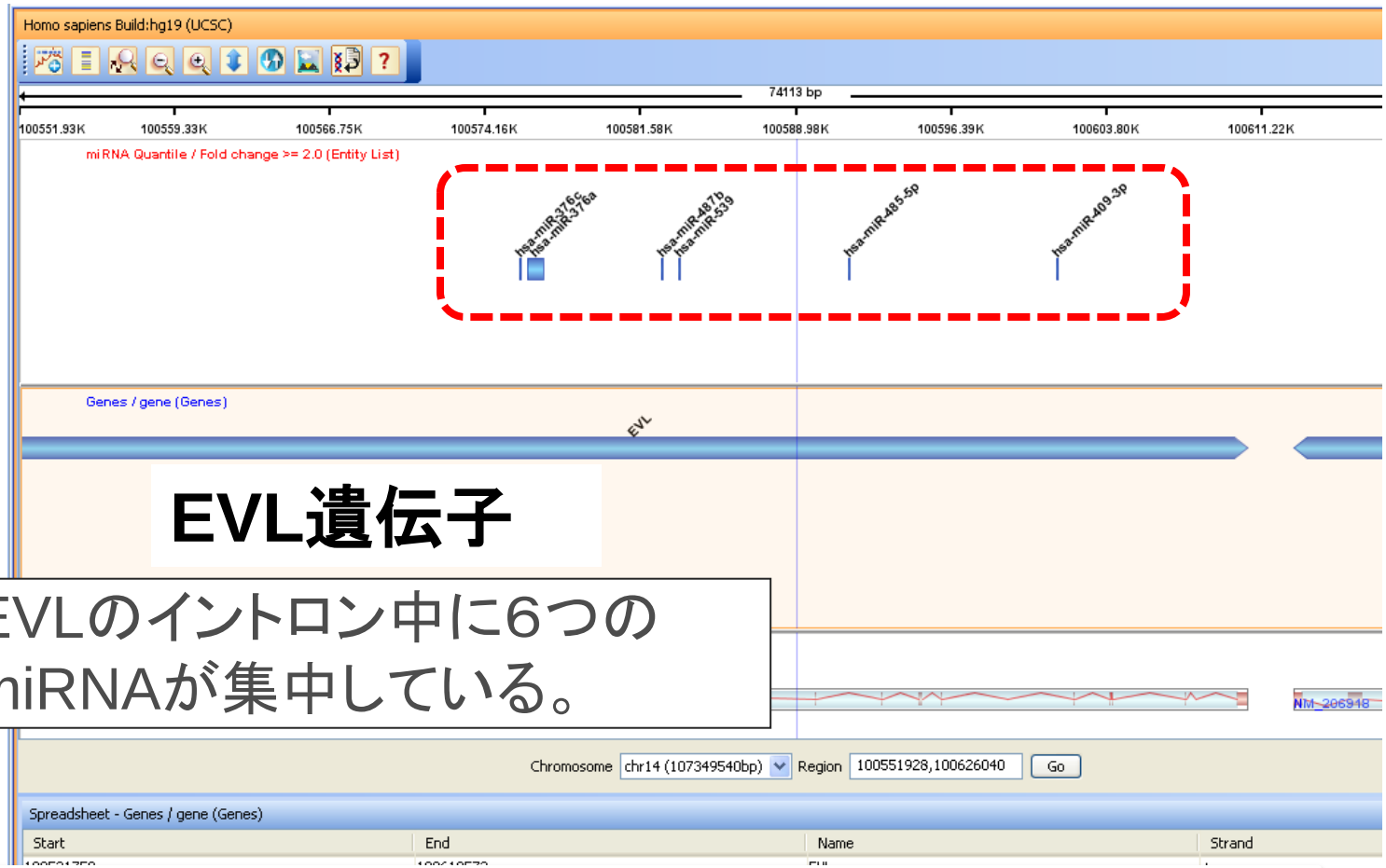
Long survivorで発現が上がった
miRNAのみをプロット

GXゲノムブラウザで確認：miRNA-cluster01



- EML1の下流に3つのmiRNAが集中している

GXゲノムブラウザで確認：miRNA-cluster02



EVL遺伝子

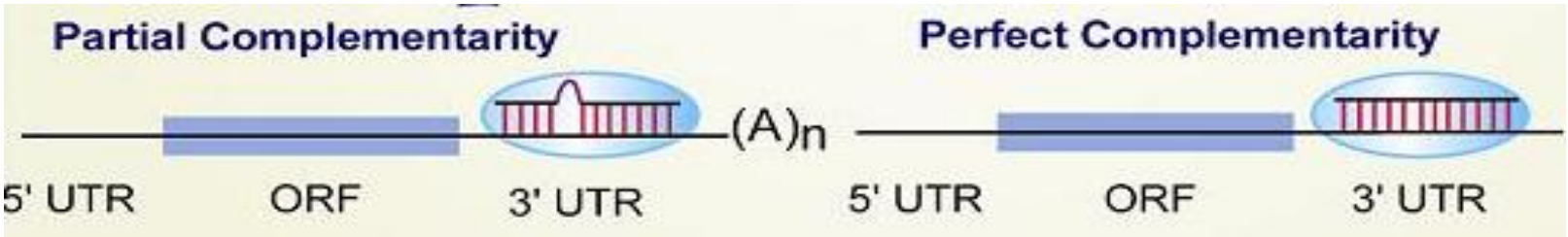
- EVLのイントロン中に6つのmiRNAが集中している。

miRNAとEVL遺伝子が同じプロモーターで転写制御されている可能性を示唆

miRNAのターゲット予測

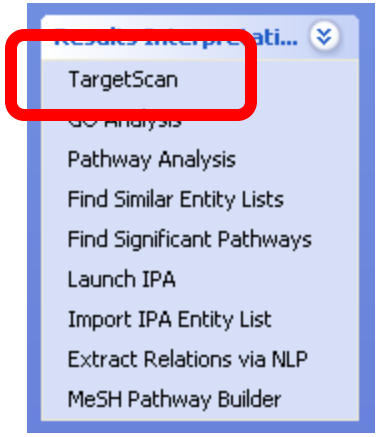
- miRNAがターゲットとしているmRNAを予測し、関連しているmRNAの機能情報等を検索

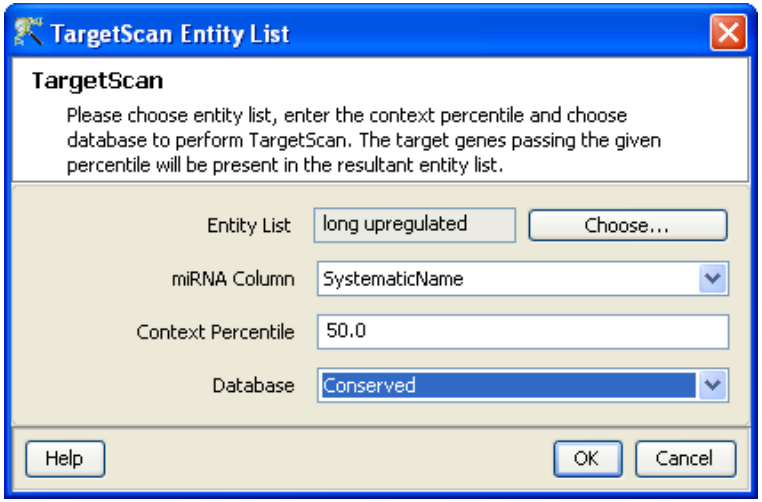
- GeneSpringGXはMITが開発したTargetScanアルゴリズムを利用して、マイクロRNAのターゲットを予測



GX11のTarget Scanによるターゲット遺伝子の予測

- ✓ 複数のmiRNAのターゲット候補遺伝子を一括で検索
- ✓ 多くのGeneが予測される場合は、スコア値の高いターゲット候補遺伝子を抽出することも可能





ターゲット候補遺伝子の抽出、Entity List作成

- 10miRNAsから1035Genesが予測された

（補足）WebのTargetScanを利用する場合

Targt 予測プログラム
PicTar, TargetBoost, MiRanda, miRBase, etc.

TargetScanHuman
Prediction of microRNA targets
Release 5.1: April 2009

Search for predicted microRNA targets in mammals

[Go to TargetScanMouse]
[Go to TargetScanWorm]
[Go to TargetScanFly]

1. Select a species Human

AND

2. Enter a human Entrez Gene symbol (e.g. "LIN28")

AND/OR

3. Do one of the following:

- Select a broadly conserved* microRNA family Broadly conserved microRNA families
- Select a conserved* microRNA family Conserved microRNA families
- Select a poorly conserved microRNA family Poorly conserved microRNA families
- Enter a microRNA name (e.g. "mmu-miR-1") hsa-miR-21

Go to TargetScan Custom if your RNA is not included in the microRNA families listed above.

Submit Reset

TargetScanHuman
Prediction of microRNA targets
Release 5.1: April 2009

Human | miR-21/590-5p
210 conserved targets, with a total of **222** conserved sites and **50** poorly conserved sites.
Table sorted by total context score [Sort table by aggregate P_{CT}]
Genes with only poorly conserved sites are not shown [View top predicted targets, irrespective of site conservation]

Target gene	Gene name	Conserved sites				Poorly conserved sites				Repre-sentative miRNA	Total context score	Aggregate P_{CT}	Previous TargetScan publication(s)	Links to sites in UTRs
		total	8mer	7mer-m8	7mer-1A	total	8mer	7mer-m8	7mer-1A					
YOD1	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog (S. cerevisiae)	**3**	2	0	1	**1**	0	1	0	hsa-miR-590-5p	-0.94	0.91	2007	Sites in UTR
GATAD2B	GATA zinc finger domain containing 2B	**2**	2	0	0	**0**	0	0	0	hsa-miR-21	-0.79	0.84	2007	Sites in UTR
GPR64	G protein-coupled receptor 64	**2**	2	0	0	**0**	0	0	0	hsa-miR-21	-0.79	0.16	2005, 2007	Sites in UTR
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	**2**	1	1	0	**1**	0	1	0	hsa-miR-590-5p	-0.76	0.53		Sites in UTR
PLAG1	pleiomorphic adenoma gene 1	**3**	0	2	1	**1**	0	1	0	hsa-miR-590-5p	-0.75	0.59	2005, 2007	Sites in UTR
RP2	retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive)	**1**	1	0	0	**2**	0	1	1	hsa-miR-590-5p	-0.72	< 0.1	2005, 2007	Sites in UTR
KRIT1	KRIT1, ankyrin repeat containing	**1**	1	0	0	**1**	1	0	0	hsa-miR-590-5p	-0.71	0.38	2005, 2007	Sites in UTR
SCML2	sex comb on midleg-like 2 (Drosophila)	**1**	1	0	0	**1**	0	1	0	hsa-miR-21	-0.70	0.63	2005, 2007	Sites in UTR
BRWD1	bromodomain and WD repeat domain containing 1	**1***	0	0	0	**1**	1	0	0	hsa-miR-590-5p	-0.66	0.45		Sites in UTR
PIP5K3	phosphatidylinositol-3-phosphate/phosphatidylinositol 5-kinase, type III	**1**	1	0	0	**1**	0	0	1	hsa-miR-590-5p	-0.66	< 0.1		Sites in UTR
PHF14	PHD finger protein 14	**1**	0	1	0	**1**	0	1	0	hsa-miR-590-5p	-0.64	0.39	2005, 2007	Sites in UTR
VCL	vinculin	**2**	1	1	0	**0**	0	0	0	hsa-miR-590-5p	-0.64	0.40		Sites in UTR
PLEKHA1	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1	**1**	1	0	0	**1**	0	1	0	hsa-miR-590-5p	-0.64	0.63	2005, 2007	Sites in UTR
FAM13A1	family with sequence similarity 13, member A1	**1**	1	0	0	**1**	0	0	1	hsa-miR-590-5p	-0.63	0.46		Sites in UTR
PDZD2	PDZ domain containing 2	**1**	1	0	0	**1**	0	1	0	hsa-miR-590-5p	-0.60	0.25	2007	Sites in UTR
SATB1	SATB homeobox 1	**2**	0	2	0	**0**	0	0	0	hsa-miR-21	-0.59	0.50	2005, 2007	Sites in UTR
TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	**1**	0	1	0	**1**	0	1	0	hsa-miR-21	-0.59	0.47	2007	Sites in UTR
C17orf39	chromosome 17 open reading frame 39	**1**	1	0	0	**1**	0	0	1	hsa-miR-21	-0.56	0.64	2005, 2007	Sites in UTR
PBRM1	polybromo 1	**1**	1	0	0	**0**	0	0	0	hsa-miR-590-5p	-0.53	0.26	2005, 2007	Sites in UTR
RAB22A	RAB22A, member RAS oncogene family	**1**	0	1	0	**2**	0	2	0	hsa-miR-590-5p	-0.53	0.42		Sites in UTR
MTMR12	myotubularin related protein 12	**1**	0	1	0	**1**	0	1	0	hsa-miR-590-5p	-0.52	0.45		Sites in UTR
CPEB3	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3	**1**	1	0	0	**1**	0	1	0	hsa-miR-21	-0.52	< 0.1	2005, 2007	Sites in UTR

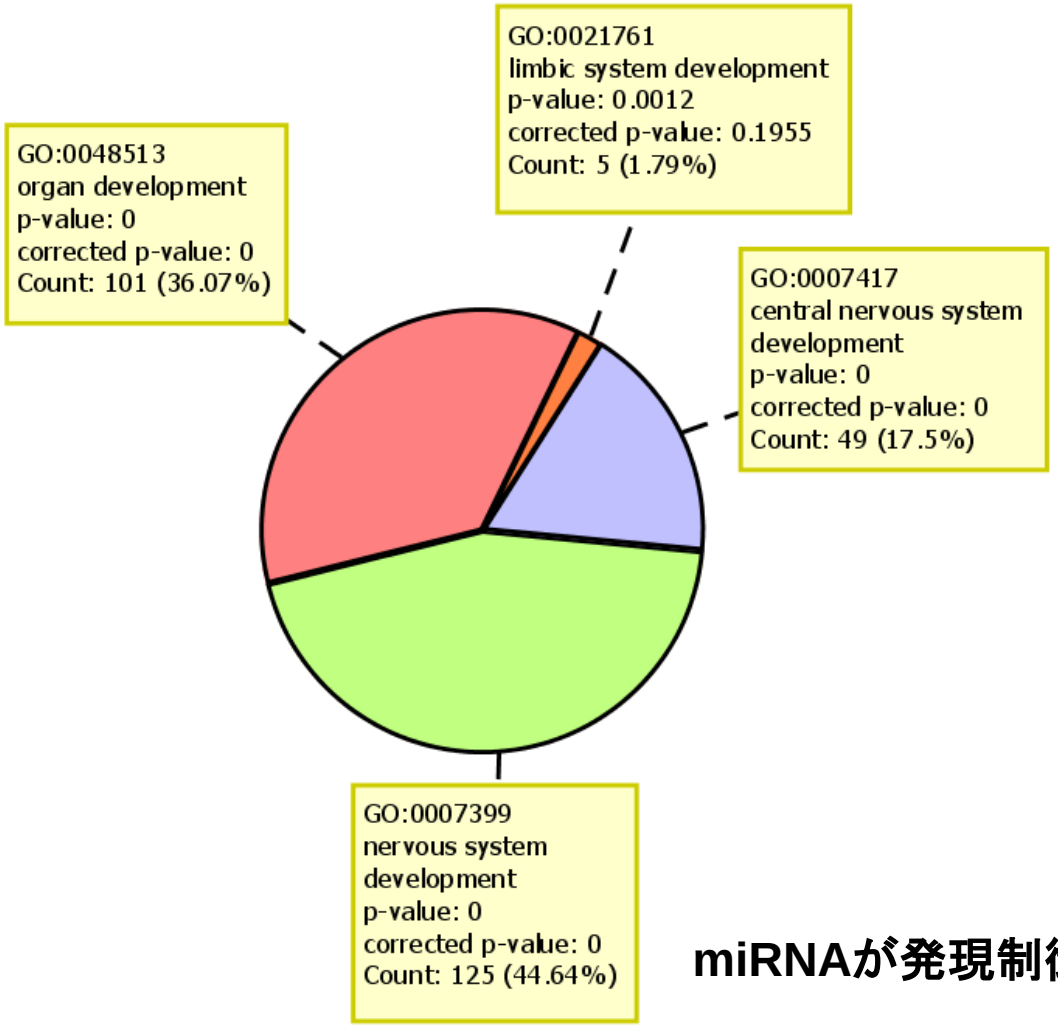
http://www.targetscan.or

Bioinformatics and Research Computing
© 2006-2009 Whitehead Institute for Biomedical Research

1. **miRNA-mRNAの結合領域が既知のモデルにあてはまるか（8mer･7mer-m8･7mer-1A）**
2. **miRNA-mRNA結合領域外の配列相補性**
3. **miRNA-mRNA予測結合領域の30塩基上流･下流のA･Uの有無**
4. **miRNA-mRNA予測結合領域とUTR末端の距離**

ターゲット遺伝子の内訳

- System Development以下のGOカテゴリで解析



miRNAが発現制御する遺伝子を予測

mRNAデータ解析- GSE16237

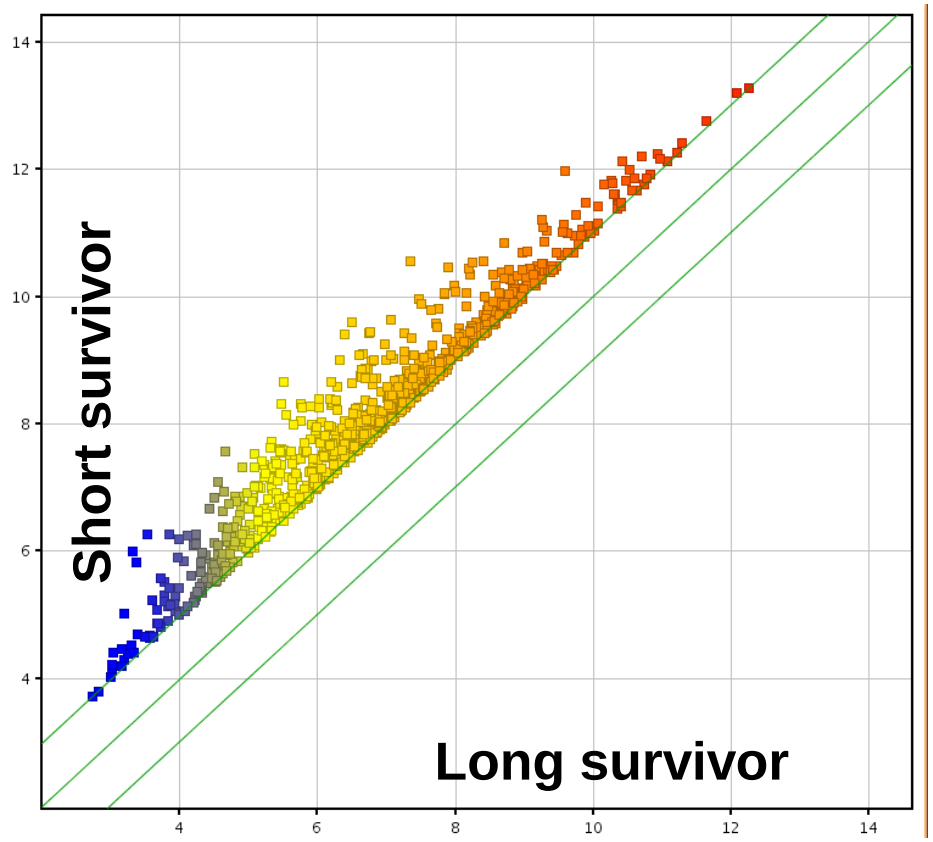
Series GSE16237	Query DataSets for GSE16237
Status	Public on Sep 01, 2009
Title	Expression data of human neuroblastoma tissue samples
Organism	Homo sapiens
Experiment type	Expression profiling by array
Summary	The prognosis of the patients with neuroblastoma largely depends on the biological characterisitics. Neuroblastoma tissues obtained before any treatments were analyzed for gene expression using Affymetrix array. We used microarrays to detail the global programme of gene expression distinguishing tumor biology of neuroblastoma tisses from the prognosis of the patients.
Overall design	51 neuroblastoma samples were selected those resected from the patients who died of tumor progression and those whose tumor regressed or matured spontaneously. Total RNA was extracted from these tissues samples and hybridized on Affymetrix microarrays. We sought to obtain genes to distinguish unfavorable tumors from favorable tumors.

- アレイ：Affymetrix HGU-133 Plus2
- Short survival < 36month (N=6)
- Long survival > 36month(N=6)

GEO(Gene Expression Omnibus)からアレイデータを取得

Long Survivorで低発現なmRNAを抽出する

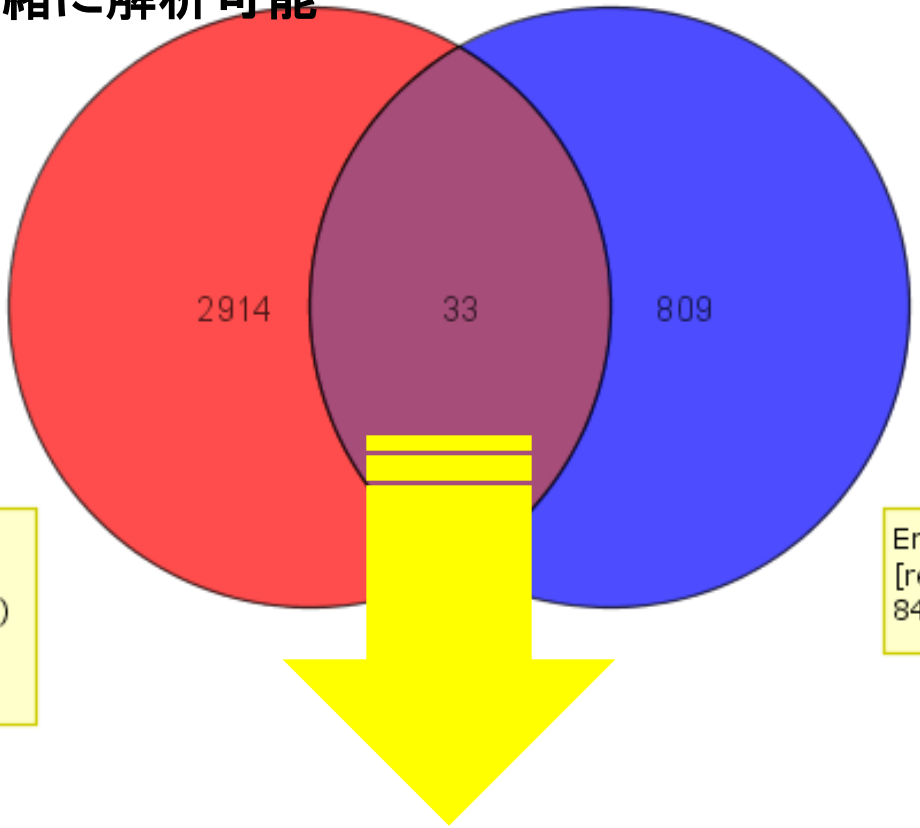
- Filter on Expression level > 20%ile 1out of 20
- Fold change >< 2fold
- Unpaired t-test FDR < 0.05
- Long survivor<2fold
- 842 probes



miRNA解析結果とmRNA解析結果の比較

異なるプラットフォームでも
GX11なら簡単に一緒に解析可能

Long survivor高
発現miRNA
のターゲット遺伝子



Long
survivor低
発現mRNA

Entity List 1 : TargetScan list, percentile = 50.0 (Translated from Copy of New Experiment) 2947 entities

Entity List 2 : Filtered List on [regulation equals down] 842 entities

Long survivorで発現しているmiRNAにより
抑制されると予測された33 probes

GO Analysis

DNA結合・RNA結合関連の遺伝子が、Short survivorでは発現が高くなっている

GO ACCESSION	GO Term	p-value	corrected p-value	Count in Selection
GO:0005622	intracellular	0.00359	0.473832	11
GO:0044424	intracellular part	0.001902	0.473832	11
GO:0043227	membrane-bounded organelle	0.002255	0.473832	8
GO:0003676	nucleic acid binding	1.01E-04	0.311792	8
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	0.002251	0.473832	8
GO:0003723	RNA binding	0.003695	0.473832	5
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	0.005944	0.482217	2
GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	0.002495	0.473832	2
GO:0048770	pigment granule	0.006687	0.482217	2
GO:0042470	melanosome	0.006687	0.482217	2
GO:0032301	MutSalpha complex	0.00265	0.473832	1
GO:0032300	mismatch repair complex	0.006613	0.482217	1
GO:0032143	single thymine insertion binding	0.00265	0.473832	1
GO:0032142	single guanine insertion binding	0.003973	0.473832	1
GO:0032139	dinucleotide insertion or deletion binding	0.005294	0.482217	1

癌関連9遺伝子

Biomarker

Molecule Annotations

ADD TO MY PATHWAY | ADD TO MY LIST | CUSTOMIZE TABLE

Symbol	Synonym(s)	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Biomarker Application	Drug(s)
MSH6	AU044881, AW550279, GTBP, Gtmbp, HNPCC5, HSAP	mutS homolog 6 (E. coli)	Nucle			
RRM2	AA407299, MGC113712, MGC116120, R2, Ribonucleoside-diphospha Ribonucleotide reductase RIBONUCLEOTIDE REDUC Rnr-r2, RNRII, RR2, RR2M	ribonucleotide reductase M2	Nucle			
SFRS1	1110054N12Rik, 5730507C05RIK, 6330415C05Rik, AI482334, ASF, AW491331, LOC688114, MGC5228, SF2, SF2/ASF, SF2p33, SRp30a	splicing factor, arg rich 1				
YWHAE	14-3-3 EPSILON, 14-3-3 L, 14-3-3E, AU019196, FLJ45465, FLJ53559, KCIP-1, LOC727845, MDCR, MDS	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	Cytop			
SOX11	1110038H03RIK, 6230403H02RIK, AI836553, end1	SRY (sex determining region Y)-box 11	Nucleus	transcription regulator		
PDIA6	1700015E05Rik, AL023058, C77895, CaBP1, CaBP5, ERP5, P5, PDIA6 isoform 2, PDIR5, Protein disulfide isomeras Similar to disullide isomera TXNDC7	protein disulfide isomerase fa A, member 6				
EIF4B	2310046H11RIK, AL024095, C85189, Eif4a2, eIF4B, MGC94923, PRO1843	eukaryotic translation initiation factor 4B	Cytoplasm	translation regulator		
DSCC1	2010006I05Rik	defective in sister chromatid	unknown	other		

Selected/Total molecules : 0/9

human MSH6 gene has been used as a biomarker for diagnosis of Colon Cancer.
Link to reference American Association for Cancer Research (AACR) Meeting Abstracts.
Source: GVK Biosciences

human RRM2 gene has been used as a biomarker for diagnosis of non-small cell lung cancer.
Link to reference American Society of Clinical Oncology (ASCO).
Source: GVK Biosciences

human SFRS1 gene has been used as a biomarker for diagnosis of ovarian cancer.
Link to reference American Society of Clinical Oncology (ASCO).
Source: GVK Biosciences

human YWHAE protein has been used as a biomarker for diagnosis of cervical cancer.
Link to reference American Association for Cancer Research (AACR) Meeting Abstracts.
Source: GVK Biosciences

RRM2インヒビターはNervous system tumorの治療薬としてPhaseII臨床試験中

Findings: affects central nervous system tumor (2/2)

Review the information that supports the gene-to-function relationship. Click the plus icon to view the reference information.

PlainText EXPORT REFERENCES

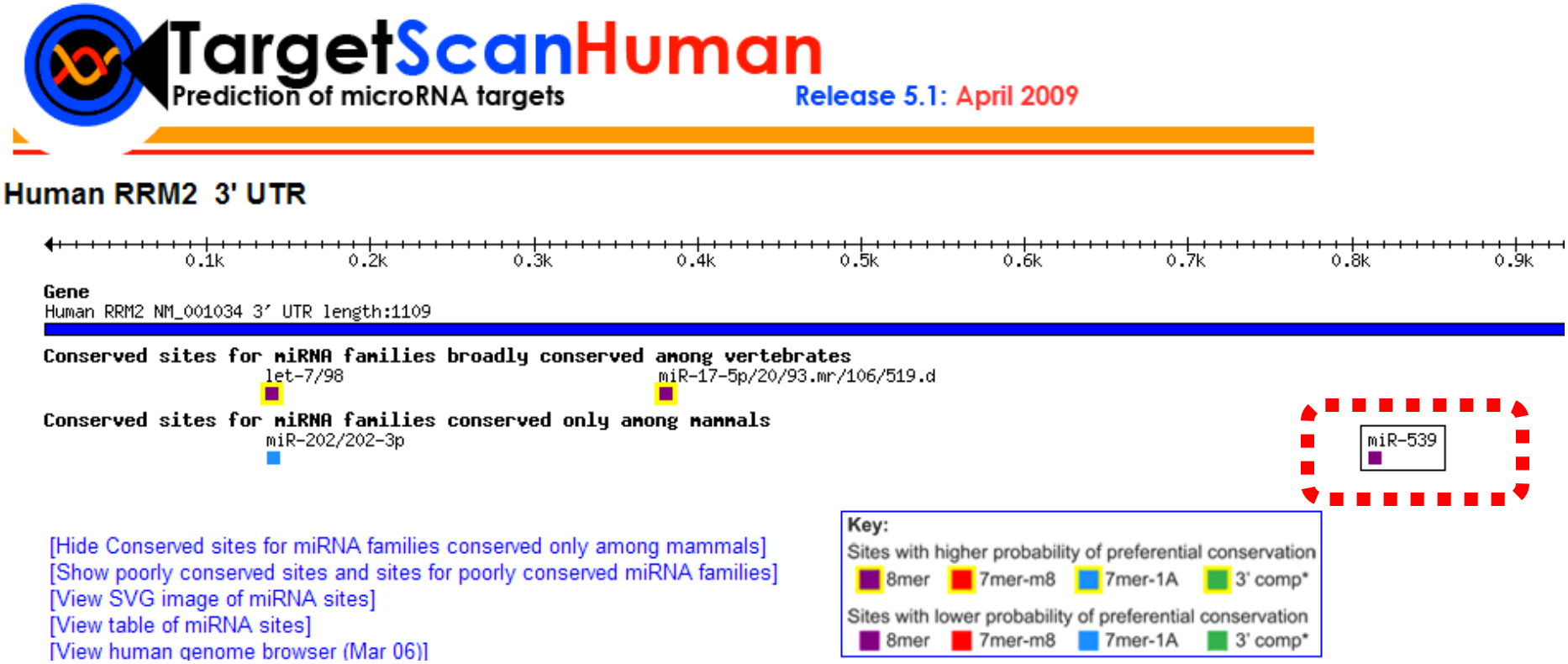
Findings 1 to 5 of 5 Expand All

- ⊞ **Hydroxyurea**, an inhibitor of human **RRM2B** protein, is in Phase II clinical trial for the treatment of central nervous system tumor.
- ⊞ **Hydroxyurea**, an inhibitor of human **RRM2** protein, is in Phase II clinical trial for the treatment of central nervous system tumor.
- ⊞ **Gemcitabine**, an inhibitor of human **RRM2** protein, is in Phase II clinical trial for the treatment of central nervous system tumor.
- ⊞ **Hydroxyurea**, an inhibitor of human **RRM2** protein, is in Phase II clinical trial for the treatment of central nervous system tumor.
- ⊞ **Hydroxyurea**, an inhibitor of human **RRM2B** protein, is in Phase II clinical trial for the treatment of central nervous system tumor.

Findings 1 - 5 of 5

今回ピックアップしたhsa-miR-539で抑制しても癌に効くのだろうか？？

hsa-miR-539 >>> RRM2



miRNAアレイとmRNAアレイを組み合わせて用いることで、
マーカー探索や機能解析を行う遺伝子の絞り込みが可能