

redundancy. In theory, the wrapper model should provide more accurate classification results than the filter model (Langley, 1994). Wrappers use classifiers to estimate the usefulness of feature subsets. The use of optimal feature subsets should provide corresponding classifiers with better classification accuracy because the features are selected according to their contribution to the classification accuracy of the classifiers. The disadvantage of the wrapper approach is its computational expense because the classifier must be repeatedly constructed to evaluate a subset during the CV process. Moreover, wrapper-type feature selection is sensitive to training data and runs the risk of over-fitting, leading to a lack of robustness in the selected gene set.

6 ROBUSTNESS OF THE SELECTED GENE LIST

Although many methods have been developed for conducting feature selection on microarrays, these selection methods produce selected gene lists that are insufficiently robust. If the predictor developed with one selected gene set would work well on data from other studies, then we would not have had to worry about list diversity. However, a lack of transferability of predictive power is often observed as a result of the same reason that causes instability of gene lists. Ein-Dor, Zuk and Domany 2006 found that the gene lists developed from microarrays using different methods in prognostic cancer studies differ significantly, even for different subsets of the same microarray data sets. They concluded that thousands of samples are needed for robust gene selection. As generating a more stable gene list will lead to more robust predictors, we must evaluate not only prediction performance but also the robustness of gene sets in feature gene selection. Assessing the stability of selected gene lists is crucial to guarantee their controlled and reliable utilization.

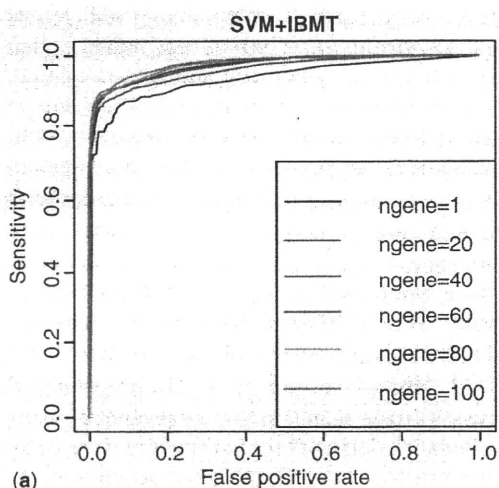
7 APPLICATION OF FILTER AND WRAPPER METHODS TO DIAGNOSTICS OF DRUG TOXICITY USING TOXICOGENOMICS DATA

Our previous study on concurrent diagnosis of drug-induced tubular injury using TGP data demon-

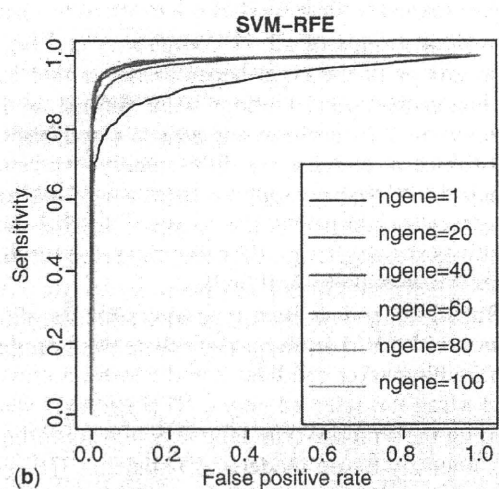
strates the application of filter- and wrapper-type methods (Kondo *et al.*, 2009). Drug-induced renal tubular injury is a major concern in pre-clinical safety evaluations. In this study, we analyzed 33 nephrotoxics and eight non-nephrotoxic hepatotoxics to elucidate time- and dose-dependent global gene expression changes associated with proximal tubular toxicity. The compounds were administered orally or intravenously once daily to male Sprague-Dawley rats. The animals were exposed to four different doses of the compounds, and kidney tissues were collected on days 4, 8, 15, and 29. High-dose groups of 23 compounds that caused necrosis, degeneration, or regeneration in the renal tubules during chronic exposure were defined as the positive set (other high-dose groups of 10 nephrotoxics were used as the external test set). Low-dose groups of all 41 compounds and high-dose groups of the eight hepatotoxics that had no histopathological findings were defined as the negative set. To perform supervised classification algorithms after selecting differentially expressed genes, the microarray samples treated with nephrotoxics and hepatotoxics were divided into positives and negatives of the training set according to their histopathological findings.

Both filter- and wrapper-type gene selection algorithms with SVM-learning algorithms were used to extract biomarker candidates and construct classifiers using the selected genes. RFE methods were used for the wrapper-type gene selection algorithms and intensity-based moderated *t*-statistics (IBMT; Sartor *et al.*, 2006) was used as a filter-type gene selection algorithm (SVM was used as the classifier in this case).

Fivefold CV was executed for optimization of the classifiers and to calculate their prediction accuracies. First, the whole positive and negative training data sets were randomly divided into five subsets of roughly equal size. The SVM was trained with a selection of optimal genes on four subsets and then applied to the fifth subset as the test data set. Before the SVM was trained, optimal genes were selected from the training sets with both RFE-SVM and IBMT-SVM. The 99 top-ranked genes from each selection strategy were used to construct the classifiers. The prediction model using the top-ranked 99 feature genes exhibited saturated prediction performance (Figures 2 and 3). Thus, by tracing the prediction performance of each constructed classifier for the test sets, we determined an appropriate



(a)

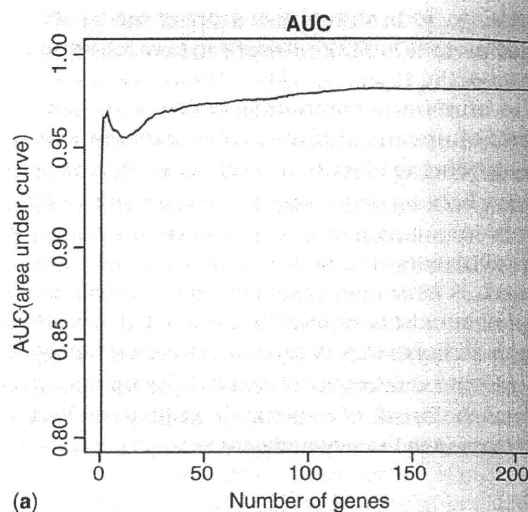


(b)

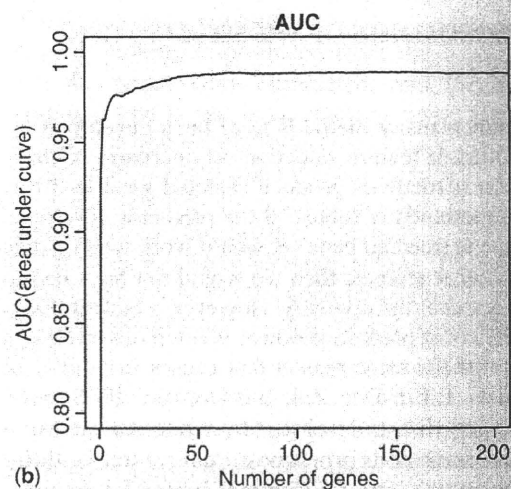
Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curves for feature gene subsets selected using SVM-IBMT (a) and SVM-RFE (b).

threshold number of feature genes, which is one of the challenges in executing search algorithms.

As the result of fivefold CV, we determined the sensitivity of each classifier to be 94% (RFE-SVM; 99 probes) and 93.8% (IBMT-SVM; 99 probes), when we allowed for 10% false positives (Figure 2). Although SVM-RFE exhibited the higher classification accuracy, as we expected, the concordance rate of the feature gene list selected by RFE between the subtraining sets of fivefold CV was lower than that of the filter-type IBMT-SVM (Figure 4). The difference in concordance rate indicates that the RFE-SVM classifier may have over-fitted to the training set, resulting in an insufficiently robust



(a)



(b)

Figure 3. Area under curves (AUC) of the ROC curves by SVM-IBMT (a) and SVM-RFE (b), along with the number of selected feature genes.

list of biomarkers. In contrast, the feature genes selected by IBMT-SVM were stable between different training data sets generated through fivefold CV. As noted above, in addition to the prediction performance of the constructed classifier, the robustness (stability) of the selected gene sets is critical to successful feature selection. Therefore, in this case using TGP kidney data sets, we concluded that the filter-type IBMT-SVM method was the preferable gene selection and classification algorithm.

Consequently, we determined the appropriate marker gene set using the following criteria: (a) the prediction accuracy was saturated (Figure 3); (b) the

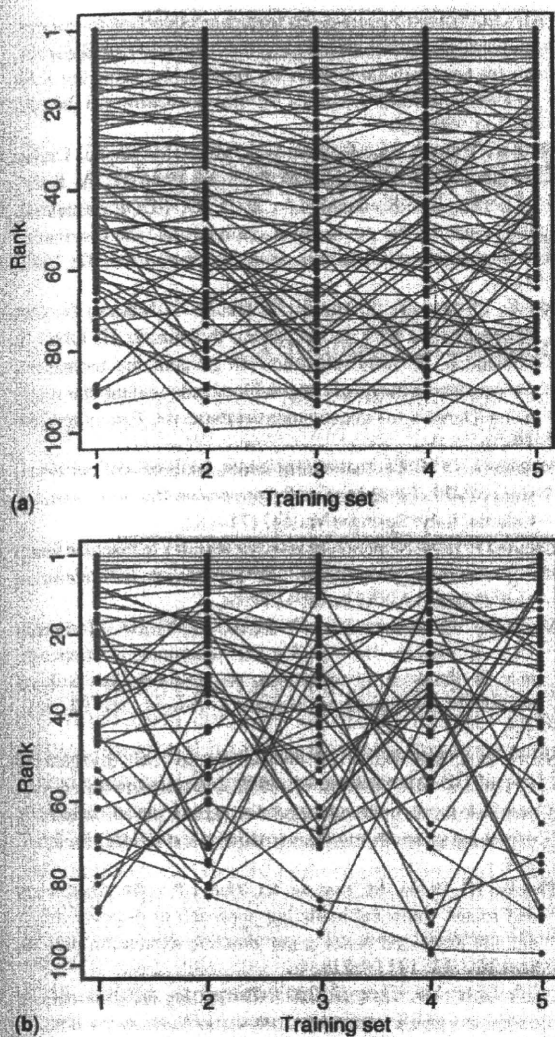


Figure 4. Perturbation of feature gene ranking between different training sets generated during fivefold CV. The horizontal axis indicates the training subsets and the vertical axis indicates the ranking of the feature genes (top 80 probes). Fivefold CV was executed by randomly dividing samples.

number of support vectors was adequately low (an excessive number of support vectors could indicate over-fitting of the linear SVM classifier) (Figure 5), and (c) the number of feature genes was substantially lower than the number of samples, to avoid over-fitting.

Also, the selected gene list contained enough key genes to interpret their biological relevance in drug-induced renal tubular injury. The gene list contained well-known biomarkers, such as kidney

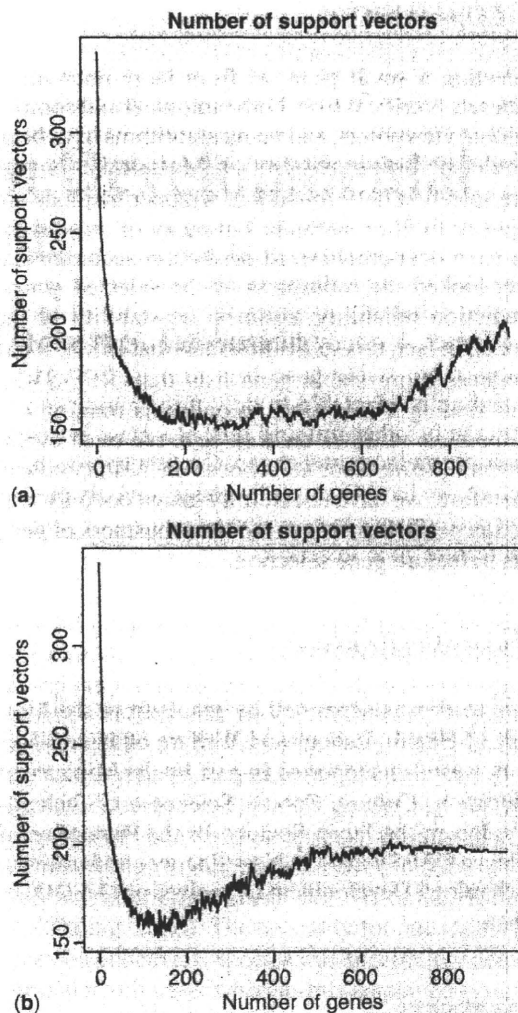


Figure 5. The number of support vectors in the constructed models of SVM-IBMT (a) and SVM-RFE (b), along with the number of selected feature genes.

injury molecule 1, ceruloplasmin, clusterin, and tissue inhibitor of metalloproteinase 1, as well as novel biomarker candidates. Most of the genes involved in tissue remodeling, immune/inflammatory response, cell adhesion/proliferation/migration, and metabolism were predominantly up-regulated. Down-regulated genes participated in cell adhesion/proliferation/migration, membrane transport, and signal transduction. This indicates that the gene list provides us with elaborate knowledge about mechanistic toxicology.

8 CONCLUSIONS

Selecting a small gene set from large microarray data sets is critical from both biological and computational viewpoints, and many algorithms have been developed for feature selection. Most studies on feature selection have found that wrapper methods are superior to filter methods, but many of these studies have over-emphasized prediction accuracy and over-looked the robustness of the selected genes. Prediction reliability assumes the stability of the model. In fact, this study illustrates that IBMT-SVM produces more stable gene lists than RFE-SVM. This finding is adaptable to only this training set. In the case of other training sets, we must evaluate multiple methods and choose the best approach. Therefore, we have to carefully gauge not only prediction performance but also the robustness of gene sets in feature gene selection.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. This work was also supported in part by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan; the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS); and the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) of Japan.

REFERENCES

- Bishop CM. 1995. *Neural Networks for Pattern Recognition*. Oxford University Press: London, UK.
- Boverhof DR, Zacharewski TR. 2006. Toxicogenomics in risk assessment: application and needs. *Toxicol. Sci.* **89**: 352–360.
- Cunningham ML, Lehman-McKeeman L. 2005. Applying toxicogenomics in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol. Sci.* **83**: 205–206.
- Ein-Dor L, Zuk O, Domany E. 2006. Thousands of samples are needed to generate a robust gene list for predicting outcome in cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**: 5923–5928.
- Hall MA. 2000. Correlation-based feature selection for discrete and numeric class machine learning. *Proceedings of the Seventeenth International Conference on Machine Learning Table of Contents*, San Francisco, CA: Morgan Kaufmann Publishers Inc. 359–366.
- Hayes KR, Vollrath AL, Zastrow GM, McMillan BJ, Craven M, Jovanovich S, Rank DR, Penn S, Walisser JA, Reddy JK, Thomas RS, Bradfield CA. 2005. EDGE: a centralized resource for the comparison, analysis, and distribution of toxicogenomic information. *Mol. Pharmacol.* **67**: 1360–1368.
- Kondo C, Minowa Y, Uehara T, Okuno Y, Nakatsu N, Ono A, Maruyama T, Kato I, Yamate J, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T. 2009. Identification of genomic biomarkers for concurrent diagnosis of drug-induced renal tubular injury using a large-scale toxicogenomics database. *Toxicology* **265**: 15–26.
- Kononenko I. 1994. Estimating attributes: analysis and extensions of RELIEF. *European Conference on Machine Learning*, Catania, Italy: Springer Verlag, 171–182.
- Langley P. 1994. Selection of relevant features in machine learning. *Proceedings of AAAI Fall Symposium on Relevance*, New Orleans: AAAI Press, 140–144.
- Mattingly CJ, Rosenstein MC, Davis AP, Colby GT, Forrest JN, Jr, Boyer JL. 2006. The comparative toxicogenomics database: a cross-species resource for building chemical-gene interaction networks. *Toxicol. Sci.* **92**: 587–595.
- Sartor MA, Tomlinson CR, Wesselkamper SC, Sivaganesan S, Leikauf GD, Medvedovic M. 2006. Intensity-based hierarchical Bayes method improves testing for differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Bioinf.* **7**: 538.
- Thomas JG, Olson JM, Tapscott SJ, Zhao LP. 2001. An efficient and robust statistical modeling approach to discover differentially expressed genes using genomic expression profiles. *Genome Res.* **11**: 1227–1236.
- Tsai C-A, Chen Y-J, Chen JJ. 2003. Testing for differentially expressed genes with microarray data. *Nucl. Acids Res.* **31**: e52.
- Urushidani T, Nagao T. 2005. *Toxicogenomics: the Japanese initiative*. In *Handbook of Toxicogenomics – Strategies and Applications*, Borlak J (ed). Wiley-VCH: Weinheim; 623–631.
- Vapnik VN. 1998. *Statistical Learning Theory*. Wiley, New York.
- Waters M, Boorman G, Bushel P, Cunningham M, Irwin R, Merrick A, Olden K, Paules R, Selkirk J, Stasiewicz S, Weis B, Van Houten B, Walker N, Tennant R. 2003. Systems toxicology and the chemical effects in biological systems (CEBS) knowledge base. *EHP Toxicogenomics* **111**: 15–28.

別刷り

毒性評価 トキシコゲノミクス

同志社女子大学 薬学部 教授／医薬基盤研究所 基盤的研究部

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクトリーダー 漆谷 徹郎

● 第2章 創薬分野への応用

第2節 毒性評価 トキシコゲノミクス

1. 創薬における 毒性試験とゲノム解析

図1に創薬過程を模式的に示した。旧来の創薬は、図の上のような経過をたどっていた。まず、創薬ターゲットを絞るために、対象疾患を決定する。次に、動物で病態モデルを作成する。このモデルを用いて出発化合物を発見するのであるが、このスクリーニング効率が最も重要であって、候補化合物の合成が律速になることはあまりなかった。通常製薬会社には多くの化合物ライブラリーがあり、また天然物には無限といえる多種多様な成分が存在しているため、スクリーニング効率が律速となっていたのである。

モデル動物による出発化合物の最適化と並行して、動物を用いた候補化合物の毒性評価がなされてきた。問題は、これら非臨床試験の臨床への外挿性である。病態モデルは必ずしも臨床の病態を反映したものとは限らなかった。たとえば現在、消化性潰瘍の主因は *Helicobacter pylori* であることが定説であるが、現在繁用されている潰瘍治療薬は(除菌薬

を除き)感染症モデルを用いて開発されたものではない。幸いなことに、潰瘍治療薬の臨床での有効性は抜群であったが、「非常に有効な、ラットに限定された治療薬」なるものが生み出されてしまい、臨床開発を断念した例は多い。

このような状況にパラダイムシフトをもたらしたのがヒトゲノムプロジェクトである。図1の下は、ポストゲノム時代の創薬スキームを示す。創薬ターゲットとしてヒト型のタンパク質を設定することが可能になり、標的タンパク質が病因に関係している限り、その有効性は保証されている。問題は薬物動態の種差であったが、これも、ヒト型薬物代謝酵素やトランスポーターが容易に入手できるようになり、急速に予測性が改善されてきた。1991年の米国の調査によれば、過去10年間に開発中止となった薬物の中止理由のうち、最大のもは薬物動態(40%)であり、毒性関係は20%程度であったが、2000年の調査では、薬物動態を理由とするものが10%を割り、相対的に毒性関係が40%近くまで達している¹⁾。2000年時点ではヒトゲノムプロジェクトの直接の成果はまだ反映されていないが、網羅的ゲノム解析に先行して、代謝酵素やトランスポーターの解析がなされたことが大きく寄与したのは明らかである。したがって、ヒトゲノムプロジェクトが完了した後は、創薬効率が飛躍的に伸びると誰もが予想していた。

しかしながら、この予想は二つの面で外れることになる。一つは、ヒトゲノムは決して創薬ターゲットの宝庫ではなかったことである。重要な疾患のターゲットの多くは、旧来の手法で既に研究し尽くされており、新たに疾患関与性の濃い因子が見出されても、非常に特殊な疾患のターゲットにしかならないことが多かった。もう一つの期待外れは、副作用に関するものであった。重大な副作用により、市場から撤退する薬物はあとを絶たず、最近ではかえって

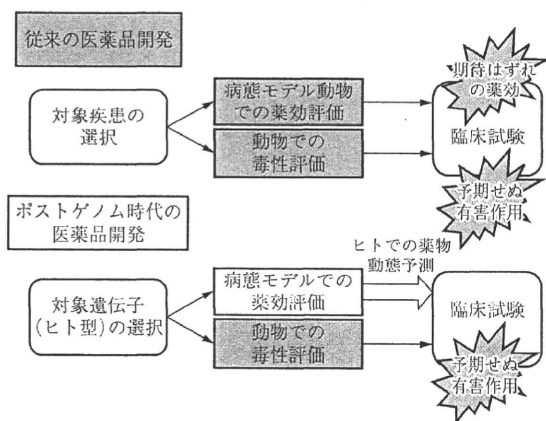


図1 創薬過程の変遷

数が増えている。これは明らかに、薬物作用の特異性・有効性と、使用上の安全性は異なった次元の問題であることを示している。創薬ターゲットは現在ほぼ100% ヒト型が利用できるが、安全性研究はこの進歩を享受できず、相変わらず動物を用いた旧態然の安全性試験を行わざるを得ない。これでは、臨床における予期しない副作用発現の頻度は低下するはずがない。

臨床での医薬品安全性における重要な要素として、いわゆる idiosyncrasy (特異体質) がある。近年問題になった、大型新薬の市場撤退の例として、トログリタゾン²⁾やセリバスタチン³⁾があるが、これらの有害作用の発生率は、数十万例に1例でしかない。数千例の動物実験ですら非現実的であり、種差が全くないとしても、動物試験でこの副作用を予測することは事実上不可能である。それでも安全性予測が可能とするなら、図2のような仮定が必要である。ここで横軸を用量、縦軸を毒性の発生率とすると、臨床用量域 A では発生率が低すぎて検出できない毒性 X も、毒性発生率が用量依存的に増加するならば、いずれ検出が可能となると期待できる(曲線右)。しかしながら多くの場合、注目している毒性以外にも、多くの臓器において種々の毒性が発現する。もし、その中に動物にとって致死的な毒性があり、その発生率が左側の曲線のようにであれば、毒性 X の検出はきわめて困難となる。用量域 C では理論的に検出不能であり、用量域 B でも検出はきわめて困難であろう。実際の例としては、非ステロイド系抗炎症薬による肝障害や腎障害がある。臨床の場でこれらの発生は無視できないが、ラットに

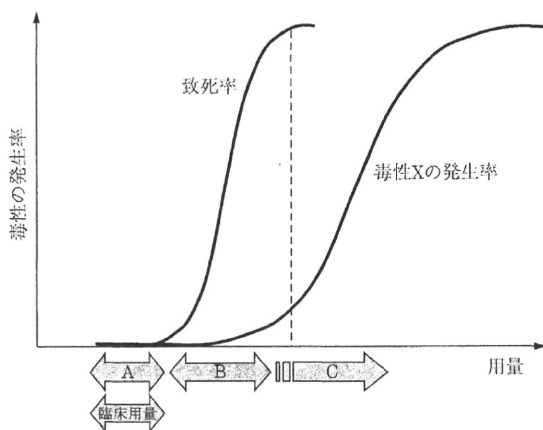


図2 仮想的な用量・毒性曲線

連続投与すると、低用量でも消化管穿孔で死亡するため、典型的な肝障害や腎障害を観察することは難しい。さらに、この議論は、個体差を考慮していない。臨床では、ある特定の遺伝子型や病態をもつ集団に発生リスクが高いことが idiosyncrasy の原因だとすれば⁴⁾、これを反映しないような、遺伝的に均一な動物の実験から予測が不可能なことは自明であろう。

環境中物質や、食品添加物などの場合と異なり、医薬品は生体に働きかけることを前提として積極的に投与するものである。したがって、NOEL (No Observable Effect Level) は原理的にあり得ず、リスクとベネフィットを秤にかけたうえで、NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) を超えた量でさえも投与される。薬の専門家でない人々がよく発する言葉に、「副作用のない薬を目指す」というものがある。これは原理的にはあり得ないのであるが、「有害作用を最小とするために、起こりうる有害作用の内容と、起こりやすい集団の性質を前もって把握し、備えておくこと」は重要である。そのためには、毒性発現のメカニズム解析が最大の武器になる。しかし、ターゲットを絞って開発された薬物の作用機序の解析とは異なり、毒性発現の可能性は無限にある。これらすべてを事前にチェックすることは原理的に不可能であると、誰もが考えていた。極端な言い方をすれば、古典的な毒性試験は、「やっても効果はないが、やることに決まっているから義務的に行うもの」という一面をもっていた。しかし、オミクステクノロジーの登場によって、膨大な数のパラメータを網羅的に測定することが可能になり、これこそが、トキシコロジーに最も有用な技術であるとの期待が集まった。

2. トキシコゲノミクスとは

「全体を測定する学問・技術」のオミクステクノロジーのうち、遺伝子全体＝ゲノムを扱うゲノミクスを、毒性学＝トキシコロジーに応用したものがトキシコゲノミクスである。ゲノミクスの解析手法に関しては第1編4・5章で詳細な解説がなされており、トキシコゲノミクス特異的な方法論があるわけではないので、ここでは創薬における安全性研究に応用

する場合の問題点に絞って論ずる。

トキシコゲノミクスという用語は通常2種類の意味に使われる。一つは「遺伝子型によって毒性発現が異なるという現象」を網羅的に解析する、というものである。薬理学＝ファーマコロジーにゲノミクスを組み合わせたファーマコゲノミクス、すなわち、遺伝子型による薬効解析では、臨床における薬物代謝に関連づけた解析の成功例が多く、ファーマコゲノミクスといえ、薬物代謝酵素のSNPsに起因する薬物動態の個体差の解析を意味するかのような勢いを示している。他方、網羅的遺伝子発現解析による毒性研究を指す場合がある。網羅的遺伝子発現＝トランスクリプトームであるから、トキシコトランスクリプトミクスと呼ぶべきであろうが、これもトキシコゲノミクスと呼び習わす。

前者のトキシコゲノミクスの場合、これはかなり有望な戦略といえよう。現在各方面で、患者のジェノタイプと病気についてのデータベース構築が進行している。2007年のScience誌においてHuman Genetic Variationがbreakthrough of the yearに選ばれたことでも分かる（<http://www.sciencedaily.com/releases/2007/12/071220140817.htm>）。疾患と遺伝子型の関連は、現在最も注目されている領域の一つである。たとえばある疾患について、疾患関連遺伝子の遺伝子型（主にSNPs）についてロジスティック解析を行えば、数学的に厳密な予測モデルが構築可能である。現在は各病態に対する寄与度の大きい遺伝子が解明途上であるため、個々の疾患例についての将来予測は困難であるものの、ある集団における予測性は向上している。生活習慣病のような多因子疾患の場合には、旧来の診断法と大差ないという批判⁵⁾もあるが、遺伝子の選択とデータの蓄積により、大幅な改良が望める。データ集積は、SNPsアレイの使用により加速されると思われる。

この方法の最大の強みは、遺伝子型には生物学的なばらつきが全くないことである。この方式は、発病率ばかりでなく、医薬品の副作用予測にも応用できよう。しかしながら、動物を用いた非臨床試験には、即座に応用することができない。

3.

網羅的遺伝子発現解析による毒性予測

通常トキシコゲノミクスというと、後者のトランスクリプトミクスを安全性試験に応用する場合を指すことが多い。新たに開発しようとする薬物の有害作用は、薬理作用と異なって、どこにどのようなものが現れるのか全く予想がつかないので、すべてを測定する必要がある。これは、たとえばGeneChipを用いれば、ある組織で発現しているすべての遺伝子を定量することができる。

さて、ある薬物によってある組織のすべての遺伝子発現変化を定量できたとしよう。そのデータを用いて、どのようにして臨床につながる安全性予測が可能となるのであろうか。ここには、以下に示す三つの問題がある。

(1) データ処理の問題

遺伝子型の場合と異なり、網羅的発現解析の場合は、測定値に生物学的なばらつきが伴う。以前は、マイクロアレイを用いた定量には再現性が乏しく、結果は必ず定量PCRなどで確認すべきであるとの意見が多かった。しかし、たとえばGeneChipのような、高度な定量化を達成したシステムの場合、定量性の問題はアレイ側にあるというより、生物側の影響が大きいのと思われる。毒性試験は、その性質上第2種の過誤を小さくする必要があるため、あまり第1種の過誤を小さくできない。たとえば数十項目が一斉に測定される血液生化学値のような古典的パラメータは、何ら毒性影響が無くても「統計的有意差」が認められる項目が複数個出現するのが常である。しかしその多くは、統計学的に有意であっても「毒性学的には」有意でないと判断されてきた。しかしながら、網羅的発現解析の場合は、この方法が使えないのである。

ここで、薬物投与による肝臓の遺伝子発現変化を、対照群と処置群それぞれ5例のラットを用いて検出したとしよう。Affymetrix社のGeneChipを用いると、1枚のチップで32000プローブセット（遺伝子数）の測定が可能であるから、32,000組の有意差検定を行うことになる。危険率 $\alpha < 5\%$ で補正なしのt検定を行ったとすると、有意差ありと判定されるペアのほとんどが、全く意味をもたない、偶然の産物である。統計学には多重比較の補正という方

法があるが、たとえば Bonferroni 補正を行って、危険率を $5/32,000=0.00016\%$ としても問題の解決にはならない。「有意差」を示す遺伝子数は激減するであろうが、「毒性学的に有意義な遺伝子の発現変化」の多くは排除されてしまう。このような問題に対して、FDR 法(擬陽性の割合を一定値以下に制御する方法)などが開発されているが、本質的な解決にはならない。

そもそも、いかなる解析を行うにも、解析対象となる項目数とデータ数は同じオーダーでなければならないというのが統計学の基本である。しかし現実には可能な動物実験は各群 10 例以下であり、マイクロアレイのコストを考えると $N=5$ 以下が通常である。数万の項目(遺伝子)に対して、数例のデータでは所詮合理的な解析をすることはできず、解析の前に対象となる遺伝子の絞り込み(フィルタリング)を行う必要がある。しかしながら、どのようにして遺伝子を絞り込むかは、次項の問題とも関連し、この手法の最大の問題点であると言っても過言でない。

(2) 遺伝子発現データと毒性の関連づけ

医薬品の場合、NOEL を投与することはあり得ない。薬効が期待できる用量を投与したとき、有害作用が出るか否かを検討するのが安全性試験であるが、遺伝子発現変化を観察するのみでは、それが毒性か否かを判断することが困難である。

遺伝子発現変化から毒性の評価・予測をする場合、発現変化と病理学的・病態生理学的な表現型(フェノタイプ)を関連づける必要がある。これをフェノタイプアンカーリングというが、トキシコゲノミクス手法における最も重要な課題である。

たとえば薬物 A の肝毒性を評価する目的で、A を投与した動物の肝臓での網羅的遺伝子発現解析を行い、膨大な数の遺伝子の、「生物学的に意味のある」発現変化を観測できたとしよう。このとき、どうすれば遺伝子発現変化から肝毒性の程度を評価できるだろうか。一つの方法は、既知の毒性学的フェノタイプが観測された時点・用量において、これと相関する変化を示す遺伝子を抽出することである。しかしこの戦略では、古典的毒性学を凌駕できない。既知のフェノタイプと完全に相関する遺伝子発現を測定するのであれば、そもそもそのフェノタイプを測定すればよく、わざわざコストのかかる実験をする必要がない。トキシコゲノミクスのメリットを生かすためには、通常の毒性試験より高感度であ

るか、早期に予測できることが必要である。

この2点をクリアする戦略として、あるフェノタイプが現れる用量より低い水準で起こる遺伝子変化、あるいはフェノタイプが現れる時点より以前で起こる遺伝子変化をとらえることにより、高感度・短時間で安全性評価・予測をしようとする試みがある。このことにより、図2で指摘したような問題は回避でき、また、特に発がん実験のように、長期間の投与を必要とする膨大なコストを削減できる可能性がある。しかしこの方式は、遺伝子発現変化と毒性発現の因果関係が保証されないと、意味をなさない。たとえば、Heme oxygenase I(HmoxI)という酵素は、酸化ストレスを引き起こす多くの肝毒性物質によって著明に誘導され、ストレスマーカーとってよい。それでは、HmoxI を誘導する物質は、肝毒性物質と分類してよいだろうか。実際の誘導は、多くの医薬品の薬理量で認められる。医薬品は生体に積極的に働きかけるものであり、何らかの応答は避けられない。問題は、実際の治療において、この酸化ストレスが容認できるか否かにある。また、HmoxI はストレスに対する防御反応と考えられ、ストレス下においては、生体にとって有益な応答である。ここに酸化ストレスを起こす薬物 A, B があって両者とも HmoxI を誘導するが、B は別経路を介してその誘導を抑制するとしよう。表面的には薬物 A の方が危険に思えるが、実際は防御機能の働かない B の方が危険であろう。

フェノタイプアンカーリングを低用量・早期時点に拡張したとき、どのようにして診断・予測の精度を保証するかが大きな重要な課題である。ここで最も望ましいのは、判断の基になる遺伝子群が、毒性学的パスウェイ上に適切に配置され、かつ毒性発現機序が説明されることである。しかしながら現時点では二つの大きな障害がある。一つは、遺伝子のアノテーションの不足である。たとえば GeneChip を使い、有意な変動が観測された遺伝子を抽出したとしても、通常そこには実体の不明な遺伝子が多く含まれている。たとえ命名されている遺伝子であっても、生理機能、特に毒性にどう関与しているのかが分かっている場合はほとんどないのが現実である。抽出された多くの遺伝子を機能分類するには、Gene Ontology Analysis(たとえば、DAVID <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)が使用されるが、これで生理機能を推定するのは困難であり、参考程度の情報

しか得られない。ここでの最大の障害は、毒性学的パスウェイに関する決定的な情報不足である。むしろ、トキシコゲノミクス手法により、毒性学的パスウェイが詳細に明らかにされ、これが毒性診断・予測の精度を上げていく、という正のスパイラルが望まれている。

(3) 種差のブリッジング

最近マイクロドージングの導入により、創薬の早期から候補化合物を人体に投与することが可能となった。しかしながら、これで得られる情報は薬物動態学的性質が主であり、直接的な毒性に関しては人体実験が不可能であることから、何らかの代替法を考えねばならない。トキシコゲノミクス手法を用いた有望な方法としては次の①～④があるが、いずれも決定的なものではない。

① 培養細胞を用いる方法

ヒト由来であっても、培養細胞を用いた実験では、*in vivo* と *in vitro* の差が大きすぎ、現在の技術ではいまだ使用に耐えない。直接の細胞毒性であれば、外挿は可能であろうが、臨床における有害作用は、血流や神経を介したものが多し。また、薬物それ自身ではなく代謝活性化を受けたものが毒性の本体である場合が多いが、一次培養肝細胞であっても、生体のような薬物代謝は再現できない。*in vitro* で再現可能な毒性学的パスウェイをなるべく多く見いだして、これを参照するという使い方が現状ではベストであろう。

② ヒト型臓器をもった動物を用いる方法

これにはマウスなどを利用した二つの方法がある。一つは、ヒト型遺伝子を組み込む(相同遺伝子と置き換えるのが望ましい)方法であり、他方は、ヒトの臓器を移植・定着させる方法である。前者は、すべての関連遺伝子をヒト化することが困難なこと、プロモーター領域込みでヒト化しないとモデルとして成立しないことなどの欠点があり、特定の遺伝子の関与を検討する場合にはよいが、一般的なスクリーニングにはまだ程遠い。後者は、免疫不全マウスの肝臓をヒト肝細胞で置き換えたマウスが作られているが⁶⁾、高価であること、免疫不全状態という特殊な環境下での毒性発現が臨床に外挿できるか、など問題が多く、これも一般化にはまだ遠い。

③ リンパ球を用いたトランスクリプトーム

たとえばラット肝臓の遺伝子発現解析によって、ある医薬品の毒性が良好に予測できたとしても、よ

ほどのことがない限り、患者の肝臓の生検を行って比較することはできない。非臨床データを臨床につなげるには、非侵襲的サンプルで判断することが望まれる。これには、非臨床データから予測される血中あるいは尿中の代替マーカーを提案するか、生検しなくても得られるサンプルの遺伝子発現を測定するしかない。前者の場合、薬物の毒性発現に関連して或る遺伝子の発現が変化したとしても、その遺伝子産物が血中に出てこない限り検出できない。それが分泌されるものなら、毒性に関連した発現変化なのか分泌自体の変化なのか、判断がつかない場合がでてこよう。非分泌型のものであれば、血中で検出されるということは細胞の破壊を意味するから、古典的な逸脱酵素の検出と変わらないことになる。ただし、逸脱酵素よりはるかに感度と特異性が高ければ、血中への臓器特異的 mRNA の漏出を測定する意味はある⁷⁾。

後者の候補としては、血液中のリンパ球がほとんど唯一のものである。薬物投与時に全身で起こる有害作用が、直接あるいは間接的にリンパ球の遺伝子発現変化として反映されることは十分考えられる。実際、ラットにおいて、アセトアミノフェン投与により薬物特異的な遺伝子変化が検出できたとの報告があり⁸⁾、また、臨床研究も進められている。

④ 毒性学的パスウェイを介したブリッジング

これまでの経験では、動物細胞において薬物の毒性に特徴的な遺伝子群の変化が認められたとしても、これらを単純にオルソログ変換したものは、ヒト細胞における発現変化を示す遺伝子群との一致率は高くない。しかし、個々の遺伝子どうしの対応は低いにしても、毒性物質に対する生理・病理的応答は共通性が見いだせる場合が多いようである。そこで、動物実験(*in vivo*, *in vitro*)で得られた結果を、毒性学的パスウェイ上にマッピングして、「ヒトにおいても、このようなメカニズムで毒性の発現する危険がある」ということを提唱することが、最も確実な戦略であろう。ただしこれを実現するには、いわゆるシステムズバイオロジーの飛躍的な進歩が必要である。

(4) 世界の現状とトキシコゲノミクスプロジェクト

遺伝子全体を扱うと、その数が膨大であるために、データ数も大きなものが必要となってくる。必然的に、小さな研究室単位での研究は困難で、巨大なデータベースの構築が必要であることから、コン

ソーシウム形式で、疾患関連遺伝子や薬物代謝関連遺伝子の SNPs データベース構築が世界中で推進されている。

毒性学的トランスクリプトミクスの場合、プラットフォームやプロトコルの違いによりデータの互換性が保証されない場合が多く、多施設で得られたデータを *in silico* で統合しても利用価値の高いデータベースとなるかどうかは疑問である。しかし、コストを考えると、アカデミアでは達成不可能で、欧米の巨大製薬会社でようやく可能となる程度のものである。トキシコゲノミクス技術が開発された当時、わが国の創薬の国際競争力を担保するためには、欧米に伍するデータベース構築が必要であるとの考えから、国衛研と製薬 17 社による官民共同プロジェクトであるトキシコゲノミクスプロジェクトが 2002 年に発足した。これは、安全性試験に使用されるラットに 150 種の医薬品を中心とする化学物質を投与し、肝臓(一部腎臓)の遺伝子発現変化を GeneChip で測定してデータベースとするものであった。このデータベースの特長は、同一プラットフォームで質の高いデータを取得したことと、プロトコルとして用量水準(溶媒対照, 低, 中, 高用量, $N=3$)と時点(単回投与後 3, 6, 9, 24 時間, 連続投与 3, 7, 14, 28 日, $N=3$)を豊富にもつことが挙げられる。用量・時点が豊富であることのメリットは、既報を参照されたい⁹⁾。

プロジェクトではこれ以外に、ヒト凍結肝細胞、ラット一次培養肝細胞でのデータ(溶媒対照, 低, 高用量, 処置後 8, 24 時間, $N=2$)での暴露実験を

行い、一化合物あたり総計 120 枚の GeneChip(腎臓も解析した化合物の場合は 216 枚)を費やしている。これら膨大なデータは古典的毒性学パラメータや病理とひもづけた形でデータベース化し、解析システム、予測システムを組みこんだ統合システム TG-GATEs (ToxicoGenomics project : Genomics Assisted Toxicity Evaluation System) として結実した⁹⁾。2007 年からは、後継プロジェクトにおいて、TG-GATEs を活用することにより、安全性バイオマーカー創出の努力が続けられている (<http://www.tgpnibio.go.jp/>)。現在はバイオマーカー候補の提案の段階であるが、実例の詳細は既報を参照されたい¹⁰⁻¹²⁾。

4. おわりに

わが国におけるトランスクリプトームのデータベースとしては、国衛研毒性部によるマウスの各臓器における化学物質の影響、NEDO によるラットの肝発ガンデータベース(一部 GEO に登録)などがある。表 1 に、現在アクセスできるデータベースを示すが、米国においては現在、製薬企業が中心になったトキシコゲノミクスコンソーシアム、欧州では、オランダが中心となったコンソーシアムが動いている。

2005 年、FDA が新薬の申請時にゲノミクスデータのボランティアサブミッションを開始したことか

表 1 各種データベースと URL

データベースの名称	URL
Array Track	http://www.fda.gov/nctr/science/centers/toxicoinformatics/ArrayTrack/
ArrayExpress	http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/
Chemical Effects in Biological Systems (CEBS)	http://cebs.niehs.nih.gov/cebs-browser/cebsHome.do
Center for Information Biology gene EXpression database (CIBEX)	http://cibex.nig.ac.jp/index.jsp
Comparative Toxicogenomics Database (CTD)	http://ctd.mdibl.org/
dbZach	http://dbzach.fst.msu.edu/
Gene Expression Omnibus (GEO)	http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/
Percellome Project	http://www.nihs.go.jp/tox/TTG_Archive.htm
PharmGKB	http://www.pharmgkb.org/
SYMATLAS	http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/
Tox-MIAMExpress	http://www.ebi.ac.uk/miamexpress/

ら、この分野に注目が集まった(<http://www.fda.gov/Cder/genomics/default.htm>)。またFDAは臨床研究におけるバイオマーカーの重要性を発信しており、今後ますますこの分野における競争が激化すると思われる(<http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/>)。創薬における安全性研究は、トキシコゲノミクス手法に限らず、最先端の科学知識・技術を可能な限り広範囲から取り入れ、統合していく必要があり、一層の進歩が期待される。

【引用・参考文献】

- 1) I. Kola and J. Landis : *Nature Rev. Drug Discov.*, **3**, 711(2004).
- 2) M. M. K. Ong, C. Latchoumycandane and U. A. Boelsterli : *Toxicol. Sci.*, **97**, 205(2007).
- 3) 齊藤充生, 平田睦子, 三宅真二, 長谷川隆一 : *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **123**, 41(2005).
- 4) J. B. Meigs, P. Shrader, L. M. Sullivan, J. B. McAteer, C. S. Fox, J. Dupuis, A. K. Manning, J. C. Florez, P. W. F. Wilson, R. B. D'Agostino and L. A. Cupples : *N Engl J Med.*, **359**, 2208(2008).
- 5) R. A. Roth, J. P. Luyendyk, J. F. Maddox and P. E. Ganey : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**, 1(2003).
- 6) K. Ohashi, P. L. Marion, H. Nakai, L. Meuse, J. M. Cullen, B. B. Bordier, R. Schwall, H. B. Greenberg, J. S. Glenn and M. A. Kay : *Nature Med.*, **6**, 327(2000).
- 7) Y. Kudo, T. Ochi, H. Shimada and K. Shinjo : *Vet. Med. Sci.*, **70**, 993(2008).
- 8) P. R. Bushel, A. N. Heinloth, J. Li, L. Huang, J. W. Chou, G. A. Boorman, D. E. Malarkey, C. D. Houle, S. M. Ward, R. E. Wilson, R. D. Fannin, M. W. Russo, P. B. Watkins, R. W. Tennant and R. S. Paulés : *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 18211(2007).
- 9) T. Urushidani : Hepatotoxicity from genomics to in vitro and in vivo models. ed by S. C. Sahu, Wiley, pp. 507-529(2007).
- 10) T. Uehara, N. Kiyosawa, T. Shimizu, K. Omura, M. Hirode, T. Imazawa, Y. Mizukawa, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao and T. Urushidani : *Human Exp. Toxicol.*, **27**, 23(2008).
- 11) M. Hirode, A. Ono, T. Shimizu, T. Nagao, Y. Ohno and T. Urushidani : *Toxicol Appl Pharmacol.*, **229**, 290(2008).
- 12) T. Uehara, A. Ono, M. Hirode, N. Kiyosawa, K. Omura, T. Shimizu, Y. Mizukawa, T. Miyagishima, T. Nagao and T. Urushidani : *Toxicology*, **250**, 15(2008).

〈漆谷 徹郎〉

Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes

Kayo Sumida¹, Yoshinobu Igarashi², Naoki Toritsuka³, Tomochika Matsushita⁴, Kaori Abe-Tomizawa⁵, Mikio Aoki⁶, Tetsuro Urushidani^{2,7}, Hiroshi Yamada² and Yasuo Ohno⁸

Abstract

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is a very common organic solvent used for dissolving lipophilic substances, for example for in vitro cell-based assays. At the same time, DMSO is known to be cytotoxic at high concentrations. Therefore, it is important to define threshold concentrations of DMSO for cells but relevant data at the molecular level are very limited. We have focused on conducting microarray analyses of human and rat hepatocytes treated with more than 100 chemicals in attempts to identify candidate biomarker genes. In the present study, the effects of DMSO on gene expression and cytotoxicity were assessed in human cryopreserved hepatocytes and rat primary cultured hepatocytes. A cytotoxicity test with lactate dehydrogenase (LDH) activity demonstrated DMSO to be noncytotoxic up to a concentration of 2% (v/v) in both cases and there were only few effects on the gene expression profiles up to 0.5% (v/v). The observed differences from controls were considered to be of little toxicological importance, but still need to be taken into account in interpretation of findings when DMSO is used at high concentration.

Keywords

gene expression profile, DMSO, human cryopreserved hepatocytes, rat primary cultured hepatocytes, cytotoxicity

Introduction

A large-scale gene expression database, termed TG-GATES (Genomics Assisted Toxicity Evaluation System), has been established by the Toxicogenomics Project in Japan.¹ About 150 chemicals, mainly for medicinal use, were selected, and gene expression in rat liver, rat kidney, rat primary cultured hepatocytes, and human cryopreserved hepatocytes is being comprehensively analyzed using Affymetrix GeneChip system (Santa Clara, CA, USA). In the project, rat and human hepatocytes are treated with toxicological prototype drugs, in three dose-ranges, and samples are collected 2, 8, and 24 hr after a single treatment. One of the main aims of our project is to identify candidate biomarker genes to predict and/or diagnose toxicity.

The actual dose-ranges are set according to dose-finding studies. The maximum concentration was set at 10 mM in the case of a chemical with high solubility. The concentration of a chemical with low solubility is determined with reference to solubility in 0.1%

¹ Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Konohana-ku, Osaka, Japan

² Toxicogenomics Informatics Project, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Osaka, Japan

³ Applied Pharmacology & New Technologies, Biopharmaceutical Assessments Core Function Unit, Eisai Co., Ltd., Tsukuba, Ibaraki, Japan

⁴ Safety Assessment Department, Chugai Pharmaceutical Co. Ltd., Gotemba, Shizuoka, Japan

⁵ Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Kawauchi-cho, Tokushima, Japan

⁶ Genomic Science Laboratories, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Konohana-ku, Osaka, Japan

⁷ Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Kyotanabe, Kyoto, Japan

⁸ National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo, Japan

Corresponding author:

Kayo Sumida, Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., 3-1-98 Kasugadenaka, Konohana-ku, Osaka 554-8558, Japan

Email: sumida@sc.sumitomo-chem.co.jp

(v/v) DMSO, which is the commonly used concentration for *in vitro* assays. However, in some cases, this means that the concentration is too low for the effects of the chemical to be adequately reflected in the gene expression profile. It is then necessary to increase the chemical concentration, but this also necessitates increasing the DMSO concentration to obtain a solution. Since DMSO is itself toxic at high concentration, this could result in misleading findings. Since there have been no reports of comprehensive gene expression profiles after treatment with DMSO, the present study was conducted using human cryopreserved hepatocytes and rat primary cultured hepatocytes.

There are several reports about influence of DMSO on expression of genes in cells. For example, it has differentiation-inducing effects on embryonic stem (ES) cells, which are most sensitive towards the cytotoxic effects of DMSO including Oct-4.² Klinken et al. also reported induction of differentiation in murine erythroleukemia (MEL) cells with alteration of proto-oncogene levels.³ Similar findings have been described for HL60 cells.⁴ As far as housekeeping genes are concerned, Nishimura et al. examined the effects of DMSO on the expression of beta-actin (Actb), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), beta-glucuronidase (Gusb), phosphoglycerate kinase 1 (Pgk1), peptidylprolyl isomerase A (Ppia), and transferrin receptor (Tfrc) mRNA in cultures of C2C12 myotubes and the mRNA levels of some housekeeping genes were affected by exposure of DMSO concentrations of 0.5% (v/v) or more.⁵ The induction of some drug-metabolizing enzyme genes by DMSO has also been reported.⁶⁻⁸

Thus, for *in vitro* assays, it is important to define the threshold concentration of DMSO for cells in accordance with the endpoint. The aim of the present study was to identify the lowest concentration of DMSO at which no significant effects on gene expression profile were observed, with particular attention to candidate biomarker genes. For this purpose, human cryopreserved hepatocytes and rat hepatocytes were examined for effects of DMSO on gene expression with a DNA microarray system and cytotoxicity with a lactate dehydrogenase (LDH) leakage method.

Materials and methods

Cell culture and *in vivo* studies

Human cryopreserved hepatocytes, purchased from CellzDirect, Inc. (Durham, NC, USA), were recovered in cryopreserved hepatocyte-recovered medium

(CellzDirect, Inc.) and seeded in HCM Bullekit[®] (Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, USA) supplemented with 10% FBS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) in 6-well collagen type-1 coated plates (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) at a concentration of 1.2×10^6 cells/2 mL/well for 4 hours in a humidified atmosphere (37°C, 5% CO₂). After 4-hour culture, medium was replaced with HCM Bullekit[®] without FBS and human hepatocytes were cultured for 20 more hours.

At day 2, medium was replaced with HCM Bullekit[®] containing 0% (v/v), 0.1% (v/v), 0.5% (v/v), 0.75% (v/v), 1% (v/v), or 2% (v/v) DMSO (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan, purity > 99.7%), and the hepatocytes were cultured for 24 more hours in a humidified atmosphere (37°C, 5% CO₂).

At day 3, medium was collected for measurement of LDH activity and total RNA samples were collected for gene expression analysis. Extraction of total RNA was conducted using a RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) before quantification with a spectrophotometer DU-7400 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and assessment of ribosomal RNA integrity using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Rat primary-cultured hepatocytes, prepared from a 5-week-old male Sprague-Dawley rat (Charles River Japan Inc., Kanagawa, Japan), were seeded in HCM Bullekit[®] supplemented with 10% FBS in 6-well collagen type-1 coated plates at a concentration of 1.0×10^6 cells/2 mL/well for 2-3 hours in a humidified atmosphere (37°C, 5% CO₂). After 2-3 hours culture, medium was replaced with HCM Bullekit[®] without FBS and rat hepatocytes were cultured for 16 hours.

At days 2 and day 3, rat primary cultured hepatocytes were treated the same as human cryopreserved hepatocytes.

Gene expression analysis

Microarray analysis was conducted on three samples for each group using HGU133 plus 2.0 probe arrays and RG230 2.0 probe arrays (Affymetrix). The procedures were basically conducted following the manufacturer's protocol, as previously reported.^{9,10} The obtained image files were analyzed with the Affymetrix data suite system, Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0) and derived signal values were globally normalized and targeted to all probe sets equal to 500 before comparative analysis to examine gene expression differences between treatment and control samples.

Quantitative RT-PCR assay validation

To confirm the gene expression data using microarray, we conducted quantitative RT-PCR for some rat genes. Five genes (*Ccl20*, sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1 [*Sult1a1*], *Cyp1a1*, carbonic anhydrase 2 [*Car2*], and *Cyp2c12*) were measured by real-time PCR using TaqMan® Gene Expression Assays and the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). cDNAs were generated from 12 ng of total RNA using Invitrogen reverse transcription reagents (SuperScript III Reverse Transcriptase (10,000 units), RNaseOUT, Random Primers, 10 mM dNTP, and 0.1 M DTT). Three replicates were run for each gene for each sample in a 384-well format plate.

Measurement of LDH activity

The collected medium was centrifuged at $1500 \times g$ or more for 5 min at 4°C. About 0.8 mL of the supernatant was applied to a biochemical autoanalyzer TBA-200FR (Toshiba, Tokyo, Japan) with the UV-rate method.

Data analysis

Raw probe intensities in Affymetrix CEL files were normalized using the MAS 5.0 algorithm with default parameters. After the MAS 5.0 process, we selected each probe for which a detection call is “present” among all conditions in this study. The fold change values were calculated as the ratio of gene expression values between DMSO treatment data versus control data. To compare gene expression levels among five different DMSO concentrations, we normalized the expression data using Tukey’s biweight method and converted them into signal/control \log_2 ratios. We used the smoothing spline clustering method¹¹ to sort and identify gene expression patterns that were dependent on the DMSO concentration. To find significantly and differentially expressed gene sets between control and DMSO treatment data, gene set enrichment analysis (GSEA)¹² was performed. The gene set data for the human and the rat were extracted from the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway database.¹³

Results

Gene expression analysis

In human cryopreserved hepatocytes, there were only 4 probe sets, which altered in expression ($p < 0.05$ and

more than 2-fold) at a concentration of 0.1% (v/v) DMSO compared with control (0% DMSO). There were 16 probe sets altered in expression at 0.5% (v/v) DMSO, 57 probe sets at 0.75% (v/v) DMSO, 133 probe sets at 1% (v/v) DMSO and 752 probe sets at 2% (v/v) DMSO. In rat primary cultured hepatocytes, there were only 1 probe set, which altered in expression ($p < 0.05$ and more than 2-fold) at a concentration of 0.1% (v/v) DMSO compared with control (0% DMSO). There were 10 probe sets altered in expression at 0.5% (v/v) DMSO, 22 probe sets at 0.75% (v/v) DMSO, 67 probe sets at 1% (v/v) DMSO, and 497 probe sets at 2% (v/v) DMSO (Figure 1a-d).

The GSEA detected differentially expressed gene sets in each DMSO treatment data compared to the control data. We analyzed 165 and 195 gene sets for human and rat hepatocytes, respectively. The differentially expressed gene sets were shown in Table 1. In the case of human hepatocytes, the top 10 differentially expressed gene sets at 0.1% (v/v) DMSO were not within the top 10 at 1% (v/v) DMSO. Distinct gene set changes were observed between 0.75% (v/v) DMSO and 1% (v/v) DMSO. In rat primary cultured hepatocytes, of the top 10 gene sets detected at 0.1% (v/v) DMSO, only 2 gene sets were detected at 2% (v/v) DMSO. The data indicate that 0.1% (v/v) DMSO had distinctly less influence than higher DMSO concentration. From 0.5% (v/v) DMSO to 1% (v/v) DMSO, some overlapping gene sets like RNO04621_NOD-LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY were observed.

The alterations in expression of Phase I, II, III drug-metabolizing enzymes are summarized in Table 2. Of the total of 728 probe sets (Phase I: 295, Phase II: 325, Phase III: 108), 161 genes demonstrated significantly altered expression levels in human hepatocytes. In rat hepatocytes, of the total of 409 probe sets (Phase I: 170, Phase II: 183, Phase III: 56), 57 genes were significantly altered. The alteration in expression of most drug-metabolizing enzymes was not severe up to 0.75% (v/v) DMSO in both human and rat cases.

Cytotoxicity of DMSO

Human cryopreserved hepatocytes and rat primary cultured hepatocytes were treated with DMSO for 24 hours at five different concentrations in order to examine its cytotoxic effects. In both human and rat hepatocytes, no toxic effects were

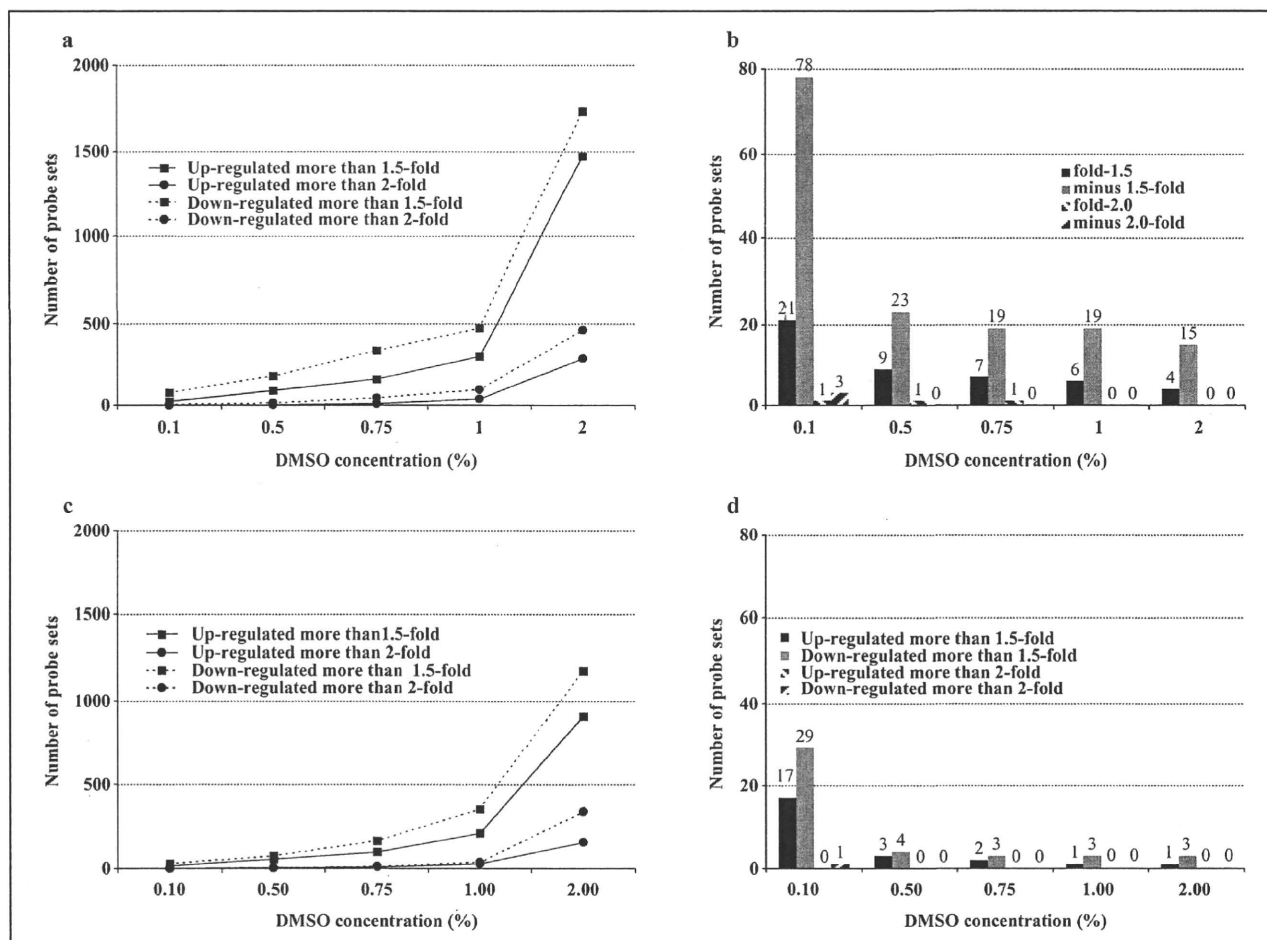


Figure 1. The numbers of differentially expressed genes (probe sets) in human cryopreserved hepatocytes (a) and rat primary cultured hepatocytes (c) are shown. Solid and dashed lines indicate up- and down-regulated genes, respectively. Circles and squares indicate 2.0- and 1.5-fold changes, respectively. The number of the probe sets was significantly increased between 1% (v/v) and 2% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO). The numbers of differentially expressed genes (probe sets) commonly observed from 0.1% (v/v) DMSO to higher concentrations in human cryopreserved hepatocytes (b) and rat primary-cultured hepatocytes (d) are shown.

morphologically observed up to the concentration of 2% (v/v) DMSO.

In addition, the cytotoxicity of DMSO was examined by the conventional LDH test. LDH activity response curves for DMSO in human and rat hepatocytes are shown in Figure 2. Again, DMSO did not show any toxic effects up to the concentration of 2% (v/v).

Discussion

We have been focusing on identification of candidate biomarker genes to predict and/or diagnose toxicity in our project (TGP2, Toxicogenomics Informatics Project). Gene expression data using rat primary hepatocytes or human cryopreserved hepatocytes as well as gene expression data using rat liver are being

analyzed. However, the effects of some chemicals were found to not be adequately reflected in the gene expression profile due to the low concentrations dictated by solubility in the set concentration of DMSO. The necessity to increase the DMSO concentration is the reason for the present study. The fact that there were not many probe sets with altered in expression up to 0.75% (v/v) DMSO is therefore very important.

In particular, there were remarkably few probe sets with altered in expression up to 0.5% (v/v) DMSO. As the concentration of DMSO increased, the number of probe sets with alteration and the magnitude of alteration increased. In human hepatocytes, there was only 1 probe set (histone cluster 1, H2bd; HIST1H2BD), which was upregulated ($p < .05$ and more than 2-fold) at a concentration of 0.1% (v/v) DMSO, 4 probe sets

Table 1. The differentially expressed gene sets in human and rat hepatocytes are shown^a

DMSO Con. (%)	Gene Set (KEGG Pathway ID and Name)	NOM <i>p</i> Value	FDR <i>q</i> Value	FWER <i>p</i> Value
0.1	HSA03010_RIBOSOME	0.00	0.00	0.00
	HSA03410_BASE EXCISION REPAIR	0.00	0.06	0.07
	HSA04110_CELL CYCLE	0.00	0.31	0.47
	HSA03050_PROTEASOME	0.02	0.24	0.48
	HSA03030_DNA REPLICATION	0.03	0.25	0.57
	HSA00760_NICOTINATE AND NICOTINAMIDE METABOLISM	0.03	0.21	0.58
	HSA00480_GLUTATHIONE METABOLISM	0.02	0.54	0.92
	HSA00240_PYRIMIDINE METABOLISM	0.02	0.48	0.92
	HSA03430_MISMATCH REPAIR	0.05	0.57	0.97
	HSA05012_PARKINSON'S DISEASE	0.00	0.86	0.99
0.5	HSA04020_CALCIIUM SIGNALING PATHWAY	0.03	0.98	1.00
	HSA03010_RIBOSOME	0.00	0.03	0.03
	HSA00590_ARACHIDONIC ACID METABOLISM	0.00	0.27	0.40
	HSA00591_LINOLEIC ACID METABOLISM	0.02	0.27	0.54
	HSA04742_TASTE TRANSDUCTION	0.04	0.20	0.54
	HSA00480_GLUTATHIONE METABOLISM	0.00	0.34	0.85
	HSA05012_PARKINSON'S DISEASE	0.05	0.83	1.00
0.75	HSA04080_NEUROACTIVE LIGAND-RECEPTOR INTERACTION	0.05	0.74	1.00
	HSA00590_ARACHIDONIC ACID METABOLISM	0.00	0.02	0.02
	HSA03010_RIBOSOME	0.00	0.20	0.31
	HSA00591_LINOLEIC ACID METABOLISM	0.00	0.14	0.32
	HSA00190_OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	0.00	0.16	0.46
	HSA05012_PARKINSON'S DISEASE	0.00	0.15	0.50
	HSA00760_NICOTINATE AND NICOTINAMIDE METABOLISM	0.02	0.30	0.85
	HSA03050_PROTEASOME	0.04	0.42	0.95
1	HSA05322_SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS	0.02	0.46	1.00
	HSA04130_SNARE INTERACTIONS IN VESICULAR TRANSPORT	0.00	0.52	0.35
	HSA05322_SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS	0.00	0.29	0.38
	HSA05120_EPITHELIAL CELL SIGNALING IN HELICOBACTER PYLORI INFECTION	0.00	0.44	0.65
	HSA04912_GNRH SIGNALING PATHWAY	0.00	0.37	0.69
	HSA00591_LINOLEIC ACID METABOLISM	0.02	0.39	0.80
	HSA00601_GLYCOSPHINGOLIPID BIOSYNTHESIS - LACTO AND NEOLACTO SERIES	0.02	0.36	0.84
	HSA04142_LYSOSOME	0.00	0.39	0.90
	HSA04010_MAPK SIGNALING PATHWAY	0.03	0.69	1.00
	2	HSA04912_GNRH SIGNALING PATHWAY	0.00	1.00
HSA05322_SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS		0.03	0.85	0.85
HSA04916_MELANOGENESIS		0.00	0.89	0.91
HSA04070_PHOSPHATIDYLINOSITOL SIGNALING SYSTEM		0.03	0.98	0.98
0.1	RNO03420_NUCLEOTIDE_EXCISION_REPAIR	0.00	0.06	0.04
0.5	RNO04621_NOD-LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.52	0.50
	RNO03420_NUCLEOTIDE_EXCISION_REPAIR	0.00	0.41	0.74
	RNO04623_CYTOSOLIC_DNA-SENSING_PATHWAY	0.00	1.00	1.00
	RNO04062_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.83	1.00
	RNO05010_ALZHEIMER'S_DISEASE	0.00	0.69	1.00
	RNO05016_HUNTINGTON'S_DISEASE	0.00	0.67	1.00
	RNO05012_PARKINSON'S_DISEASE	0.02	0.98	1.00
	RNO00190_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	0.02	1.00	1.00

(continued)

Table I. (continued)

DMSO Con. (%)	Gene Set (KEGG Pathway ID and Name)	NOM <i>p</i> Value	FDR <i>q</i> Value	FWER <i>p</i> Value
0.75	RNO04621_NOD-LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.81	0.49
	RNO05016_HUNTINGTON's_DISEASE	0.00	0.58	0.64
	RNO00071_FATTY_ACID_METABOLISM	0.00	0.44	0.71
	RNO00051_FRUCTOSE_AND_MANNOSE_METABOLISM	0.05	0.60	0.90
	RNO05012_PARKINSON's_DISEASE	0.00	0.60	1.00
	RNO04062_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.55	1.00
	RNO03420_NUCLEOTIDE_EXCISION_REPAIR	0.00	0.50	1.00
	RNO04330_NOTCH_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.46	1.00
	RNO05010_ALZHEIMER's_DISEASE	0.00	0.49	1.00
	RNO04120_UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS	0.00	0.45	1.00
	RNO00330_ARGININE_AND_PROLINE_METABOLISM	0.04	0.54	1.00
1	RNO04621_NOD-LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.05	0.02
	RNO05016_HUNTINGTON's_DISEASE	0.00	0.06	0.11
	RNO05012_PARKINSON's_DISEASE	0.00	0.10	0.24
	RNO00051_FRUCTOSE_AND_MANNOSE_METABOLISM	0.00	0.26	0.76
	RNO04330_NOTCH_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.28	0.85
	RNO00534_HEPARAN_SULFATE_BIOSYNTHESIS	0.00	0.33	0.92
	RNO04062_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.35	1.00
	RNO05010_ALZHEIMER's_DISEASE	0.00	0.32	1.00
	RNO00190_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	0.00	0.33	1.00
RNO04620_TOLL-LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.32	1.00	
2	RNO00280_VALINE_LEUCINE_AND_ISOLEUCINE_DEGRADATION	0.00	0.02	0.00
	RNO04621_NOD-LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.03	0.04
	RNO04062_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.02	0.04
	RNO05010_ALZHEIMER's_DISEASE	0.00	0.05	0.13
	RNO04620_TOLL-LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.06	0.13
	RNO00071_FATTY_ACID_METABOLISM	0.00	0.12	0.35
	RNO04330_NOTCH_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.13	0.44
	RNO00600_SPHINGOLIPID_METABOLISM	0.00	0.12	0.53
	RNO04130_SNARE_INTERACTIONS_IN_VESICULAR_TRANSPORT	0.00	0.12	0.53
	RNO04622_RIG-I-LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.12	0.56
	RNO04623_CYTOSOLIC_DNA-SENSING_PATHWAY	0.00	0.16	0.76
	RNO00640_PROPANOATE_METABOLISM	0.00	0.17	0.76
	RNO00100_STEROID_BIOSYNTHESIS	0.00	0.17	0.76
	RNO04142_LYSOSOME	0.00	0.16	0.76
	RNO04060_CYTOKINE-CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	0.00	0.17	0.81
	RNO04140_REGULATION_OF_AUTOPHAGY	0.00	0.19	0.86
	RNO05215_PROSTATE_CANCER	0.00	0.32	1.00
RNO04660_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.00	0.34	1.00	

^aThe pathway gene sets were extracted from KEGG pathway database and assessed using GSEA (gene set enrichment analysis). The GSEA can determine differentially expressed gene sets between two biological states or conditions. NOM-*p*val, FDR-*q*val and FWER-*p*val indicate nominal *p*-value, false discovery rate and family-wise error rate *p*-value, respectively.

(HIST1H2BD, BTB [POZ] domain containing 11 [BTBD11], chemokine [C-X-C motif] ligand [CXCL11], and another with no annotation) at 0.5% (v/v) DMSO. And there were 3 probe sets (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 [ERAP1], natural killer-tumor recognition sequence [NKTR], and cleavage and polyadenylation factor subunit, homolog [PCF11]), which were down-regulated ($p < 0.05$ and

less than 1/2) at a concentration of 0.1% (v/v) DMSO, 12 probe sets (insulin-like growth factor binding protein 3 [IGFBP3], dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 [DHRS9], LIM and cysteine-rich domains 1 [LMCD1], solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5 [SLC13A5], IGFBP1, thyroid hormone responsive [THRSP], interleukin 1 receptor antagonist [IL1RN],

Table 2. Up- and down-regulated drug metabolizing enzymes in human and rat hepatocytes are shown^a

Expression	Gene Symbol
Strongly up-regulated	AGXT2L1, BHMT, CYP2C8, CYP39A1, CYP3A4, CYP3A5, CYP4F3, CYP7B1, OAT, TAT
Up-regulated	ABAT, ABCC5, ABCC9, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ADH6, ALDH1L1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH9A1, BCAT1, BCAT2, BHMT2, COQ5, CYB5A, CYB5R4, CYP1B1, CYP20A1, CYP27A1, CYP2A6, CYP2A7, CYP2B6, CYP2B7P1, CYP2E1, CYP2U1, CYP4A11, CYP4A22, CYP4F11, DPYD, EPHX1, FMO3, FMO5, FTSJD2, GPT2, GPX4, GSTM2, HGSNAT, LRTOMT, MAOB, MSRB2, N6AMT2, NAT12, NAT15, PCMTD1, PCMTD2, PRMT2, PSAT1, SETD7, SLCO4C1, TPMT, TXNDC12, ZADH2
Strongly down-regulated	ABCA1, ABCC3, ADH1B, ADH1C, ADH4, AKR1B10, AKR1D1, ALDH1A1, ALDH1B1, ALPL, CYP2C18, CYP2C9, HNMT, METT10D, METTL12, METTL8, METTL9, NAT11, NAT8, PRMT1, SLCO1B1, SLCO1B3, SULT1A1, SULT1B1, TRMT6, UGT1A6, UGT2A3, UGT2B15, UGT2B28, UGT2B4
Down-regulated	ABCB10, ABCB6, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ADH5, AGXT2L2, AKR1A1, AKR1B1, AKR1C1, AKR1C4, AKR7A3, ALDH4A1, AOX1, ARD1A, AS3MT, ASMTL, COMTD1, COQ3, CYB5B, CYB5D1, CYB5R3, CYP51A1, DMAP1, DNMT1, FMO4, GPX1, GSTA1, GSTCD, GSTO1, HEMK1, HNMT, MAOA, METT5D1, METTL1, METTL1A, METTL13, METTL3, METTL5, MGST1, MTR, NAT10, NAT11, NAT13, NAT2, NAT5, NAT9, PEMT, PRMT5, RG9MTD1, RG9MTD2, RNMTL1, RRP8, SETD8, SHMT1, SULT1A1, SULT1A2, SULT2A1, TRDMT1, TRMT1, TRMT11, TRMT5, TRMT6, ZADH2
Up-regulated	Abca4, Abca5, Abcb1a, Aldh1a2, Aldh6a1, As3mt, Bhmt2, Ces3, Coq3, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp4a3, Cyp4f17, Cyp4f5, Gpx3, Gstm7, Gstt1, Gstt2, Nnmt, Pcmt1, Pcmt2, Slco3a1, Sult1a1, Tpm1, Trmt12
Down-regulated	Abcb11, Abcc2, Adh1, Akr1b8, Akr1c12, Akr1d1, Akr7a3, Ard1a, Bcat1, Comtd1, Cyp26b1, Cyp2b3, Cyp2c12, Cyp2c22, Cyp3a9, Fmo5, Gpt2, Gstm2, Gstt3, Maoa, Maob, Mett10d, Mett12, Mgst2, N6amt1, Prmt1, Psat1, Rrp8, Slco1a1, Slco1b2, Ugt2b17, Ugt2b36

^aAll drug metabolizing enzymes are classified using the smoothing spline clustering¹¹. This method is able to classify a series data such as time series data. Several genes are shown multiple times due to redundant probe sets in the microarray.

chromosome 10 open reading frame 108 [C10orf108], palmdelphin [PALMD], and choroideremia-like (Rab escort protein 2) [CHML]) at 0.5% (v/v) DMSO. In

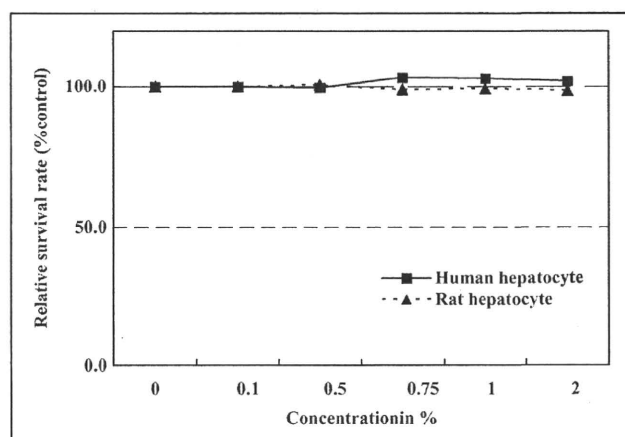


Figure 2. Lactate dehydrogenase (LDH) activity response curves for dimethyl sulfoxide (DMSO) in human cryopreserved hepatocytes and rat primary cultured hepatocytes. The experiments were conducted with hepatocytes in three independent wells ($n = 3$). Standard error bars are shown.

rat hepatocytes, there was no probe set, which was up-regulated ($p < 0.05$ and more than 2-fold) at a concentration of 0.1% (v/v) DMSO, 6 probe sets (Ccl2, radical S-adenosyl methionine domain containing 2 (Rsd2), Ccl20, Cxcl2, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60 [Ddx60], and Cxcl10) at 0.5% (v/v) DMSO and there was only 1 probe set (with no annotation), which was down-regulated ($p < 0.05$ and less than 1/2) at 0.1% (v/v) DMSO, and 4 probe sets (Car3, D4, zinc and double PHD fingers, family 3 [Dpf3], LOC681825, and another with no annotation) at 0.5% (v/v) DMSO. CXCL11 was up-regulated and IGFBP4 was down-regulated in common, but neither gene is reported to have any relation with DMSO.

To determine whether an a priori defined set of genes shows statistically significant, concordant differences between control and DMSO treatment, GSEA was carried out. In human hepatocytes, a large gap was observed between 0.75% (v/v) and 1% (v/v) DMSO. And only 1 gene set was shared in common. In contrast, there were 3 gene sets in common

between 0.1% (v/v) and 0.5% (v/v) DMSO, 4 gene sets in common between 0.1% (v/v) and 0.75% (v/v) DMSO, and 4 gene sets in common between 0.5% (v/v) and 0.75% (v/v) DMSO. In rat hepatocytes, large gaps were observed between 0.1% (v/v) and 0.5% (v/v) DMSO and between 0.1% (v/v) and 0.75% (v/v) DMSO. There was only 1 gene set in common in each gap. In contrast, 6 gene sets were in common from 0.5% (v/v) to 1% (v/v) DMSO (Table 1).

With regard to Phase I, II, III drug-metabolizing enzymes, DMSO concentration-dependent probe sets were clustered with the smoothing spline clustering method, and 161 genes in human cryopreserved hepatocytes and 57 genes in rat primary cultured hepatocytes were altered in expression level, respectively (Table 2). However, the magnitude of alteration for expression of most drug-metabolizing enzymes was within 1 standard deviation in both cells.

In human hepatocytes, there were 66 enzymes, which were up-regulated, and 95 enzymes, which were down-regulated. Of 66 enzymes, 10 enzymes including CYP3A4 and CYP3A5, were strongly up-regulated enzymes and 56 enzymes including CYP1B1, CYP2A6 and CYP2E1 were moderately up-regulated. Of 95 enzymes, 30 enzymes including UGT1A6 were strongly down-regulated enzymes and 65 enzymes were moderately down-regulated. Nishimura et al. earlier investigated the gene expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, UGT1A6, UGT1A9 and ABCB1 after 24 hours of exposure to 0.1% (v/v), 0.5% (v/v), and 2.5% (v/v) DMSO in primary culture of human hepatocytes.⁶ Our results were in excellent agreement with their findings. Wilkening and Bader also reported the response after 24 hours exposure to 0%-1% (v/v) DMSO in primary human hepatocytes.⁷ They found CYP3A4 but not CYP3A7 to be induced by DMSO and this also corresponds with our data. Furthermore, Choi et al. reexamined induction of CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D8, CYP3A4, CYP3A5, UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7 after exposure to 1% (v/v) DMSO over 20 days in Huh7 cells, which was established from a 57-year-old male with a well-differentiated hepatocellular carcinoma in 1952.⁸ In their report, all of the examined enzymes, except for CYP1A1, showed significant increase in their expression by DMSO treatment. Since their experimental condition was very different from our own, we are not able to make an

easy comparison, but CYP2B6, CYP2C8, CYP3A4, and CYP3A5 were induced by DMSO in both data sets. On the other hand, there is a discrepancy between the two concerning CYP2C9 and UGT1A6. In rat hepatocytes, there were 25 enzymes which were up-regulated and 32 enzymes which were down-regulated. Some enzymes including betaine-homocysteine methyltransferase 2 (Bhmt2), protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2 (Pcmt2), aldo-keto reductase family 1, member D1 (delta 4-3-ketosteroid-5-beta-reductase; Akr1d1), and methyltransferase 10 domain containing (Mett10D) were up-regulated or down-regulated in both human and rat hepatocytes. The magnitude of change of these transcripts in rat hepatocytes was often larger than that in human hepatocytes.

As for housekeeping genes, Nishimura et al. examined the effects of DMSO on the expression of Actb, Gapdh, Gusb, Pgk1, Ppia, and Tffc mRNA in cultures of C2C12 myotubes.⁵ They reported that Actb, Pgk1 and Tffc were significantly ($p < 0.05$ and less than 1/2) decreased at 2.5% (v/v) DMSO after 24 hours. At 2% (v/v) DMSO, we found the above 6 genes to show similar expression change as their results.

To confirm the gene expression data using microarray, we conducted quantitative RT-PCR for some rat genes (Ccl20, Sult1a1, Cyp1a1, Car2, and Cyp2c12). Ccl20, which was up-regulated ($p < 0.05$ and 2.13-fold compared with control) in microarray analysis at a concentration of 0.5% (v/v) DMSO, showed up-regulation ($dCt = -0.67$) in expression in using quantitative RT-PCR. It was also confirmed that Sult1a1 and Cyp1a1 were up-regulated in quantitative RT-PCR analysis ($dCt = -0.09$ and $dCt = -0.26$, respectively) as well as in microarray analysis (1.59-fold and 1.84-fold) at 2% (v/v) DMSO. On the other hand, Car2 and Cyp2c12 showed down-regulation in both quantitative RT-PCR analysis and microarray analysis (eTable). The Quantitative RT-PCR data were well coincident with the microarray data.

As regards cytotoxicity, no toxic effects were observed up to the concentration of 2% (v/v) in either of the cells with either of the tests employed.

In conclusion, we showed that there are only very few probe sets altered in expression at doses up to 0.75% (v/v) DMSO in both human and rat hepatocytes. In particular, there are remarkably few probe sets altered in expression up to 0.5% (v/v) DMSO and the magnitude of alteration for expression of most drug-metabolizing enzymes was within 1 standard