

DNA 直接損傷とエピゲノム修飾変動に起因する  
海馬における神経新生の障害機序の比較に関する  
研究

2017 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科  
(東京農工大学)

渡邊 洋祐

序 論.....	2
第 1 章.....	6
緒 言 .....	7
材料および方法.....	8
結 果 .....	13
考 察 .....	16
小 括 .....	19
第 2 章.....	20
緒 言 .....	21
材料および方法.....	22
結 果 .....	27
考 察 .....	30
小 括 .....	34
第 3 章.....	35
緒 言 .....	36
材料および方法.....	38
結 果 .....	43
考 察 .....	45
小 括 .....	48
総合考察 .....	49
結 論.....	54
謝 辞.....	55
引用文献 .....	56
図 表.....	63

## 序 論

発達神経毒性試験は、化学物質などの曝露による胎生期または生後発達期の神経系の構造及び機能に対する有害作用の有無を評価する試験と定義される。現行の発達神経毒性試験は、経済協力開発機構 (OECD) の TG426 及び米国環境保護局 (EPA) の OPPTS 870.6300 を指針として実施されているが (OECD, US EPA), その評価には長期間かつ大規模な動物試験が要求されることから、病理発生の解明に根ざした簡便かつ効率的な評価系の確立が求められている [17]。また、種々の疾患に類似した毒性兆候・変化を捉えるために、行動学・機能学的な検査を要求されることが多く、これが発達神経毒性の評価の実施をより一層困難にさせている側面もあり、その毒性評価方法には未だ課題が多い。特に、発達期の脳における神経細胞の分化過程には、神経幹細胞の自己複製に始まり、前駆細胞の増殖に加えて、軸索伸長やシナプス形成、髄鞘形成などの分化・成熟過程も含まれるため、神経毒性物質の作用点が多数存在すると考えられる。また、これらの神経発達過程と成熟神経の生存・維持過程は共通の分子機序に従っている場合が多く [62], 成熟神経に対する神経毒性物質は、発達神経毒性を誘発する可能性が高いと考えられる。従って、毒性標的の異なる神経毒性物質 (軸索傷害物質や神経伝達障害物質、髄鞘傷害物質など) の発達神経毒性とその毒性機序を明らかにすることにより、それぞれの傷害機序に根ざした発達期及び成熟期での包括的な神経毒性情報が得られ、これらの情報を整理することにより、迅速かつ検出力の高い簡便な神経毒性評価法を構築することが可能になると考えられる。

大脳辺縁系の一部である海馬は記憶や学習に関与していることが知られており、歯状回にある顆粒細胞層下帯 (subgranular zone: SGZ) では、生後に始まる過程として神経細胞が作り出される神経新生が行われている [21, 42]。その過程には神経幹細胞の自己複製、前駆細胞の増殖や分化、神経突起形成やシナプス形成などの神経発生の各段階が含まれ、神経新生開始時の生後発達期が最も活発であることが知られている [29, 42]。そのため、SGZ でのこれらの各段階を標的とするような発達神経毒性物質の発達期での曝露により、生後の神経新生が障害を受ける可能性がある。さらに、海馬歯状回門に存在する  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 性介

在ニューロンは、成熟顆粒細胞に対する抑制性の入力を行うだけでなく、増殖・分化中の顆粒細胞系譜に投射して神経新生を調節する機能を持つ [56, 84]。また、GABA 性介在ニューロンに加え SGZ の外部からの様々な神経も海馬歯状回の神経に対しシナプスを形成し入力を行っており、グルタミン酸作動性神経やアセチルコリン作動性神経は顆粒細胞の増殖及び分化に関与することが報告されている [12, 24]。このことから、神経新生に関与する全ての細胞や入力などが毒性の標的となる可能性が考えられる。特に、自己複製能を持つ type-1 神経幹細胞、増殖能を持つ各前駆細胞、突起伸展などの最終分化を示す未熟顆粒細胞、神経新生の制御系入力である GABA 性介在ニューロン、成熟過程にある顆粒細胞のシナプス可塑性への影響は、神経新生に直接的もしくは間接的な障害を与える可能性が高く、これらの細胞分布の変動は発達神経毒性として評価できることが考えられる。実際に、所属する研究室では、既知の成熟神経毒性物質であるクプリゾン（髄鞘形成傷害物質）とグリシドール（軸索末端傷害物質）についてラット発達期曝露試験を実施して、海馬の神経新生に対する影響検索を行った結果、顆粒細胞系譜の細胞分化の後期を標的とした海馬における神経新生障害が誘発されることを見出している [2, 6]。このことから、海馬における神経新生に着目し、顆粒細胞系譜の細胞分布及び遺伝子やタンパク質の発現量の変動を評価することで、発達神経毒性を海馬における神経新生障害に置き換えることができ、病理発生に根ざした簡易評価系の構築につながる可能性が高いと考えられる。

神経新生は生涯にわたり継続することから、成熟動物に対する発達神経毒性物質の曝露によっても障害を受ける可能性が考えられる。実際に、前述したクプリゾン及びグリシドールについて、離乳後動物を用いて 28 日間反復強制経口投与した場合においても顆粒細胞系譜の中期から後期の傷害が確認され、発達期曝露による影響と同様の標的性を示すことが報告されている [1, 5]。これらの結果は、離乳後の動物を用いた試験においても、海馬における神経新生障害性を評価することで発達神経毒性を予測できる可能性を示唆しており、これにより一般毒性試験の枠組みでの発達神経毒性の簡易予測系確立の道が開かれた。しかしながら、抗甲状腺剤であり様々な発達障害性を誘発するプロピルチオウラシルを用いたラット発達期曝露試験では、type-1 神経幹細胞を含めた顆粒細胞系譜を標的とする神経新生障害が誘発され

るのに対し、離乳後のラットを用いた 28 日間反復強制経口投与試験では, type-1 神経幹細胞への影響は認められなかった [73]。従って、発達障害性を有する物質による神経幹細胞を標的とした海馬における神経新生障害性は、発達期曝露と離乳後曝露の試験間で異なるパターンを示す可能性が考えられる。

発達過程での神経幹細胞毒性の影響として懸念すべき点として、遺伝子の構造や機能の障害が生じることで、遺伝子発現プログラムに従った神経分化機構の破綻が生じ、ひいては生後の神経中枢の高次機能形成に影響を与えることが挙げられる。遺伝子の構造や機能の障害は、DNA 直接損傷に起因する遺伝子変異や染色体異常の他に、近年、エピゲノム毒性による遺伝子修飾やヒストン修飾の変化の関与が注目されており [14, 40, 79]、これらの障害が神経幹細胞に生じると、それによって生じる遺伝子やヒストンの変化は、神経幹細胞のみならず、娘細胞である神経細胞系譜にも受け継がれる性質がある。即ち、神経系の DNA に対する直接障害性のある遺伝毒性物質と DNA には直接損傷を与えずにゲノムに修飾を与えるエピゲノム毒性物質は共に神経幹細胞毒性物質であると考えられ、発達神経毒性を示すと共に、生後の曝露によっても神経新生に影響を与える可能性がある。しかしながら、発達期でのこれらの機序による海馬における神経新生障害による生後影響に関する研究は乏しく、共に発達神経毒性物質として考えた場合、発達期と成熟後での曝露における、それぞれの海馬における神経新生に対する影響の相違についても明らかにはされていない。

本研究では、DNA 直接損傷の代表物質としてメチルニトロソ尿素 (MNU)、エピゲノム毒性物質の代表としてヒストンのアセチル化を誘発するバルプロ酸 (VPA) を用いて、ラットの妊娠期～離乳期までの発達期曝露を行い、神経幹細胞を含む神経新生への影響を比較・検討した。その目的のため、SGZ の顆粒細胞指標、海馬における神経新生を制御する歯状回門の GABA 性介在ニューロン指標及び顆粒細胞層 (granule cell layer: GCL) のシナプス可塑性指標について免疫組織化学的解析により各細胞分布を検討した他、海馬に入力される様々な伝達物質の合成酵素、受容体及び応答遺伝子の発現解析を行い、海馬における神経新生への関与について検討した。さらに、一般毒性試験の枠組みでの検出性を検討する目的で、離乳後動物に対する MNU ないし VPA の 28 日間強制反復経口投与を行い、神経新生への標的性や影響の

強さを発達期曝露と比較した。

また、エピゲノム修飾変動を介した発達期での神経新生異常がその後の神経新生に与えるインパクトを解明することを目的に、ゲノム情報の豊富なマウスを用いて、既に神経新生障害を見出しているヘキサクロロフェン (HCP) の発達期曝露を行い、海馬歯状回でのゲノムのメチル化に焦点を絞った次世代シーケンス解析を実施して、エピゲノム変動に起因した神経新生障害の検討も行った。

## 第 1 章

### MNU の発達期及び離乳後曝露による 神経新生に及ぼす影響の検討

## 緒 言

メチルニトロソ尿素 (MNU) は、DNA アルキル化剤であり増殖細胞に対し殺細胞作用を有することが知られている [35, 37]。実験動物では、母動物に MNU を単回投与すると、その胚胎生子の背側終脳神経上皮で増殖活性を有する神経幹細胞及び前駆細胞を標的とした細胞傷害が起こり、その結果、生後の脳で小頭症が誘発されることがマウス及びラットで報告されている [3, 45, 65]。これらの結果は、MNU が発達期の神経幹細胞を標的とした発達神経毒性を有する物質であることを示唆する。また、当研究室における過去の検討で、MNU のマウス妊娠中期単回投与及びラット妊娠後期短期曝露の結果、離乳期の子動物の海馬において海馬歯状回における神経前駆細胞の減数を確認しており、MNU が海馬における神経新生障害を誘発することを報告している [35, 81]。しかしながら、両試験において type-1 神経幹細胞の傷害性は確認されなかった。

第 1 章では、MNU を DNA 直接損傷物質として用いて、OECD の発達神経毒性試験ガイドライン [63]の方法に準拠した、妊娠期～離乳期までの発達期曝露実験をラットで行い、type-1 神経幹細胞を含む海馬における神経新生への影響を検討した。その目的のため、SGZ における顆粒細胞系譜指標、歯状回門における GABA 性介在ニューロン指標及び GCL のシナプス可塑性指標の免疫組織化学的解析を行い、各細胞の分布変動を確認した。また、海馬に入力される様々な伝達物質の合成酵素、受容体及び応答遺伝子のリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 解析を行い、海馬における神経新生への関与について検討した。

さらに、離乳後動物の海馬歯状回における神経新生障害の検出性を検討する目的として、生後 5 週齢のラットに対する MNU の 28 日間反復投与を OECD の 28 日間反復投与試験ガイドライン [64]に準拠して行い、発達期曝露試験と同様の解析により海馬における神経新生への影響について比較・検討した。



## 材料および方法

### 化学物質及び供試動物

MNU (CAS No. 684-93-5) は Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) より購入した。発達期曝露試験では、交配後（プラグ確認日を妊娠 0 日として起算）の Sprague-Dawley 系 SPF ラットを日本チャールス・リバー株式会社（横浜）から購入して実験に供した。動物は温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55\pm 15\%$ 、照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件の飼育室で、床敷を入れたプラスチック製ケージに 1 匹ずつ収容し、分娩後は母子共に同一ケージに収容した。母動物は妊娠 2 日から分娩後 21 日（分娩日を生後 0 日として起算）の離乳まで、基礎飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社，東京）を自由に摂取させた。飲料水は妊娠 6 日目の MNU 投与開始までは水道水を自由に摂取させた。離乳後の子動物はプラスチック製ケージに 3 から 4 匹ずつ収容し、基礎飼料 CRF-1 及び水道水を自由に摂取させた。

離乳後曝露試験では、4 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系 SPF ラットを日本チャールス・リバー株式会社から購入して実験に供した。動物は温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55\pm 15\%$ 、照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件の飼育室で、床敷を入れたプラスチック製ケージに 3 から 4 匹ずつ収容し、基礎飼料 CRF-1 及び水道水を自由に摂取させた。

全ての動物実験計画は実験施設（東京農工大学）の動物実験委員会の承認を受け、全ての動物実験操作は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議，平成 18 年 6 月 1 日）を遵守して行った。

### 実験デザイン

#### ①発達期曝露試験

交配後の雌ラットを 1 群あたり 13 匹ずつの 4 群に無作為に群分けし、妊娠 6 日目から分娩後 21 日目の離乳時まで、MNU を 0, 3, 10, 30 ppm の濃度で精製水に混じ、自由に摂取させた。所属研究室で以下の用量設定試験を実施し、投与量の設定根拠とした。即ち、用量設定試験において、50 ppm の MNU 飲水投与により母動物の体重増加抑制、摂餌量及び飲水量の低値が確

認された。また、10 ppm 群では母動物の体重や摂餌量及び飲水量の変動はなかったことから、OECD の発達神経毒性試験ガイドラインに従い、母動物に軽度の毒性が出る用量として最高用量を 30 ppm とし、公比 3 で除した 3 用量を設定した。

母動物は、投与期間中、体重を週 2-3 回、摂餌量及び摂水量を週 2 回の頻度で測定した。生後 4 日目に、1 腹雄各 8 匹になるよう無作為に選抜して子数の調整を行った。1 腹の雄子動物が 8 匹に満たない場合は、1 腹 8 匹となるように雌子動物を残して調整した。子動物は、体重を授乳期間中は週 2 回、離乳後は体重及び摂餌量を週 1 回の頻度で測定した。

母動物は、出産後 21 日目に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ剖検し脳重量を測定した。子動物は、生後 21 日目に無作為に選抜した各腹雄各 1-2 匹 (各群 11-12 匹) の雄子動物の脳を免疫組織化学的解析に用いるため、4% (w/v) パラホルムアルデヒド (PFA)/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) による灌流固定を行った (流速 10 mL/分)。さらに、各腹雄各 2-3 匹 (各群 24-36 匹) を、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ剖検し、脳を遺伝子発現解析に供した。各腹残りの子動物は基礎飼料 CRF-1 及び水道水を自由に摂取させて継続飼育し、体重および摂餌量を週 1 回測定した。生後 77 日目に無作為に選抜した各腹雄各 1-2 匹 (各群 11-12 匹) の雄子動物の脳を免疫組織化学的解析に用いるため、4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) による灌流固定を行った (流速 35 mL/分)。さらに、各腹雄各 2-3 匹 (各群 24-36 匹) を、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ剖検し、脳を遺伝子発現解析に供した。剖検時、脳重量を測定した。性周期におけるステロイドホルモンの周期的変動によりニューロン新生が影響を受けることが報告されていることから [67]、雌の試料は保存のみとし、以降の解析は実施しなかった。

化学物質の曝露時期は、OECD ガイドラインに従い、着床時期 (妊娠 6 日目) から離乳時 (生後 21 日目) とした。剖検時期は、曝露が終了する離乳時点、および性成熟が完了する時期 (生後 77 日目) を目安に決定した。この 2 点での検討を行うことで、発達神経毒性の可逆性を検討することができると考えられる。

## ②離乳後暴露試験

1 週間の馴化飼育後、5 週齢の動物を 1 群当たり 24～30 匹ずつの 3 群に無作為に群分けし、0, 5, 15 mg/kg の用量で MNU を 28 日間強制経口投与した。所属研究室で用量設定試験を実施し、投与量の設定根拠とした。即ち、用量設定試験において、30 mg/kg の MNU 強制経口投与により体重減少が確認され、15 mg/kg では体重増加抑制が確認されたことより、最高用量を 15 mg/kg とし、公比 3 で除した 5 mg/kg を低用量として設定した。投与期間中、体重及び摂餌量を週に 1-2 回測定した。最終投与翌日に、無作為に選抜した各群 11 匹の脳を免疫組織化学的解析に用いるため、4% PFA/0.1M リン酸バッファ (pH 7.4) による灌流固定を行った (流速 35 mL/分)。残りの動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ剖検し、脳を遺伝子発現解析に供した。剖検時、脳重量を測定した。

#### 脳における免疫組織学的染色及びアポトーシス検出

4% PFA/0.1M リン酸バッファ (pH 7.4) 灌流固定を行った出生後 21 日及び 77 日の雄子動物又は離乳後曝露動物から脳を採取し、同じ固定液を用いて一昼夜固定した。大脳の bregma の後方約-3.0 mm 又は-3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、さらに 4% PFA/0.1M リン酸バッファ (pH 7.4) バッファで一昼夜固定した。前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 µm 厚の連続切片を作製した。切片は Table 1-11 に示した条件で以下の各分子に対する抗体を用いて免疫染色を行った。即ち、顆粒細胞層における神経新生の分化ステージ指標である glial fibrillary acidic protein (GFAP) [42], SRY box 2 (SOX2) [77], T box brain 2 (TBR2) [53], doublecortin (DCX) [42, 53], Neuron specific Nuclea (NeuN) [42, 53], 介在ニューロンの指標である [24, 26], reelin (RELN), parvalbumin (PVALB), calbindin-D-28K (CALB1), calbindin-D-29K (Calretinin, CALB2), somatostatin (SST), 成熟ニューロンの指標である NeuN, 細胞増殖活性の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA), 細胞周期因子である cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) [68], immediate early gene である activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC) 及び cyclooxygenase-2 (COX2) [27, 59, 61]について実施した。シグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて製造元のプロトコールに従って実施し、免疫反応は DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて可視

化した後、ヘマトキシリンにより対比染色した。脱パラフィンには 0.3 v/v %過酸化水素水を含むメタノール溶液 (室温, 30 分) を用いた。海馬歯状回の SGZ におけるアポトーシスの評価については, TUNEL 法 (Apop Tag® Peroxidase in Situ apoptosis detection kit, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を用いて製造元のプロトコールに従って検出を行った。標本はヘマトキシリンにより対比染色を施した。

### 免疫組織化学染色および TUNEL 染色陽性細胞の定量解析

海馬歯状回 SGZ/GCL における GFAP, SOX2, TBR2, DCX, NeuN, PCNA, p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, TUNEL, ARC 及び COX2 陽性細胞数について, 両側でカウントし, 単位長さ当りの陽性細胞数を算出した [Fig. 1-1]。歯状回門に分布する RELN, PVALB, CALB1, CALB2, SST, NeuN 陽性細胞については, 両側でカウントし, 歯状回門の単位面積当りの陽性細胞数の検索を行った。これらの解析は盲検法で実施した。歯状回門におけるアンモン角 CA3 領域の顆粒細胞はカウントから除外した。定量的解析のための写真撮影は 200 及び 400 倍の倍率で行い解析した。

### 遺伝子発現発現解析

出生後 21 日目の子動物及び離乳後曝露動物の海馬歯状回における mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。脳標本をメタカーン固定液により固定した [4]。対照群及び高用量群のメタカーン固定脳標本を用いて, 大脳の bregma の後方約-3.0 mm 又は-3.5 mm の 2 mm 厚切片より生検トレパン (KAI インダストリーズ株式会社, 岐阜) を用いて海馬歯状回部分を採取し, QIAzol (Qiagen, Germany) 及び RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した (N = 6/群)。2 µg の total RNA から SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて cDNA を合成した。PCR 反応は SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い, Step One Plus™ Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) にて, 製造元のプロトコールに従って実施した。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Thermo Fisher Scientific) を用いて設計し, Table 1-16 に示した。各遺伝子の mRNA 発現量は, 内因性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyl

transferase (*Hprt1*) または glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) の  $C_T$  値を同時に算出し, 0 ppm 群又は 0 mg/kg との  $\Delta\Delta C_T$  値を算出して比較した [50]。

## 統計解析

各曝露実験の体重ならびに臓器重量, 摂餌量, 摂水量, 免疫組織化学染色, TUNEL 染色における陽性細胞のカウント数, 遺伝子発現解析結果は群平均及び標準偏差を算出した。発達期曝露実験の解析結果については母動物ごとに平均値を算出し, さらに群平均及び標準偏差を算出した。統計学的解析は, 体重, 摂餌量, 摂水量, 臓器重量, 陽性細胞数について, 各群の分散を Bartlett の方法で検定し, 等分散の場合は Dunnett, 不等分散の場合は Steel の方法により対照群と各群との検定を行った。2 群間の比較においては各群の分散を F 検定により比較し, 等分散の場合は Student の t 検定, 不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定により対照群と各投与群との検定を行った。すべての統計学的解析はエクセル統計 2010 ソフトウェア (社会情報サービス株式会社, 東京) を用いて行った。

## 結 果

### 動物への影響

発達期曝露試験では、試験期間中にいずれの群でも母動物の死亡はなかった。一方で、3 及び 10 ppm 群で各 1 例の未妊娠動物がみられたため、試験データから除外した [Table 1-1]。また、曝露群の着床痕数、出生数、雄性率に関して有意な変化はなかった。経産後 4 日目に、雄子動物数の調整のため各群 2 例の母動物を実験から除外した [Table 1-1]。試験期間中、いずれの曝露群でも母動物の体重に有意な変化はなかった [Table 1-2]。経産後 7, 14, 21 日目に 30 ppm 群で摂餌量が対照群より低値を示した [Table 1-3]。妊娠 9, 13 日目にいずれの曝露群でも飲水量が対照群より低値を示した他、妊娠 7, 20 日目及び経産後 1, 11, 14, 21 日目に 30 ppm 群で摂水量が対照群より低値を示した。試験期間中いずれの曝露群でも異常な歩行や行動はなかった。経産後 21 日目の解剖時は、いずれの投与群でも母動物の体重及び脳重量に有意な変化はなかった [Table 1-8]。

発達期曝露試験では、試験期間中にいずれの群でも子動物の死亡及び異常な歩行や行動はなかった。生後 7, 70 日目に 30 ppm 群で体重が対照群より低値を示した [Table 1-4]。生後 35 日目に 3, 10 ppm 群で、生後 42 日目に 3 ppm 群で摂餌量が対照群より高値を示した [Table 1-5]。生後 56, 63 日目に 30 ppm 群で摂餌量が対照群より低値を示した。生後、35, 42 日目に 30 ppm 群で飲水量が対照群より低値を示した。生後 21 日目の解剖時は、30 ppm 群で体重が、10 ppm 群以上で脳重量が対照群より低値を示した [Table 1-9]。また病理組織学的変化では、SGZ の長さ及び海馬歯状回の面積が対照群より低値を示した [Table 1-12]。生後 77 日目の解剖時は、いずれの群でも体重に変化はなかった。30 ppm 群で脳重量が対照群より低値を示した [Table 1-9]。また病理組織学的変化では、SGZ の長さはいずれの投与群でも有意な変化はなかったが、30 ppm 群で海馬歯状回の面積が対照群より低値を示した [Table 1-12]。

離乳後曝露試験では、試験期間中にいずれの群でも動物の死亡及び肉眼的な異常はなかった。投与 7 日目から 28 日目に 5 mg/kg 群以上で体重が対照群より低値を示した [Table 1-6]。投与 3 日目から 21 日目に 5 mg/kg 群以上で、投与 28 日目に 15 mg/kg 群で摂餌量が対照群より



り低値を示した [Table 1-7]。投与 14 日目から 28 日目に 15 mg/kg 群で飲水量が対照群より低値を示した。解剖時は、5 mg/kg 群以上で体重が、15 mg/kg で脳重量が対照群より低値を示した [Table 1-10]。また、病理組織学的変化では、SGZ の長さ及び海馬歯状回の面積はいずれの投与群でも有意な変化はなかった [Table 1-13]。

### 曝露動物の SGZ 及び GCL における顆粒細胞系譜の分布

発達期曝露試験では、雄子動物の出生後 21 日において 30 ppm 群で、GFAP 陽性細胞 (type-1 幹細胞) 数が減少及び SOX2 陽性細胞 (type-1 幹細胞～type-2b 前駆細胞) 数、TBR2 陽性細胞 (type-2b 前駆細胞) 数及び DCX 陽性細胞 (type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞) 数が増加した [Fig. 1-2]。一方で、NeuN 陽性細胞 (成熟顆粒細胞) 数は変化しなかった。出生後 77 日において 10 及び 30 ppm 群で、NeuN 陽性細胞数が減少した。一方で、GFAP 陽性細胞数、SOX2 陽性細胞数、TBR2 陽性細胞数及び DCX 陽性細胞数は変化しなかった。また、出生後 77 日における NeuN 陽性顆粒細胞層の厚さ、及び出生後 21 日及び 77 日における NeuN 陽性顆粒細胞層の面積が 30 ppm 群で減少した [Table 1-14]。

離乳後曝露試験では、15 mg/kg 群で GFAP 陽性細胞数及び SOX2 陽性細胞数が減少、5 及び 15 mg/kg 群で TBR2 陽性細胞数、DCX 陽性細胞数及び NeuN 陽性細胞が減少した [Fig. 1-3]。また、NeuN 陽性顆粒細胞層の厚さが 5 及び 15 mg/kg 群で減少した [Table 1-15]。

### 曝露動物の歯状回門における成熟ニューロン及び介在ニューロンの分布

発達期曝露試験では、出生後 21 日及び 77 日において、いずれの投与群でも、RELN 陽性細胞数、PVALB 陽性細胞数、CALB1 陽性細胞数、CALB2 陽性細胞数及び NeuN 陽性細胞数は変化しなかった [Fig. 1-4]。

離乳後曝露試験では、いずれの投与群でも、RELN 陽性細胞数、PVALB 陽性細胞数、CALB1 陽性細胞数、CALB2 陽性細胞数及び NeuN 陽性細胞数は変化しなかった [Fig. 1-5]。

### 曝露動物の SGZ における細胞増殖活性、細胞周期停止及びアポトーシス

発達期曝露試験では、出生後 21 日において 30 ppm 群で、p21<sup>Cip1/Waf1</sup> 陽性細胞数及び TUNEL 陽性細胞数が増加した。一方で、PCNA 陽性細胞数は変化しなかった [Fig. 1-6]。出生後 77 日において、PCNA 陽性細胞数、p21<sup>Cip1/Waf1</sup> 陽性細胞数及び TUNEL 陽性細胞数は変化しなかった。

離乳後曝露試験では、15 mg/kg 群で、TUNEL 陽性細胞数が増加した。p21<sup>Cip1/Waf1</sup> 陽性細胞数及び TUNEL 陽性細胞数は変化しなかった [Fig. 1-7]。

### 曝露動物の GCL におけるシナプス可塑性関連分子

発達期曝露試験では、出生後 21 日において 30 ppm 群で COX2 陽性細胞数が増加した。一方で、ARC 陽性細胞数は変化しなかった [Fig. 1-8]。出生後 77 日において、ARC 陽性細胞数及び COX2 陽性細胞数は変化しなかった。

離乳後曝露試験では、5 及び 15 mg/kg 群で ARC 陽性細胞数及び COX2 陽性細胞数が減少した [Fig. 1-9]。

### 曝露動物の海馬歯状回における遺伝子発現解析

発達期曝露試験では、子動物の脳が小さかったため海馬部分を 1 mm のパンチ生検で回収することが出来なかったため、遺伝子発現解析を実施しできなかった。

離乳後曝露試験では、顆粒細胞の分化マーカーの *Gfap* 及び *Dpsyl3*, N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型レセプターである *Grin2a* の発現が減少した [Table1-17]。介在ニューロン関連分子の *Pvalb*, 神経成長因子である *Bdnf* の発現, アポトーシスに関連する分子の *Casp6*, *Casp8*, *Bax*, *Tnf*, DNA 損傷関連分子である *Tp53*, *Mdm2*, *Cdkn1a*, DNA 修復関連分子の *Mgmt* の発現が増加した。その他の介在ニューロン, グルタミン酸もしくはアセチルコリンレセプターに関連する遺伝子群に変化はみられなかった。



## 考 察

MNU の発達期曝露により、子動物の脳重量の低値が 30 ppm 投与群の生後 21 日目及び生後 77 日目、及び 10 ppm 投与群の生後 21 日目で確認された。これら結果は、過去の報告である、MNU の妊娠 14 日目の発達期曝露によって誘発する小頭症 [45] を示唆する。また、今回の MNU 発達期曝露により、SGZ 長の短縮及び海馬歯状回の面積の減少が、30 ppm 投与群の生後 21 日目及び 77 日目で確認された。これらの結果は、過去の報告である、MNU の妊娠 14 日目に 10 mg/kg の MNU を単回腹腔内投与によって誘発する海馬の低形成 [81] を示唆する。一方で、妊娠期～離乳期までの持続的な MNU 発達期曝露は、GCL の層構造の厚さを減少させたが、妊娠期の単回投与では GCL の厚さに変動はなかったと報告されている [81]。これらの結果は、一過的な MNU 発達期曝露は終脳の神経上皮の増殖活性を有する神経細胞を標的とし海馬の低形成のみを誘発するのに対し、持続的な MNU 発達期曝露は海馬の顆粒細胞系譜を含めた多くの増殖性神経細胞が標的となり、GCL の厚みを減少させたと考えられる。また、今回の離乳後曝露試験では GCL の厚さは減少したが、海馬歯状回の面積は変動しなかった。従って、生後の MNU 曝露の影響は、既に形成された海馬歯状回の神経新生 [48] を標的とする。対照的に、胎生期の MNU 曝露の影響は海馬を形成する終脳の神経上皮の増殖活性を有する神経細胞を標的とすることが推察された。

今回の MNU 発達期曝露では、生後 21 日目に 30 ppm 投与群で SGZ の GFAP 陽性 type-1 神経幹細胞の減数及び SOX2, TBR2, DCX 陽性細胞の増数が確認された。また、TUNEL 陽性アポトーシス細胞の増数が確認されたことから、MNU が主に type-1 神経幹細胞を標的としたアポトーシスを誘発したものと推察された。しかし、type-1 神経幹細胞は SGZ での割合は少なく増殖性もほとんどない。従って、より高い増殖活性を有する type-2 及び type-3 前駆細胞の方が MNU の標的となり細胞傷害を誘発すると考えるのが一般的である。考えられる可能性としては、SGZ の生存細胞の増殖活性が MNU 発達期曝露により促進されることであり、同時に促進される増殖細胞の細胞死が真の増殖活性を隠蔽している可能性が示唆される。成熟顆粒細胞の COX2 発現が SGZ 前駆細胞のプロスタグランジン E/EP2 を介して増殖活性を促進すること

が報告されている [54]。さらに, COX2 の KO マウスでは, SGZ の DCX 陽性細胞の減数が報告されている [61]。これらの結果は, 今回の MNU 発達期曝露により離乳時でみられた GCL の COX2 陽性細胞の増加が, 顆粒細胞系譜のアポトーシスの代償反応として SGZ 細胞の増殖活性を促進させている可能性を示唆する。従って, 離乳時に PCNA 陽性細胞に有意な増数はないものの, SGZ の前駆細胞の増殖活性が増加している可能性が示唆される。一方, 生後 77 日目では, 30 ppm 投与群で GCL の厚さの減少を伴い NeuN 陽性未熟及び成熟顆粒細胞が MNU の休薬後に減数した。これらの動物では, 生後 21 日目に  $p21^{Cip1/Waf1}$  陽性細胞が増数している。 $p21^{Cip1/Waf1}$  は, サイクリン依存性リン酸化酵素阻害作用を有し, DNA 傷害後に G<sub>1</sub>/S チェックポイントで細胞周期停止を誘発する [71]。また,  $p21^{Cip1/Waf1}$  は細胞の静止期を維持し, 慢性的な  $p21^{Cip1/Waf1}$  の活性化は不可逆的な細胞周期の停止及び細胞老化を引き起こすことが報告されている [67]。以上より, 成熟時にみられた NeuN 陽性未熟及び成熟顆粒細胞の減数は, 離乳時に増加した  $p21^{Cip1/Waf1}$  陽性細胞の DNA 傷害が蓄積し, G<sub>1</sub>/S 細胞周期停止が促進された結果と考えられた。

離乳後曝露試験では, 15 mg/kg 投与群で GFAP 陽性又は SOX2 陽性 type-1 神経幹細胞及び type-2a 前駆細胞が, 5 mg/kg 以上の投与群で TBR2, DCX, NeuN 陽性 type-2, type-3 前駆細胞及び未熟顆粒細胞, 成熟顆粒細胞が SGZ 又は GCL で減数した。TUNEL 陽性細胞も 15 mg/kg 投与群で増数した。このことから, MNU の影響は type-2 以降の顆粒細胞系譜に対する方が type-1 神経幹細胞より強く 離乳後の MNU の曝露は増殖活性の高い細胞を標的することが示唆された。同様に, ニトロソ尿素化合物であるエチルニトロソ尿素の単回静脈内投与の結果, SGZ で増殖細胞及び DCX 陽性前駆細胞を減数させる [13]。この結果は, MNU の離乳後曝露が増殖活性の高い細胞に対し細胞傷害性を有することを示唆しており, 細胞保護や代償反応がみられた MNU の発達期曝露結果とは異なる。MNU の離乳後曝露では,  $p21^{Cip1/Waf1}$  陽性細胞の変数はなく, 遺伝子発現解析においても *Cdkn1a* の変動は確認されなかった。この結果は, MNU の殺細胞作用によって誘発された最大限の顆粒細胞系譜の減数及び COX2 を介した細胞増殖活性の抑制によるものと考えられた。一方で, MNU の離乳後曝露では *Pvalb* 及び *Bdnf* の遺伝子発現量の増加がみられた。脳由来神経栄養因子 (BDNF) は神経の成熟を促進し, PVALB 陽性

GABA 性介在ニューロンを活性化する報告がある [10, 32]。さらに、歯状回門の PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロンは type-2 前駆細胞の増殖を促進する [84]。従って、*Pvalb* 及び *Bdnf* の遺伝子発現量の増加は、MNU の離乳後曝露による影響に対する代償性の反応の可能性があるが、MNU の殺細胞作用や COX2 を介した増殖活性の抑制による影響が強いため、type-2 前駆細胞も減数している。

発達期曝露試験及び離乳後曝露試験では 共通して TUNEL 陽性細胞が増数した。さらに、離乳後曝露試験の海馬歯状回では遺伝子解析の結果、カスパーゼ 6 及びカスパーゼ 8 や *Bax* 及び *Tnf* などのアポトーシスを示唆する遺伝子発現が、DNA 傷害指標である *Trp53* と共に増加した。カスパーゼ 8 は、外因経路によって活性化するイニシエーターであり、カスパーゼ 6 は、ミトコンドリア経路の下流のアポトーシス実行因子として機能する [88]。*Tnf* や *Bax* の遺伝子発現量の増加は、MNU の曝露により様々なアポトーシス経路が活性化することを示唆している。さらに、これらの結果は SGZ での DNA 傷害が MNU の曝露によって誘発された反応に対し、p53 が活性化し、アポトーシス又は DNA 修復などの細胞運命を定めている。MNU は、*O*<sup>6</sup>-メチルグアニジン塩基を含むミスペアによってアポトーシスを誘導する [25]。本実験でも、*O*<sup>6</sup>-メチルグアニジンを発現する遺伝子の *Mgmt* の発現増加が海馬歯状回でみられた。この結果は、MNU が *O*<sup>6</sup>-メチルグアニジン蓄積を誘発させた結果、アポトーシスが起ることを示唆する。発達期曝露試験では、神経新生に影響のある高用量群で、小頭症のため 1 mm の生検トレパンでは海馬歯状回のサンプリングが上手くいかず、遺伝子解析結果は得られていないが、TUNEL 陽性細胞の増数がみられることから、離乳後曝露と同様の遺伝子発現変動が生じたものと考えられる。

以上より、MNU では曝露時期を問わず、DNA の直接損傷に起因した type-1 神経幹細胞を含む SGZ 細胞のアポトーシスを主要メカニズムとした神経新生障害が示唆された。また、発達期曝露による一過的な前駆細胞の増加は COX2 発現による増殖活性促進に起因するものと考えられ、発達期特有な反応であると推察されることから、曝露時期の違いによる神経新生障害の反応パターンの違いに反映されるものと考えられた。

## 小 括

第 1 章では, MNU の発達期曝露と離乳後曝露を行った。発達期曝露では, 交配後の雌ラットに 0, 3, 10 及び 30 ppm の濃度で妊娠 6 日目から出産後 21 日目の離乳時まで MNU を飲水投与し, 子動物の離乳時及び成熟後の神経新生への影響を検討した。その結果, 離乳時に 30 ppm 群で SGZ/GCL の GFAP 陽性 type-1 神経幹細胞数が減少, SOX2, TBR2, DCX 陽性 type-2/type-3 神経前駆細胞及び未熟顆粒細胞数, TUNEL 陽性アポトーシス細胞数, p21 陽性細胞周期停止細胞数, COX2 陽性成熟顆粒細胞数が増加した。成熟後では, GCL の NeuN 陽性成熟顆粒細胞数が減少した。次に, 5 週齢のラットに 0, 5 及び 15 mg/kg の MNU を 28 日間反復強制経口投与し, 離乳後曝露による神経新生への影響を検討した。その結果, 5 mg/kg 群から SGZ/GCL の GFAP, SOX2, TBR2, DCX, NeuN, COX2, ARC 陽性細胞数が減少し, TUNEL 陽性細胞数は増加した。また, 歯状回では NMDA 型グルタミン酸受容体の遺伝子発現が減少した。以上より, MNU では曝露時期を問わず, DNA の直接損傷に起因した SGZ 細胞のアポトーシスを主要メカニズムとした神経新生障害が示唆された。また, 発達期曝露による一過的な前駆細胞の増加は COX2 発現による増殖活性促進に起因し, 発達期特有な反応であると考えられることから, 曝露時期の違いによる神経新生障害の反応パターンの違いに反映される可能性が示唆された。

## 第 2 章

### VPA のラット発達期及び離乳後曝露による 神経新生に及ぼす影響の検討

## 緒 言

バルプロ酸（VPA）は、抗てんかん薬、精神安定薬及び頭痛薬として使用されている。胎生期（特に神経管閉塞の間）の VPA 曝露が、小脳を含んだ形での異常な脳形成及び自閉症様症状に関与することが実験動物の曝露実験で明らかにされている [34, 70]。ラットの自閉症モデルは、妊娠 11 日目の母動物に 800 mg/kg の VPA を投与することで確認されており、妊娠 16 日目の胎子では、皮質の菲薄化や神経の移動異常が報告されている [47]。さらに、妊娠 12.5 日目に 500 mg/kg の VPA を投与した自閉症モデル例では、生後 67 日目の子動物において、アンモン角、海馬台、海馬歯状回の神経細胞の密度が増加している [20]。また、VPA はヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤としても知られており、成熟ラットに 1 日 2 回、300 mg/kg の VPA を 14 日間腹腔内投与すると、海馬の神経前駆細胞のヒストンのアセチル化に関連した SGZ の分化促進作用が誘導される [31]。以上より、VPA は発達神経毒性を有しており、海馬における神経新生障害物質として既知物質であるが、発達期の脳に持続的に曝露させる OECD ガイドラインの方法に準拠した発達神経毒性試験での海馬における神経新生への影響はまだ確認されていない。

第 2 章では、VPA をエピゲノム毒性物質の代表として用いて、OECD の発達神経毒性試験ガイドライン [63]の方法に準拠した、妊娠期～離乳期までの発達期曝露実験をラットで行い、type-1 神経幹細胞を含む海馬における神経新生への影響を検討した。その目的のため、SGZ における顆粒細胞系譜指標、歯状回門における GABA 性介在ニューロン指標及び GCL のシナプス可塑性指標の免疫組織化学的解析を行い、各細胞の分布変動を確認した。また、海馬に入力される様々な伝達物質の合成酵素、受容体及び応答遺伝子のリアルタイム RT-PCR 解析を行い、海馬における神経新生への関与について検討した。

さらに、第 1 章同様に、離乳後動物の海馬歯状回における神経新生障害の検出性を検討する目的で、生後 5 週齢のラットに対する VPA の 28 日間反復投与を OECD の 28 日間反復投与試験ガイドライン [64]に準拠して行い、発達期曝露試験と同様の解析により海馬における神経新生への影響について比較・検討した。



## 材料および方法

### 化学物質及び供試動物

VPA (CAS No. 99-66-1) は Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) より購入した。発達期曝露実験では、交配後（プラグ確認日を妊娠 0 日として起算）の Sprague-Dawley 系 SPF ラットを日本チャールス・リバー株式会社（横浜）から購入して実験に供した。動物は温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55\pm 15\%$ 、照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件の飼育室で、床敷を入れたプラスチック製ケージに 1 匹ずつ収容し、分娩後は母子共に同一ケージに収容した。母動物は妊娠 2 日から分娩後 21 日（分娩日を生後 0 日として起算）の離乳まで、基礎飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社，東京）を自由に摂取させた。飲料水は妊娠 6 日目の VPA 投与開始までは水道水を自由に摂取させた。離乳後の子動物はプラスチック製ケージに 3 から 4 匹ずつ収容し、基礎飼料 CRF-1 及び水道水を自由に摂取させた。

離乳後曝露実験では、4 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系 SPF ラットを日本チャールス・リバー株式会社から購入して実験に供した。動物は温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55\pm 15\%$ 、照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件の飼育室で、床敷を入れたプラスチック製ケージに 3 から 4 匹ずつ収容し、基礎飼料 CRF-1 及び水道水を自由に摂取させた。

全ての動物実験計画は実験施設（東京農工大学）の動物実験委員会の承認を受け、全ての動物実験操作は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議，平成 18 年 6 月 1 日）を遵守した。

### 実験デザイン

#### ①発達期曝露試験

交配後の雌ラットを 1 群あたり 12 匹ずつの 4 群に無作為に群分けし、妊娠 6 日目から分娩後 21 日目の離乳時まで、VPA を 0, 667, 2000 ppm の濃度で精製水に混じ、自由に摂取させた。所属研究室で用量設定試験を実施し、投与量の設定根拠とした。即ち、用量設定試験において、2000 ppm 以上の VPA 飲水投与により母動物の体重増加抑制が確認され、4000 ppm 群では摂

餌量及び飲水量の低値が確認されたことから、OECD の発達神経毒性試験ガイドラインに従い、母動物に軽度の毒性が出る用量として最高用量を 2000 ppm とし、公比 3 で除した 3 用量を設定した。

母動物は、投与期間中、体重を週 2-3 回、摂餌量及び摂水量を週 2 回の頻度で測定した。生後 4 日目に、1 腹雄各 8 匹になるよう無作為に選抜して子数の調整を行った。1 腹の雄子動物が 8 匹に満たない場合は、1 腹 8 匹となるように雌子動物を残して調整した。子動物は、体重を授乳期間中は週 2 回、離乳後は体重及び摂餌量を週 1 回の頻度で測定した。

母動物は、出産後 21 日目に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ剖検し脳重量を測定した。子動物は、生後 21 日目に無作為に選抜した各腹雄各 1-2 匹 (各群 11-12 匹) の雄子動物の脳を免疫組織化学的解析に用いるため、4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) による灌流固定を行った (流速 10 mL/分)。さらに、各腹雄各 2-3 匹 (各群 24-36 匹) を、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ剖検し、脳を遺伝子発現解析に供した。各腹残りの子動物は基礎飼料 CRF-1 及び水道水を自由に摂取させて継続飼育し、体重および摂餌量を週 1 回測定した。生後 77 日目に無作為に選抜した各腹雄各 1-2 匹 (各群 11-12 匹) の雄子動物の脳を免疫組織化学的解析に用いるため、4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) による灌流固定を行った (流速 35 mL/分)。さらに、各腹雄各 2-3 匹 (各群 24-36 匹) を、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ剖検し、脳を遺伝子発現解析に供した。剖検時、脳重量を測定した。性周期におけるステロイドホルモンの周期的変動によりニューロン新生が影響を受けることが報告されていることから [67]、雌の試料は保存のみとし、以降の解析は実施しなかった。

化学物質の曝露時期は、OECD ガイドラインに従い、着床時期 (妊娠 6 日目) から離乳時 (生後 21 日目) とした。剖検時期は、曝露が終了する離乳時点、および性成熟が完了する時期 (生後 77 日目) を目安に決定した。この 2 点での検討を行うことで、発達神経毒性の可逆性を検討することができると考えられる。

## ②離乳後暴露試験



1 週間の馴化飼育後、5 週齢の動物を 1 群当たり 20～24 匹ずつの 4 群に無作為に群分けし、0, 200, 800, 900 mg/kg の用量で VPA を 28 日間強制経口投与した。所属研究室で用量設定試験を実施し、投与量の設定根拠とした。即ち、用量設定試験において、1000 mg/kg の VPA 強制経口投与により投与動物の死亡が確認されたが、その後、用量変更した 700 mg/kg では死亡は確認されなかったことから、最高用量を 900 mg/kg として設定した。投与期間中、体重及び摂餌量を週に 1-2 回測定した。最終投与翌日に、無作為に選抜した各群 11 匹の脳を免疫組織化学的解析に用いるため、4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) による灌流固定を行った (流速 35 mL/分)。残りの動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ剖検し、脳を遺伝子発現解析に供した。剖検時、脳重量を測定した。

#### 脳における免疫組織学的染色及びアポトーシス検出

4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) 灌流固定を行った出生後 21 日及び 77 日の雄子動物又は離乳後曝露動物から脳を採取し、同じ固定液を用いて一昼夜固定した。大脳の bregma の後方約-3.0 mm 又は-3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、さらに 4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) バッファーで一昼夜固定した。前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 µm 厚の連続切片を作製した。切片は Table 2-11 に示した条件で以下の各分子に対する抗体を用いて免疫染色を行った。顆粒細胞層における神経新生の分化ステージ指標である glial fibrillary acidic protein (GFAP) [42], SRY box 2 (SOX2) [77], T box brain 2 (TBR2) [53], Brain lipid-binding protein (BLBP), doublecortin (DCX) [42, 53], Neuron specific Nuclea (NeuN) [42, 53], 介在ニューロンの指標である [24, 26], reelin (RELN), parvalbumin (PVALB), calbindin-D-28K (CALB1), calbindin-D-29K (Calretinin, CALB2), glutamate decarboxylase, 成熟ニューロンの指標である NeuN, 細胞増殖活性の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA), immediate early gene である FBJ osteosarcoma oncogene (FOS), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC) 及び cyclooxygenase-2 (COX2) [27, 59, 61] について実施した。シグナル検出は VECTASTAIN® Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて製造元のプロトコールに従って実施し、免疫反応は

DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて可視化した後、ヘマトキシリンにより対比染色した。脱パラフィンには 0.3 v/v %過酸化水素水を含むメタノール溶液 (室温, 30 分) を用いた。海馬歯状回の SGZ におけるアポトーシスの評価については、TUNEL 法 (Apop Tag® Peroxidase in Situ apoptosis detection kit, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を用いて製造元のプロトコールに従って検出を行った。標本はヘマトキシリンにより対比染色を施した。

### 免疫組織化学染色および TUNEL 染色陽性細胞の定量解析

海馬歯状回 SGZ/GCL における GFAP, SOX2, TBR2, DCX, NeuN, PCNA, TUNEL, ARC 及び COX2 陽性細胞数について、両側でカウントし、単位長さ当りの陽性細胞数を算出した [Fig. 1-1]。歯状回門に分布する RELN, PVALB, CALB1, CALB2, GAD67, NeuN 陽性細胞については、両側でカウントし、歯状回門の単位面積当りの陽性細胞数の検索を行った。これらの解析は盲検法で実施した。歯状回門におけるアンモン角 CA3 領域の顆粒細胞はカウントから除外した。定量的解析のための写真撮影は 200 及び 400 倍の倍率で行い解析した。

### 遺伝子発現発現解析

出生後 21 日の子動物及び離乳後曝露動物の海馬歯状回における mRNA 発現量をリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて解析した。脳標本をメタカーン固定液により固定した [4]。対照群及び高用量群のメタカーン固定脳標本を用いて、大脳の bregma の後方約-3.0 mm 又は-3.5 mm の 2 mm 厚切片より生検トレパン (KAI インダストリーズ株式会社, 岐阜) を用いて海馬歯状回部分を採取し、QIAzol (Qiagen, Germany) 及び RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した (N = 6/群)。2 µg の total RNA から SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。PCR 反応は SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、Step One Plus™ Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) にて、製造元のプロトコールに従って実施した。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Thermo Fisher Scientific) を用いて設計し、Table 2-13 に示した。各遺伝子の mRNA 発現量は、内因性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyl

transferase (*Hprt1*) または glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) の  $C_T$  値を同時に算出し, 0 ppm 群又は 0 mg/kg 群との  $\Delta\Delta C_T$  値を算出して比較した [50]。

## 統計解析

各曝露試験の体重ならびに臓器重量, 摂餌量, 摂水量, 免疫組織化学染色, TUNEL 染色における陽性細胞のカウント数, 遺伝子発現解析結果は群平均及び標準偏差を算出した。発達期曝露試験の解析結果については母動物ごとに平均値を算出し, さらに群平均及び標準偏差を算出した。統計学的解析は, 体重, 摂餌量, 摂水量, 臓器重量, 陽性細胞数, 各群の分散を Bartlett の方法で検定し, 等分散の場合は Dunnett, 不等分散の場合は Steel の方法により対照群と各群との検定を行った。2 群間の比較においては各群の分散を F 検定により比較し, 等分散の場合は Student の t 検定, 不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定により対照群と各投与群との検定を行った。すべての統計学的解析はエクセル統計 2010 ソフトウェア (社会情報サービス株式会社, 東京) を用いて行った。

## 結 果

### 動物への影響

発達期曝露試験では、試験期間中にいずれの群でも母動物の死亡はなかった。一方で、0 及び 2000 ppm 群で各 1 例の未妊娠動物がみられたため、試験データから除外した [Table 2-1]。また、曝露群の着床痕数、出生数、雄性率に関して有意な変化はなかった。試験期間中、いずれの曝露群でも母動物の体重に有意な変化はなかった [Table 2-2]。経産後 2 日目に 667 ppm 群以上で摂餌量が対照群より低値を示した [Table 2-3]。経産後 2 日目及び 14 日目から 20 日目に 2000 ppm 群で飲水量が対照群より低値を示した。試験期間中にいずれの曝露群でも異常な歩行や行動はなかった。経産後 21 日目の解剖時は、いずれの曝露群でも母動物の体重及び脳重量に有意な変化はなかった [Table 2-8]。

発達期曝露試験では、試験期間中にいずれの群でも子動物の死亡及び異常な歩行や行動はなかった。また、いずれの曝露群でも子動物の体重、摂餌量、飲水量に有意な変化はなかった [Table 2-4 及び Table 2-5]。生後 21 日目及び 77 日目の解剖時は、いずれの曝露群でも母動物の体重及び脳重量に有意な変化はなかった [Table 2-9]。

離乳後暴露試験では、試験期間中にいずれの群でも動物の死亡及び肉眼的な異常はなかった。投与 6 日目に 900 mg/kg 群で、投与 10 日目から 28 日目に 800 mg/kg 群以上で体重が対照群より低値を示した [Table 2-6]。投与 1 日目に 900 mg/kg 群で摂餌量が対照群より高値を示し、投与 21 日目に 900 mg/kg 群で、投与 4 日目から 11 日目に 800 mg/kg 群以上で低値を示した [Table 2-7]。投与 1 日目に 800 mg/kg 群で飲水量が対照群より高値を示した。解剖時は、800 mg/kg 群以上で体重及び脳重量が対照群より低値を示した [Table 2-10]。

### 曝露動物の SGZ 及び GCL における顆粒細胞系譜の分布

発達期曝露試験では、生後 21 日目に顆粒細胞系譜の分布変動はなかった [Fig. 2-1]。一方で、生後 77 日目に 2000 ppm 群で NeuN 陽性細胞が増数した。また、出生後 77 日における NeuN 陽性顆粒細胞層の厚さが 667 ppm 群以上増加し、NeuN 陽性顆粒細胞層の面積が 2000 ppm 群で

増加した [Table 2-12]。

離乳後曝露試験では、900 mg/kg 群で GFAP 陽性細胞が増数、DCX 陽性細胞が減数した [Fig. 2-2]。

#### 曝露動物の歯状回門における成熟ニューロン及び介在ニューロンの分布

発達期曝露試験では、生後 21 日に、 $\geq 667$  ppm 群で RELN 陽性細胞の減数が、2000 ppm 群で PVALB 及び GAD67 陽性細胞が減数した [Fig. 2-3]。生後 77 日には、2000 ppm 群で GAD67 陽性細胞が減数した。

離乳後曝露試験では、900 mg/kg 群で NeuN 陽性細胞が減数した [Fig. 2-4]。いずれの投与群でも、介在ニューロンの分布変動はなかった。

#### 曝露動物の SGZ における細胞増殖活性及びアポトーシス

発達期曝露試験では、生後 21 日に、いずれの投与群でも、細胞増殖活性及びアポトーシスの分布変動はなかった [Fig. 2-5]。出生後 77 日に、 $\geq 667$  ppm 群で PCNA 陽性細胞が増数した。TUNEL 陽性細胞の分布変動はなかった。

離乳後曝露試験では、いずれの投与群でも、細胞増殖活性及びアポトーシスの分布変動はなかった [Fig. 2-6]。

#### 曝露動物の GCL におけるシナプス可塑性関連分子

発達期曝露試験では、生後 21 日に、いずれの投与群でも、シナプス可塑性関連分子の分布変動はなかった [Fig. 2-7]。出生後 77 日に、 $\geq 667$  ppm 群で ARC 陽性細胞数及び COX2 陽性細胞が増数した。FOS 陽性細胞の分布変動はなかった。

離乳後曝露試験では、いずれの投与群でも、シナプス可塑性関連分子の分布変動はなかった [Fig. 2-8]。

#### 曝露動物の海馬歯状回における遺伝子発現解析

発達期曝露試験では、介在ニューロン指標の *Reln* 及び *Gad1* の発現が増加し、*Pvalb* の発現が減少した他、NMDA 型受容体のサブタイプである *Grin2d* の発現が減少した [Table 2-14]。

離乳後曝露試験では、顆粒細胞の分化指標の *Dpsyl3* の発現が減少、介在ニューロン指標の *Pvalb* の発現が減少、幹細胞受容体の *Kit* の発現が増加、ニコチン性アセチルコリン受容体サブタイプの *Chrn2* の発現が減少、AMPA 型受容体サブタイプの *Gria1* の発現が増加し、*Gria3* の発現が減少した [Table 2-15]。

## 考 察

発達期曝露試験では、2000 ppm 投与群で離乳時に歯状回門で RELN, PVALB, GAD67 陽性 GABA 性介在ニューロンが減数した。RELN 陽性細胞は 667 ppm 投与群でも減数した。クブリゾンやグリシドールの発達期曝露は、SGZ の顆粒細胞を標的とした神経新生障害を誘発し、それに続いて歯状回門の GABA 性介在ニューロン数が変動することが見出されている [2, 6]。しかし、今回の VPA の発達期曝露結果では、成熟後に SGZ/GCL の PCNA 陽性増殖細胞, NeuN 陽性成熟顆粒細胞, 及び ARC 及び COX2 陽性細胞が 667 ppm 以上の曝露群で増数している。これらの結果から、VPA の発達期曝露は曝露終了時である離乳時には主に GABA 性介在ニューロンを標的とし、休薬後の成熟時に遅発的な影響として顆粒細胞系譜に影響を生じさせることが示唆された。顆粒細胞系譜への遅発的な影響については以下の報告がある。カルシウム交換因子でシナプス可塑性に寄与する *Grfl* 遺伝子を標的のすると、マウス海馬歯状回の前駆細胞及び未熟顆粒細胞の減数が 1 か月齢ではみられず、2 か月齢でみられる [18]。また、実験的に離乳時に母親と離れることによるストレスが、エピジェネティックな制御を介して成熟後の海馬における神経新生に影響することが見出されている [80]。このような報告があることから、VPA の発達期曝露が顆粒細胞系譜への直接的なエピジェネティックな制御を介して海馬における神経新生に影響を与えている可能性が考えられた。

自閉症患者の脳皮質で GABA 性介在ニューロン入力への減少がみられている [85]。自閉症スペクトラム障害のミュータント動物、例えば Fragile X, Rett 症候群, Angelman 症候群, Dravet 症候群、や VPA 誘発自閉症モデル動物では、脳皮質、扁桃体、海馬で GAD67 及び PVALB 陽性介在ニューロンの減数が確認されている [15]。また、VPA 誘発モデルでは、小規模抑制性シナプス後電流の頻度の低下、抑制性シナプス後電流を電気的に誘発する減衰時間の低下、脳皮質 2/3 層における細胞の入力及び出力の低下もみられる [8]。GABA 作動系の傷害は、感情、コミュニケーションや社会性といった自閉症スペクトラム障害の核となるシナプスの興奮/抑制の割合を増加させる [8]。RELN 陽性細胞に関しても、自閉症患者の脳皮質で減数していること [11]、機能障害が自閉症でみられる構造及び行動異常に寄与する可能性が報告



されている [23]。これらの報告は、今回の VPA 発達期曝露で確認された歯状回門部の GABA 性介在ニューロンの減数を支持する結果であると考えられる。

今回の VPA 発達期曝露では、離乳時に歯状回門の RELN 陽性細胞の減数と対照的に、海馬歯状回で *Reln* 遺伝子の発現が増加していた。RELN は、海馬歯状回で、顆粒細胞の移動を調節し、正常な顆粒細胞系譜の統制に関与する [26]。RELN の入力は、*Vldlr* や *Dab1* が発現する受容体を介して伝達され、自閉症患者では *Vldlr* 遺伝子の発現増加や *Dab1* 遺伝子の発現減少が報告されている [23]。しかし、今回の VPA 発達期曝露では *Vldlr* や *Dab1* 遺伝子の発現変動は確認されなかった。一方で、VPA 曝露したマウスの前脳でプロモーター領域のメチル化減少により *Reln* 遺伝子の発現が増加することが報告されている [19]。今回の VPA 発達期曝露の結果では、歯状回門の RELN 陽性細胞数が減少し、*Reln* 遺伝子発現が増加していることから、減数した RELN 陽性細胞の *Reln* 遺伝子発現が増加し、顆粒細胞系譜の移動や統制機能を保持していたことが考えられた。また、RELN 同様に、離乳時に歯状回門の GAD67 陽性細胞の減数と対照的に、海馬歯状回で *Gad1* 遺伝子の発現が増加していた。GAD67 は、GABA の合成酵素であり、GABA は歯状回門の介在ニューロン間のシグナル伝達を担っており、GABA 量は GAD67 の安定性及び発現調節によって、精密に制御されている [69]。一方で、*Reln* 遺伝子と同様に、VPA 曝露したマウスの前脳でプロモーター領域のメチル化減少により *Gad1* 遺伝子の発現が増加することが報告されている [19]。従って、VPA の発達期曝露により *Gad1* 遺伝子の発現が増加し、GABA 産生量が増えたため、GAD67 陽性細胞数が減少したと考えられた。HDAC2 は GABA 性介在ニューロンに発現し、発達期の小脳でニューロンの移動及び成熟を促進することが報告されている [90]。また、多くの GABA 性介在ニューロンが胎生期に大脳基底核で産生され、海馬歯状回へ向かって移動する [60]。今回の検討では、VPA の HDAC の活性を確認していないが、VPA は HDAC 阻害作用を有していることから [31]、HDAC 活性の阻害が発達期の GABA 性介在ニューロンの海馬への移動を障害し、その結果、離乳後の海馬歯状回で GABA 性介在ニューロン数が減少していた可能性が考えられた。

離乳後曝露試験では、900 mg/kg 曝露群で SGZ/GCL の DCX 陽性顆粒細胞が減数した。さらに、海馬歯状回では未熟顆粒細胞の指標である *Dpsyl3* [44] の遺伝子発現が減少していたこと



から, type-2 及び type-3 前駆細胞と未熟顆粒細胞への分化が標的となっていることが示唆された。一方で, 海馬歯状回では *Chrn2* の遺伝子発現が減少していた。海馬歯状回門の GABA 性介在ニューロンは, 歯状回外部からのアセチルコリン作動性及びグルタミン酸作動性入力を受けている [12, 24]。脳白質のミエリンに空胞化を誘発させる HCP をマウス発達期曝露させることで, 海馬歯状回門部の CHRN2 陽性介在ニューロンの減数に関連した SGZ の中期増殖前駆細胞の減数が報告されている [36]。GABA 性介在ニューロンが CHRN2 を発現していることを考慮すると [76], VPA の離乳後曝露は CHRN2 陽性 GABA 性介在ニューロンも標的することが考えられる。さらに, 歯状回門部の GABA 性介在ニューロンの機能障害が中期前駆細胞を傷害することが報告されており [84], GABA 性介在ニューロンの *Chrn2* の遺伝子発現減少が中期から後期にかけた顆粒細胞の減数を誘発した可能性が考えられる。或いは, 海馬歯状回門部の NeuN 陽性成熟ニューロンの減数は, CHRN2 陽性 GABA 性介在ニューロンの減数の可能性も考えられた。一方で, 歯状回門では PVLB 陽性細胞の減数はないが, 海馬歯状回の *Pvalb* の遺伝子発現は減少していた。従って, GABA 性介在ニューロンでの *Pvalb* 遺伝子の発現減少が PVALB 陽性ニューロンの機能を抑制し, 中期から後期にかけた顆粒細胞の減数を誘発する可能性も考えられる。

また, VPA の離乳後曝露により 900 mg/kg 曝露群で SGZ の DCX 陽性顆粒細胞が減数したのに対し GFAP 陽性 type-1 神経幹細胞が増数した。歯状回では, AMPA 型グルタミン酸受容体をコードする *Gria1* の遺伝子発現が増加していた。AMPA 受容体は, グルタミン酸受容体ファミリーの一つとして知られており, 興奮性の神経伝達受容体であり, 様々な正常神経活動において活性化される [57]。慢性的な AMPA 受容体の作動薬投与が顆粒細胞系譜の増殖活性を増加することが報告されている [9]。従って, VPA 離乳後曝露が, SGZ への GRIA1 を介した入力による GFAP 陽性 type-1 神経幹細胞の増殖活性を増加させた可能性が考えられる。さらに, VPA の離乳後曝露により歯状回では *Kit* 遺伝子の発現も増加した。マウスの脳では, KIT は type-1 神経幹細胞及び type-2 前駆細胞に発現し細胞の分化や増殖を高めている [78]。また, ラットの脳でも発現が報告されており SCF の投与で SGZ の増殖活性を増加させることが報告されている [38]。これらの結果は GFAP 陽性 type-1 神経幹細胞の増加を支持する理由となり,

VPA の離乳後曝露が SGZ の神経幹細胞の自己増殖を増加させると考えられる。SGZ の PCNA 陽性細胞の増数は確認できなかったが、SGZ での type-1 神経幹細胞数は前駆細胞に比べ少ないため、PCNA 陽性 type-1 神経幹細胞の増数がみられなかった可能性が考えられた。一方で、VPA の離乳後曝露により歯状回では *Btg2* 遺伝子の発現は減少した。BTG2 は、神経芽細胞の最後のアシンメトリックな有糸分裂を誘導する [33]。最近の報告では、*Btg2* の遺伝子欠損マウスでは、側脳室下帯の GFAP 陽性神経幹細胞が増数し、DCX 陽性細胞が減数しており、BTG2 が増殖性前駆細胞の細胞周期からの脱却と分化を誘導することが報告されている [22]。従って、VPA の離乳時曝露による *Btg2* の遺伝子発現の減少は、SGZ の GFAP 陽性細胞を増加させ、DCX 陽性細胞を減少させた可能性が考えられた。

以上より、VPA は曝露時期を問わず、神経新生制御系の障害性を示したが、発達期曝露の離乳時では顆粒細胞系譜には影響を与えず、発達期曝露の成熟後及び離乳後曝露の反応性と異なっていた。このことから、発達期と離乳後では VPA 曝露に起因した制御系入力の変動に対する顆粒細胞系譜の感受性が異なるものの、曝露時期を問わず VPA は神経新生制御系に主に作用し、顆粒細胞系譜の変動に対してエピゲノム毒性が関与している可能性が示唆された。

## 小 括

第2章では、VPAによる神経新生障害を第1章と同様に検討した。発達期曝露では、0, 667 及び 2000 ppm の濃度で母動物に対して飲水投与し、子動物の離乳時及び成熟後の神経新生への影響を検討した。その結果、離乳時に SGZ/GCL の顆粒細胞系譜は変動しなかったが、667 ppm 群から歯状回門部の RELN, GAD67, PVALB 陽性細胞数が減少した。また、歯状回の遺伝子発現として、GABA 合成酵素が発現増加、NMDA 型グルタミン酸受容体が発現減少した。成熟後では、2000 ppm 群で SGZ/GCL の PCNA 陽性増殖細胞数、NeuN, ARC, COX2 陽性細胞数が増加し、GAD67 陽性細胞数の減数及び NMDA 型グルタミン酸受容体の遺伝子発現の減少は離乳時から継続した。次に、5 週齢のラットに 0, 200 及び 900 mg/kg の VPA を 28 日間強制経口投与し、離乳後曝露による神経新生への影響を検討した。その結果、900 mg/kg 群で SGZ/GCL で GFAP 陽性細胞数が増加、DCX 陽性細胞数が減少した他、歯状回門の NeuN 陽性細胞数が減少した。また、*Pvalb* 及びニコチン性アセチルコリン受容体遺伝子発現も減少した。以上より、VPA は曝露時期を問わず、ヒストンのアセチル化を主機序とする神経新生制御系の障害を示したが、発達期曝露の離乳時では顆粒細胞系譜には影響を与えず、発達期曝露の成熟後及び離乳後曝露の反応性と異なっていた。このことから、発達期と離乳後では VPA 曝露に起因した制御系入力の変動に対する顆粒細胞系譜の感受性が異なるものの、曝露時期を問わず VPA は神経新生制御系に主に作用し、顆粒細胞系譜の変動に対してエピゲノム毒性が関与している可能性が示唆された。

## 第 3 章

### HCP のマウス発達期曝露による エピゲノム毒性関連遺伝子の探索

## 緒 言

ヘキサクロロフェン（HCP）は、1960 年代に石鹼、洗剤や化粧品などの抗菌剤として使用されており、防カビ剤や農薬としても利用されていた [43]。1950 年代から 1960 年代にかけて 3%の濃度での HCP の未熟児のお風呂での繰り返しの使用が、脳幹網様体における空胞形成性脳症と関連することや [74]、齧歯類の脳白質のミエリン鞘が途中で解離することでミエリンが空胞化することが報告されている [49]。また、ラットに HCP を慢性曝露させると、神経細胞の軸索において脱髄と再ミエリン化が繰り返し行われ、少なくなった神経線維が軸索の脱落を誘発させることや [58]、HCP を用いたマウス発達期曝露実験でも、子動物の脳でミエリンの空胞化を確認されていることから [41]、現在では典型的な神経毒と知られている。神経新生障害性に関しては、HCP の発達期曝露によって、海馬における神経新生の顆粒細胞系譜の分化中期を標的とした傷害性を示すことが見出されており、コリン作動性神経及びグルタミン酸作動性神経の関与が報告されている [36, 42]。

DNA の過メチル化を含む多様なエピゲノム修飾変動が、海馬における神経新生を制御していることが報告されている [79]。細胞の表現型維持のための細胞記憶として DNA のメチル化の動的性質が見出されており [16]、DNA のメチル化と遺伝子発現調節の関連性は、直接的な転写調節因子の DNA への結合阻害や、クロマチン凝集とそれに引き続く遺伝子サイレンスを誘導する HDAC を動員するメチル化 DNA 結合タンパクを介した間接的な転写抑制が見出されており、そのような DNA のメチル化はプロモーター領域の CpG サイトに特に共通して確認されている [40]。神経新生におけるエピゲノム修飾変動はまだ不明であるが、環境的な要因が DNA のメチル化破綻を誘発するという研究も進められており [14]、神経発達に対する DNA のメチル化の重要性が明確化されている。マウスにおいて発達期のマンガン (Mn) の曝露により、type-1 神経幹細胞を含む不可逆性の海馬の神経新生障害が誘発されることが見出されているが [86]、歯状回での CpG アイランドマイクロアレイ解析を実施した結果、type-1 神経幹細胞を含む顆粒細胞系譜でのエピゲノム修飾変動を示す遺伝子が同定されている [86, 87]。しかし、第 2 章で見出したような、神経新生制御系を中心とした障害性に対するエピゲ

ノム毒性の関与についての報告はまだない。

第 3 章では、エピゲノム修飾変動を介した神経新生異常の解明を目的として、ゲノム情報の豊富なマウスを用いて、既に神経新生障害を見出している HCP の発達期曝露を行い、海馬歯状回での過メチル化遺伝子の解析を、次世代シーケンス解析法を用いて検索した。さらに、見出された過メチル化遺伝子について海馬における神経新生との関連性についても検討した。

## 材料および方法

### 化学物質及び供試動物

HCP (CAS. No. 70-30-4) は MP Biomedicals 社より購入した。24 匹の妊娠 ICR マウスを妊娠 1 日目で SLC 株式会社 (浜松) より購入した。妊娠マウスは分娩後 22 日まで、温度  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 15\%$ 、照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件で個別に飼育した。HCP 投与開始までは飼育期間を通じて、粉末 MF (オリエンタル酵母工業, 東京) および飲料水の自由に摂取させた。出生後 21 日 (出生日を 0 日とする) 以降、子動物は 3~4 匹/ケージで、粉末 MF および飲料水の自由摂取下で飼育した。

### 実験デザイン

発達神経毒性試験ガイドライン記載の動物数及び曝露スケジュールに従い、交配マウスを各群 12 匹の 2 群に分け、0, 100 ppm の HCP を含む粉末 MF を妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで摂取させた。本実験では出生後 3 日目に間引きを行い、各母動物に 8 匹の子動物となるよう雄子動物をランダムに割り当て、不足する場合は雌子動物を追加して子物数を調整した。性周期におけるステロイドホルモンの周期的変動によりニューロン新生が影響を受けることが報告されていることから[67]、雄子動物のみを解析対象とし実験を行った。出生後 21 日に、各群 10 匹の雄子動物 (1 匹/母動物) を免疫組織学的検討のため、 $\text{CO}_2/\text{O}_2$  麻酔下で氷冷した 4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) により灌流固定を行った (流速 10 mL/分)。遺伝子発現解析のため、雄子動物 (2~3 匹/母動物) は、 $\text{CO}_2/\text{O}_2$  麻酔下で放血死させた後、脳を採材した。母動物及び雌子動物は、それぞれ出産・出生後 21 日に  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  麻酔下で放血した。

残りの子動物は、出生後 77 日目まで HCP を含まない通常飼料により飼育した。出生後 77 日に、免疫組織学的検討のため、各群 10 匹の雄子動物 (1 匹/母動物) を  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  麻酔下で氷冷した 4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) により灌流固定を行った (流速 10 mL/分)。遺伝子発現解析のため、雄子動物 (2~3 匹/母動物) は、 $\text{CO}_2/\text{O}_2$  麻酔下で放血死させた後、脳を採材した。動物実験計画は、国立大学法人東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承

認を受け、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

## DNA 及び RNA 抽出

メチル化解析のため、出生後 21 日目及び 77 日目の雄子動物海馬歯状回における DNA 及び RNA を抽出した。4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) 灌流固定を行わない雄子動物を対象として、脳標本をメタカーン固定液により固定した [4]。メタカーン固定脳標本を用いて、大脳の bregma の後方約-2.2 mm (生後 21 日目) 及び-2.8 mm (生後 77 日目) の 2 mm 厚切片より生検トレパン (KAI インダストリーズ株式会社, 岐阜) を用いて海馬歯状回部分を採取した。0 及び 100 ppm 群について、All-prep DNA/RNA mini kit (Qiagen) を用いて DNA 及び total RNA を抽出した (N = 6/群)。抽出した DNA は、メチル基特異的次世代シーケンス解析、メチル特異的定量 PCR 解析及びパイロシーケンス解析に用いた。抽出した RNA は、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析に用いた。

## メチル基特異的次世代シーケンス解析

生後 21 日目の子動物から抽出したゲノム DNA を超音波破碎装置 (Bioruptor UCD-250; Cosmo Bio CO. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて断片化し、EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, Canada)を用いて methyl-CpG binding domain 2 protein (MBD2) によるメチル化 DNA の濃縮を行った。続いて、DNA NEB® Next ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina® (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA) を用いてメチル化 DNA ライブラリの作製を行った。このメチル化 DNA ライブラリを用いて、Miseq Sequencing System (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) によるシーケンス解析を実施し、得られたデータを Strand NGS next generation sequencing analysis software (Strand Genomics, Inc., San Francisco, CA) を用いて解析した。解析条件は、転写開始点より 1000 塩基対上流のプロモーター領域における CpG サイトで、対照群に比し 5 倍以上のカウントが確認される遺伝子を抽出するよう設定した。



## 過メチル化候補遺伝子発現解析

出生後 21 日及び 77 日目の子動物の海馬歯状回におけるメチル基特異的次世代シーケン  
ス解析によって選出されたメチル化候補遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR を用  
いて解析した。抽出した 2 µg の total RNA から SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo  
Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。PCR 反応は SYBR®Green PCR Master Mix  
(Thermo Fisher Scientific) を用い、Step One Plus™ Real-time PCR System (Thermo Fisher  
Scientific) にて、製造元のプロトコールに従って実施した。プライマーは Primer Express  
software (Version 3.0; Thermo Fisher Scientific) を用いて設計し、Table 3-1 に示した。各遺伝子の  
mRNA 発現量は、内因性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) ま  
たは glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) の C<sub>T</sub> 値を同時に算出し、0 ppm 群との  
 $\Delta\Delta C_T$  値を算出して比較した [50]。

## メチル特異的定量 PCR 解析

メチル化候補遺伝子の中から、mRNA 発現量の下方制御が確認された遺伝子について、メ  
チル特異的定量 PCR 解析を行った。生後 21 日目の子動物から抽出したゲノム DNA を超音波  
破碎装置 (Bioruptor UCD-250) を用いて断片化し、熱により変性させた。その後、インプット  
として 20% の DNA を -20℃ に保存し、残りを EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment kit  
(Clontech Laboratories, Inc.) を用いて methyl-CpG binding domain 2 protein (MBD2) によるメチル  
化 DNA の濃縮を行った。DNA 量を揃えたインプットサンプル及び濃縮サンプルを用いて、プ  
ロモーター領域の標的 CpG サイトを含む増幅反応を StepOnePlus Real-time PCR System  
(Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、増幅反応曲線は Power SYBR® Green PCR Master Mix  
(Thermo Fisher Scientific) を用いて検出した。Table 3-2 に示すメチル特異的定量 PCR 用のプラ  
イマーは、Methyl Primer Express software Ver. 1.0 (Thermo Fisher Scientific) 及び Primer Express  
software Ver. 3.0 (Supplementary Table 3; Thermo Fisher Scientific) を用いて設計した。定量は、比  
較 Ct 法を用いて行い、インプット DNA とメチル濃縮 DNA の Ct 値の差から算出した。

### パイロシーケンス解析

CpG サイトのメチル化比率を PyroMark Q24 pyrosequencing system (Qiagen)を用いて解析した。生後 21 日目及び 7 日目の抽出したゲノム DNA 10 ng を EpiTect<sup>®</sup> Plus DNA Bisulfite kit (Qiagen)を用いてバイサルファイト変換し、サーマルサイクラーによって増殖した。シーケンス反応は PyroMark Gold Q24 reagents (Qiagen) 用いて検出した。Table 3-3 に示すパイロシーケンス解析用のプライマーの設計及び CpG サイトのメチル化比率の解析は Pyrosequencing Assay Design software Ver. 2.0 (Supplementary Table 4; Qiagen) を用いて行った。

### 免疫組織化学的解析

4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) 灌流固定を行った出生後 21 日及び 77 日の雄子動物又は離乳後曝露動物から脳を採取し、同じ固定液を用いて一昼夜固定した。大脳の bregma の後方約-3.0 mm 又は-3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、さらに 4% PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) バッファーで一昼夜固定した。前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 µm 厚の連続切片を作製した。切片は Table 3-4 に示した条件で以下の各分子に対する抗体を用いて免疫染色を行った。解析は、過メチル化遺伝子として検出された DLX4, DMRT1 及び PLCB4 の他, GABA 性介在ニューロン指標である GAD67 [30], グルタミン酸受容体のサブタイプである glutamate metabotropic receptor 1 [GRM1, 55]及びシナプス可塑性指標である ARC [27] について実施した。シグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて製造元のプロトコールに従って実施し、免疫反応は DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いて可視化した後、ヘマトキシリンにより対比染色した。脱パラフィンは 0.3 v/v %過酸化水素水を含むメタノール溶液(室温, 30 分)を用いた。共発現解析のため、同一薄切面を持つ切片による解析を実施した。

### シナプス関連遺伝子発現解析

出生後 21 日及び 77 日目の子動物の海馬歯状回におけるシナプス可塑性関連遺伝子の

mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。抽出した 2  $\mu$ g の total RNA から SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。PCR 反応は SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、Step One Plus<sup>™</sup> Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) にて、製造元のプロトコールに従って実施した。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Thermo Fisher Scientific) を用いて設計し、Table 3-1 に示した。各遺伝子の mRNA 発現量は、内因性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) または glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) の  $C_T$  値を同時に算出し、0 ppm 群との  $\Delta\Delta C_T$  値を算出して比較した [50]。

### 統計解析

遺伝子発現解析結果及び免疫組織化学染色における陽性細胞のカウント数は群平均及び標準偏差を算出した。統計学的解析は、遺伝子発現解析結果及び陽性細胞数について、2 群間の比較で行い、各群の分散を F 検定により比較し、等分散の場合は Student の  $t$  検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の  $t$  検定により 0 ppm 群と各投与群との検定を行った。

## 結 果

### 次世代シーケンス解析による過メチル化遺伝子の探索

次世代シーケンス解析の結果、転写開始点より 1000 bp 上流のプロモーター領域で、5 倍以上の過メチル化シグナルを有する 19 遺伝子を特定した [Table 3-5]。

### 海馬歯状回遺伝子発現解析

次世代シーケンス解析の結果、過メチル化を示した19遺伝子の内、*Dmrt1*, *Gsdma3*, *Mms19*, *Vmn1r90*, *Adgrl3*, *Dlx4*, *Fign*, *Maz*, *Plcb4*及び*Reps1*の発現が、生後21日目の海馬で減少した [Fig. 3-1]。その他、*Cdk14*, *Mafg*, *Mcurl*, *Nusap1*, *Rasal2*, *Spsb1*, *Tex14*, *Trim62*及び*Vps37a*の発現に変動は確認されなかった [Table 3-6]。

生後77日目では、*Dlx4*の発現が減少し、*Fign*及び*Plcb4*の発現が増加した。その他、*Adgrl3*, *Dmrt1*, *Gsdma3*, *Maz*, *Mms19*, *Reps1*及び*Vmn1r90*の発現に変動は確認されなかった。

### メチル特異的 PCR 法による過メチル化のバリデーション解析

遺伝子発現の減少が確認された 10 遺伝子の内、*Dlx4*, *Dmrt1*, *Plcb4* 及び *Reps1* のプロモーター領域での過メチル化を確認した [Fig. 3-2]。*Adgrl3* 及び *Vmn1r90* プライマー設計が困難であったため実施しなかった。

### パイロシーケンス法による過メチル化塩基の特定

プロモーター領域での過メチル化が確認された *Dlx4*, *Dmrt1*, *Plcb4* 及び *Reps1* について、過メチル化塩基の特定を行った。生後 21 日目では、*Dlx4* の 1 番の塩基、*Dmrt1* の 3 番及び 5 番の塩基、*Plcb4* の 3 番の塩基の過メチル化が確認された [Fig. 3-3 及び 3-4]。

生後 77 日では、*Dlx4* の 9 番及び 16 番の塩基、*Dmrt1* の 1 番及び 2 番の塩基の過メチル化が確認された。

### 免疫組織学的染色法による分布解析

プロモーター領域の過メチル化が特定された *Dlx4*, *Dmrt1*, *Plcb4* について、免疫組織化学的染色法による海馬歯状回での分子レベルでの発現分布を解析した結果、いずれの発現分子も海馬歯状回門部で発現していることが確認された [Fig. 3-5]。また、共発現解析では、いずれの分子も GABA 性介在ニューロン指標である GAD67 と共発現する細胞が確認された。

さらに、歯状回門での発現細胞数を解析した結果、生後 21 日目において、DLX4, DMRT1, PLCB4 及び GAD67 発現細胞数が対照群に比し、有意に減少した [Fig. 3-6]。生後 77 日目では、変動は回復した。

PLCB4 に関しては、GRM1 との共発現が確認された [Fig.3-7]。さらに、生後 21 日目の GCL で ARC 発現細胞数が減少した。生後 77 日目では、変動は回復した。

### 海馬歯状回のシナプス可塑性関連遺伝子

生後21日目では、*Stx4a*, *Dlg4*, *Gabbr1*及び*Gabra1*の発現が減少した [Table 3-7]。 *Gabbr2*, *Gabrb2*, *Homer1*及び*Syp*の発現は変動しなかった。生後77日目では、*Gabbr2*, *Gabra1*及び*Gabrb2*の発現が増加、*Homer1*及び*Stx4a*の発現が減少した。 *Dlg4*, *Gabbr1*及び*Syp*の発現は変動しなかった。

## 考 察

本章では、HCP を発達期曝露した子動物の海馬歯状回から DNA を抽出し、過メチル化遺伝子を次世代シーケンス解析によって検索した結果、転写開始点から 1000 塩基対上流のプロモーター領域で過メチル化を誘発している 19 遺伝子を見出した。その内、遺伝子発現が低下している遺伝子は 10 遺伝子あり、さらにメチル特異的 PCR 解析及びパイロシーケンス解析により過メチル化塩基が特定できたのは、*Dlx4*, *Dmrt1*, *Plcb4* の 3 遺伝子であった。

過メチル化が認められた遺伝子の免疫組織化学的染色法により発現分布解析を行った結果、DLX4, DMRT1, PLCB4 陽性細胞は海馬歯状回門部に局在し、ミラー切片を用いた解析により、そのほとんどが GABA 性介在ニューロン指標である GAD67 を共発現していた。全ての GABA 性介在ニューロンが GAD67 を発現してはいないので [30], GAD67 を共発現した DLX4, DMRT1, PLCB4 陽性細胞は GABA 性介在ニューロン様の細胞であると考えられた。興味深いことに、以前の HCP 発達期曝露の報告では、海馬歯状回門部の GABA 性介在ニューロン指標である RELN, PVALB, CALB2 発現細胞は減数していなかったが [41], DLX4, DMRT1, PLCB4 及び GAD67 陽性細胞の生後 21 日目で減数がみられた。

HCP は、ミエリン鞘を標的とする剤であり、発達期曝露によって子動物の脳でミエリンの空胞変性が確認されている [41]。海馬歯状回の顆粒細胞は軸索にミエリンを有していないが [46], GABA 性介在ニューロンを始めとした海馬における神経新生を調節する外部からの神経細胞は軸索にミエリンを有しているため [39], HCP の曝露は海馬における神経新生を調節する外部からの神経細胞のミエリン鞘を標的とし、神経新生障害を誘発させることが推察される。これまでも、HCP の発達期曝露が海馬中隔核経路から顆粒細胞や GABA 性介在ニューロンに投射するコリン作動性神経のミエリン鞘を空胞化し、神経伝達速度を遅くするということが議論されていた[41]。グルタミン酸作動性神経の機能障害もまた報告されている [41]。以上より、HCP の発達期曝露による海馬における神経新生の調節神経系の傷害には、GABA 性介在ニューロンの *Dlx4*, *Dmrt1*, *Plcb4* 遺伝子のエピゲノム修飾変動による発現減少が、直接若しくは間接的に関与することが示唆された。

DLX4 は, distal-less homeobox genes の一つであり, *Dlx1/Dlx2* のミュータントマウスでは, 脳の様々な領域で GABA 性介在ニューロンの減数が確認されている [66]。この減数には, 未熟な GABA 性介在ニューロンの終脳皮質から大脳皮質への水平移動障害が誘発されることが考えられている [7]。従って, HCP の発達期曝露によるエピゲノム修飾変動を介した *Dlx4* の減少が, 未熟な GABA 性介在ニューロンの水平移動障害を誘発させた可能性が示唆された。一方で, 胎生幹細胞に *Dlx4* 遺伝子を発現させることで GABA67 分子を発現する GABA 性ニューロン様の細胞が誘導されることが報告されている [83]。本研究では, HCP の発達期曝露により海馬歯状回門の GAD67 陽性 GABA 性介在ニューロンが減数している。従って, HCP の発達期曝露による *Dlx4* 遺伝子のエピゲノム修飾変動による発現減少が GABA 性ニューロンへの分化を抑制している可能性がある。歯状回門部の GABA 性介在ニューロンは海馬における神経新生を調節するコリン作動性入力を受けており [92], HCP の発達期曝露によりコリン作動性入力受容体遺伝子の発現減少も確認している [41]。 *Dlx* ファミリー遺伝子の機能的な神経新生への関係について, *Dlx1/Dlx2* 及び *Dlx5/Dlx6* のミュータントマウスでは, 側脳室下帯での神経新生での分化異常が確認されている [66]。DLX4 の海馬における神経新生への機能的な関与の報告はないが, HCP の発達期曝露による DLX4 陽性 GABA 性介在ニューロンの減数が神経新生を抑制する可能性が考えられる。歯状回門の GABA 性介在ニューロンが type-2 前駆細胞の増殖及び分化を制御することが知られている [84]。従って, 以前報告されている HCP の発達期曝露による type-2a 及び type-2b 前駆細胞の減数は, DLX4 陽性 GABA 性介在ニューロンの減数に起因することが示唆された。

PLCB4 は, マウス小脳で代謝型グルタミン酸受容体である GRM1 の様な G タンパク共役型受容体のセカンドメッセンジャーとしてフォスファチジルイノシトールニリン酸からジアシグリセロールとイノシトール三リン酸の生成経路を触媒する [55]。当研究室のこれまでの報告で, HCP の発達期曝露が海馬歯状回の *Grm1* 遺伝子の発現を減少させることを確認している [41]。本研究では, 歯状回門部の PLCB4 発現細胞に GRM1 が共発現することを確認しており, PLCB4 発現細胞数が歯状回門部で減少している。これらの結果から, HCP の発達期曝露が GABA 性介在ニューロンの GRM1-PLCB4 カスケードを標的としていることが考えられた。さ



らに、薬理的に GABA 性介在ニューロンに発現している受容体の GRM1 や GRM5 を阻害することで、シナプス可塑性の抑制を介した顆粒細胞の長期増強を消失させることが報告されている [28]。本研究では、顆粒細胞層での ARC 発現細胞が減数していた。*Arc* は、IEG の一つであり神経可塑性の最初の段階で機能する [27]。また、離乳時に *Dlg4*, *Gabbr1*, *Gabra1* 及び *Stx4a* といったシナプス関連遺伝子の発現減少が確認されていることから、HCP 発達期曝露によるシナプス可塑性の低下が示唆される。以上より、HCP の発達期曝露により、GABA 性介在ニューロンの GRM1-PLCB4 の機能破綻とそれに伴うシナプス可塑性の低下が誘発されることが示唆された。

DMRT1 は、DNA 結合ドメインである DM ドメインを有するファミリーの一つであり、生殖細胞分化や有糸分裂及び多能性に関与することが報告されている [82]。胎生幹細胞に DMRT1 を過剰発現させることにより、神経様の細胞に分化することが報告されている [89]。しかし、DMRT1 と神経新生の関連性については、これまでに報告されていない。本研究結果から、HCP の発達期曝露による DMRT1 の GABA 性介在ニューロンでのエピゲノム修飾変動を介した発現減少は、GABA 性介在ニューロンへの分化抑制に関連する可能性が考えられた。

## 小 括

第 3 章では、エピゲノム修飾の一つであるプロモーター領域の過メチル化に起因した神経新生障害に関わる遺伝子探索を行った。交配後の雌マウスに HCP を 0 及び 100 ppm の濃度で妊娠 6 日目から出産後 21 日目の離乳時まで飲水投与し、100 ppm 曝露子動物の海馬歯状回で過メチル化を示した遺伝子について次世代シーケンス解析を用いて検索した。遺伝子発現が下方制御される過メチル化遺伝子を候補遺伝子とし、メチル化特異的 PCR 法及びパイロシーケンス法によるバリデーション解析を実施した。その結果、離乳時において過メチル化した *Dlx4*, *Dmrt1*, *Plcb4* の 3 遺伝子が得られ、免疫組織化学的解析の結果、これらの発現分子は歯状回門の GABA 作動性介在ニューロンと共局在することを見出した。また、離乳時では DLX4, DMRT1 及び PLCB4 陽性細胞数が減少したが、成熟後では回復した。さらに、離乳時には GCL の ARC 陽性成熟顆粒細胞数が減少しており、海馬歯状回のシナプス関連遺伝子の発現が不可逆的に変動していた。以上より、HCP の発達期曝露による神経新生障害時に、DNA の過メチル化による遺伝子発現変動は歯状回門の GABA 性介在ニューロンに生じ、間接的に神経新生障害を誘発する可能性が示唆された。メチル化に関連した発現変化は回復したが、神経新生後のシナプス可塑性への影響は回復しなかったことから、エピゲノム修飾変動による不可逆的な影響も示唆された。

## 総合考察

MNU を例とした DNA 直接損傷に起因した海馬における神経新生への影響は、曝露時期を問わず、type-1 神経幹細胞から type-3 前駆細胞までの増殖活性を伴う顆粒細胞系譜を標的としたアポトーシスを主体とする障害であることを見出した。この結果は、MNU の DNA 傷害作用に起因するものであり、type-1 神経幹細胞より増殖活性の高い type-2 及び type-3 前駆細胞の方が傷害を受けやすく、傷害が蓄積した結果、アポトーシスに至る可能性を示した [25]。しかし、発達期曝露では離乳時に type-2 及び type-3 前駆細胞が増加した。この結果は、細胞傷害に対する保護及び代償性の反応が、顆粒細胞系譜の増殖活性が高い発達期でみられたと考えられる。また、その増殖活性を促進する機序として GCL の成熟顆粒細胞の COX2 発現の関与を見出した [54, 61]。以上より、発達期及び離乳後曝露の影響の違いは、標的細胞の増殖活性の程度に依存した MNU への感受性の違いを反映した結果であると判断された。

一方で、VPA を例としたエピゲノム修飾変動に起因した神経新生への影響は、曝露時期を問わず神経新生制御系である GABA 性介在ニューロンの障害を示したが、発達期及び離乳後曝露の間で顆粒細胞系譜への影響が異なっていた。即ち、発達期曝露では曝露直後である離乳時に、顆粒細胞系譜の変動がみられなかったのに対し、離乳後曝露では曝露後に type-1 神経幹細胞の増加及び type-2, type-3 前駆細胞及び未熟顆粒細胞の減少がみられた。この結果は、離乳後では顆粒細胞系譜の VPA 又は神経新生制御系である GABA 性介在ニューロンに対する感受性が異なることを示唆する。以上より、曝露時期を問わず VPA は神経新生制御系に主に作用し、エピゲノム毒性の標的性は明らかではないものの、顆粒細胞系譜の変動に対する直接ないし間接的な関与が示唆された。

MNU 及び VPA の検討結果から、DNA 直接損傷誘発物質とエピゲノム修飾変動誘発物質の発達期曝露による海馬における神経新生に対する影響を比較すると、前者では広範な顆粒細胞系譜の分布変動がみられたのに対し、後者では神経新生制御系である GABA 性介在ニューロンの障害が主な作用であったと考えられる。DNA 直接損傷に関して、放射線照射による海馬における神経新生障害では、顆粒細胞系譜での直接的な DNA 傷害が認められていることか

ら [52], MNU が顆粒細胞系譜を直接傷害する可能性が示唆される。一方で, エピゲノム修飾変動に関しても, VPA による顆粒細胞系譜でのアセチル化ヒストンの増加が認められていることから [31], 顆粒細胞系譜の直接的なエピゲノム修飾変動を予測した。しかし, 今回の VPA 発達期曝露の検討では, 主に歯状回門の神経新生制御系である GABA 性介在ニューロンの分布変動を確認したことから, VPA のエピゲノム毒性が神経新生制御系である GABA 性介在ニューロンも標的とする可能性が考えられた。

発達期曝露の休薬後の影響として, MNU では成熟顆粒細胞が減少, VPA では成熟顆粒細胞が増加した。MNU は発達期の曝露により小頭症になることが報告されており [3, 45, 65], 一方で, VPA は発達期の曝露より大頭症に関連した報告がある [20, 47]。MNU では, 離乳時から脳重量の低値, SGZ 長の短縮及び歯状回面積の縮小がみられており, 胎生期の脳発達過程での MNU の影響により, 海馬形成の前の段階で海馬の低形成が助長されている。このことから, 海馬以外の部位でも同様に低形成が部分的に誘発され, 結果的に小頭症様の構造となる可能性が考えられる。休薬後に顆粒細胞系譜への影響が発現した理由としては, DNA 傷害の蓄積による  $p21^{Cip1/Waf1}$  の発現増加による細胞周期停止細胞の増加が考えられ, SGZ での増殖活性の減少と共に顆粒細胞層の菲薄化が進行したと考えられる。一方, VPA では, 離乳時に大脳皮質及び小脳においても歯状回同様に GABA 性介在ニューロンの減数がみられており, 胎生期の脳発達過程での VPA の影響により, 海馬の GABA 伝達機構の障害が誘発されている。しかし, VPA 曝露中は VPA の作用により, GABA 濃度が保持されていたため, 顆粒細胞系譜への影響は顕在化せず, 休薬後に GABA 伝達障害が顕在化した可能性が考えられる。従って, 海馬における神経新生と脳全体の構造の発達に関しては直接的な関連性は否定できる。しかし, 感染により小頭症の発症報告があるジカウイルスを感染させたマウスの SGZ においても増殖活性の低下やアポトーシスが確認されていること [51], 及び成熟顆粒細胞数の変動と脳構造の発達度合いに相関性があることから, 成熟顆粒細胞数が脳形成異常の指標となる可能性が考えられた。

発達神経毒性物質である MNU 及び VPA による海馬における神経新生への影響は, 発達期曝露と離乳後曝露では, 異なるパターンの顆粒細胞系譜の変動が確認された。この結果は, 発

達期曝露と離乳後曝露で異なるパターンの顆粒細胞系譜の変動が確認された発達神経毒性物質のプロピルチオウラシルと同様であった [73]。しかし、クプリゾン及びグリシドールのような既知の成熟神経毒性物質では、発達期曝露及び離乳後曝露において同一パターンでの神経新生への影響が確認されている [1, 2, 5, 6]。発達期曝露による海馬における神経新生に対する影響の標的性をそれぞれ考えると、プロピルチオウラシル及びMNUはtype-1 神経幹細胞を含む顆粒細胞系譜、VPA は歯状回門の神経新生制御系である GABA 性介在ニューロンであるのに対し、クプリゾン及びグリシドールでは顆粒細胞系譜の分化の後期を標的としている。離乳後の完成された脳の海馬では、type-1 神経幹細胞を含む顆粒細胞系譜の増殖活性は離乳前に比べ低いため [72]、プロピルチオウラシル及び MNU ではこの増殖活性の違いにより発達期曝露と離乳後曝露で異なるパターンの顆粒細胞系譜の変動となった可能性が考えられる。また、歯状回門の神経新生制御系である GABA 性介在ニューロンは、type-1 神経幹細胞に対して増殖・分化を促進させる働きがある [75]。このため、VPA も GABA 性介在ニューロンを介して type-1 神経幹細胞を標的とすることから、発達期曝露と離乳後曝露で異なるパターンの顆粒細胞系譜の変動となった可能性が考えられる。一方で、成熟神経毒性物質であるクプリゾン及びグリシドールでは、顆粒細胞系譜の分化の後期を標的とするため、増殖活性の影響が低く、発達期曝露及び離乳後曝露において同一パターンでの神経新生障害を誘発したと考えられた。従って、曝露時期の違いによる海馬における神経新生に与える影響については、type-1 神経幹細胞を標的とする場合において異なるパターンの神経新生障害性を誘発するものと推察された。

一般毒性試験の枠組みにおける発達神経毒性の検出性に関しては、離乳後曝露で神経新生障害を誘発する物質は、発達期曝露においても神経新生障害性を示す可能性が高く、発達神経毒性誘発性として捉えることが可能であると考えられる。従って、発達神経毒性物質では発達期曝露と離乳後曝露で神経新生障害性が異なるパターンを示したものの、顆粒細胞系譜、神経新生制御系及び関連分子及び遺伝子の変動などの海馬における神経新生環境への影響は少なからず存在し、異なるパターンで検出できるため、神経新生障害性を軸とした病理発生に根ざした評価は可能と判断された。発達神経毒性物質では type-1 神経幹細胞を標的とする



か否かで障害のパターンが区別される可能性が示唆されるが、障害の程度及び種類に関してのデータがまだまだ不十分である他、発達神経毒性物質に対する神経新生の活性と毒性感受性の関係、各種制御系の成熟度合いによる感受性の違いなど、検討すべき項目が多い。特に序論で述べた神経幹細胞毒性の懸念すべき点として、遺伝子の構造や機能の障害が生じること、遺伝子発現プログラムに従った神経分化機構の破綻が生じ、生後の神経中枢の高次機能形成に影響を与えることが考えられるため、病理発生に根ざした評価と記憶や行動障害性との関連性について検証していく必要がある。従って、海馬における神経新生を用いた発達神経毒性評価は、現段階では高次の発達神経毒性評価系としての有用性に関する検証は十分ではないものの、神経毒性が懸念されるような化合物の発達神経毒性評価を、病理発生に根ざした簡易的なスクリーニング評価系として、一般毒性試験の枠組みで実用化できる可能性が高いと考えられた。

第3章で示した HCP を例とした海馬における神経新生障害に対する過メチル化制御破綻の関与の検討では、歯状回門の GABA 性介在ニューロンに発現する遺伝子のみで、DNA の過メチル化による遺伝子発現の下方制御が認められたことから、HCP による神経新生部位でのエピゲノム毒性は主に神経新生制御系に働く可能性が示唆された。GABA 性介在ニューロンへの影響は回復を示したが、神経新生後のシナプス可塑性にもたらした効果は遺伝子発現の観点からは不可逆的であった。このことは、エピゲノム変動による影響が、複数のステップの障害のカスケードにスイッチを入れ、その一部は後戻りできずに不可逆的な影響を残した可能性を示唆する。また、エピゲノミクスの定義は、DNA の塩基配列の変化に依存しない遺伝子発現への修飾とされていることから [16]、離乳後の曝露実験においてもエピゲノム変動が生じることが想定される。これまでの報告では、海馬における神経新生においては神経幹細胞がエピゲノム変動修飾を受けることで、神経幹細胞の運命を変え、神経新生障害が起こるとしてきた [14]。しかし、近年、神経幹細胞だけでなく、正常な神経新生に重要な役割を果たすとされる脳由来神経成長因子 *Bdnf* の発現にもエピゲノム変動の関与が確認されている [91]。本研究においても、発達期曝露実験において、神経新生の制御を行う GABA 介在性ニューロンの一過的なエピゲノム変動による影響を曝露直後に見出した。このことは、28 日間反復投与

試験においても同様の変動を検出できる可能性が考えられる。type-1 神経幹細胞を含む顆粒細胞系譜の増殖活性が発達期及び離乳後では異なるが[72], 制御系に対する影響は発達期及び離乳後で同一である可能性も考えられる。以上より, エピゲノム変動修飾による遺伝子発現制御機構の破綻の解明が, 発達神経毒性を検出する為の解析法の構築の一助となることが期待される。



## 結 論

本研究では、MNUを例としたDNA直接損傷に起因した海馬の神経新生への影響は、神経幹細胞を含む増殖活性を伴う顆粒細胞系譜を標的としたアポトーシスを主体とし、VPAを例としたエピゲノム修飾変動に起因した神経新生への影響は、主に神経新生制御系の障害を示した。このことから、障害機序ごとに海馬における神経新生への影響が異なることが示唆され、傷害機序に根差した海馬における神経新生障害性に関する情報の整理の重要性が見出された。

MNU及びVPAによる海馬における神経新生への影響は、発達期曝露と離乳後曝露では、異なるパターンの顆粒細胞系譜の変動が確認された。傷害機序により発達期と離乳後の増殖活性の違いに対する感受性が異なる可能性が示唆され、type-1神経幹細胞を含む顆粒細胞系譜を標的とする場合、及び神経新生制御系を標的とする場合では、発達期曝露及び離乳後曝露での海馬における神経新生への影響が異なるパターンである可能性を見出した。

発達神経毒性の一般毒性試験の枠組みでの検出性に関しては、発達神経毒性物質でも発達期曝露と離乳後曝露では神経新生障害性が異なるパターンを示したものの、顆粒細胞系譜、神経新生制御系及び関連分子及び遺伝子の変動などの海馬における神経新生環境への影響は少なからず存在し、異なるパターンで検出できるため、神経新生障害性を軸とした病理発生に根ざした評価は可能と判断された。今後は、病理発生に根ざした評価と記憶や行動障害性との関連性について検証していくことで、高次の神経機能障害の予測に関しても評価できるようになることが望まれる。

HCPによる神経新生部位でのエピゲノム毒性は主に神経新生制御系に働く可能性が示唆された。また、VPAの主な標的が歯状回門の神経新生制御系であることから、エピゲノム毒性がGABA性介在ニューロンで影響を及ぼす可能性が見出された。制御系に対する影響は発達期及び離乳後で同一である可能性も考えられることから、エピゲノム変動修飾による遺伝子発現制御機構の破綻の解明が、一般毒性試験において発達神経毒性を検出する為の解析法の構築の一助となることが期待される。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して終始御指導、御鞭撻を賜りました岐阜大学大学院連合獣医学研究科ならびに東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 渋谷 淳 教授、東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 吉田 敏則 准教授に深謝いたします。

本稿作成に際し、懇篤な御指導、御助言を賜りました、東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 下田 実 教授、帯広畜産大学基礎獣医学研究部門病態予防学分野 古林 与志安 教授、岩手大学農学部共同獣医学科 佐藤 洋 教授、岐阜大学応用生物科学部応用生物科学科 柳井 徳磨 教授に謹んで深謝の意を表します。

研究に際し、御指導・御協力賜りました、星薬科大学先端生命科学研究センター 五十嵐 勝秀 副センター長、星薬科大学先端生命科学研究センター 大塚 まき 研究員、株式会社富士薬品第二研究所、実験にご協力下さりました同教室諸氏の皆様に心から感謝いたします。

## 引用文献

1. Abe,H., Tanaka,T., Kimura,M., Mizukami,S., Saito,F., Imatanaka,N., Akahori,Y., Yoshida,T. and Shibutani,M. (2015). Cuprizone decreases intermediate and late-stage progenitor cells in hippocampal neurogenesis of rats in a framework of 28-day oral dose toxicity study. *Toxicol. Appl. Pharm.* 287, 210–221.
2. Abe,H., Saito,F., Tanaka,T., Mizukami,S., Hasegawa-Baba,Y., Imatanaka,N., Akahori,Y., Yoshida,T. and Shibutani,M. (2016). Developmental cuprizone exposure impairs oligodendrocyte lineages differentially in cortical and white matter tissues and suppresses glutamatergic neurogenesis signals and synaptic plasticity in the hippocampal dentate gyrus of rats. *Toxicol. Appl. Pharm.* 290, 10–20.
3. Akaike,M., Tanaka,K., Goto,M. and Sakaguchi,T. (1988). Impaired Biel and radial arm maze learning in rats with methylnitrosourea-induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.* 10, 327–332.
4. Akane,H., Shiraki,A., Imatanaka,N., Akahori,Y., Itahashi,M., Ohishi,T., Mitsumori,K. and Shibutani,M. (2013). Glycidol induces axonopathy by adult-stage exposure and aberration of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by developmental exposure in rats. *Toxicol. Sci.* 134, 140–154.
5. Akane,H., Shiraki,A., Imatanaka,N., Akahori,Y., Itahashi,M., Abe,H. and Shibutani,M. (2014a). Glycidol induces axonopathy and aberrations of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by exposure to rats in a framework of 28-day toxicity study. *Toxicol. Lett.* 224, 424–432.
6. Akane,H., Saito,F., Shiraki,A., Takeyoshi,M., Imatanaka,N., Itahashi,M., Murakami,T. and Shibutani,M. (2014b). Downregulation of immediate-early genes linking to suppression of neuronal plasticity in rats after 28-day exposure to glycidol. *Toxicol. Appl. Pharm.* 279, 150–162.
7. Anderson,S., Eisenstat,D., Shi,L. and Rubenstein,J. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474–476.
8. Banerjee,A., Garcí'a-Oscos,F., Roychowdhury,S., Galindo,L.C., Hall,S., Kilgard,M.P. and Atzori,M. (2013). Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1309–1318.
9. Bai,F., Bergeron,M. and Nelson,D.L. (2003). Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology* 44, 1013–1021.
10. Berghuis,P., Dobszay,M.B., Sousa,K.M., Schulte,G., Mager,P.P., Härtig,W., Görcs,T.J., Zilberter,Y., Ernfors,P. and Harkany,T. (2004). Brain-derived neurotrophic factor controls functional differentiation and microcircuit formation of selectively isolated fastspiking GABAergic interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1290–1306.
11. Camacho,J., Ejaz,E., Ariza,J., Noctor,S.C. and Martí'nez-Cerden˜o,V. (2014). RELN-expressing neuron density in layer I of the superior temporal lobe is similar in human brains with autism and in age-matched controls. *Neurosci. Lett.* 579, 163–167.
12. Cameron,H.A., McEwen,B.S. and Gould,E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 15, 4687–4692.
13. Capilla-Gonzalez,V., Gil-Perotin,S., Ferragud,A., Bonet-Ponce,L., Canales,J.J. and

- Garcia-Verdugo, J.M. (2012). Exposure to N-ethyl-N-nitrosourea in adult mice alters structural and functional integrity of neurogenic sites. *PLoS One* 7, e29891.
14. Ceccatelli, S., Bose, R., Edoff, K., Onishchenko, N. and Spulber, S. (2013). Long-lasting neurotoxic effects of exposure to methylmercury during development. *J. Intern. Med.* 273, 490–497.
  15. Cellot, G. and Cherubini, E. (2014). GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. *Front. Pediatr.* 2, 70.
  16. Covic, M., Karaca, E. and Lie, D.C. (2010). Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Heredity (Edinb.)* 105, 122–134.
  17. Crofton, K.M., Mundy, W.R., Lein, P.J., Bal-Price, A., Coecke, S., Seiler, A.E., Knaut, H., Buzanska, L. and Goldberg, A. (2011). Developmental neurotoxicity testing: recommendations for developing alternative methods for the screening and prioritization of chemicals. *ALTEX* 28, 9–15.
  18. Darcy, M.J., Trouche, S., Jin, S.X. and Feig, L.A. (2014). Age-dependent role for Ras-GRF1 in the late stages of adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Hippocampus* 24, 315–325.
  19. Dong, E., Chen, Y., Gavin, D.P., Grayson, D.R. and Guidotti, A. (2010). Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics* 5, 730–735.
  20. Edalatmanesh, M.A., Nikfarjam, H., Vafaei, F. and Moghadas, M. (2013). Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain Res.* 1526, 15–25.
  21. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A. and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317.
  22. Farioli-Vecchioli, S., Ceccarelli, M., Saraulli, D., Micheli, L., Cannas, S., D'Alessandro, F., Scardigli, R., Leonardi, L., Cinà, I., Costanzi, M., Mattera, A., Cestari, V. and Tirone, F. (2014). Tis21 is required for adult neurogenesis in the subventricular zone and for olfactory behavior regulating cyclins, BMP4, Hes1/5 and Ids. *Front. Cell Neurosci.* 8, 98.
  23. Fatemi, S.H., Snow, A.V., Stary, J.M., Araghi-Niknam, M., Reutiman, T.J., Lee, S., Brooks, A.I. and Pearce, D.A. (2005). Reelin signaling is impaired in autism. *Biol. Psychiatry* 57, 777–787.
  24. Freund, T.F. and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470.
  25. Fujikane, R., Komori, K., Sekiguchi, M. and Hidaka, M. (2016). Function of high-mobility group A proteins in the DNA damage signaling for the induction of apoptosis. *Sci. Rep.* 6, 31714.
  26. Gong, C., Wang, T.W., Huang, H.S. and Parent, J.M. (2007). Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 1803–1811.
  27. Guzowski, J.F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12, 86–104.
  28. Hainmüller, T., Krieglstein, K., Kulik, A. and Bartos, M. (2014). Joint CP-AMPA and group I mGlu receptor activation is required for synaptic plasticity in dentate gyrus fast-spiking interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 13211–13216.
  29. Hodge, R.D., Kowalczyk, T.D., Wolf, S.A., Encinas, J.M., Rippey, C., Enikolopov, G., Kempermann, G. and Hevner, R.F. (2008). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *J. Neurosci.* 28, 3707–3717.

30. Houser,C.R. (2007). Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog. Brain Res.* 163, 217–232.
31. Hsieh,J., Nakashima,K., Kuwabara,T., Mejia,E. and Gage,F.H. (2004). Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16659–16664.
32. Huang,Z.J., Kirkwood,A., Pizzorusso,T., Porciatti,V., Morales,B., Bear,M.F., Maffei,L. and Tonegawa,S. (1999). BDNF regulates the maturation of inhibition and the criticalperiod of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98, 739–755.
33. Iacopetti,P., Michelini,M., Stuckmann,I., Oback,B., Aaku-Saraste,E. and Huttner,W.B. (1999). Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4639–4644.
34. Ingram,J.L., Peckham,S.M., Tisdale,B. and Rodier,P.M. (2000). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 319–324.
35. Itahashi,M., Wang,L., Shiraki,A., Abe,H., Tanaka,T., Murakami,T., Yoshida,T. and Shibutani,M. (2014). N-methyl-N-nitrosourea during late gestation results in concomitant but reversible progenitor cell reduction and delayed neurogenesis in the hippocampus of rats. *Toxicol. Lett.* 226, 285–293.
36. Itahashi,M., Abe,H., Tanaka,T., Mizukami,S., Kimura,M., Yoshida,T. and Shibutani,M. (2015). Maternal exposure to hexachlorophene targets intermediate-stage progenitor cells of the hippocampal neurogenesis in rat offspring via dysfunction of cholinergic inputs by myelin vacuolation. *Toxicology* 328, 123–134.
37. IARC, 1978. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some N-Nitroso Compounds, General Principles for Evaluating the Carcinogenic Risk of Chemicals, vol. 17 International Agency for Research on Cancer Lyon, France (pp. 227).52.
38. Jin,K., Mao,X.O., Sun,Y., Xie,L. and Greenberg,D.A. (2002). Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 110, 311–319.
39. Jinno,S., Klausberger,T., Marton,L.F., Dalezios,Y., Roberts,J.D., Fuentealba,P., Bushong,E.A., Henze,D., Buzsáki,G. and Somogyi,P. (2007). Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 8790–8804.
40. Jones,P.L., Veenstra,G.J., Wade,P.A., Vermaak,D., Kass,S.U., Landsberger,N., Strouboulis,J. and Wolffe,A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187–191.
41. Kato,M., Abe,H., Itahashi,M., Kikuchihara,Y., Kimura,M., Mizukami,S., Yoshida,T. and Shibutani,M. (2016). Maternal exposure to hexachlorophene targets intermediate-stage progenitor cells in the hippocampal neurogenesis involving myelin vacuolation of cholinergic and glutamatergic inputs in mice. *J. Appl. Toxicol.* 36, 211–222.
42. Kempermann,G., Jessberger,S., Steiner,B. and Kronenberg,G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27, 447–452.

43. Kennedy,G.L., Dressler,I.A., Richter,W.R., Keplinger,M.L. and Calandra,J.C. (1976). Effects of hexachlorophene in the rat and their reversibility. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35, 137–145.
44. Knoth,R., Singec,I., Ditter,M., Pantazis,G., Capetian,P., Meyer,R.P., Horvat,V., Volk,B. and Kempermann,G. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5, e8809
45. Komada,M., Fujiyama,F., Yamada,S., Shiota,K. and Nagao,T. (2010). Methylnitrosourea induces neural progenitor cell apoptosis and microcephaly in mouse embryos. *Birth Defects Res. B: Dev. Reprod. Toxicol.* 89, 213–222
46. Kress,G.J., Dowling,M.J., Meeks,J.P. and Mennerick,S. (2008). High threshold, proximal initiation, and slow conduction velocity of action potentials in dentate granule neuron mossy fibers. *J. Neurophysiol.* 100, 281–291.
47. Kuwagata,M., Ogawa,T., Shioda,S. and Nagata,T. (2009). Observation of fetal brain in a rat valproate-induced autism model: a developmental neurotoxicity study. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 399–405.
48. Lajud,N. and Torner,L. (2015). Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 3.
49. Lampert,P., O'Brien,J. and Garrett,R. (1973). Hexachlorophene encephalopathy. *Acta Neuropathol.* 23, 326–333.
50. Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408.
51. Li,H., Saucedo-Cuevas,L., Regla-Nava,J.A., Chai,G., Sheets,N., Tang,W., Terskikh,A.V., Shresta,S. and Gleeson,J.G. (2016). Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell* 19, 593–598.
52. Li,Y.Q., Cheng,Z.C., Liu,S.W., Aubert,I. and Wong,C.S. (2016). P53 regulates disruption of neuronal development in the adult hippocampus after irradiation. *Cell Death Discov.* 2, 16072.
53. Lugert,S., Vogt,M., Tchorz,J.S., Müller,M., Giachino,C. and Taylor,V. (2012). Homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus does not involve amplification of *Ascl1*(high) intermediate progenitors. *Nat. Commun.* 3, 670.
54. Ma,Y., Matsuwaki,T., Yamanouchi,K. and Nishihara,M. (2017). Glucocorticoids suppress the protective effect of cyclooxygenase-2-related signaling on hippocampal neurogenesis under acute immune stress. *Mol. Neurobiol.* 54, 1953–1966.
55. Maejima,T., Oka,S., Hashimoto-dani,Y., Ohno-Shosaku,T., Aiba,A., Wu,D., Waku,K., Sugiura,T. and Kano,M. (2005). Synaptically driven endocannabinoid release requires  $\text{Ca}^{2+}$ -assisted metabotropic glutamate receptorsubtype 1 to phospholipase C  $\beta$ 4 signaling cascade in the cerebellum. *J. Neurosci.* 25, 6826–6835.
56. Masiulis,I., Yun,S. and Eisch,A.J. (2011). The interesting interplay between interneurons and adult hippocampal neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* 44, 287–302.
57. Maksimovic,M., Vekovischeva,O.Y., Aitta-aho,T. and Korpi,E.R. (2014). Chronic treatment with mood-stabilizers attenuates abnormal hyperlocomotion of *GluA1*-subunit deficient mice. *PLoS One* 9, e100188.



58. Maxwell, I.C. and Le Quesne, P.M. (1979). Conduction velocity in hexachlorophene neuropathy: correlation between electrophysiological and histological findings. *J. Neurol. Sci.* 43, 95–110.
59. Nahm, W.K. and Noebels, J.L. (1998). Nonobligate role of early or sustained expression of immediate-early gene proteins c-fos, c-jun, and Zif/268 in hippocampal mossy fiber sprouting. *J. Neurosci.* 18, 9245–9255.
60. Nakajima, K. (2007). Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochem Int* 51, 121–131.
61. Nam, S.M., Kim, J.W., Yoo, D.Y., Choi, J.H., Kim, W., Jung, H.Y., Won, M.H., Hwang, I.K., Seong, J.K. and Yoon, Y.S. (2015). Comparison of pharmacological and genetic inhibition of cyclooxygenase-2: effects on adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus. *J. Vet. Sci.* 16, 245–251.
62. Nóbrega-Pereira, S. and Marín, O. (2009). Transcriptional control of neuronal migration in the developing mouse brain. *Cereb. Cortex.* 19, 1107–1113.
63. OECD, 2007a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study. OECD publishing, Paris, France.
64. OECD, 2007b. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD publishing, Paris, France.
65. Ohta, R., Matsumoto, A., Hashimoto, Y., Nagao, T. and Mizutani, M. (1997). Behavioral characteristics of micrencephalic rats in high and low shuttlebox avoidance lines. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 157–162.
66. Panganiban, G. and Rubenstein, J.L. (2002). Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development.* 129, 4371–4386.
67. Pawluski, J.L., Brummelte, S., Barha, C.K., Crozier, T.M. and Galea, L.A. (2009). Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 343–357.
68. Pechnick, R.N., Zonis, S., Wawrowsky, K., Pourmorady, J. and Chesnokova, V. (2008). p21<sup>Cip1</sup> restricts neuronal proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1358–1363.
69. Rimvall, K., Sheikh, S.N. and Martin, D.L. (1993). Effects of increased gamma-aminobutyric acid levels on GAD67 protein and mRNA levels in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 60, 714–720.
70. Rodier, P.M., Ingram, J.L., Tisdale, B., Nelson, S. and Romano, J. (1996). Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J. Comp. Neurol.* 370, 247–261.
71. Roque, T., Haton, C., Etienne, O., Chicheportiche, A., Rousseau, L., Martin, L., Mouthon, M.A. and Boussin, F.D. (2012). Lack of a p21<sup>waf1/cip</sup>-dependent G1/S checkpoint in neural stem and progenitor cells after DNA damage in vivo. *Stem Cells* 30, 537–547.
72. Shiraki, A., Akane, H., Ohishi, T., Wang, L., Morita, R., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M. (2012). Similar distribution changes of GABAergic interneuron subpopulations in contrast to the different impact on neurogenesis between developmental and adult-stage hypothyroidism in the hippocampal dentate gyrus in rats. *Arch. Toxicol.* 86, 1559–1569.



73. Shiraki,A., Tanaka,T., Watanabe,Y., Saito,F., Akahori,Y., Imatanaka,N., Yoshida,T. and Shibutani,M. (2016). Immunohistochemistry of aberrant neuronal development induced by 6-propyl-2-thiouracil in rats. *Toxicol. Lett.* 261, 59–71.
74. Shuman,R.M., Leech,R.W. and Alvord,E.C. Jr. (1975). Neurotoxicity of hexachlorophene in humans. II. A clinicopathological study of 46 premature infants. *Arch. Neurol.* 32, 320–325.
75. Song,J., Zhong,C., Bonaguidi,M.A., Sun,G.J., Hsu,D., Gu,Y., Meletis,K., Huang,Z.J., Ge,S., Enikolopov,G., Deisseroth,K., Luscher,B., Christian,K.M., Ming,G.L. and Song,H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489, 150–4.
76. Son,J.H. and Winzer-Serhan,U.H. (2008). Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs in rat hippocampal GABAergic interneurons. *J. Comput. Neurol.* 511, 286–299.
77. Steiner,B., Klempin,F., Wang,L., Kott,M., Kettenmann,H. and Kempermann,G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54, 805–814.
78. Sun,L., Lee,J. and Fine,H.A. (2004). Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J. Clin. Invest.* 113, 1364–1374.
79. Sun,J., Sun,J., Ming,G.L. and Song,H. (2011). Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1087–1093.
80. Suri,D., Veenit,V., Sarkar,A., Thiagarajan,D., Kumar,A., Nestler,E.J., Galande,S. and Vaidya,V.A. (2013). Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol. Psychiatry* 73, 658–666.
81. Takimoto,N., Wang,L., Itahashi,M., Ogawa,T., Segawa,R., Hara,S., Murakami,T., Suzuki,K. and Shibutani,M. (2014). Maternal single injection of N-methyl-N-nitrosourea to cause microcephaly in offspring induces transient aberration of hippocampal neurogenesis in mice. *Toxicol. Lett.* 226, 20–27.
82. Takashima,S., Hirose,M., Ogonuki,N., Ebisuya,M., Inoue,K., Kanatsu-Shinohara,M., Tanaka,T., Nishida,E., Ogura,A. and Shinohara,T. (2016). Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1. *Genes. Dev.* 27, 1949–1958.
83. Teratani-Ota,Y., Yamamizu,K., Piao,Y., Sharova,L., Amano,M., Yu,H., Schlessinger,D., Ko,M.S. and Sharov,A.A. (2016). Induction of specific neuron types by overexpression of single transcription factors. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 52, 961–973.
84. Tozuka,Y., Fukuda,S., Namba,T., Seki,T. and Hisatsune,T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47, 803–815.
85. Uzunova,G., Pallanti,S. and Hollander,E. (2016). Excitatory/inhibitory imbalance in autism spectrum disorders: implications for interventions and therapeutics. *World J. Biol. Psychiatry* 17, 174–186.
86. Wang,L., Ohishi,T., Shiraki,A., Morita,R., Akane,H., Ikarashi,Y., Mitsumori,K. and Shibutani,M. (2012). Developmental exposure to manganese chloride induces sustained aberration of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of mice. *Toxicol. Sci.* 127, 508–521.
87. Wang,L., Shiraki,A., Itahashi,M., Akane,H., Abe,H., Mitsumori,K. and Shibutani,M. (2013). Aberration in epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis by developmental exposure to manganese chloride in mice. *Toxicol. Sci.* 136, 154–165.
88. Wu,G.J., Chen,J.T., Tsai,H.C., Chen,T.L., Liu,S.H. and Chen,R.M. (2017). Protection of

dexmedetomidine against ischemia/reperfusion-induced apoptotic insults to neuronal cells occurs via an intrinsic mitochondria-dependent pathway. *J. Cell. Biochem.* 118, 2635–2644.

89. Yamamizu,K., Piao,Y., Sharov,A.A., Zsiros,V., Yu,H., Nakazawa,K., Schlessinger,D. and Ko,M.S. (2013). Identification of transcription factors for lineage-specific ESC differentiation. *Stem Cell Reports* 27, 545–559.

90. Yoo,J.Y., Larouche,M. and Goldowitz,D. (2013). The expression of HDAC1 and HDAC2 during cerebellar cortical development. *Cerebellum* 12, 534–546.

91. Zheleznyakova,G.Y., Cao,H. and Schiöth,H.B. (2016). BDNF DNA methylation changes as a biomarker of psychiatric disorders: literature review and open access database analysis. *Behav. Brain Funct.* 12, 17.

92. Zhu,G., Okada,M., Yoshida,S., Ueno,S., Mori,F., Takahara,T., Saito,R., Miura,Y., Kishi,A., Tomiyama,M., Sato,A., Kojima,T., Fukuma,G., Wakabayashi,K., Hase,K., Ohno,H., Kijima,H., Takano,Y., Mitsudome,A., Kaneko,S. and Hirose,S. (2008). Rats harboring S284L *Chrna4* mutation show attenuation of synaptic and extrasynaptic GABAergic transmission and exhibit the nocturnal frontal lobe epilepsy phenotype. *Neurosci.* 28, 12465–12476.

图 表

**Table 1-1**

**Reproductive parameters in developmental exposure study of MNU**

	MNU in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	3	10	30
No. of dams examined	13	12	12	13
Reproductive parameters				
No. of implantation sites	13.5±2.2	13.7±1.8	13.4±1.8	13.9±2.1
No. of live offspring	13.5±2.2	13.7±1.8	13.4±1.8	13.8±2.2
Male ratio (%)	55.4±14.1	51.2±10.8	49.7±12.0	54.4±9.1

Abbreviation: MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

**Table 1-2**

**Body weight of dams in developmental exposure study of MNU**

	MNU in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	3	10	30
No. of dams examined	11	10	10	11
GD 1	238±18	245±21	239±17	243±19
GD 6	279±22	288±22	280±19	280±22
GD 9	299±23	305±23	296±21	296±20
GD 13	323±23	332±25	324±24	315±21
GD 16	348±26	359±27	347±29	342±22
GD 20	411±33	422±34	412±39	397±26
PND 0	317±27	336±31	322±33	300±30
PND 4	340±24	353±30	344±29	315±22
PND 7	343±20	363±31	343±28	324±21
PND 11	340±23	359±37	335±23	321±19
PND 14	334±19	351±36	329±24	309±23
PND 18	315±19	326±25	309±22	303±19
PND 21	333±24	342±35	326±22	321±21

Abbreviations: GD, gestational day; PND, postnatal day; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

Data are expressed as mean ± SD.

**Table 1-3****Food and water consumption of dams in developmental exposure study of MNU**

	MNU in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	3	10	30
No. of dams examined	11	10	10	11
Food consumption				
GD 7	21.2±3.9	23.0±4.6	20.5±4.0	20.0±2.6
GD 13	27.2±1.2	27.5±5.5	24.6±2.0	21.3±3.6
GD 20	24.7±3.6	23.9±3.2	24.4±3.9	21.4±3.7
PND 1	30.5±4.8	31.5±3.9	32.9±6.4	25.9±6.5
PND 7	47.4±3.0	49.8±3.2	47.4±4.2	43.3±3.5*
PND 14	52.7±5.8	52.2±5.3	48.9±3.8	43.5±3.8**
PND 21	59.5±9.3	57.8±5.5	53.8±3.8	49.8±4.8*
Water consumption				
GD 7	44.4±6.3	42.6±4.4	39.5±7.9	34.4±4.7**
GD 9	42.0±6.4	34.7±5.6**	35.1±4.0**	32.4±4.7**
GD 13	50.7±7.4	45.0±7.1*	45.8±7.0*	33.0±5.1**
GD 16	45.9±5.6	41.4±8.0	41.2±6.4	43.1±14.9
GD 20	42.0±6.0	42.2±5.7	41.7±8.2	34.5±6.8**
PND 1	39.3±9.4	38.5±8.6	43.8±7.3	20.9±14.8*
PND 4	59.1±5.6	58.9±7.7	65.2±9.9	54.4±9.7
PND 7	58.3±9.9	59.8±6.3	60.7±7.8	48.1±7.2
PND 11	72.8±8.6	73.9±9.3	73.7±12.4	61.6±9.1*
PND 14	70.5±10.3	69.0±8.7	68.5±6.7	55.0±17.6*
PND 18	90.9±20.9	86.8±18.8	92.3±15.3	79.5±6.0
PND 21	90.3±31.0	90.3±10.7	85.2±12.0	64.1±7.5**

Abbreviations: GD, gestational day; PND, postnatal day; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 1-4****Body weight of offspring in developmental exposure study of MNU**

	MNU in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	3	10	30
No. of litter examined	11	10	10	11
PND 4	11.3±0.6	11.7±0.6	11.0±0.5	10.7±0.4
PND 7	18.1±0.8	19.1±0.7	18.4±0.8	17.1±0.7**
PND 11	30.2±1.6	31.5±1.1	30.0±1.7	28.0±1.1*
PND 14	39.1±2.0	40.4±1.8	38.5±2.3	36.1±1.1**
PND 18	49.2±2.5	51.2±3.1	49.0±3.2	46.1±1.7**
PND 21	56.5±3.5	57.8±3.5	55.2±3.7	51.4±1.7**
PND 28	98.8±7.2	96.7±7.0	95.7±9.6	82.5±10.1**
PND 35	159.8±11.2	160.5±10.1	155.4±11.1	144.7±8.8**
PND 42	228.6±14.7	231.5±16.4	226.2±14.9	212.2±12.4*
PND 49	291.5±17.6	298.6±21.1	290.0±21.7	271.5±15.3*
PND 56	352.8±20.4	362.2±26.8	352.5±26.3	328.3±19.7*
PND 63	406.0±22.8	415.5±31.9	407.1±29.9	379.5±21.5*
PND 70	447.3±27.6	462.1±36.9	450.3±35.3	419.5±24.7*
PND 77	476.2±31.7	492.3±38.4	476.8±37.6	445.2±28.0

Abbreviations: PND, postnatal day; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 1-5****Food and water consumption of offspring in developmental exposure study of MNU**

	MNU in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	3	10	30
No. of litter examined	11	10	10	11
Food consumption				
PND 28	14.8±0.8	14.8±0.9	14.3±0.3	13.9±1.0
PND 35	18.3±3.5	21.8±1.0**	21.3±0.8**	20.5±1.1
PND 42	21.0±0.9	22.9±0.6**	21.5±0.9	20.7±1.2
PND 49	24.7±2.9	26.2±1.7	25.5±1.6	23.8±1.9
PND 56	27.7±1.3	28.0±1.3	27.6±1.2	25.0±2.4*
PND 63	28.0±1.3	28.0±1.2	26.9±2.9	25.0±2.4*
PND 70	49.1±3.6	50.9±1.8	51.5±2.4	48.3±3.5
PND 77	26.4±1.9	26.1±1.7	23.2±6.4	24.7±1.8
Water consumption				
PND 28	23.5±2.6	24.4±4.0	22.6±1.8	24.2±4.3
PND 35	32.6±2.3	33.3±1.7	33.2±1.6	30.2±1.3*
PND 42	36.1±3.1	37.4±1.7	36.0±2.5	33.3±1.6*
PND 49	43.1±3.6	45.3±3.1	43.2±1.9	40.0±3.1
PND 56	47.8±5.0	53.8±4.2	51.0±4.4	40.0±9.8
PND 63	46.5±5.0	51.0±4.0	49.1±4.7	47.1±4.9
PND 70	90.2±13.1	93.2±8.6	93.9±10.7	85.4±6.8
PND 77	47.2±5.0	50.2±5.4	48.9±5.3	44.6±3.5

Abbreviations: PND, postnatal day; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 1-6****Body weight of rats in postpubertal exposure study of MNU**

	MNU by oral gavage (mg/kg body weight)		
	0 (Control)	5	15
No. of animals examined	30	24	30
Day 1	203±10.5	204±9.5	206±10.9
Day 3	220±11.9	217±9.8	215±10.9
Day 7	254±14.4	243±11.7**	227±12.2**
Day 10	279±16.4	263±12.8**	240±13.7**
Day 14	312±19.9	290±14.7**	250±16.2**
Day 21	351±25.6	326±21.8**	260±20.1**
Day 28	390±30.0	356±24.7**	274±22.8**

Abbreviation: MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

Data are expressed as mean ± SD.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 1-7****Food and water consumption of rats in postpubertal exposure study of MNU**

	MNU by oral gavage (mg/kg body weight)		
	0 (Control)	5	15
No. of animals examined	30	24	30
Food consumption			
Day 1	18.9±0.7	19.8±1.0	20.3±1.4
Day 3	19.3±0.8	16.5±1.0**	14.4±1.2**
Day 7	22.7±1.4	19.3±1.0**	16.2±1.1**
Day 14	23.9±1.2	20.6±1.2**	14.1±1.3**
Day 21	22.5±1.8	18.4±2.0**	14.1±1.1**
Day 28	23.1±1.4	21.7±1.2	15.3±1.1**
Water consumption			
Day 1	32.8±2.4	34.2±3.1	32.0±2.0
Day 3	32.3±2.9	30.7±3.0	29.8±4.3
Day 7	36.1±4.2	35.8±3.5	37.7±4.8
Day 14	44.3±5.9	41.7±3.2	32.4±3.7**
Day 21	40.7±5.7	39.1±5.4	25.4±3.7**
Day 28	40.8±7.4	39.2±4.4	25.9±3.2**

Abbreviation: MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

Data are expressed as mean ± SD.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 1-8****Maternal body and brain weights on necropsy after developmental exposure to MNU**

	MNU in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	3	10	30
No. of dams examined	11	10	10	11
Body and brain weights on day 21 after delivery				
Body weight (g)	332.5±24.0	342.3±34.6	325.8±21.7	321.1±21.1
Brain weight (g)	1.93±0.11	1.94±0.06	1.93±0.07	1.96±0.06

Abbreviation: MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

Data are expressed as mean ± SD.

**Table 1-9****Body and brain weights of offspring on necropsy after developmental exposure to MNU**

	MNU in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	3	10	30
PND 21				
No. of litter examined	11	10	10	11
Body weight (g)	56.5±3.5	57.8±3.5	55.2±3.7	51.4±1.7**
Brain weight (g)	1.48±0.03	1.50±0.02	1.43±0.03*	1.05±0.07**
PND 77				
No. of litter examined	11	10	10	11
Body weight (g)	476.2±31.7	492.3±38.4	476.8±37.6	445.2±28.0
Brain weight (g)	2.10±0.12	2.08±0.07	2.00±0.10	1.52±0.07**

Abbreviations: PND, postnatal day; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 1-10****Body and brain weights of rats on necropsy after postpubertal exposure to MNU**

	MNU by oral gavage (mg/kg body weight)		
	0 (Control)	5	15
No. of animals examined	19	13	19
Body weight (g)	369.6±31.2	335.9±25.9*	262.8±22.4**
Brain weight (g)	2.00±0.07	2.00±0.06	1.84±0.09**

Abbreviation: MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 1-11****Antibodies used in this study**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:300	Autoclaving <sup>a</sup>	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
Calbindin-D-28K	CALB1	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	CB-955	1:500	Microwaving <sup>b</sup>	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
Calbindin-D-29K	CALB2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	CRT01/O. N.40	1:100	Microwaving <sup>b</sup>	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	p21 <sup>Cip1/Waf1</sup>	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2b</sub>	CP74	1:1000	Microwaving <sup>b</sup>	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
Cyclooxygenase 2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	n.a.	1:200	Autoclaving <sup>a</sup>	BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA, USA)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam Inc.
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	GA5	1:200	None	EMD Millipore, (Billerica, MA, USA)
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	A60	1:100	None	EMD Millipore
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	PARV-19	1:1000	Microwaving <sup>b</sup>	EMD Millipore
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	PC10	1:200	None	Dako (Glostrup, Denmark)
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Sex determining region Y (SRY)-box 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	9-9-3	1:4000	None	Abcam Inc.
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Microwaving <sup>b</sup>	Abcam Inc.
T-box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving <sup>a</sup>	Abcam Inc.

Abbreviation: n.a, not applicable.

<sup>a</sup> 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>b</sup> 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).



**Table 1-12****Histomorphometrical changes in the hippocampal dentate gyrus of offspring after developmental exposure to MNU<sup>a</sup>**

	MNU in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	3	10	30
PND 21				
No. of animals examined	10	10	10	10
Length of the SGZ (mm)	2.69±0.25	2.85±0.22	2.79±0.34	2.04±0.26**
Area of the dentate hilus (mm <sup>2</sup> )	0.24±0.03	0.23±0.03	0.24±0.02	0.16±0.04**
PND 77				
No. of animals examined	10	10	10	10
Length of the SGZ (mm)	2.73±0.31	2.63±0.21	2.73±0.33	2.36±0.33
Area of the dentate hilus (mm <sup>2</sup> )	0.35±0.04	0.36±0.03	0.37±0.05	0.25±0.04**

Abbreviations: MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea; PND, postnatal day; SGZ, subgranular zone.

Data are expressed as mean ± SD.

<sup>a</sup> Histomorphometry was performed using NeuN-immunostained sections.\*\**P* < 0.01, significantly different from the 0 ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.**Table 1-13****Histomorphometrical changes of the hippocampal dentate gyrus of rats after postpubertal exposure to MNU<sup>a</sup>**

	MNU by oral gavage (mg/kg body weight)		
	0 (Control)	5	15
No. of animals examined	10	10	10
Length of the SGZ (mm)	2.72±0.39	2.84±0.51	2.76±0.43
Area of the dentate hilus (mm <sup>2</sup> )	0.36±0.04	0.36±0.07	0.35±0.05

Abbreviations: MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea; SGZ, subgranular zone.<sup>a</sup> Histomorphometry was performed using NeuN-immunostained sections.

Data are expressed as mean ± SD.

**Table 1-14****Area and thickness of NeuN<sup>+</sup> SGZ and GCL of offspring after developmental exposure to MNU**

	MNU in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	3	10	30
PND 21				
No. of examined	10	10	10	10
Area (mm <sup>2</sup> )	0.15±0.02	0.16±0.03	0.16±0.02	0.12±0.02*
Thickness (mm)	54.8±7.4	57.7±9.1	58.6±5.9	56.3±5.5
PND 77				
No. of examined	10	10	10	10
Area (mm <sup>2</sup> )	0.19±0.03	0.19±0.03	0.19±0.03	0.16±0.03*
Thickness (mm)	66.9±3.1	72.5±5.9	70.9±5.4	60.3±8.0**

Abbreviations: GCL; granule cell layer; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea; PND, postnatal day; SGZ, subgranular zone.

Data are expressed as mean ± SD.

\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, significantly different from the 0 ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.**Table 1-15****Area and thickness of NeuN<sup>+</sup> SGZ and GCL of rats after postpubertal exposure to MNU**

	MNU by oral gavage (mg/kg body weight)		
	0 (Control)	5	15
No. of examined	10	10	10
Area (mm <sup>2</sup> )	0.18±0.04	0.16±0.03	0.14±0.03
Thickness (mm)	66.9±6.5	56.5±5.9**	51.5±4.9**

Abbreviations: GCL; granule cell layer; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea; NeuN, neuron-specific nuclear protein; SGZ, subgranular zone.

Data are expressed as mean ± SD.

\*\**P* < 0.01, significantly different from the 0 mg/kg controls by the Dunnett's test or Steel's test.

Table 1-16

## Sequence of primers used for real-time RT-PCR

Gene	Accession no.	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Bax</i>	NM_017059	AGGACGCATC CACCAAGAAG	CCAGTTCATC GCCAATTGC
<i>Bcl2</i>	NM_016993	GGATGCCTTT GTGGAATAT ATGG	CAGAGACAGC CAGGAGAAAT CAA
<i>Bcl2l11</i>	NM_022612	GCCAGGCCTT CAACCATTAT C	GGTTCCTCCT GAGACTGCCT TAT
<i>Bdnf</i>	NM_001270630	CACTTTTGAG CACGTGATCG A	TCCGCGTCCT TATGGTTTTTC
<i>Casp3</i>	NM_012922	ACAAGCTGGA ATTCATGCAC AT	CAAATTCCGT GGCCACCTT
<i>Casp6</i>	NM_001271984	GCACGGTAGT TCCCTGGAGT T	GCGCTGAGAG ACCTTCCTGT T
<i>Casp8</i>	NM_022277	TGGCTGGAAA ACCCAAAATC	GGCACCCTT TCTGGAAGT
<i>Casp9</i>	NM_031632	CATGGTGGAG GTGAAGAACG A	TGCGCCATCT CCATCAAAG
<i>Cdkn1a</i>	NM_080782	GGTTCCTCCT GAGACTGCCT TAT	GGTTCCTCCT GAGACTGCCT TAT
<i>Chrna7</i>	NM_012832	CGTTCGCTGG TTCCCTTTT	GGACCAGGAC CCAAACCTCA
<i>Chrn2</i>	NM_019297	GCTTCATTGC GGACCACAT	GTATTTCCAG TCCTCCCTCA CACT
<i>Dpysl3</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCTAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC
<i>Eoms</i>	XM_001077231	CCCCATAAAG TCGGAGGACA T	GCCCCCATGC CTTTTGAG
<i>Gad1</i>	NM_017007	AGGTCACCCT CGGTTTTTCA	CATTCGCCAG CTAAACCAAT G
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGC CACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT
<i>Gfap</i>	NM_017009	CCTTGACCTG CGACCTTGAG	GCGCATTTGC CTCTCCAA
<i>Gria1</i>	NM_031608	GTGAGCGTCG TCCTCTTCCT	TCTTCGCTGT GCCATTCGTA
<i>Gria2</i>	NM_001083811	CATCACACCT AGCTTCCCAA CA	CTTTGAGGTC AGGTCGCATC T
<i>Gria3</i>	NM_001112742	GAAACATAAA GGACGTCCAG GAA	TTCTGCCTT CTGTCCATTT CT
<i>Grin2a</i>	NM_012573	GGCTGTCAGC ACTGAATCCA	GGTTTAGAGA ATCCTGGCGT AGAG
<i>Grin2b</i>	NM_012574	TCGTCAAGAC ACAAGATTAA AACCA	GGAGGATAAA GGAACGGAAG AAA
<i>Grin2d</i>	NM_022797	TCGTGCTCAC ACCCAAGGA	GGTCACTGCC ACAAAGGATG T
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCTAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC
<i>Kit</i>	NM_022264	AATCCGACAA CCAAAGCAAC A	TCCTTCTGTG CCTTTCAATC TG
<i>Kitl</i>	NM_021843	GCAGTATGAT GCCACGGTGT A	TTCCGCTGGT CCACATTGA
<i>Mdm2</i>	NM_001108099	GGTTCCTCCT GAGACTGCCT TAT	GGTTCCTCCT GAGACTGCCT TAT
<i>Mgmt</i>	NM_012861	AGGAGCGATG AGGAGCAATC	GGCACCCTCA CTGCGAAT
<i>Notch1</i>	NM_001105721	TGCTGTCATC TCCGACTTCA TC	TGGCAGCATC TGAACGAGAG TA
<i>Pvalb</i>	NM_022499	TCGCCACAAA AAGTTCTTCC A	TCTTCACATC ATCCGCACTC TT
<i>Reln</i>	NM_0080394	GCCAGCTTTC GACTACCCTA TTAAC	CGTAGTGGCA CAGAAGCTAT CG
<i>Sox2</i>	NM_001109181	GCGGCAACCA GAAGAACAG	CCACACCATG AAGGCATTCA
<i>Tnf</i>	NM_012675	GCCCGAGGCA ACACATCT	CCAGTTCCAC ATCTCGGATC A
<i>TP53</i>	NM_030989	CCCTTCACTG CCTTTTTTTA CCT	GCCAGGAACC AGTTTGCATA G

Abbreviations: *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bcl2l11*, BCL2 like 11; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrn2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Eomes*, eomesodermin; *Gad1*, glutamate decarboxylase 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kit*, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *Kitl*, KIT ligand; *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene; *Mgmt*, *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea; *Notch1*, notch 1; PND, postnatal day; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; *Sox2*, SRY box 2; *Tnf*, tumor necrosis factor; *TP53*, tumor protein p53.

Table 1-17

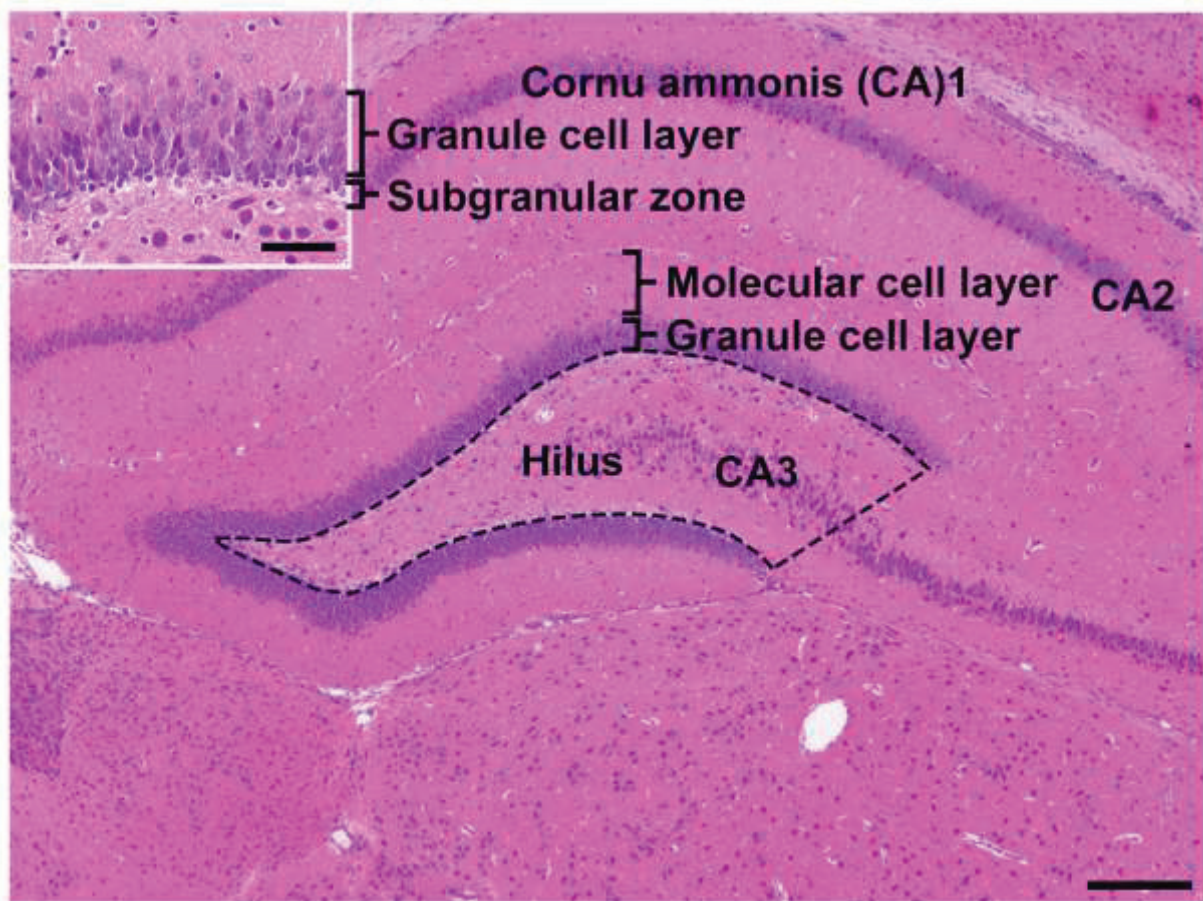
Real-time RT-PCR analysis data in the hippocampal dentate gyrus of rats after postpubertal exposure to MNU

	0 mg/kg (body weight) MNU (Control)		15 mg/kg (body weight) MNU	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
Granule cell lineage markers				
<i>Gfap</i>	1.02±0.21	1.00±0.06	0.89±0.24	0.79±0.10**
<i>Sox2</i>	1.07±0.37	1.01±0.13	1.16±0.20	0.93±0.36
<i>Eoms</i>	1.10±0.53	1.03±0.27	1.33±0.93	1.21±0.72
<i>Dpysl3</i>	1.04±0.29	1.03±0.29	0.86±0.15	0.72±0.12*
Interneuron subpopulations				
<i>Reln</i>	1.08±0.47	1.07±0.45	0.95±0.34	0.79±0.15
<i>Pvalb</i>	1.02±0.19	1.01±0.18	2.14±0.94*	1.82±0.56*
<i>Gad1</i>	1.06±0.39	1.06±0.38	1.08±0.51	0.88±0.33
Stem cell factors/receptors				
<i>Kitl</i>	1.02±0.22	1.04±0.32	1.38±0.45	1.07±0.38
<i>Kit</i>	1.01±0.18	1.05±0.38	1.47±0.58	1.06±0.30
<i>Notch1</i>	1.02±0.20	1.03±0.28	2.78±1.43	2.15±0.93
Neurotrophic factor				
<i>Bdnf</i>	1.03±0.27	1.02±0.24	2.46±0.78**	2.42±0.67**
Apoptosis-related molecules				
<i>Casp3</i>	1.01±0.16	1.06±0.45	1.48±0.55	1.09±0.21
<i>Casp6</i>	1.08±0.52	1.01±0.11	1.81±0.50*	1.81±0.33**
<i>Casp8</i>	1.05±0.32	1.03±0.31	2.11±0.40**	1.98±0.48**
<i>Casp9</i>	1.02±0.20	1.01±0.11	1.09±0.25	1.00±0.14
<i>Bcl2</i>	1.06±0.43	1.03±0.31	1.43±0.24	1.27±0.27
<i>Bax</i>	1.03±0.25	1.01±0.15	1.49±0.34*	1.31±0.32
<i>Bcl2l11</i>	1.08±0.41	1.03±0.25	1.01±0.27	0.84±0.27
<i>Tnf</i>	1.01±0.17	1.02±0.24	3.19±1.05**	2.54±0.76**
DNA damage response-related molecules				
<i>TP53</i>	1.04±0.33	1.02±0.22	1.47±0.34*	1.30±0.30*
<i>Mdm2</i>	1.07±0.35	1.02±0.22	1.56±0.36	1.32±0.22*
<i>Cdkn1a</i>	1.07±0.42	1.06±0.43	2.66±0.74**	2.43±1.11*
DNA repair-related molecule				
<i>Mgmt</i>	1.10±0.47	1.04±0.30	4.81±2.94*	4.07±1.91*
Cholinergic receptors				
<i>Chrna7</i>	1.01±0.17	1.00±0.08	1.21±0.36	1.15±0.24
<i>Chrn2</i>	1.02±0.18	1.06±0.44	1.22±0.22	0.96±0.27
Glutamate receptors				
<i>Gria1</i>	1.04±0.32	1.01±0.19	1.05±0.38	0.96±0.21
<i>Gria2</i>	1.01±0.14	1.01±0.19	1.12±0.29	0.94±0.14
<i>Gria3</i>	1.01±0.18	1.01±0.12	1.00±0.27	0.89±0.10
<i>Grin2a</i>	1.04±0.35	1.02±0.25	0.76±0.22	0.72±0.10*
<i>Grin2b</i>	1.04±0.31	1.01±0.15	0.89±0.21	0.85±0.11
<i>Grin2d</i>	1.09±0.48	1.08±0.51	1.23±0.45	1.33±0.62

Abbreviations: *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bcl2l11*, BCL2 like 11; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrn2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Eomes*, eomesodermin; *Gad1*, glutamate decarboxylase 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kit*, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *Kitl*, KIT ligand; *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene; *Mgmt*, O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase; MNU, N-methyl-N-nitrosourea; *Notch1*, notch 1; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; *Sox2*, SRY box 2; *Tnf*, tumor necrosis factor, *TP53*, tumor protein p53.

Data are expressed as mean ± SD.

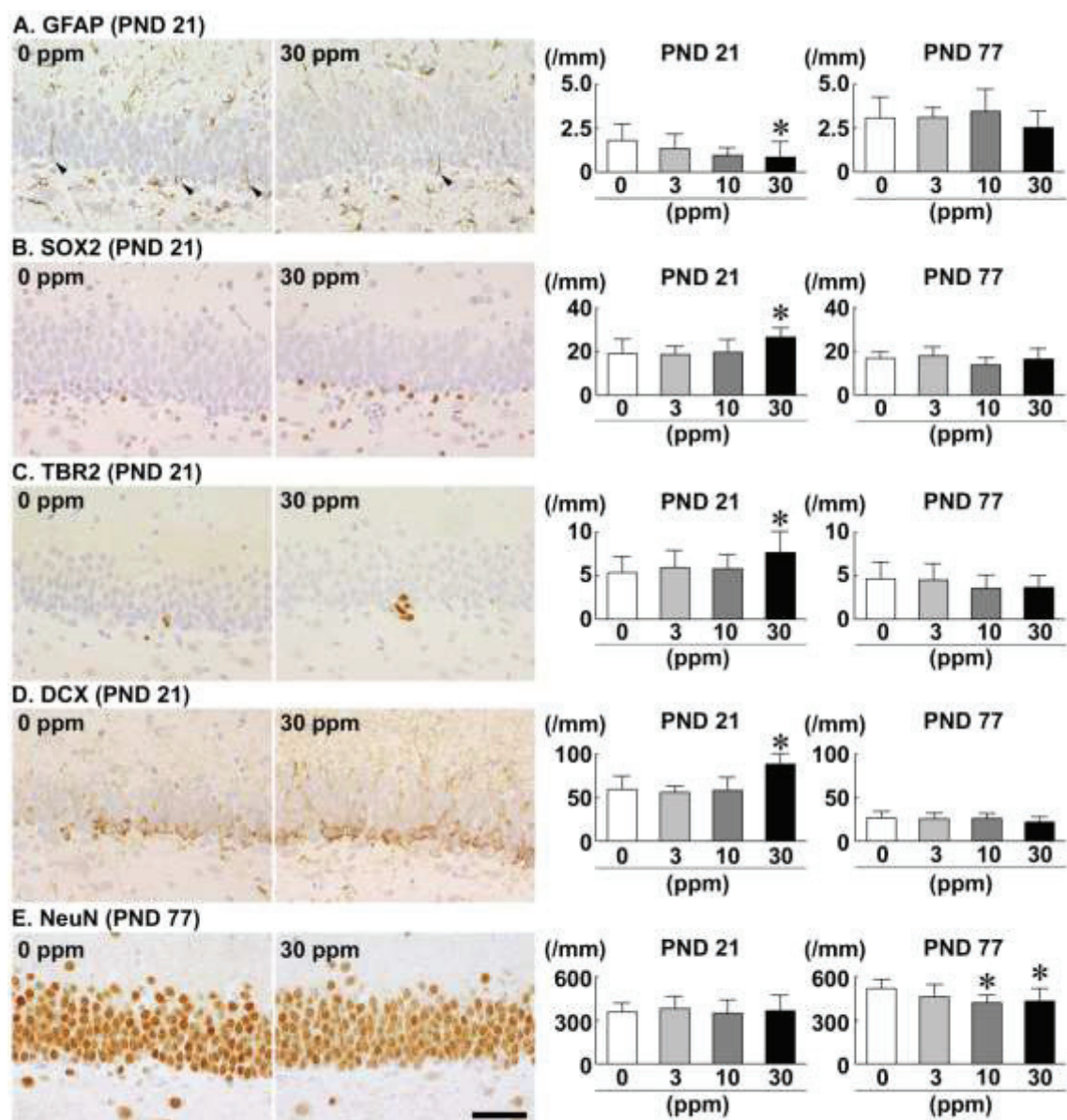
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by the Student's t-test or Aspin-Welch's t-test.



**Fig. 1-1**

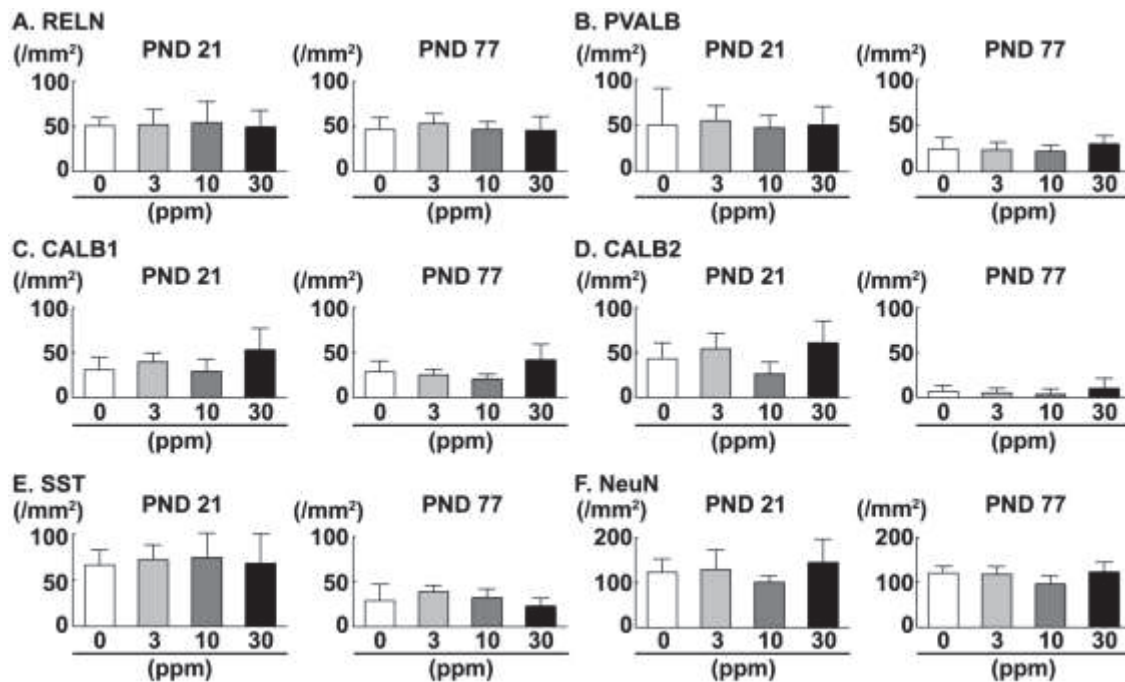
Overview of the hippocampal formation of a male rat stained with hematoxylin and eosin. The number of cells in the hilus of the dentate gyrus (as enclosed by the dotted line) displaying immunoreactivity for RELN, PVALB, CALB1, CALB2, SST or NeuN was counted and normalized for the unit area. Only small-sized cells with positive immunoreactivity for these antigens were counted, and larger cornu ammonis region 3 neurons were excluded. (Inset) Higher magnification of the granule cell layer (GCL) and subgranular zone (SGZ). The distribution of immunoreactive cells for GFAP, SOX2, TBR2, DCX, NeuN, PCNA, p21<sup>Cip1/Kip1</sup>, ARC or COX2, and TUNEL<sup>+</sup> apoptotic cells were measured in the SGZ and/or GCL. Magnification  $\times 40$ ; bar 200  $\mu\text{m}$ . (Inset) Higher magnification of the granule cell layer. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 1-2**

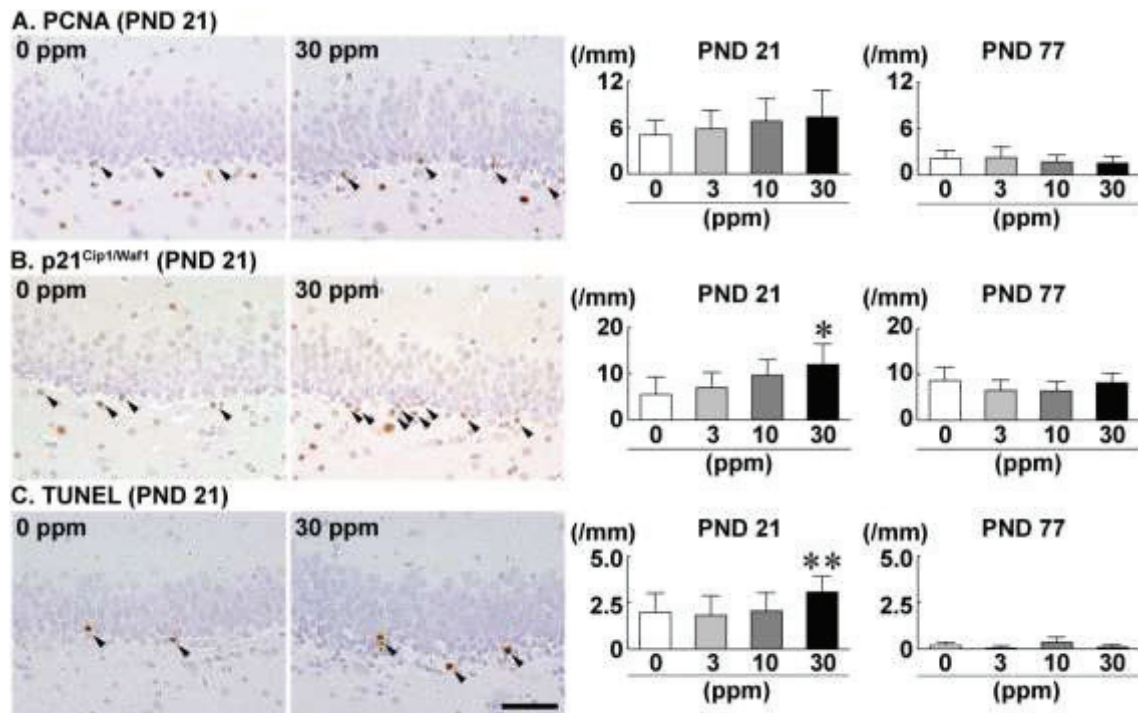
Distribution and number of immunoreactive cells for GFAP, SOX2 or TBR2 in the subgranular zone (SGZ), and DCX or NeuN in the SGZ and granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to *N*-methyl-*N*-nitrosourea (Experiment 1). (A) GFAP. (B) SOX2. (C) TBR2. (D) DCX. (E) NeuN. Representative images from 0 ppm controls (left) and 30 ppm group (right) on PND 21. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD.  $N = 10$  in each group (one animal per dam). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared to 0 ppm controls by Dunnett's or Steel's test.



**Fig. 1-3**

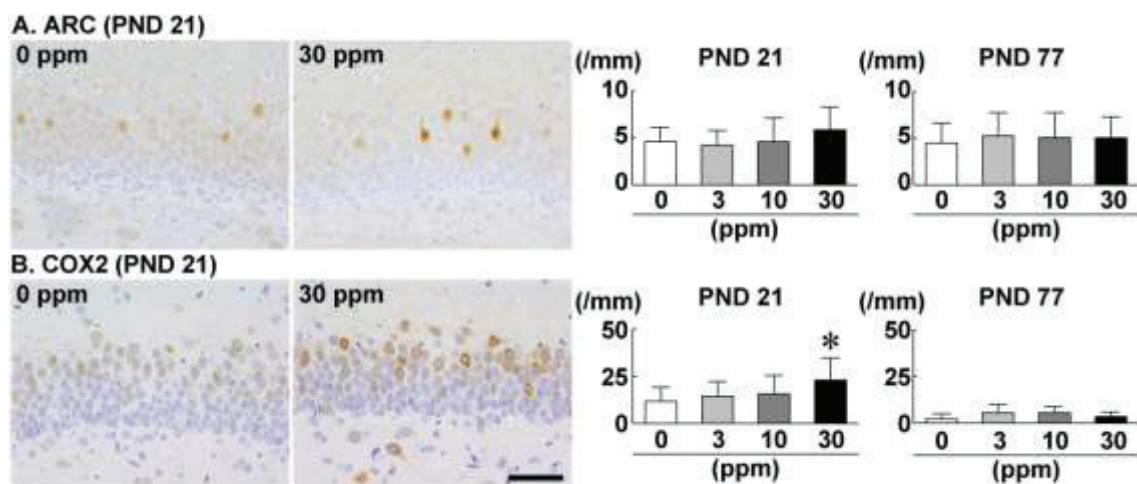
The number of immunoreactive cells for RELN, PVALB, CALB1, CALB2, SST and NeuN in the hilus of the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to N-methyl-N-nitrosourea in Experiment 1. (A) RELN. (B) PVALB. (C) CALB1. (D) CALB2. (E) SST. (F) NeuN. Graphs show the number of immunoreactive cells for each antigen/unit area (mm<sup>2</sup>) of the hilus of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 10 in each group.





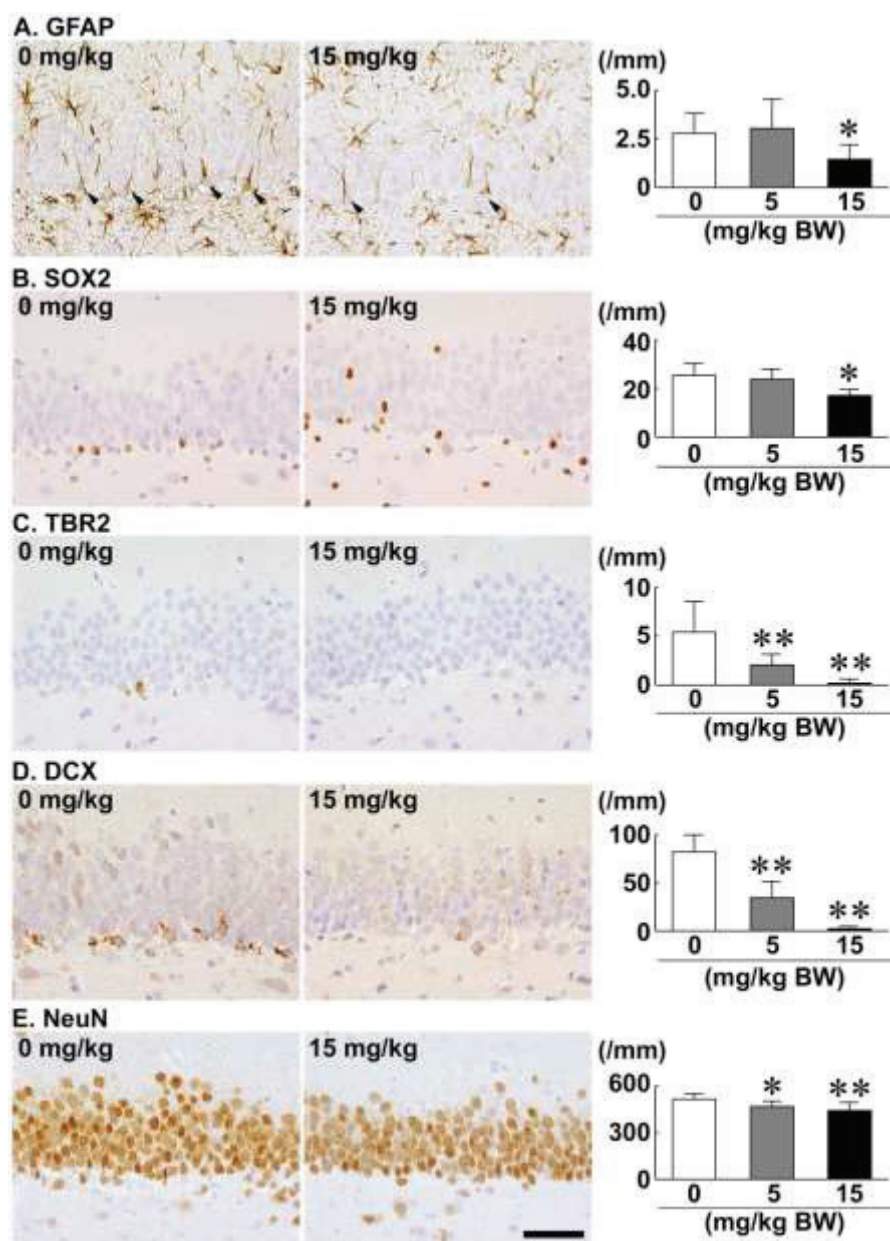
**Fig. 1-4**

Distribution and number of immunoreactive cells for PCNA or p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, or TUNEL positive cells in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to *N*-methyl-*N*-nitrosourea (Experiment 1). (A) PCNA. (B) p21<sup>Cip1/Waf1</sup>. (C) TUNEL. Representative images from 0 ppm controls (left) and the 30 ppm group (right) on PND 21 in developmental exposure study. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 10 in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared to 0 ppm controls by Dunnett's or Steel's test.



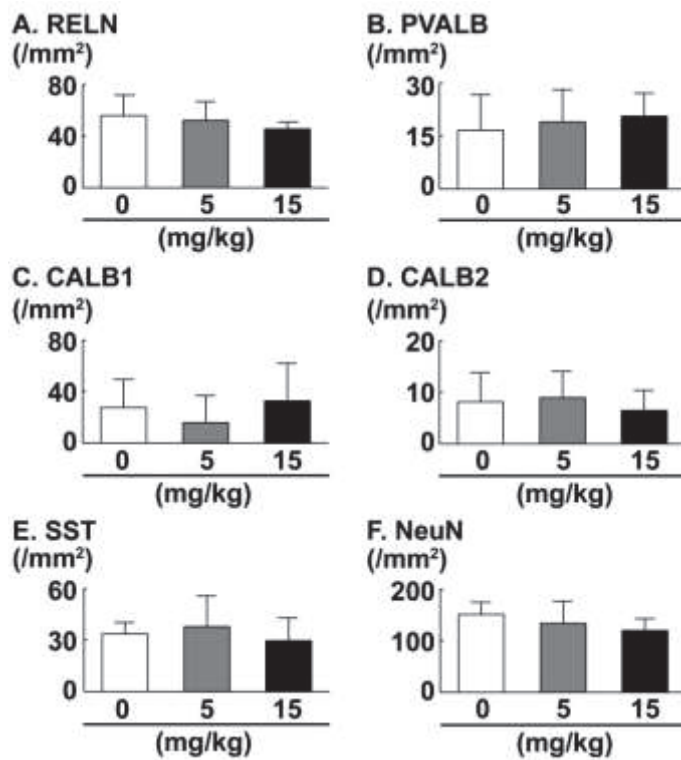
**Fig. 1-5**

Distribution and number of immunoreactive cells for ARC or COX2 in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to *N*-methyl-*N*-nitrosourea (Experiment 1). (A) ARC. (B) COX2. Representative images from 0 ppm controls (left) and the 30 ppm group (right) on PND 21 in developmental exposure study. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD.  $N = 10$  in each group.  $*P < 0.05$ , compared to 0 ppm controls by Dunnett's or Steel's test.



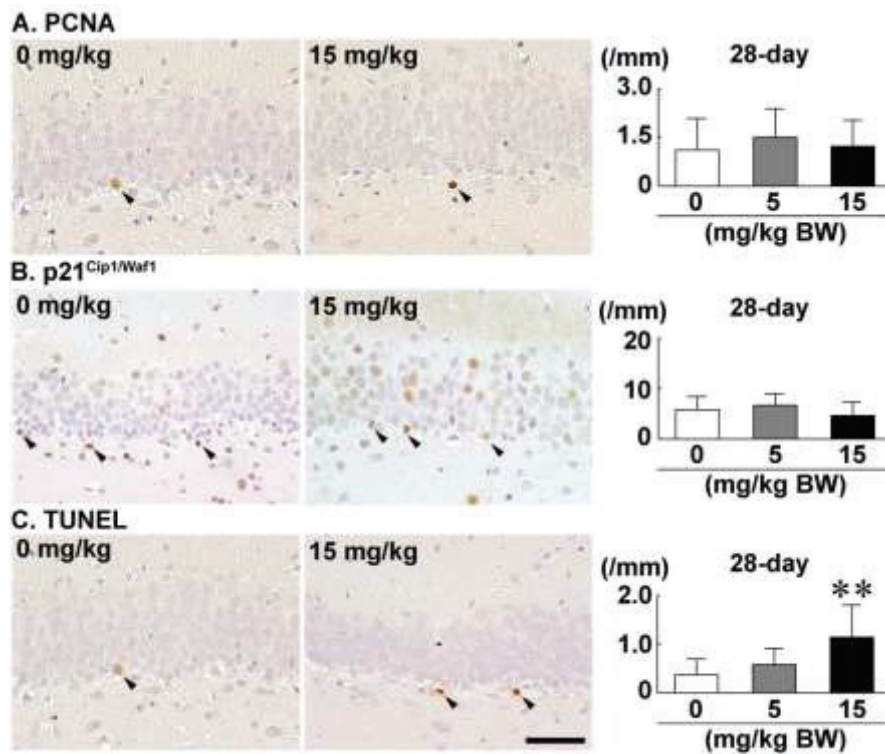
**Fig. 1-6**

Distribution and number of immunoreactive cells for GFAP, SOX2 or TBR2 in the subgranular zone (SGZ), and DCX or NeuN in the SGZ and granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus after postpubertal exposure to *N*-methyl-*N*-nitrosourea (Experiment 2). (A) GFAP. (B) SOX2. (C) TBR2. (D) DCX. (E) NeuN. Representative images from 0 mg/kg controls (left) and 15 mg/kg group (right). Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 10 in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared to 0 mg/kg controls by Dunnett's or Steel's test.



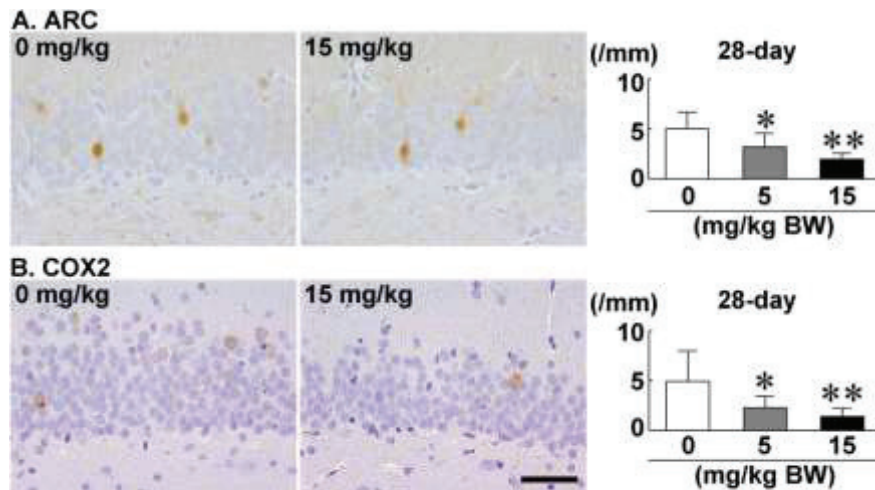
**Fig. 1-7**

The number of immunoreactive cells for RELN, PVALB, CALB1, CALB2, SST and NeuN in the hilus of the hippocampal dentate gyrus after postpubertal exposure to N-methyl-N-nitrosourea in Experiment 2. (A) RELN. (B) PVALB. (C) CALB1. (D) CALB2. (E) SST. (F) NeuN. Graphs show the number of immunoreactive cells for each antigen/unit area (mm<sup>2</sup>) of the hilus of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 10 in each group.



**Fig. 1-8**

Distribution and number of immunoreactive cells for PCNA or p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, or TUNEL positive cells in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus after postpubertal exposure to *N*-methyl-*N*-nitrosourea (Experiment 2). (A) PCNA. (B) p21<sup>Cip1/Waf1</sup>. (C) TUNEL. Representative images from 0 mg/kg controls (left) and 15 mg/kg group (right) in postpubertal exposure study. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 10 in each group. \*\* $P < 0.01$ , compared to 0 mg/kg controls by Dunnett's or Steel's test.



**Fig. 1-9**

Distribution and number of immunoreactive cells for ARC or COX2 in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus after postpubertal exposure to *N*-methyl-*N*-nitrosourea (Experiment 2). (A) ARC. (B) COX2. Representative images from 0 mg/kg controls (left) and 15 mg/kg group (right) in postpubertal exposure study. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD.  $N = 10$  in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared to 0 mg/kg controls by Dunnett's or Steel's test.



**Table 2-1****Reproductive parameters in developmental exposure study of VPA**

	VPA in the drinking water (ppm)		
	0 (Control)	667	2000
No. of dams examined	11	12	11
Reproductive parameters			
No. of implantation sites	14.6±1.4	13.6±2.3	13.1±2.1
No. of live offspring	13.8±1.6	12.9±2.5	12.8±2.1
Male ratio (%)	49.5±21.7	62.3±18.8	47.3±16.2

Abbreviation: VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

**Table 2-2****Body weight of dams in developmental exposure study of VPA**

	VPA in the drinking water (ppm)		
	0 (Control)	667	2000
No. of dams examined	11	12	11
GD 5	270±22	270±21	269±21
GD 7	286±23	283±21	281±21
GD 10	305±28	301±21	298±21
GD 13	326±28	325±25	322±24
GD 15	342±32	340±24	337±26
GD 19	401±37	401±32	395±31
PND 0	327±31	328±26	328±30
PND 3	338±34	337±23	336±24
PND 5	344±32	341±20	338±25
PND 9	354±34	343±18	346±25
PND 13	350±30	344±19	344±21
PND 17	328±25	328±18	329±22
PND 21	310±24	314±17	315±22

Abbreviations: GD, gestational day; PND, postnatal day; VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.



**Table 2-3****Food and water consumption of dams in developmental exposure study of VPA**

	VPA in the drinking water (ppm)		
	0 (Control)	667	2000
No. of dams examined	11	12	11
Food consumption			
GD 4	18.9±1.8	20.4±2.1	19.1±2.7
GD 6	20.2±1.8	21.1±3.3	22.0±2.8
GD 8	20.7±3.0	22.5±3.2	19.8±2.6
GD 11	23.4±3.1	23.0±2.4	22.9±2.9
GD 14	24.2±4.1	24.7±2.0	24.3±3.8
GD 16	24.4±3.7	26.7±3.8	25.7±3.7
GD 18	26.7±4.0	27.4±3.1	26.5±3.3
GD 20	27.1±3.5	27.7±3.8	27.6±4.2
PND 2	34.3±8.3	30.2±6.0	31.7±4.0
PND 6	47.2±6.8	48.7±4.4	48.3±4.5
PND 10	53.5±6.9	54.5±7.3	53.0±4.2
PND 14	53.7±6.4	52.6±4.5	51.7±4.4
PND 17	55.2±5.0	58.5±5.1	56.1±3.8
PND 21	77.2±9.0	80.8±5.6	74.7±8.1
Water consumption			
GD 4	32.7±5.8	34.8±3.1	33.8±5.6
GD 6	32.0±5.8	34.3±5.5	35.6±7.6
GD 8	32.2±6.4	35.2±7.5	30.2±6.6
GD 11	41.2±8.3	39.7±8.5	33.6±7.8
GD 14	41.3±8.1	39.6±5.6	34.8±6.4
GD 16	39.4±9.4	43.2±8.2	37.1±8.2
GD 18	45.0±8.8	46.1±9.1	41.3±7.9
GD 20	43.3±9.8	45.9±7.9	40.1±8.7
PND 2	54.9±10.6	47.4±9.7	44.6±6.0*
PND 6	67.0±15.1	70.1±14.2	56.4±6.1
PND 10	71.5±18.8	68.4±8.7	58.1±6.4
PND 14	82.9±21.1	80.5±16.4	59.3±11.9**
PND 17	90.8±16.0	97.7±16.4	72.8±8.7*
PND 20	123.0±13.2	134.5±17.1	105.4±9.8*

Abbreviations: GD, gestational day; PND, postnatal day; VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 2-4****Body weight of offspring in developmental exposure study of VPA**

	VPA in the drinking water (ppm)		
	0 (Control)	667	2000
No. of litter examined	11	10	10
PND 4	10.4±0.8	10.8±0.8	10.8±0.9
PND 7	18.0±1.2	18.1±1.0	17.8±1.3
PND 11	26.1±1.9	26.1±1.5	25.7±2.0
PND 14	38.0±2.8	37.7±2.0	36.6±2.6
PND 18	48.6±3.5	48.3±2.6	46.5±3.5
PND 21	66.8±4.8	67.0±3.9	63.7±4.6
No. of litter examined	11	10	10
PND 28	105.0±6.1	106.3±5.5	102.1±6.3
PND 35	161.6±10.1	163.4±10.2	159.1±9.0
PND 42	219.6±13.6	223.9±11.7	217.1±11.6
PND 49	298.6±17.4	301.7±16.3	301.2±14.8
PND 56	337.0±21.6	342.8±19.3	342.4±16.6
PND 63	385.1±24.5	391.3±21.9	394.2±20.0
PND 70	427.3±28.7	430.4±22.0	431.7±20.8
PND 77	470.3±31.3	471.1±26.4	477.7±21.4

Abbreviations: PND, postnatal day; VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

**Table 2-5****Food and water consumption of offspring in developmental exposure study of VPA**

	VPA in the drinking water (ppm)		
	0 (Control)	667	2000
No. of litter examined	11	10	10
Food consumption			
PND 28	12.7±1.4	12.5±0.8	12.4±1.2
PND 35	14.5±2.2	14.9±1.8	15.0±1.5
PND 42	18.8±2.9	19.9±2.4	19.5±2.5
PND 49	20.6±3.3	20.4±3.1	20.6±3.3
PND 56	21.3±3.6	21.3±3.1	22.8±3.1
PND 63	21.2±3.5	21.0±3.4	22.3±3.2
PND 70	22.1±3.2	21.0±3.7	22.5±4.4
PND 77	25.1±5.0	24.0±4.1	25.1±4.5
Water consumption			
PND 28	18.6±1.8	19.5±1.4	18.6±2.4
PND 35	25.9±2.8	26.1±5.3	24.3±4.7
PND 42	31.8±4.2	35.8±5.1	33.8±4.5
PND 49	38.0±8.1	43.1±9.6	38.9±11.0
PND 56	42.9±9.3	48.7±10.4	45.3±9.7
PND 63	45.3±12.4	47.6±13.0	48.2±13.3
PND 70	51.2±16.4	50.8±13.5	50.9±16.8
PND 77	48.7±13.2	51.4±12.2	51.5±14.2

Abbreviations: PND, postnatal day; VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 2-6****Body weight of rats in postpubertal exposure study of VPA**

	VPA by oral gavage (mg/kg body weight)			
	0 (Control)	200	800	900
No. of animals examined	20	24	24	24
Day 1	207±10.9	207±8.2	208±9.5	210±9.2
Day 4	231±14.6	231±9.7	224±9.9*	219±11.7**
Day 7	244±15.8	248±10.2	238±10.2	234±13.8*
Day 10	276±18.6	279±10.9	267±13.8*	259±18.1**
Day 14	308±23.6	309±12.3	290±17.2**	284±22.2**
Day 18	334±30.3	333±13.3	308±21.1**	299±27.1**
Day 21	352±33.9	351±13.9	325±21.5**	313±26.7**
Day 24	375±38.1	373±15.0	344±22.6**	336±30.1**
Day 28	390±40.9	386±16.3	357±23.6**	341±32.4**

Abbreviation: VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 2-7****Food and water consumption of rats in postpubertal exposure study of VPA**

	VPA by oral gavage (mg/kg body weight)			
	0 (Control)	200	800	900
No. of animals examined	20	24	24	24
Food consumption				
Day 1	19.6±0.4	20.0±0.6	20.4±1.6	21.1±0.6**
Day 4	21.1±0.9	20.8±0.7	19.1±0.8*	18.0±1.5**
Day 7	21.7±1.1	22.3±1.6	18.7±1.7*	17.9±0.9**
Day 11	22.4±1.1	21.6±1.4	18.9±1.3**	19.3±0.9**
Day 18	23.4±1.4	22.3±0.5	21.1±2.6	21.8±1.4
Day 21	24.6±1.9	24.9±1.1	22.3±1.7	21.5±1.0*
Day 28	22.6±0.8	21.3±0.9	20.4±2.6	20.2±1.7
Water consumption				
Day 1	31.5±2.0	32.8±2.6	35.7±4.4*	34.8±1.7
Day 4	36.4±2.2	37.1±3.6	36.0±3.2	36.6±2.5
Day 7	36.5±3.6	38.6±5.1	37.5±4.4	38.7±3.5
Day 11	35.6±5.5	36.0±5.7	37.9±6.0	38.4±4.6
Day 14	48.1±8.9	46.4±6.8	53.7±8.9	49.8±7.3
Day 21	42.5±7.7	39.8±4.3	48.3±8.0	45.9±6.6
Day 28	41.4±10.2	37.9±4.3	45.2±13.5	43.2±9.0

Abbreviation: VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 2-8****Maternal body and brain weights on necropsy after developmental exposure to VPA**

	VPA in the drinking water (ppm)		
	0 (Control)	667	2000
No. of dams examined	11	12	11
Body and brain weights on day 21 after delivery			
Body weight (g)	310.0±23.5	314.4±16.9	314.9±22.1
Brain weight (g)	1.96±0.08	1.95±0.10	1.95±0.08

Abbreviation: VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

**Table 2-9****Body and brain weights of offspring on necropsy after developmental exposure to VPA**

	VPA in the drinking water (ppm)		
	0 (Control)	667	2000
PND 21			
No. of litter examined	11	10	10
Body weight (g)	66.8±4.8	67.0±3.9	63.7±4.6
Brain weight (g)	1.54±0.06	1.58±0.06	1.55±0.06
(g/100g body weight)	2.33±0.17	2.37±0.13	2.46±0.18
PND 77			
No. of litter examined	11	10	10
Body weight (g)	470.3±31.3	471.1±26.4	477.7±21.4
Brain weight (g)	2.05±0.09	2.08±0.09	2.07±0.07
(g/100g body weight)	0.44±0.03	0.44±0.02	0.43±0.03

Abbreviations: PND, postnatal day; VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

**Table 2-10****Body and brain weights of rats on necropsy after postpubertal exposure to VPA**

	VPA by oral gavage (mg/kg body weight)			
	0 (Control)	200	800	900
No. of animals examined	20	24	24	24
Body weight (g)	372.6±40.9	368.4±17.4	336.5±24.5**	321.7±29.7**
Brain weight (g)	2.00±0.09	2.03±0.08	1.92±0.09**	1.93±0.07*
(g/ body weight)	0.54±0.06	0.55±0.03	0.57±0.04	0.60±0.05**

Abbreviation: VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from 0 mg/kg controls by Dunnett's test or Steel's test.

**Table 2-11****Antibodies used in this study**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval or/and DNA denaturation	Manufacturer (City, State, Country)
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:300	Autoclaving <sup>a</sup>	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
Brain lipid-binding protein	BLBP	Rabbit	Polyclonal IgG <sub>1</sub>	n.a.	1:150	None	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
Calbindin-D-28K	CALB1	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	CB-955	1:500	Microwaving <sup>b</sup>	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
Calbindin-D-29K	CALB2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	CRT01/O. N.40	1:100	Microwaving <sup>b</sup>	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)
Cyclooxygenase 2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	n.a.	1:200	Autoclaving <sup>a</sup>	BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA, USA)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam Inc.
FBL osteosarcoma oncogene	FOS	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	None	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	GA5	1:200	None	Millipore Corporation (Temecula, CA, USA)
Glutamic acid decarboxylase 67	GAD67	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	1G10.2	1:50	None	Millipore Corporation
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	A60	1:100	None	Millipore Corporation
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	PARV-19	1:1000	Microwaving <sup>b</sup>	Millipore Corporation
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	PC10	1:200	None	Dako (Glostrup, Denmark)
Reelin	n.a.	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Sex determining region Y (SRY)-box 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	9-9-3	1:4000	None	Abcam Inc.
T-box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving <sup>a</sup>	Abcam Inc.

Abbreviation: n.a, not applicable.

<sup>a</sup> 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>b</sup> 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>c</sup> 95°C for 20 min in 10 mM citrate buffer (pH 9.0).

**Table 2-12****Area and thickness of NeuN<sup>+</sup> granule cell layer in the SGZ/GCL of offspring on PND 21 and PND 77**

		VPA in the drinking water (ppm)		
		0 (Control)	667	2000
PND 21				
No. of offspring examined		11	10	11
Area (mm <sup>2</sup> )		0.13±0.02	0.14±0.02	0.14±0.01
Thickness (µm)		55.9±5.7	57.3±4.0	59.8±3.4
PND 77				
No. of offspring examined		11	11	10
Area (mm <sup>2</sup> )		0.18±0.03	0.21±0.02	0.21±0.02*
Thickness (µm)		58.7±6.1	66.4±2.8**	65.4±5.1*

Abbreviations: GCL, granule cell layer; NeuN, neuron-specific nuclear protein; PND, postnatal day; SGZ, subgranular zone; VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 2-13****Sequence of primers used for real-time RT-PCR**

Gene	Accession no.	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Bdnf</i>	NM_001270630	CACCTTTTGAG CACGTGATCG A	TCCGCGTCCT TATGGTTTTC
<i>Chrna7</i>	NM_012832	CGTTCGCTGG TTCCCTTTT	GGACCAGGAC CCAAACCTCA
<i>Chrn2</i>	NM_019297	GCTTCATTGC GGACCACAT	GTATTTCCAG TCCTCCCTCA CACT
<i>Dab1</i>	NM_153621	AGCAACCCTG GCCAACTGT	TGGCAGCTGG TAAAGGCATA
<i>Dcx</i>	NM_053379	GGATTGTGTA CGCTGTTTCT TCTG	TCAGGTCAGC CAGCAATGC
<i>Dpysl3</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC
<i>Gad1</i>	NM_017007	AGGTCACCCT CGGTTTTTCA	CATTCGCCAG CTAAACCAAT G
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGG CCACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT
<i>Gria1</i>	NM_031608	GTGAGCGTCG TCCTCTTCTCT	TCTTCGCTGT GCCATTGTA
<i>Gria2</i>	NM_001083811	CATCACACCT AGCTTCCCAA CA	CTTTGAGGTC AGGTCGCATC T
<i>Gria3</i>	NM_001112742	GAAACATAAA GGACGTCCAG GAA	TTCTTGCTTT CTGTCCATTT CT
<i>Grin2a</i>	NM_012573	GGCTGTCAGC ACTGAATCCA	GGTTTAGAGA ATCCTGGCGT AGAG
<i>Grin2b</i>	NM_012574	TCGTCAAGAC ACAAGATTAA AACCA	GGAGGATAAA GGAACGGAAG AAA
<i>Grin2d</i>	NM_022797	TCGTGCTCAC ACCCAAGGA	GGTCACTGCC ACAAAGGATG T
<i>Hdac1</i>	NM_001025409	CCATCAAAGG ACATGCCAAG T	ACATTAGCAT CGGCAAGTTG AA
<i>Hdac2</i>	NM_053447	CACCACGCCA AGAAGTCAGA	CGAGGACAGC AAGCACAATG T
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC
<i>Otx2</i>	NM_001100566	CTTGACGTTCTGGAAGCTCTGTT	GCTACCTCCTCCCGCATGA
<i>Pvalb</i>	NM_022499	TCGCCACAAA AAGTTCTTCC A	TCTTCACATC ATCCGCACCTC TT
<i>Reln</i>	NM_0080394	GCCAGCTTTC GACTACCCTA TTAAC	CGTAGTGGCA CAGAAGCTAT CG
<i>Vldlr</i>	NM_013155	ATGTAGCGCG GATGAGTTCA C	TCATCCTGTC CATTGCACAC A

Abbreviations: *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrn2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dab1*, DAB1, reelin adaptor protein; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Gad1*, glutamate decarboxylase 1; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hdac1*, histone deacetylase 1; *Hdac2*, histone deacetylase 2; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Otx2*, orthodenticle homeobox 2; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; *Vldlr*, very low density lipoprotein receptor.

Table 2-14

**Real-time RT-PCR analysis data in the hippocampal dentate gyrus on PND 21 and PND 77**

	0 ppm VPA (Control)		2000 ppm VPA	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
PND 21				
Granule cell lineage markers				
<i>Dcx</i>	1.09±0.57	1.09±0.48	1.42±0.76	0.93±0.26
<i>Dpysl3</i>	1.00±0.10	0.92±0.08	1.05±0.36	0.77±0.22
Interneuron subpopulations				
<i>Reln</i>	1.06±0.40	1.06±0.36	2.51±0.87*	1.92±1.13
<i>Pvalb</i>	1.06±0.41	1.11±0.56	0.38±0.06*	0.33±0.12*
<i>Gad1</i>	1.02±0.22	1.06±0.37	1.50±0.31*	1.29±0.46
Reelin-related molecules				
<i>Vldlr</i>	1.01±0.17	1.01±0.17	0.89±0.27	0.71±0.24
<i>Dab1</i>	1.03±0.27	1.04±0.31	1.21±0.34	1.02±0.38
Neurotrophic factor				
<i>Bdnf</i>	1.10±0.52	1.09±0.49	1.50±0.54	1.20±0.51
Histone deacetylases				
<i>Hdac1</i>	1.01±0.12	1.01±0.17	1.14±0.13	1.02±0.42
<i>Hdac2</i>	1.03±0.28	1.04±0.31	1.25±0.25	1.05±0.34
Homeodomain protein				
<i>Otx2</i>	1.04±0.31	1.07±0.47	1.05±0.31	0.88±0.35
Cholinergic receptors				
<i>Chrna7</i>	1.06±0.40	1.06±0.39	1.40±0.35	1.20±0.50
<i>Chrn2</i>	1.01±0.11	1.02±0.22	1.13±0.36	0.84±0.22
Glutamate receptors				
<i>Gria1</i>	1.13±0.64	1.10±0.52	1.19±0.23	1.11±0.34
<i>Gria2</i>	1.07±0.48	1.05±0.37	1.00±0.28	0.92±0.31
<i>Gria3</i>	1.01±0.14	1.01±0.17	0.99±0.34	0.93±0.47
<i>Grin2a</i>	1.03±0.25	1.04±0.27	1.07±0.45	0.94±0.31
<i>Grin2b</i>	1.00±0.11	1.01±0.13	1.04±0.20	0.87±0.22
<i>Grin2d</i>	1.01±0.15	1.01±0.17	0.79±0.35	0.70±0.29*
PND 77				
Granule cell lineage markers				
<i>Dcx</i>	1.01±0.14	1.03±0.28	0.91±0.13	1.02±0.23
<i>Dpysl3</i>	1.02±0.21	1.03±0.27	0.85±0.14	0.93±0.14
Interneuron subpopulations				
<i>Reln</i>	1.01±0.16	1.02±0.21	0.99±0.45	1.14±0.63
<i>Pvalb</i>	1.01±0.19	1.03±0.30	1.08±0.18	1.21±0.24
<i>Gad1</i>	1.00±0.07	1.01±0.18	0.97±0.19	1.08±0.27
Glutamate receptors				
<i>Gria1</i>	1.01±0.14	1.01±0.18	0.88±0.18	1.00±0.32
<i>Gria2</i>	1.01±0.16	1.02±0.20	0.85±0.10	0.96±0.28
<i>Gria3</i>	1.01±0.13	1.01±0.16	0.91±0.11	1.03±0.26
<i>Grin2a</i>	1.00±0.10	1.02±0.22	1.00±0.16	1.13±0.30
<i>Grin2b</i>	1.03±0.25	1.01±0.19	0.99±0.26	1.16±0.59
<i>Grin2d</i>	1.03±0.30	1.08±0.51	0.70±0.15*	0.78±0.20

Abbreviations: *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrn2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dab1*, DAB1, reelin adaptor protein; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Gad1*, glutamate decarboxylase 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hdac1*, histone deacetylase 1; *Hdac2*, histone deacetylase 2; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Otx2*, orthodenticle homeobox 2; PND, postnatal day; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; *Vldlr*, very low density lipoprotein receptor; VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

\**P* < 0.05, significantly different from the 0 ppm controls by the Student's t-test or Aspin-Welch's t-test.

**Table 2-15**

**Real-time RT-PCR analysis data in the hippocampal dentate gyrus of rats after postpubertal exposure to VPA**

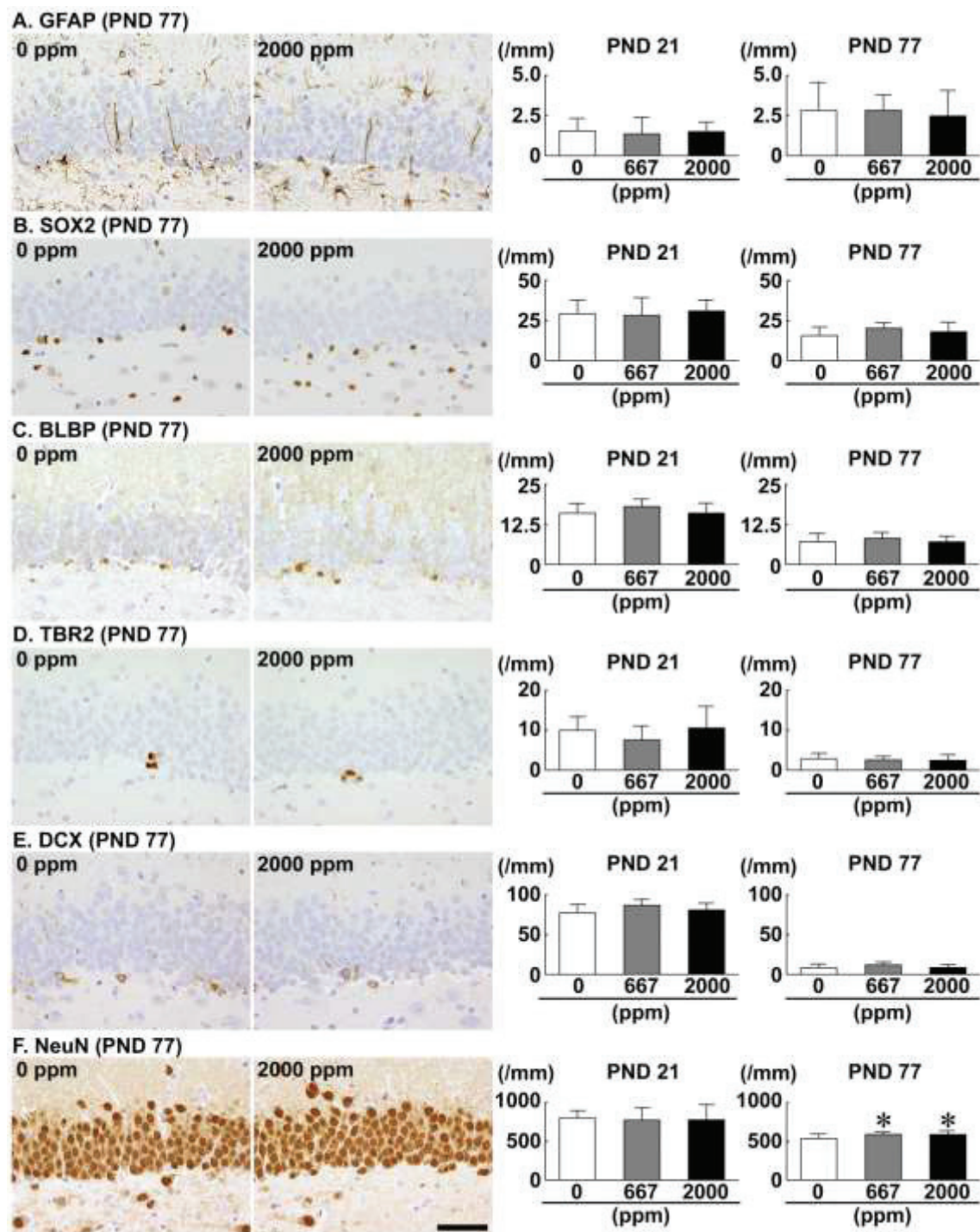
	0 mg/kg (body weight) VPA (Control)		900 mg/kg (body weight) VPA	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
Granule cell lineage markers				
<i>Gfap</i>	1.10±0.55	1.06±0.42	1.00±0.28	0.81±0.27
<i>Dcx</i>	1.04±0.35	1.05±0.35	1.09±0.25	0.88±0.25
<i>Dpysl3</i>	1.02±0.22	1.04±0.27	0.89±0.20	0.71±0.21*
Interneuron subpopulations				
<i>Reln</i>	1.17±0.74	1.12±0.59	1.42±0.22	1.16±0.36
<i>Pvalb</i>	1.04±0.30	1.06±0.36	0.74±0.49	0.57±0.27*
<i>Gad1</i>	1.05±0.37	1.03±0.25	1.41±0.74	1.05±0.42
Reelin-related molecule				
<i>Vldl</i>	1.04±0.33	1.03±0.24	0.95±0.17	0.74±0.10
<i>Dab1</i>	1.04±0.31	1.04±0.32	1.04±0.35	0.85±0.35
HDAC inhibitor				
<i>Hdac1</i>	1.05±0.34	1.04±0.34	0.91±0.19	0.72±0.17
<i>Hdac2</i>	1.03±0.27	1.02±0.24	1.05±0.17	0.83±0.15
Neurotrophic factor				
<i>Bdnf</i>	1.05±0.36	1.09±0.53	1.05±0.27	1.27±0.84
Stem cell factors/receptors				
<i>Kit</i>	1.17±0.79	1.07±0.37	4.45±2.47*	3.43±1.78*
<i>kitl</i>	1.02±0.23	1.02±0.21	0.85±0.19	0.68±0.20
<i>Notch1</i>	1.02±0.22	1.06±0.38	0.91±0.11	0.74±0.22
<i>Notch3</i>	1.12±0.56	1.06±0.36	0.83±0.14	0.75±0.15
<i>Myc</i>	1.05±0.35	1.05±0.36	0.84±0.26	0.66±0.19*
Anti-proliferation factor				
<i>Btg2</i>	1.11±0.58	1.05±0.32	0.60±0.22	0.47±0.15**
Apoptosis-related molecules				
<i>Casp3</i>	1.03±0.28	1.08±0.48	1.09±0.49	0.89±0.48
<i>Casp6</i>	1.01±0.14	1.05±0.30	1.05±0.23	0.85±0.24
<i>Casp8</i>	1.19±0.75	1.12±0.51	1.17±0.53	0.99±0.56
<i>Casp9</i>	1.00±0.08	1.06±0.38	0.79±0.20	0.61±0.10
<i>Bcl2l1l</i>	1.02±0.20	1.04±0.32	1.01±0.27	0.79±0.14
<i>Tp53</i>	1.03±0.30	1.06±0.38	0.86±0.23	0.70±0.26
Cholinergic receptors				
<i>Chrna7</i>	1.10±0.57	1.06±0.41	1.37±0.38	1.10±0.37
<i>Chrb2</i>	1.01±0.13	1.04±0.29	0.77±0.24	0.61±0.19*
Glutamate receptors				
<i>Gria1</i>	1.13±0.63	1.06±0.39	2.37±1.02*	1.86±0.80
<i>Gria2</i>	1.08±0.48	1.04±0.31	1.49±0.54	1.18±0.41
<i>Gria3</i>	1.03±0.29	0.95±0.23	1.02±0.22	0.74±0.14*
<i>Grin2a</i>	1.06±0.39	1.03±0.26	1.00±0.39	0.79±0.31
<i>Grin2b</i>	1.01±0.19	1.03±0.25	0.92±0.14	0.74±0.21
<i>Grin2d</i>	1.25±0.89	1.04±0.35	0.91±0.32	0.81±0.24

Abbreviations: *Bcl2l1l*, BCL2 like 11; *Bdnf*, brain derived neurotrophic factor; *Btg2*, BTG anti-proliferation factor 2; *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrb2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dab1*, DAB1 reelin adaptor protein; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Gad1*, glutamate decarboxylase 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hdac1*, histone deacetylase 1; *Hdac2*, histone deacetylase 2; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kit*, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *Kitl*, KIT ligand; *Myc*, MYC proto-oncogene; *Notch1*, notch 1; *Notch3*, notch 3; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; *Tp53*, tumor protein p53; *Vldl*, very low density lipoprotein receptor; VPA, valproic acid.

Data are expressed as mean ± SD.

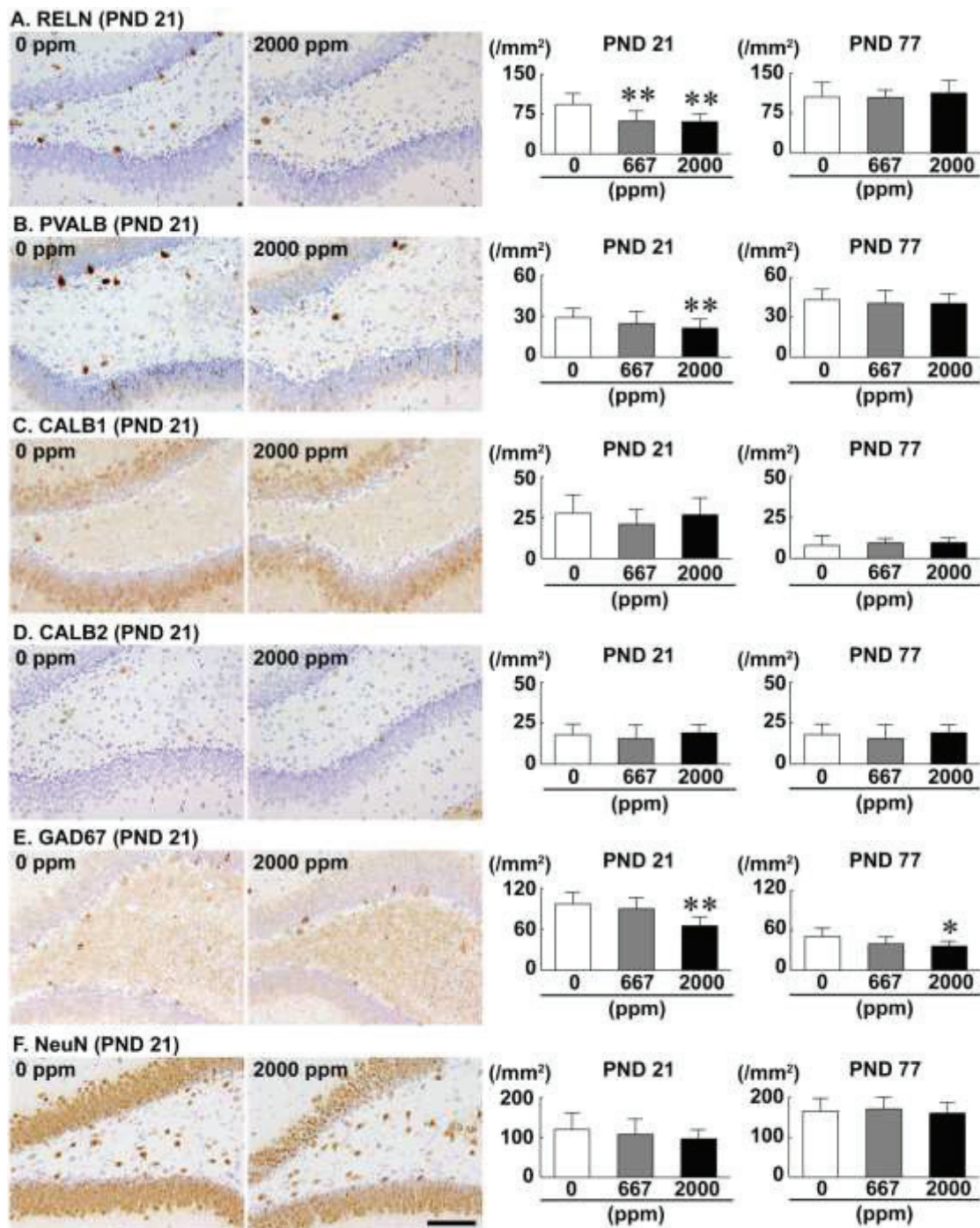
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from 0 mg/kg controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.





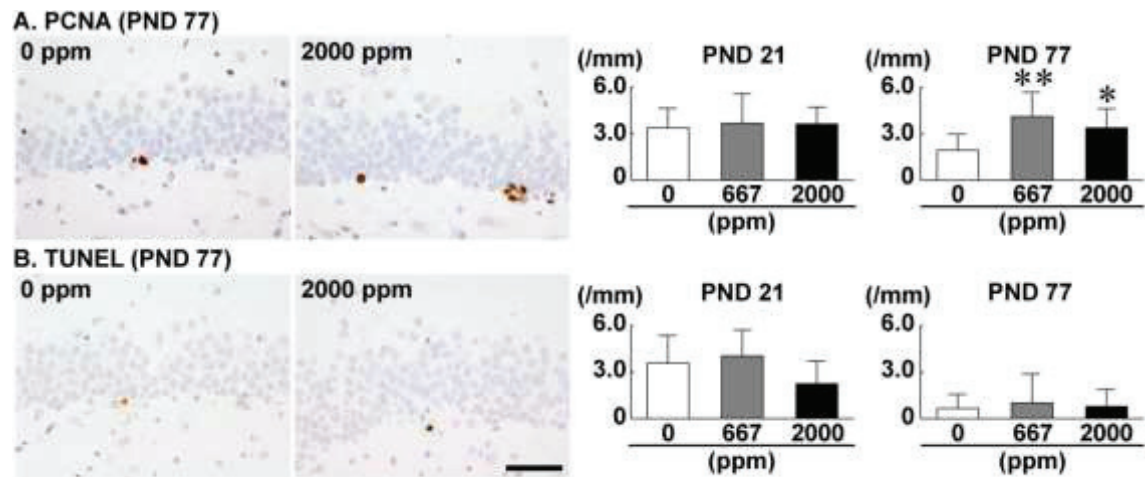
**Fig. 2-1**

Distribution of immunoreactive cells for GFAP, SOX2, BLBP or TBR2 in the SGZ, DCX or NeuN in the SGZ and GCL of male offspring at PND 21 and PND 77 after maternal exposure to VPA from GD 6 to PND 21. (A) GFAP. (B) SOX2. (C) BLBP. (D) TBR2. (E) DCX. (F) NeuN. Representative images from the 0 ppm controls (left) and 2000 ppm VPA group (right) at PND 77. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL.  $N = 10$  or  $11$ /group (PND 21: 0 ppm controls, 11; 667 ppm VPA, 10; 2000 ppm VPA, 11; PND 77: 0 ppm controls, 10; 667 ppm VPA, 11; 2000 ppm VPA, 10). \* $P < 0.05$ , compared with the 0 ppm controls by Dunnett's test or Steel's test.



**Fig. 2-2**

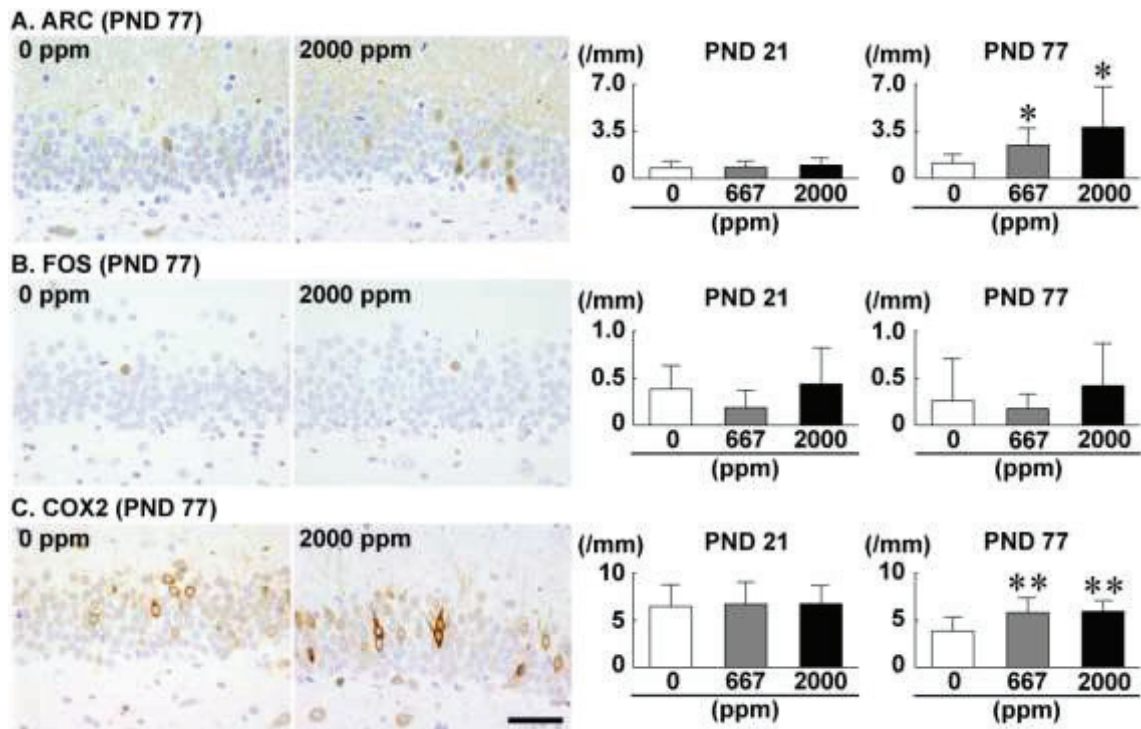
Distribution of immunoreactive cells for reelin, PVALB, CALB1, CALB2, GAD67 or NeuN in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring at PND 21 and PND 77 after maternal exposure to VPA from GD 6 to PND 21. (A) RELN. (B) PVALB. (C) CALB1. (D) CALB2. (E) GAD67. (F) NeuN. Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 2000 ppm VPA group (right) at PND 21. Magnification  $\times 200$ , bar = 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the densities of immunoreactive cells in the dentate hilus.  $N = 10$  or  $11$ /group (PND 21: 0 ppm controls, 11; 667 ppm VPA, 10; 2000 ppm VPA, 11; PND 77: 0 ppm controls, 10; 667 ppm VPA, 11; 2000 ppm VPA, 10). \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , compared with the 0 ppm controls by Dunnett's test or Steel's test.



**Fig. 2-3**

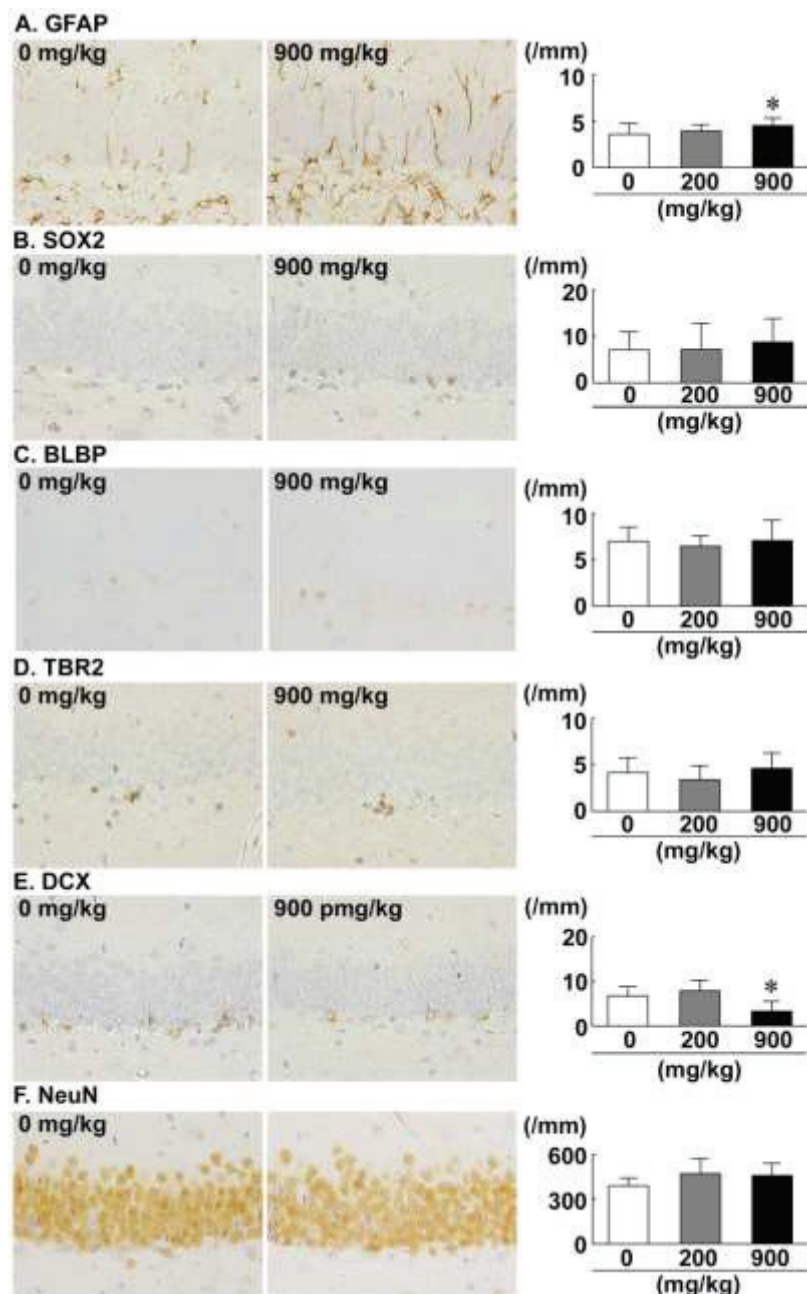
Distribution of PCNA-immunoreactive proliferating cells or TUNEL-positive apoptotic cells in the SGZ of male offspring at PND 21 and PND 77 after maternal exposure to VPA from GD 6 to PND 21. (A) PCNA. (B) TUNEL. Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 2000 ppm VPA group (right) at PND 77. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the number of positive cells in the SGZ.  $N = 10$  or  $11$ /group (PND 21: 0 ppm controls, 11; 667 ppm VPA, 10; 2000 ppm VPA, 11; PND 77: 0 ppm controls, 10; 667 ppm VPA, 11; 2000 ppm VPA, 10).  $*P < 0.05$ , compared with the 0 ppm controls by Dunnett's test or Steel's test.





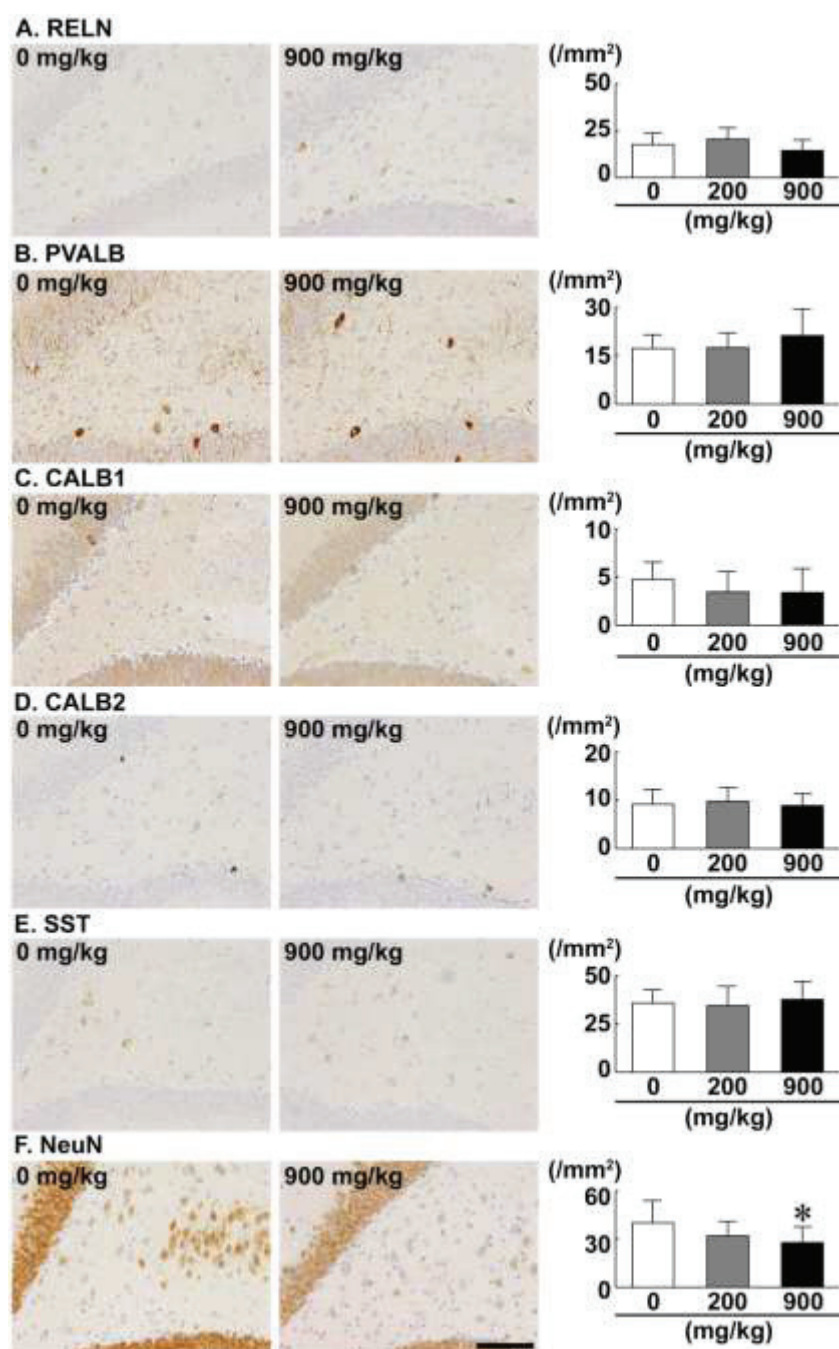
**Fig. 2-4**

Distribution of immunoreactive cells for ARC, FOS or COX2 in the GCL of the hippocampal dentate gyrus of male offspring at PND 21 and PND 77 after maternal exposure to VPA from GD 6 to PND 21. (A) ARC. (B) FOS. (C) COX2. Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 2000 ppm VPA group at PND 77. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the number of immunoreactive cells in the GCL.  $N = 10$  or  $11/\text{group}$  (PND 21: 0 ppm controls, 11; 667 ppm VPA, 10; 2000 ppm VPA, 11; PND 77: 0 ppm controls, 10; 667 ppm VPA, 11; 2000 ppm VPA, 10). \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , compared with the 0 ppm controls by Dunnett's test or Steel's test.



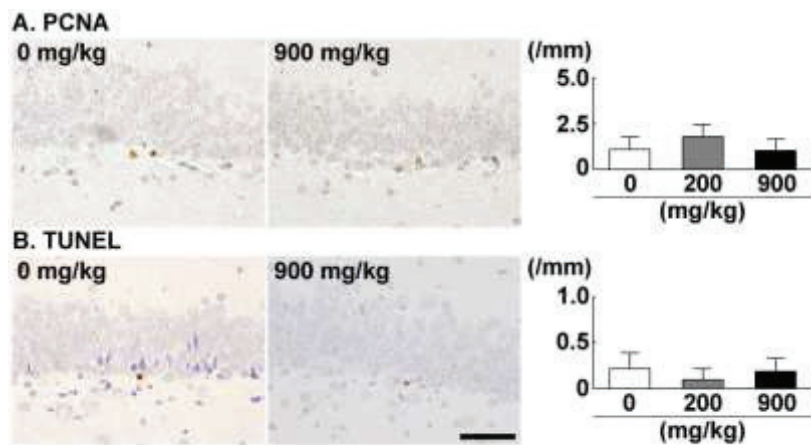
**Fig. 2-5**

Distribution of immunoreactive cells for (A) glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2), (C) brain lipid-binding protein (BLBP) or (D) T-box brain protein 2 (TBR2) in the subgranular zone (SGZ), (E) doublecortin (DCX) or (F) neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the SGZ and granule cell layer (GCL) after postpubertal exposure to valproic acid (VPA). Representative images from 0 mg/kg controls (left) and 900 mg/kg VPA group. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. Values are expressed as mean + SD.  $N = 10/\text{group}$ .  $*P < 0.05$ , compared with 0 mg/kg controls by Dunnett's test or Steel's test.



**Fig. 2-6**

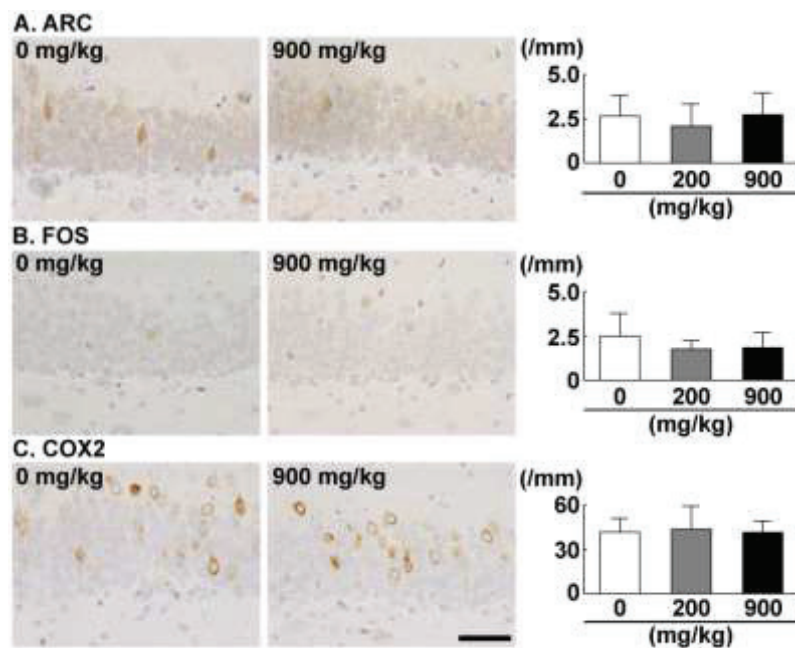
Distribution of immunoreactive cells for (A) reelin (RELN), (B) parvalbumin (PVALB), (C) calbindin-D-28k (CALB1), (D) calbindin-D-29k (CALB2), (E) somatostatin (SST) or (F) neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus after postpubertal exposure to valproic acid (VPA). Representative images from 0 mg/kg controls (left) and 900 mg/kg VPA group. Magnification  $\times 200$ , bar = 100  $\mu$ m. Graphs show the densities of immunoreactive cells in the dentate hilus. Values are expressed as mean + SD.  $N = 10/\text{group}$ .



**Fig. 2-7**

Distribution of (A) proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-immunoreactive proliferating cells or (B) terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL)-positive apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ) after postpubertal exposure to valproic acid (VPA). Representative images from 0 mg/kg controls (left) and 900 mg/kg VPA group. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the number of positive cells in the SGZ. Values are expressed as mean + SD.  $N = 10/\text{group}$ .





**Fig. 2-8**

Distribution of immunoreactive cells for (A) activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), (B) FBJ osteosarcoma oncogene (FOS) or (C) cyclooxygenase 2 (COX2) in the granular cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus after postpubertal exposure to valproic acid (VPA). Representative images from 0 mg/kg controls (left) and 900 mg/kg VPA group. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the number of immunoreactive cells in the GCL. Values are expressed as mean  $\pm$  SD.  $N = 10/\text{group}$ .

**Table 3-1****Primer sequence for real-time RT-PCR analysis**

Gene	Accession No.	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Adgrl3</i>	NM_198702	CGCGGCTCTT TTGCATT	GCACCCCTTC TAGAAACATC CA
<i>Cdkl4</i>	NM_001033443	CCGAGCCCCC GAACTT	GCCCACACGT CTACAGAGGA A
<i>Dlg4</i>	NM_001109752	AGGACATTCA GGCGCACAA	TCCCGTAGAG GTGGCTGTTG
<i>Dlx4</i>	NM_007867	AATTGGTGGC GCCATCTC	AGCTCCTGCG GGTGTTTCA
<i>Dmrt1</i>	NM_015826	TTACCAGCCT TCTCTGTTTC CTTAC	GCAGACAAGG CCATGGAATA C
<i>Fign</i>	NM_001267846	ACTCGTGAAT GGTGCGAAAA A	AACGGCTTCT GAATTCAAGG AA
<i>Gabbr1</i>	NM_019439	TCCCACGTTC GTTATATCCA GAA	AGCCCACAGC AGTCAGATTG T
<i>Gabbr2</i>	NM_001081141	ACACCAGAGA AGACCACATA CATCA	CCCAAGCTGA GGATGTCGTT
<i>Gabra1</i>	NM_010250	CCTGTGTTTC CCTAAAACGA CAA	AGGCAGGACC AAATCAAACA A
<i>Gabrb2</i>	NM_001347314	CAGCTCATGG TACAGAAGTG AAGAG	AGAATGCGGA GTGCCAATAT AGAAA
<i>Gapdh</i>	NM_008084	TGTC AAGCTC ATTCCTGGT ATGA	TCTTACTCCT TGGAGGCCAT GTA
<i>Gsdma3</i>	NM_001007461	TGTGGTGATG GAGGCAGTAG AA	GCATTGCGT TGCCAGTTT
<i>Homer1</i>	NM_001284189	CAAGGACGGC CACTTCCA	AAGACCCATC TGCCACAGTC A
<i>Hprt</i>	NM_013556	TTGTATACCT AATCATTATG CCGAGG	CAGAGGGCCA CAATGTGATG
<i>Mafg</i>	NM_010756	CGACCCCCAA TAAAGGAAAC A	GGTCAAGCTG GTGCCATTCT
<i>Maz</i>	NM_010772	TGCGCCAAGG AGTTCAAGA	CTTGGCTCCC GTGTGGAT
<i>Mcur1</i>	NM_001081059	AGGCGCACAA GCTTGATACA	GCCACTGTTA GGCACGTAAA CA
<i>Mms19</i>	NM_028152	CCAAGCCTCT GGACGACAAG	CATTCTCCCC TCGTGACA
<i>Nusap1</i>	NM_001042652	AGCTTGCTCT GTCCCTCAA	TGTCCCCAAG GTTTCAGCTT
<i>Plcb4</i>	NM_013829	GAAGAGCGCA ATATTTACTA TAACATG	CAATCGCGTG CGTCTTCA
<i>Rasal2</i>	NM_177644	CCGAGAGAGA TAAGTGGATG GAA	AGCTCGTCTA CAATTGTCCT TATTG
<i>Reps1</i>	NM_001111065	TCTCCCTCTC CCACGATTG	GCTGCAAGGC GAGATTCC
<i>Spsb1</i>	NM_029035	GCGCTACTTG AACGGACTTG A	CCGGCACAGG TCCATGAG
<i>Stx4a</i>	NM_009294	AGAAAAAGT CATGATTGCC ATCTG	GCCATGATG ACAGCCAAGA
<i>Syp</i>	NM_009305	TGCTGTGTCT GTGACGTTGG TA	GGCCACAGTC AGACAAAATG G
<i>Tex14</i>	NM_001199293	CAGCTTTTCC GTGATCATAC AAGA	AGTGAGCCAT CCAAGCCATT
<i>Trim62</i>	NM_178110	CCGCACACTG ACGGACATT	CCTTTCGTAG TTGCTGGCTG TA
<i>Vmn1r90</i>	NM_001244031	ATGAAGCCAT GAAAACCACT GA	CCCTATTCCA AACTGACAAA GCA
<i>Vps37a</i>	NM_033560	TGCTCTACAG GCAAGATTGA AAGT	TCTTCAGCAA TATTATCCGA TTCTTC

Abbreviations: *Adgrl3*, adhesion G protein-coupled receptor L3; *Cdkl4*, cyclin-dependent kinase-like 4; *Dlg4*, discs, large homolog 4 (*Drosophila*); *Dlx4*, distal-less homeobox 4; *Dmrt1*, doublesex and mab-3-related transcription factor 1; *Fign*, fidgetin; *Gabbr1*, gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1; *Gabbr2*, gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2; *Gabra1*, gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 1; *Gabrb2*, gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 2; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gsdma3*, gasdermin A3; *Homer1*, homer scaffolding protein 1; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *Mafg*, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (avian); *Maz*, MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor); *Mcur1*, mitochondrial calcium uniporter regulator 1; *Mms19*, MMS19 (MET18 *S. cerevisiae*); *Nusap1*, nucleolar and spindle-associated protein 1; PCR, polymerase chain reaction; *Plcb4*, phospholipase C, beta 4; *Rasal2*, RAS protein activator-like 2; *Reps1*, RalBP1-associated Eps domain containing protein; RT, reverse transcription; *Spsb1*, splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1; *Stx4a*, syntaxin 4A (placental); *Syp*, synaptophysin; *Tex14*, testis-expressed gene 14; *Trim62*, tripartite motif-containing 62; *Vmn1r90*, vomeronasal 1 receptor 90; *Vps37a*, vacuolar protein sorting 37A.

**Table 3-2****Primer sequence for quantitative methylation-specific PCR analysis**

Gene	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Dlx4</i>	GCGTCGGAAT GCGTAGCT	CCCCAGCGTC TGTTTACCAA
<i>Dmrt1</i>	GCGCGCAGAG AGAGTTCCTC	GGGAGAGGGC GCTACGCG
<i>Fign</i>	GTAACATGAC CCGGCGGCC	GTTGGAGCGC GGC GGCC
<i>Gsdma3</i>	AAGTGACCTG CTCCGGCTTC	CGGAATCGTG GGCTGCCTCC
<i>Maz</i>	CACCCAGGGG GCGTCGCC	ACGCATGGCC CGAGGGCC
<i>Plcb4</i>	GACCCTGCAC CGGGAAGGC	AGCATGCCCA GTGCGGCGC
<i>Reps1</i>	CCCTGCTTCA GTGGACGGC	TTCAGGTCGC ACTGCGGGCT
<i>Mms19</i>	CCGTCTGGCT CCGAGAAGCC	AAGCGAGCAG GTAACGCCAG

Abbreviations: *Dlx4*, distal-less homeobox 4; *Dmrt1*, doublesex and mab-3-related transcription factor 1; *Reps1*, RalBP1-associated Eps domain-containing protein; *Gsdma3*, gasdermin A3; *Mms19*, MMS19 (MET18 S. cerevisiae); *Fign*, fidgetin; PCR, polymerase chain reaction; *Plcb4*, phospholipase C, beta 4; *Maz*, MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor).

**Table 3-3****Sequence of primers used for pyrosequencing analysis**

Gene	Gene primer	Sequence (5' → 3')
<i>Dlx4</i>	Forward	GGGTTTGTAG GAGTTGTGG
	Reverse, 5'-labeled with biotin	CCTAACCCCC AACCTACCC
	Sequencing, forward	TATTGGGGGT GGTGA
<i>Dmrt1</i>	Forward	TGAGGGAAGG GAGTTAGT
	Reverse, 5'-labeled with biotin	ACTTACACCA ACTACAAAAT TACTACA
	Sequencing, forward	ATTTTTTGA GTTGGG
<i>Plcb4</i>	Forward	GGGGATTGAG TTGAGTTAGT AG
	Reverse, 5'-labeled with biotin	ATCCCTATCT CACAATACCT ACTACA
	Sequencing, forward	GTTAGGGAGG AGGGG
<i>Reps1</i>	Forward	ATGTGAGGTA GGGAGGAGAG A
	Reverse, 5'-labeled with biotin	TACCCCAAC CTAAAATCCT
	Sequencing, reverse	AGAGAGAGAG AGAGAAATA

Abbreviations: *Dlx4*, distal-less homeobox 4; *Dmrt1*, doublesex and mab-3-related transcription factor 1; *Reps1*, RalBP1-associated Eps domain-containing protein; *Plcb4*, phospholipase C, beta 4.

**Table 3-4****Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:2000	Microwaving <sup>b</sup>	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
Distal-less homeobox 4	DLX4	Rabbit	Monoclonal IgG	EPR 9263	1:500	Microwaving <sup>a</sup>	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
Doublesex and mab-3 related transcription factor 1	DMRT1	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:100	Microwaving <sup>b</sup>	Bioss Inc. (Woburn, MA, USA)
Glutamic acid decarboxylase-65	GAD65	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	GAD-6	1:100	Autoclaving <sup>c</sup>	Abcam Inc.
Glutamic acid decarboxylase-67	GAD67	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	1G10.2	1:100	Autoclaving <sup>c</sup>	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
Metabolic glutamate receptor 1	GRM1	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:100	Microwaving <sup>a</sup>	Abcam Inc.
Phospholipase C, beta 4	PLCB4	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	n.a.	1:500	Autoclaving <sup>c</sup>	BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA, USA)

Abbreviation: n.a, not applicable.

<sup>a</sup> 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 9.0).<sup>b</sup> 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).<sup>c</sup> 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).**Table 3-5****Genes downstream of hypermethylated CpG sites in the hippocampal dentate gyrus of mouse offspring developmentally exposed to HCP**

Genome location	Accession No.	Gene symbol	Description	Read counts	
				100 ppm HCP	0 ppm HCP (control)
Chr 1	MGI:2443881	<i>Rasal2</i>	RAS protein activator like 2	19	3
Chr 2	MGI:1890647	<i>Fign</i>	Fidgetin	26	2
Chr 2	MGI:2675669	<i>Nusap1</i>	Nucleolar and spindle associated protein 1	26	0
Chr 2	MGI:107464	<i>Plcb4</i>	Phospholipase C, beta 4	24	1
Chr 4	MGI:1921896	<i>Spsb1</i>	SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1	19	3
Chr 4	MGI:1914775	<i>Trim62</i>	Tripartite motif-containing 62	24	4
Chr 5	MGI:2441950	<i>Adgrl3</i>	Adhesion G protein-coupled receptor L3	28	3
Chr 7	MGI:1338823	<i>Maz</i>	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)	18	3
Chr 7	MGI:3612342	<i>Vmn1r90</i>	Vomeroneasal 1 receptor 90	24	2
Chr 8	MGI:1261835	<i>Vps37a</i>	Vacuolar protein sorting 37A	28	5
Chr 10	MGI:1196373	<i>Reps1</i>	RalBP1 associated Eps domain containing protein	26	1
Chr 11	MGI:94904	<i>Dlx4</i>	Distal-less homeobox 4	21	1
Chr 11	MGI:3044668	<i>Gsdma3</i>	Gasdermin A3	22	4
Chr 11	MGI:96911	<i>Mafg</i>	v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (avian)	23	4
Chr 11	MGI:1933227	<i>Tex14</i>	Testis expressed gene 14	27	3
Chr 13	MGI:1923387	<i>Mcur1</i>	Mitochondrial calcium uniporter regulator 1	23	2
Chr 17	MGI:3587025	<i>Cdkl4</i>	Cyclin-dependent kinase-like 4	26	4
Chr 19	MGI:1354733	<i>Dmrt1</i>	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1	20	0
Chr 19	MGI:1919449	<i>Mms19</i>	MMS19 (MET18 S. cerevisiae)	24	3

Abbreviation: HCP, hexachlorophene.

**Table 3-6****Real-time RT-PCR analysis of the hippocampal dentate gyrus on PND 21**

	0 ppm HCP (Control)		100 ppm HCP	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
PND 21				
<i>Cdkl4</i>	1.10±0.58	1.19±0.88	1.40±0.35	1.15±0.32
<i>Mafg</i>	1.01±0.13	1.03±0.26	0.95±0.23	0.76±0.08
<i>Mcur1</i>	1.01±0.16	1.03±0.26	1.28±0.28	1.03±0.17
<i>Nusap1</i>	1.01±0.16	1.04±0.30	0.96±0.25	0.78±0.18
<i>Rasal2</i>	1.01±0.14	1.02±0.21	0.98±0.23	0.79±0.16
<i>Spsb1</i>	1.01±0.14	1.03±0.26	1.18±0.32	0.75±0.14
<i>Tex14</i>	1.00±0.57	1.02±0.10	1.11±0.76	0.92±0.26
<i>Trim62</i>	1.01±0.11	1.03±0.28	0.94±0.24	0.75±0.14
<i>Vps37a</i>	1.00±0.08	1.02±0.23	1.00±0.19	0.81±0.12

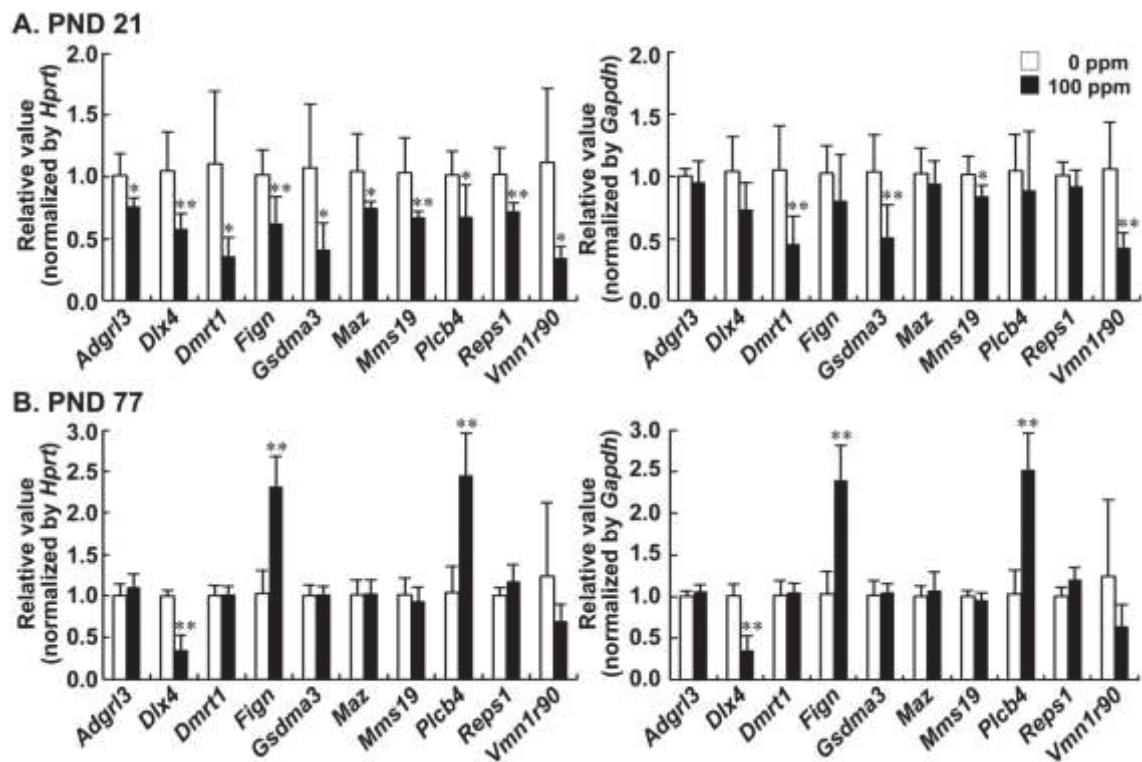
Abbreviations: *Cdkl4*, cyclin-dependent kinase-like 4; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HCP, hexachlorophene; *Hprt*, hypoxanthine; *Mafg*, V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (avian); *Mcur1*, mitochondrial calcium uniporter regulator 1; *Nusap1*, nucleolar and spindle associated protein 1; PCR, polymerase chain reaction; PND, postnatal day; *Rasal2*, RAS protein activator-like 2; RT, reverse transcription; *Spsb1*, splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1; *Tex14*, testis-expressed gene 14; *Trim62*, tripartite motif-containing 62; *Vps37a*, vacuolar protein sorting 37A; phosphoribosyltransferase. Data are expressed as the mean ± SD.

**Table 3-7****Transcript expression of synaptic plasticity-related genes in the hippocampal dentate gyrus**

	0 ppm HCP (Control)		100 ppm HCP	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
PND 21				
<i>Dlg4</i>	1.06±0.39	1.07±0.45	0.79±0.32	0.61±0.22*
<i>Gabbr1</i>	1.05±0.39	1.03±0.29	0.77±0.15	0.65±0.12*
<i>Gabbr2</i>	1.06±0.37	1.06±0.40	0.74±0.18	0.62±0.11
<i>Gabra1</i>	1.03±0.26	1.04±0.30	0.76±0.18	0.64±0.13*
<i>Gabrb2</i>	1.01±0.17	1.02±0.26	1.10±0.31	0.96±0.38
<i>Homer1</i>	1.02±0.20	1.03±0.26	1.30±0.52	1.10±0.61
<i>Stx4a</i>	1.02±0.19	1.03±0.26	0.74±0.14*	0.63±0.12*
<i>Syp</i>	1.02±0.21	1.04±0.35	0.88±0.15	0.75±0.16
PND 77				
<i>Dlg4</i>	1.02±0.22	1.04±0.32	0.92±0.07	0.95±0.14
<i>Gabbr1</i>	1.00±0.08	1.04±0.30	1.13±0.22	1.17±0.21
<i>Gabbr2</i>	1.03±0.23	1.03±0.29	1.53±0.39*	1.59±0.42*
<i>Gabra1</i>	1.02±0.21	1.03±0.26	1.53±0.34*	1.56±0.28**
<i>Gabrb2</i>	1.02±0.21	1.02±0.25	1.53±0.30**	1.58±0.32**
<i>Homer1</i>	1.02±0.21	1.04±0.32	0.52±0.11**	0.54±0.09*
<i>Stx4a</i>	1.03±0.24	1.04±0.28	0.71±0.18*	0.72±0.10*
<i>Syp</i>	1.01±0.17	1.02±0.24	1.16±0.18	1.21±0.21

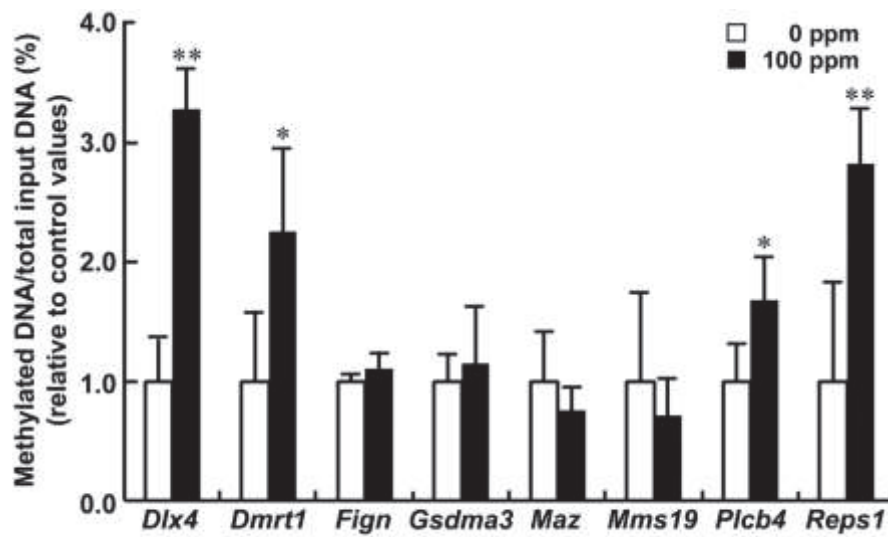
Abbreviations: *Dlg4*, discs, large homolog 4 (*Drosophila*); *Gabbr1*, gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1; *Gabbr2*, gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2; *Gabra1*, gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 1; *Gabrb2*, gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 2; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HCP, hexachlorophene; *Homer1*, homer scaffolding protein 1; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; PND, postnatal day; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; *Stx4a*, syntaxin 4A (placental); *Syp*, synaptophysin. Data are expressed as mean ± SD.

\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , significantly different from unexposed (0 ppm HCP) controls by Student's or Aspin-Welch's *t*-tests.



**Fig. 3-1**

Transcript expression results obtained from MethylCap-seq analysis of hypermethylated genes in the hippocampal dentate gyrus of mice on postnatal day (PND) 21 and PND 77. (A) PND 21. (B) PND 77. Values are normalized to *Hprt* (left) or *Gapdh* (right) and expressed as mean + SD; n = 6/group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with 0 ppm controls by Student's or Aspin-Welch's *t*-tests.



**Fig. 3-2**

Quantitative methylation-specific PCR data of selected genes in the hippocampal dentate gyrus on postnatal day (PND) 21. Values are expressed as mean + SD; n = 5/group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with 0 ppm controls by Student's or Aspin-Welch's  $t$ -tests.



### A. *Dlx4*

Sequence analyzed: Na-bisulfite converted (sense)

5'-GGYGTAGTGG YGGYGGTYGY GGYGTGTTAG GTTTTGGGYG TTYGGYGGGG

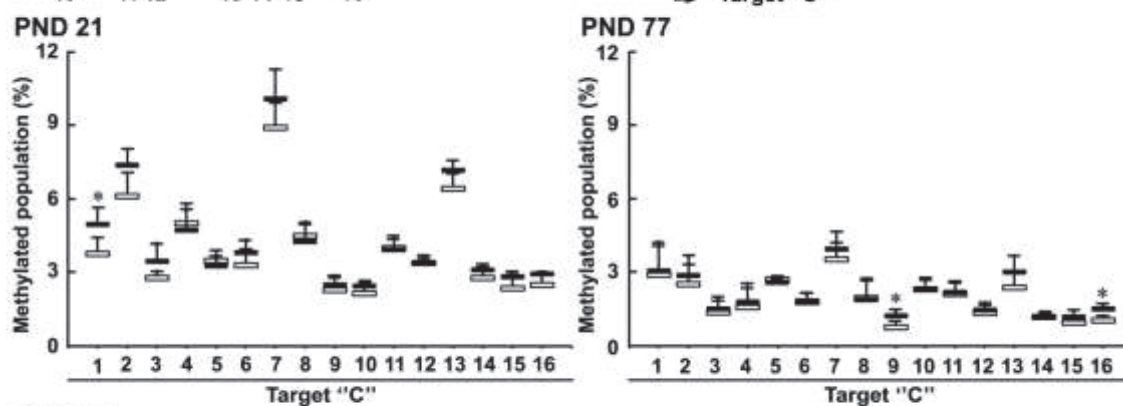
GGYGTGYGYGT TAYGYGYGTG YGGGGTAGGT TGGG-3'

Original sequence analyzed: Before Na-bisulfite treatment

5'-GGCGCAGTGG CCGCGGTCCG GCGTGCCAG GCTCTGGGCG CTCGGCGGGG

CGGTGCGCGCCACCGCGCGTGGGGGCAGGCTGGG-3'

Target "C"



### B. *Dmrt1*

Sequence analyzed: Na-bisulfite converted (sense)

5'-YGYGTAGAGA GAGTTTTTYG TGTTGGTGYG TTGTATAYGG TTGAGGTTTG TAGTAATTTT GTA-3'

Original sequence analyzed: Before Na-bisulfite treatment

5'-CGCGCAGAGA GAGTTCCTCG TGCTGGTGCG CTGCACACGG CTGAGGTTTG TAGTAATTTT GTA-3'

Target "C"

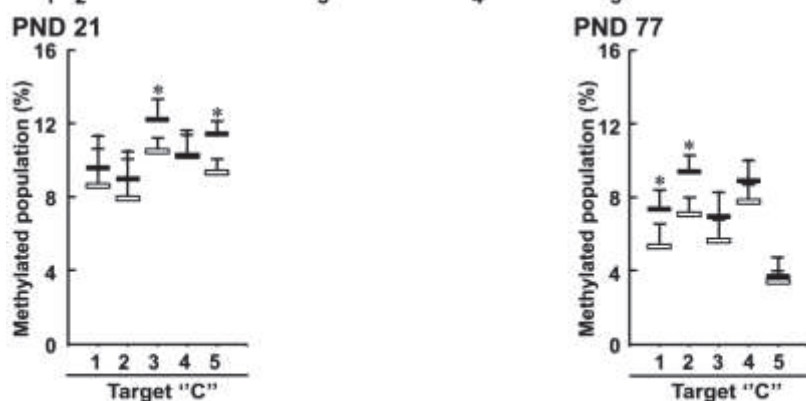


Fig. 3-3

Pyrosequencing results for *Dlx4* and *Dmrt1* in the hippocampal dentate gyrus on postnatal day (PND) 21. (A) *Dlx4*. (B) *Dmrt1*. All cytosine bases within CpG site are numbered as 1–16 or 1–5. White columns, 0 ppm controls; black columns, 100 ppm hexachlorophene. Values are expressed as tmean + SD; n = 4/group. \**P* < 0.05 compared with 0 ppm controls by Student's or Aspin-Welch's *t*-tests.

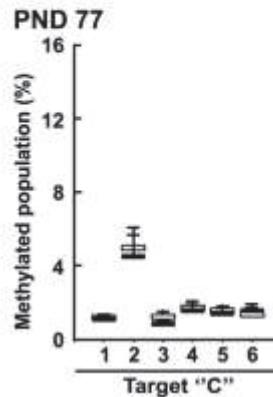
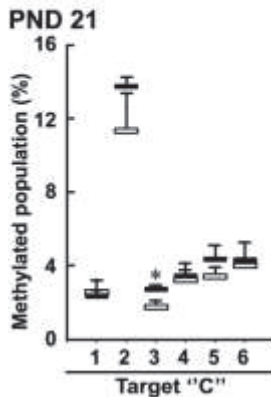
### A. *Plcb4*

Sequence analyzed: Na-bisulfite converted (anti-sense)

5'-GTGYGAGTTA GTTAGAATYG GGAGYGGGGA GYGGGAATTG YGTTTTYGT TATGTTATAT TGAATAAATA-3'

Original sequence analyzed: Before Na-bisulfite treatment

5'-CACGCTCGGT CGGTCTTGGC CCTCGCCCT CGCCCTTGAC GCGAAAGCAG ATACAATGTA ACTTGTGTTGT-3'  
3'-GTGCGAGCCA GCCAGAACC G GAGCGGGGA GCGGGAAGT GCGTTTCGTC TATGTTACAT TGAACAAACA-5'



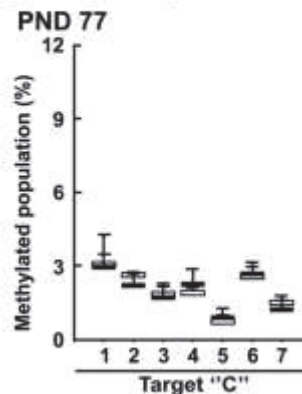
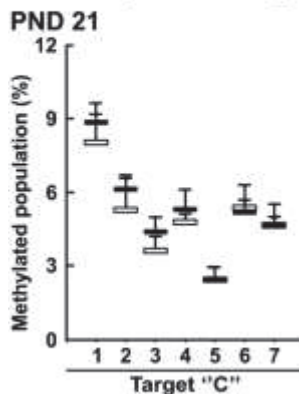
### B. *Reps1*

Sequence analyzed: Na-bisulfite converted (anti-sense)

5'-TTTATYGGGT TGGTTYGGTY GTTTYGGGA GAGYGGGTG TAGYGT TTTT TGTTGGT-3'

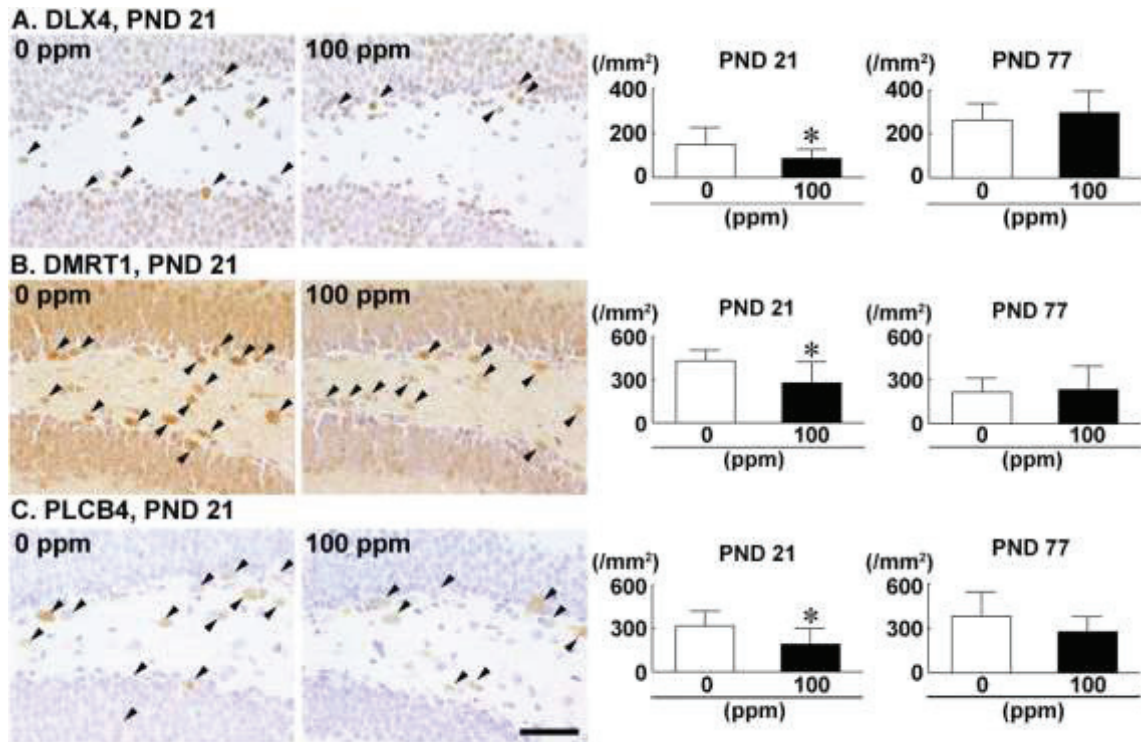
Original sequence analyzed: Before Na-bisulfite treatment

5'-GCCAGCAGGG GGCGCTGCGG CCGCTCTCC CGGGAGCGGC CGAGCCAGCC CGGTGGG-3'  
3'-CCCACCGGGC TGGCTCGGCC GCTCCGGGA GAGCGGGCCG CAGCGCCCC TGCTGGC-5'



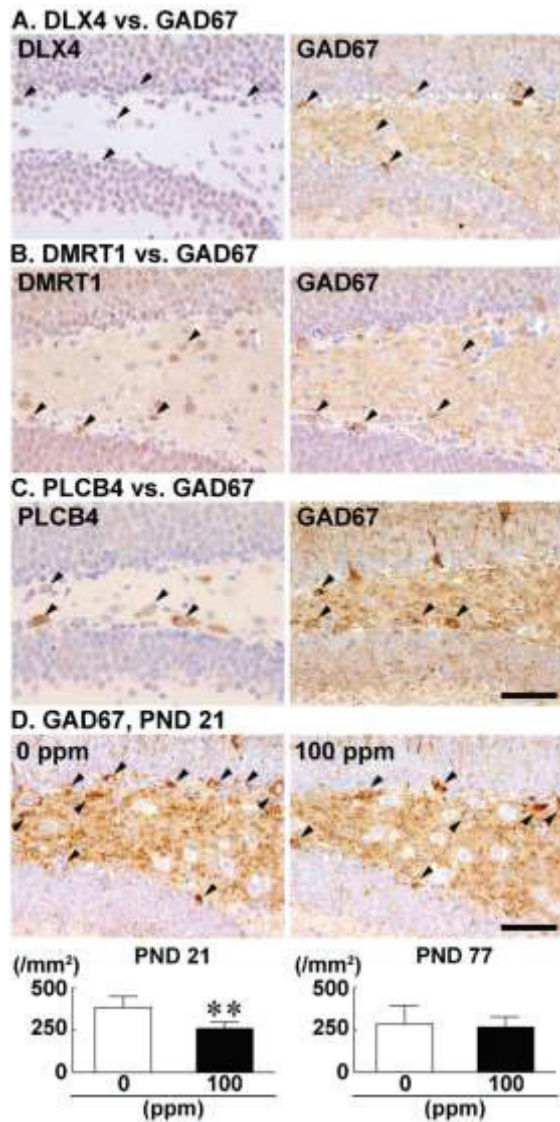
**Fig. 3-4**

Pyrosequencing results for *Plcb4* and *Reps1* in the hippocampal dentate gyrus on postnatal day (PND) 21. (A) *Plcb4*. (B) *Reps1*. All cytosine bases within CpG site are numbered as 1–6 or 1–7. White columns, 0 ppm controls; black columns, 100 ppm hexachlorophene. Values are expressed as mean + SD; n = 4/group. \* $P < 0.05$  compared with 0 ppm controls by Student's or Aspin-Welch's  $t$ -tests.



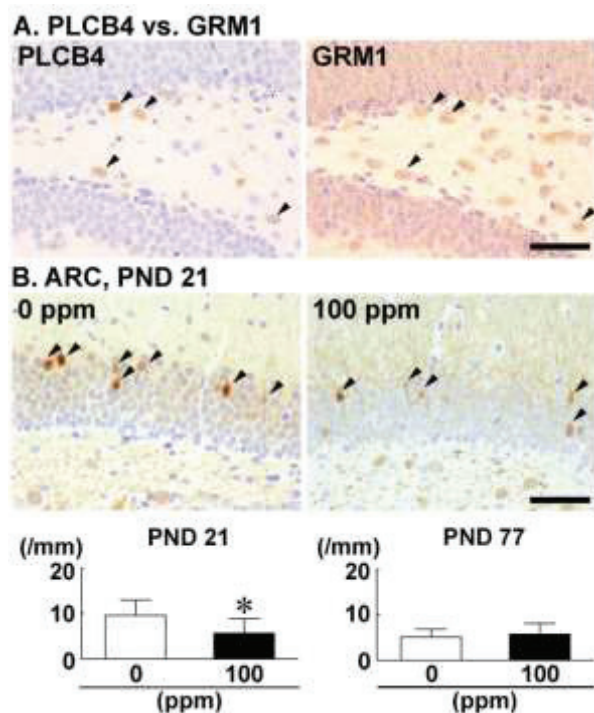
**Fig. 3-5**

Distribution of cells immunoreactive for DLX4, DMRT1, and PLCB4 in the hippocampal dentate hilus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to hexachlorophene (HCP) from gestational day 6 to PND 21. (A) DLX4. (B) DMRT1. (C) PLCB4. Representative images from mice exposed to 0 ppm controls (left) and 100 ppm HCP (right) on PND 21. Magnification,  $\times 400$ ; scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the density of cells immunoreactive for the indicated molecule in the dentate hilus.  $n = 10/\text{group}$ .  $*P < 0.05$  compared with 0 ppm controls by Student's or Aspin-Welch's  $t$ -tests.



**Fig. 3-6**

Distribution of cells immunoreactive for DLX4, DMRT1, and PLCB4 in the dentate hilus in relation to GAD67<sup>+</sup> cells. (A-C) Cellular identity of DLX4, DMRT1, and PLCB4 with GAD67<sup>+</sup> cells analyzed using serial mirror sections. (A) DLX4 vs. GAD67. (B) DMRT1 vs. GAD67. (C) PLCB4 vs. GAD67. Arrows indicate cells positive for both GAD67 and the indicated molecule. Magnification,  $\times 400$ ; scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . (D) Distribution of GAD67<sup>+</sup> cells in the dentate hilus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to hexachlorophene (HCP) from gestational day 6 to PND 21. Representative images from mice exposed to 0 ppm controls (left) and 100 ppm HCP (right) on PND 21. Magnification,  $\times 400$ ; scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the density of GAD67-immunoreactive cells in the dentate hilus.  $n = 10/\text{group}$ .  $**P < 0.01$  compared with 0 ppm controls by Student's or Aspin-Welch's  $t$ -tests.



**Fig. 3-7**

Distribution of GRM1<sup>+</sup> cells in the dentate hilus in relation to PLCB4<sup>+</sup> cells, and alteration in the distribution of ARC<sup>+</sup> granule cells after maternal exposure to hexachlorophene (HCP). (A) Identity of PLCB4<sup>+</sup> cells as GRM1<sup>+</sup> cells analyzed using serial mirror sections. Arrows indicate cells positive for both PLCB4 and GRM1.

Magnification,  $\times 400$ ; scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . (B) Distribution of ARC<sup>+</sup> granule cells in male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to HCP from gestational day 6 to PND 21. Representative images from mice exposed to 0 ppm controls (left) and 100 ppm HCP (right) on PND 21. Magnification,  $\times 400$ ; scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the number of ARC-immunoreactive cells in the granule cell layer.  $n = 10/\text{group}$ . \* $P < 0.05$  compared with 0 ppm controls by Student's or Aspin-Welch's  $t$ -tests.