

されたりしている。これは、非常に良い言葉であり、毒性学の本質を突いている。しかし、実際の起源は、水銀の様な毒物でも薄めて使うと薬になる（癲癇に効いたという話らしい）という「ホルミシス」現象を指していた様である。注意すべきことは、ここでの「毒作用」と「薬作用」の間の用量作用関係や、「薬」用量とゼロの間の用量域は考慮されていないことである（図1）。

この流れを汲んで、現代の薬学も、薬効が期待される薬用量での作用が考察の対象であり、副作用としての毒性は、無意識のうちに薬効量より高い用量を想定して語られることが多い。そして「用量ゼロ」は「服用しない」ことであり、その用量ゼロのところと薬用量との間の半端な投与量の領域は考慮外である。これが、薬学（薬効）の毒性学の特徴であるが、我々は、薬だけに暴露されているわけではない。より一般化された毒性学には、この「パラケルスス」の毒の概念だけでは少し足りないのである。

広義の毒性学は、生体とあらゆる外来性物質 (xenobiotics) との相互作用を研究する分野であり、主目的は「人（ヒト）の安全」であり、少なくとも以下の、相互に絡み合った要因を考慮する必要がある。

- ① 用量作用関係：少なくとも幾つかのパターンが想定される。特に、遺伝子に不可逆的な「傷」を入れる発がん物質の場合のように、閾値が想定できない場合（あるいは設定しないことが合理的な場合）がある。その場合、高用量を暴露されればその人が被害者となるが、低用量の場合、個々の被害者の顔が見えない（1万人中、何人かが発症する確率的な事象）。対象は多数のヒト、例えば国民、消費者、労働者。例えば、アフラトキシンを1ng/kg体重/日毎日摂取すると肝臓癌で死ぬ人の数が100万人につき0.1～3人増える。全国で10人～300人。この人たちの顔は見えないし、「私、汚染されたお米を食べ

ちゃったんですけど、肝臓癌になるのでしょうか？」と聞かれても答えに窮するタイプの毒性である。

- ② 閾値の設定（閾値の有無）の問題：受容体を介したシグナルが毒性の主要因である場合、DNAにアダクトを形成するなどして直接的に「傷」を残す場合（DNA修復機構も完全ではなくある確率で見逃しがあると考え）など、原理的に閾値が無いことが想定される場合のほか、一端身体に入ったら出て行かないアスベストの様に影響が不可逆的に蓄積すると考えられる場合は、閾値を設定しない方が合理的である。
- ③ 不可逆的か可逆的かの問題：DNA障害のほか、エピジェネティックに不可逆的な影響が残る場合が想定される。また、発生、発達期の個体では、暴露された瞬間の影響自体が可逆的であっても、成長中の体の構築に影響が残ることで結果として不可逆的となる場合がある。特に、発達中の中枢神経系では一時的な神経活動のかく乱が、形成途上の神経回路の微細構造に不可逆的な乱れを残すことが示されている。
- ④ 毒性発現の時間軸：「急性毒性」、「慢性毒性」、「遅発性毒性」等として表現される。急性毒性は「単回暴露」の影響を指すことが、慢性毒性は「反復暴露」の影響を指すことが多い。遅発影響は、単回または短い期間の反復暴露の後、潜伏期を置いて影響が現れることを指し、毒性学の分野での深刻な問題として「周産期、新生児期、あるいは小児期暴露による成熟後の有害影響」がある。
- ⑤ ADME：体に入る物質の立場からは、ADME（吸収Absorption, 分配Distribution, 代謝Metabolism, 排泄Excretion）が考察される。SNPsが大きく影響すると考えられ、その研究が進んでいるのが代謝、特にP450などの代謝酵素についてである。ADME

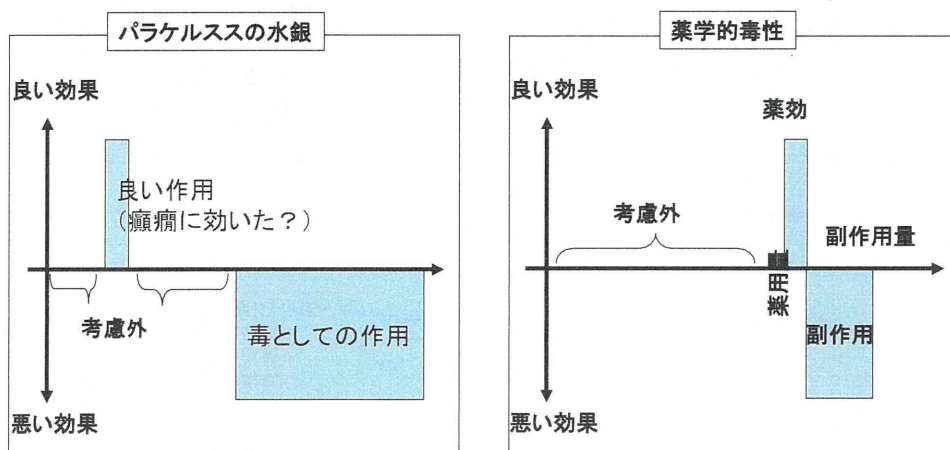


図 1

が胎児・新生児・小児と大人で異なることが知られている。グレープフルーツの問題もこのレベルで語られる。

- ⑥ 複合影響：重要であるが毒性学で最も立ち遅れている研究分野の一つ。薬剤は複合処方常識であるが、それに加えて、患者の食事、腸内細菌産生物、疾病そのものによる体の異常状態、などとの相互作用は、おそらく、事故や事象が明らかになってから後追いで解析している状況であろう。
- ⑦ ホルミシス現象と、何通りかの閾値：ももとの謂れは、「ホルミシスとは、ある物質が高濃度あるいは大量に用いられた場合には有害であるのに、低濃度あるいは微量に用いられれば逆に有益な作用をもたらす現象」であるとされる。放射線ホルミシスは「高線量は有害だが、低線量は健康によい」という話になる。よく、ホルミシス現象として報告される実験のパターンとして、発癌物質Aで肝臓に低頻度ながら肝腫瘍を誘発しておいて、物質Bを与えると、低用量では発がん率が下がり、途中の用量で発がん率がAのみの時と同じになり、その量を超えると発がん率が上昇を始める、というものがある。一旦、発癌率が下がった用量域において、ホルミシス現象が認められたと判定する。興味深いのは、同じ実験で、発がん率の減少は無視し、増加のみをもって物質Bの発癌促進影響を定義すると、Bは途中の用量から影響を発揮したとの判定になり、Bの発癌促進作用には「閾値」があるとの判定がなされる。ところが、「閾値」には、別の定義も可能である。用量をゼロから増加させた場合、その物質の影響が観察されない用量の最大値を閾値とする、即ち、上

記で「発がん率の減少」を無視しない立場である。この場合、Bには閾値が無いことになる。この、チグハグは、シグナル毒性の立場から「複合影響」の範疇において論議することで解決される。ある特定の原因により誘発されている背景病態がある場合、それと同じ原因が追加されると、その原因の用量作用関係に基づいて病態は悪化する。ところが、背景病態に、別の要因が加わった場合、病態は、悪化する場合、変化しない場合、及び軽快する場合の3つの可能性がある。実際、放射線の場合、ラットに400日間外部照射したのち、全例が死亡するまで生涯観察(1,400日間)した低線量外部照射実験では、寿命短縮や発がん率には、ホルミシス現象は認められない、との結論が出ている(Tanaka et al, Radiation Res. 160:376-379, 2003)。これは、背景病変に対して処置が加算的であること、即ち、背景の放射線等の影響に対して外部照射の影響のメカニズムが同等であることを示唆する。異種の化学物質同士や、化学物質と放射線との組み合わせの場合には、両者間の毒性発現メカニズムが異なる事が多く、モニターする毒性影響(例えば腫瘍発生率)とそのモニター時期を適切に選択すると、容易に「ホルミシス現象」を示す実験を組むことが出来る。異時的に暴露すると更に容易になる。この実態は、シグナル毒性の観点から網羅的にA及びBの影響を解明するに越したことはないが、この場合、実験プロトコルを精査すれば通常は明瞭に予測あるいは解釈がつくことが多い。ここでの結論は「無条件でのホルミシス」は存在しないということである。算数の因数分解の話ではないが、「殴ってさする」たぐいの現象なので

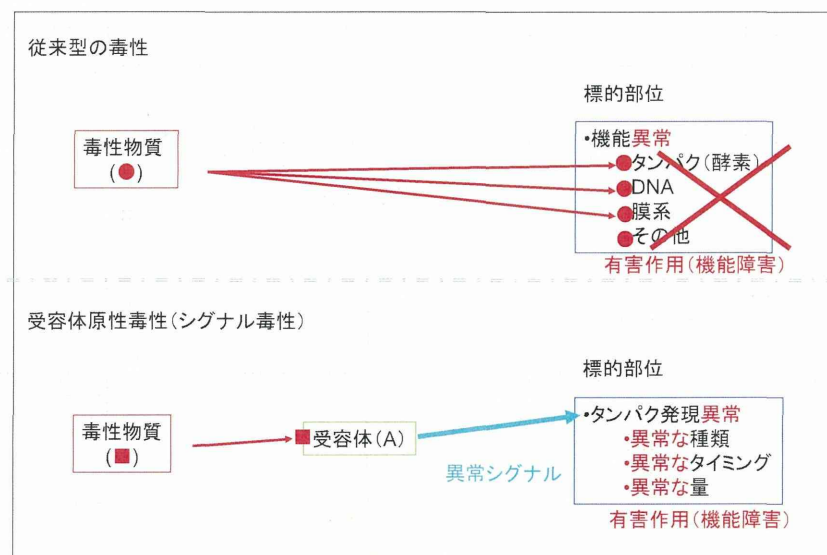


図 2

ある。「殴る」に相当する要因は、実験者自らが用意する場合は明瞭であるが、それが「天然」由来のものを使用する実験では一見「無条件」にホルミシス現象が得られるように錯覚されるので、注意が必要である。そういう意味では、このParacerasusの有名な言葉には落とし穴があるのである（図1）。

●シグナル毒性（受容体原毒性）

古典的な毒性の場合、毒性物質は、細胞やその中の蛋白質やDNAなどに直接作用し機能障害を起こす。一方、シグナル毒性の場合は、毒性物質は細胞にある受容体に結合してシグナルを伝えるだけで十分に作用が現れる（図2）。受容体と結合して誤ったシグナルを出すことによって障害を起こすが、受容体の無い細胞には何の悪さもしない。

また、内分泌系だけではなく、神経系、免疫系も同じ仕組みであり、これらの系に対するシグナル毒性もある。受容体に結合して反応を引き起こす物質と受容体については、よく「鍵と鍵穴」のような関係と説明され、内分泌系のものなどは多少ルーズに作られているので、ドンピシャの「鍵」となる物質でなくても、構造が似たような物質が鍵穴に作用することもある。受容体に本来の「鍵」となる物質ではなく別の物質がくっついて、間違っただ種類のタンパクを、間違っただタイミングで、間違っただ量を作るという間違っただ指令（シグナル）を出してしまうために有害な作用が生じるのがシグナル毒性の基本である。またシグナル伝達は、通常小さな刺激でより大きな影響として働く増幅系なので、ごく微量のばく露で影響がでて、閾値が設定しにくい。またシグナルのかく乱であるために、遺伝子の損傷などの影響は起こさない。遺伝子の発現を調整する仕組みであるエピジェネティックな仕組みの変化を介して、長く影響を残すと言うことになる。

異常なシグナルが身体に及んだ時期によって個体を受ける影響は違う。特に胎生期～新生児期は、各種のシグナルを体内でやり取りして身体を完成させていくので、そういう時期に異常なシグナルが外部からの化学物質等によりもたらされると、身体の構造や機能に大きな影響が及ぶことがある。シグナル毒性の極端な例として、1981年のノーベル生理学賞を受賞した視覚野の形成に関する研究がある。子猿の片目の瞼を縫い合わせてしまうと、その眼の網膜には、明暗刺激は届くものの、物の輪郭、即ち輪郭刺激が届かないために、縫い合わせた方の目の視覚野の神経領域が発達することなく、その子猿が大人になってから瞼を開いても、そちらの目は失明する。眼球に異常はなくても視覚を喪失する皮質盲であった。人間でも、2歳以下の子どもに2日以上眼帯をさせると、

眼帯をかけた目が弱視になることが知られている。治療は6歳ごろまでなら可能で、見える方の目を隠すことでバランスを取り戻し、きちんと立体視ができるようになるが、それ以降に治療を開始しても症状は修正されなくなってしまう。このノーベル賞の受賞講演の要旨の冒頭に、「この実験のデザインは、先天性の白内障の子供が、白濁したレンズを除去し適切に視力を矯正してもなお重篤かつ恒久的な視覚欠損を示すという知見に、間違いなく影響されたものである」との下りがある。大人になってからの白内障では、レンズを交換するだけで、視力が劇的に回復すが、子供の場合は、猿の実験と同じことが起こってしまっていたのである。

言語の発音、絶対音感など、俗に「頭の固くならない内」でないと身につかないことは他にもたくさん知られている。脳の中には、適切な時期に適切な刺激、即ち、シグナルが適切どころに届かないと正常に機能が完成しなくなるという部位が、今まで、我々がはっきりと認識されていない部位や機能を含めて、沢山あるということなのである。

この様な、異常なシグナルの影響は、極端な例では、組織、臓器の形態形成に直接影響するが、よりマイルドな状況では、特定の影響がしばしば確率的事象としてあらわれるようになる。例えば、胎内で経胎盤的にエストロゲン活性のある化学物質に暴露された雌マウスの性周期を生後6か月以上追跡すると、高用量群は、早期から全動物が一斉に性周期異常を示すのに対し、低用量群は、その内の何匹かが時間差を持って性周期異常を示すことが知られている。この様な状況は、丁度、低線量放射線の影響の説明と同じく、確率的事象として、性周期を制御する中枢神経系に対するエピジェネティックな機構により、引き起こされていると考えられる。

●内分泌かく乱化学物質問題

ホルモン様活性化学物質の、従来の毒性評価試験に於ける無毒性量よりも低用量域（実際の環境からの暴露濃度に近い用量域）での暴露に於いて有害性が現れる懸念が指摘され、内分泌かく乱化学物質（EDCs）問題として、毒性学分野で大きく取り上げられて来た。EDCs問題は、本質的には上記の「シグナル毒性」の問題と捕らえることが出来る。化学物質が特定の受容体に結合し、そこから発せられる異常シグナルが毒性症状を誘発する、と考えるものである。EDCsの主たる標的は受容体であり、内在性のリガンドと類似した濃度域で作用を発揮することが問題となる。その際、恒常性維持機構が完成している成人（成獣）では、その作用は相殺される可能性が高い。これに対して、永続的・不可逆的な影響が危惧されるのが、恒常性維持機構が完成していない発達途上の胎

児・新生児・小児である。EDCs問題の理解は、「本質的対象は胎児・新生児・小児であり、その分子標的は受容体シグナル系を共有する神経・内分泌・免疫系であり、その有害影響は不可逆的な遅発影響として現れる」ということである。

話は、若干それるが、ダイオキシンはとても不思議な物質と言える。通常ダイオキシンを大量に投与すると、マウスは死んでしまい、人間の場合は体がボロボロになるが、ダイオキシン受容体を取り除いたノックアウトマウスに大量にダイオキシンを与えても、ほとんど症状が出ないという結果になる。つまり、ダイオキシンは受容体が無いと毒性を示さない、即ち、受容体以外のタンパク、酵素、膜成分、などと、ほとんど相互作用しない、というシグナル毒性の典型例ということである。

●化学物質の毒性評価-Percellome (パーセローム) 法-

数万種に及ぶと言われる身の回りの化学物質の毒性評価は、実験動物の所見を人に外挿する事によって実施され、種差や個体差は「安全係数 (不確実係数)」により、量的な安全マージンをとる事で勘案されてきた。しかし、サリドマイドに代表されるが如く、これには科学的な限界があり、人の安全性確保をより確実にするためには「毒性学の近代化」が必要である。それには従来法に加え、ブラックボックスであった毒性発現機序の分子レベルでの把握が重要であり、そのための研究手法としては網羅的に遺伝子発現変動をプロファイリングすることによるトキシコゲノミクス研究法が特に有効である。

トキシコゲノミクスを毒性評価に応用するために、一般的には従来法により得られた毒性所見にトキシコゲノミクス情報を照合して、毒性所見との対応を検討する方法が行われた。しかし、この方法では、従来法で得られた所見よりも詳細な変化がトキシコゲノミクス情報に含まれていても、それを掘り起こすことが難しいという欠点があった。そこで、我々は、トキシコゲノミクス情報の中から毒性を予見し得る変化を漏れなく抽出する方針を取った。これは、丁度、電子顕微鏡が発明されたときに、そこに映し出された、今までに見たことが無い様な映像が、何なのであるかを明らかにしてきた過程に類似している。この為には、既存の毒性情報に頼らずに、幾通りもの毒性に対応する可能性のある遺伝子発現変化のデータを集積した大規模な網羅的遺伝子発現データベースが必要となる。その構築に際して問題となったのが、多数のマイクロアレイ実験に由来するトキシコゲノミクスデータを一括参照するための基盤技術の開発であった。当時一般的にマイクロアレイで測定した“発現量”は相対比 (fold change) で示され、マイクロアレイ間比較、及び実験間比較に際しては逐一、データを相対

的に比較する計算が必要で、統一的な比較は困難な状況だったからである。

そこで我々はmRNA発現量を細胞1個あたりのコピー数として絶対量化する方法 (Percellome法、特許第4415079号、Kanno et al., BMC Genomics, 29:764, 2006) を独自に開発して、全データの直接比較を可能とした。具体的には、生体材料の破碎液に、そのDNA含量 (=サンプル中の細胞数を反映) に比例した量の、枯草菌由来RNA混合液 (GSC=Grade-dosed Spike Cocktail) を添加してからtotal RNAを抽出し、そのままマイクロアレイ測定を行う (Affymetrix GeneChipには枯草菌遺伝子のプローブセットが5種、予め用意されている)。これにより、マイクロアレイ毎に全ての測定値が、GSCの測定値から生成した換算式によって、細胞1個あたりのコピー数単位に変換 (絶対量化) される。

次に問題となったのは、どの様な時点のデータを採取するか、及び投与量である。前者については、化学物質が生体に次々と変化を誘発して行く様子をmRNAの発現変化として、網羅的に追跡することとした。後者については、大量に投与すると肝に光学顕微鏡的に明瞭なアポトーシスを誘発される事があるが、その際のmRNAデータはアポトーシスのものが中心となってしまい、投与物質の特徴が抽出困難であった。そこで、投与量を「24時間以内に従来法で明らかな毒性が検知されない最大量」、即ち、狙うところを、シグナル毒性量、とした。

この約10数年間に、140種類超 (医薬品、一般化学物質、食品関連物質を含む) の化学物質の単回経口暴露によるマウス肝の初期応答データを含む、延べ5.8億遺伝子情報からなるPercellomeデータベースを得た。これは、基本的に投与後の時間、暴露用量、遺伝子発現量の3軸からなる3次元曲面データにより構成される。解析にはこの3次元曲面の特徴抽出という独創的な方法を採用し、解析ソフトウェア群 (相崎健一) は独自開発である (図3)。また、動物実験レベルからの厳重な実験管理により、高精細且つ高再現性を実現している。このシステムによりシグナル毒性が類似した物質は瞬時に検出可能となり、未知の作用の同定も迅速に行えるようになった (Kanno et al., J Toxicol Sci. 38(4): 643-54, 2013)。シックハウス症候群の指針値程度のごく低濃度域での吸入毒性トキシコゲノミクスも実施しており、ごく低濃度のホルマリンで肺の複数の遺伝子発現が明確に誘導されること、海馬に影響が及ぶこと、キシレン (2ppm) については情動認知行動に影響が現れること、などを見出している。中枢影響が疑われる物質群については、胎生期~幼若期の発達中の脳に対する神経シグナルかく乱が脳構造や神経回路の形成に影響を及ぼし、成熟後に行動異常等の脳高次機能の障害として顕在化することを、妊娠マウスへ神経伝達

物質類似物質を投与する経胎盤暴露実験や、離乳前暴露実験から見いだしており、仔マウスに成長後に誘発される遅発性中枢毒性と海馬の遺伝子発現異常の関連解析から標的ネットワークが示唆されつつある。

反復暴露時の毒性に関する実験も進めている。全動物に同量の検体を反復投与し、遺伝子発現測定直前の投与時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終投与を一回行う、というプロトコルを開発し、「新型反復暴露」と名付けた。この新型反復暴露は、遺伝子改変マウスに対する単回投与実験からヒントを得ている。「化学物質による遺伝子改変状態 (chemically-induced transgenic state)」を反復暴露により作成し、そこに単回投与を行うという考えである。この新型反復暴露により、反復暴露が2種類の反応を遺伝子発現に及ぼすことが判明した。それは、過渡反応：暴露の都度に概ね24時間以内に収まる速い変化、及び、基線反応：暴露を重ねるに連れ、日を追って発現値の基線が徐々に移動する緩徐な反応である。四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウムなどについて、単回暴露と新型反復暴露を比較解析し、過渡反応の振幅の増減と、基線反応の増減傾向が相関することを見出した。ただし四塩化炭素では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、バルプロ酸ナトリウムではそのような傾向は弱いという差異も認められた。

また、興味深いことに、基線反応の上流に、化学物質に依存しない共通した分子機構が働いている強い可能性が示された。

以上の、単回暴露プロトコル及び、新型反復暴露プロトコルから得られたPercellome解析結果から、ごく短期（単回暴露及び小数回反復暴露）の、ごく少数のマウスによる実験から、毒性メカニズム予測が可能となる段階に到達したと考えられる。

●まとめ

筆者は、発がんプロモーション作用（今で言うエピジェネティック作用）を研究の主対象に皮膚メラノサイトや甲状腺の発がん実験を手掛け、そこから内分泌かく乱化学物質問題に関わり、受容体原生毒性（シグナル毒性）、Percellome トキシコゲノミクスProjectによる網羅的遺伝子発現ネットワーク解析による毒性予測へと対象を広げてきた。その過程で、特に内分泌かく乱化学物質問題の際に、物議をかもしたのが「生物学的蓋然性 (biological plausibility)」の概念である。生命科学一般には馴染むこの概念は、規制決定に関わる毒性評価システムにはそうではなかった様である。現在OECDなどで取り上げられているAOP (Adverse Outcome Pathway) は内分泌かく乱化学物質問題のアプローチを手本に、それを一般

Percellomeトキシコゲノミクス研究

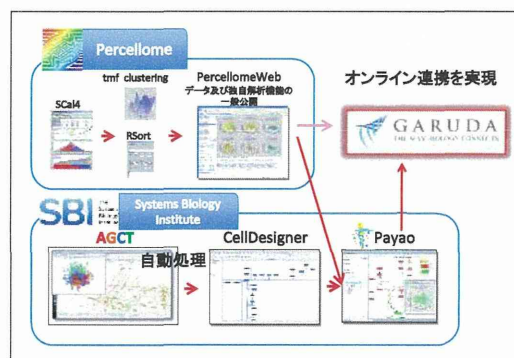
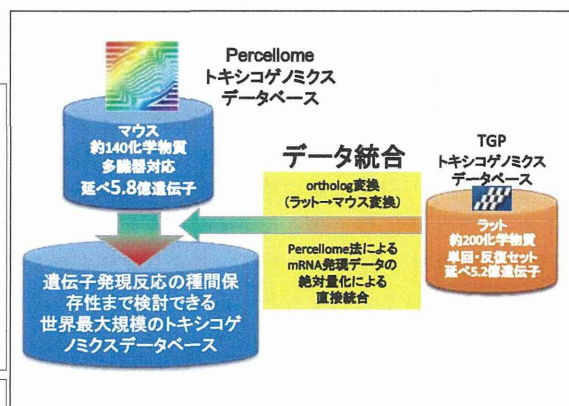
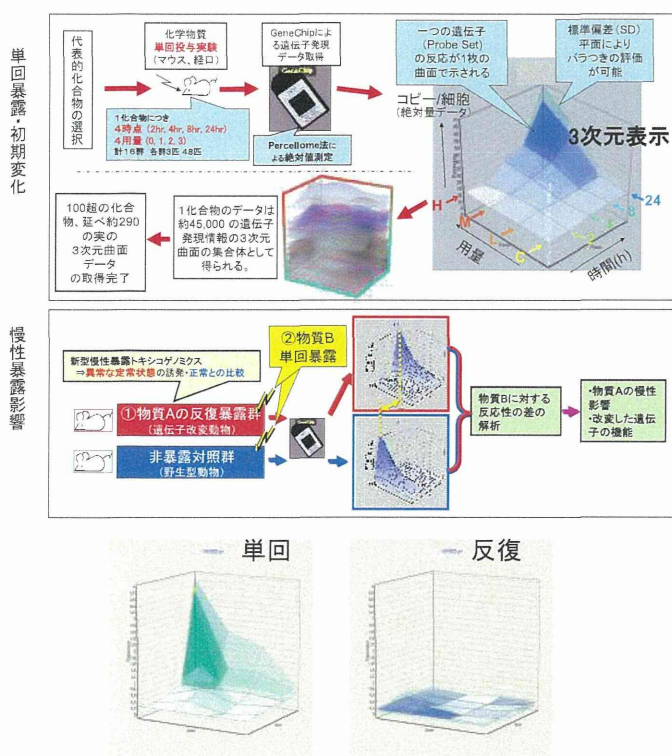


図 3

化しようという試みと理解できよう。蓋然性は、不安や危惧に根ざした当てずっぽうではなく、科学的知見からの演繹に基づく明白な妥当性があることを指す。これを毒性学的に裏返せば、毒性試験が正しく行われたことを判断出来てデータが読めることのみならず、使用した試験プロトコルの限界が把握できること、に該当すると思われる。ナノマテリアル毒性研究は、既存の異物・粉体毒性の限界に対処するための実施可能な工夫を模索する過程であり、特にアスベストの中皮腫発癌メカニズムとの共通性が指摘されるMWCNTの検討は蓋然性の延長に位置するものと考えられよう (Takagi et al., *Cancer Sci.* 103(8):1440-4, 2012, Taquahashi et al., *J Toxicol Sci.* 38(4):619-28, 2013)。毒性評価 (有害性評価) には、多くの場合、人の身代わりとして実験動物が用いられ、その毒性所見を人に外挿することが行われる。今後、当分の間、シグナル毒性解析の手法として少規模の動物実験が必須であり続けると考える。その成果が、バリテーション可能な代替法の開発の基礎となってゆくと考える。

現在の毒性学は、先端的分子生物学的手法を取り入れ、生体反応メカニズムに踏み込むことにより、種差や個体差 (SNPsなどを勘案した) の問題に対しても科学的な検討が進もうとしている。また、遺伝子改変動物やトキシコゲノミクスなどの新技術の導入により、評価の高精度化と迅速化が進んでいる。ちょうど、*in vivo*で分子生物学研究を実施することが可能となった現在、毒性発生機構をシグナル毒性のレベルで、システムバイオロジーの助けを借りモデル系の解析などを通して、毒性評価の更なる最適化とリスク評価の精度の向上が達成されると考える。これらが、患者のみならず健康なすべての人々 (消費者、労働者、製造者を含む) の安全安心と健全な活動の維持に大きく貢献すると考える。

Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid

Berry Juliandi,^{1,2,9} Kentaro Tanemura,^{3,9} Katsuhide Igarashi,⁴ Takashi Tominaga,⁵ Yusuke Furukawa,⁶ Maky Otsuka,⁴ Noriko Moriyama,⁶ Daigo Ikegami,⁷ Masahiko Abematsu,⁸ Tsukasa Sanosaka,¹ Keita Tsujimura,¹ Minoru Narita,^{4,7} Jun Kanno,⁶ and Kinichi Nakashima^{1,*}

¹Department of Stem Cell Biology and Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

²Department of Biology, Bogor Agricultural University (IPB), Bogor 16680, Indonesia

³Laboratory of Animal Reproduction and Development, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Miyagi 981-8555, Japan

⁴Life Science Tokyo Advanced Research Center, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Tokyo 142-8501, Japan

⁵Laboratory of Neural Circuit Systems, Institute of Neuroscience, Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, Kagawa 769-2193, Japan

⁶Division of Cellular and Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

⁷Department of Pharmacology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Tokyo 142-8501, Japan

⁸Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, Kagoshima 890-8544, Japan

⁹Co-first author

*Correspondence: kin1@scb.med.kyushu-u.ac.jp

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.012>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

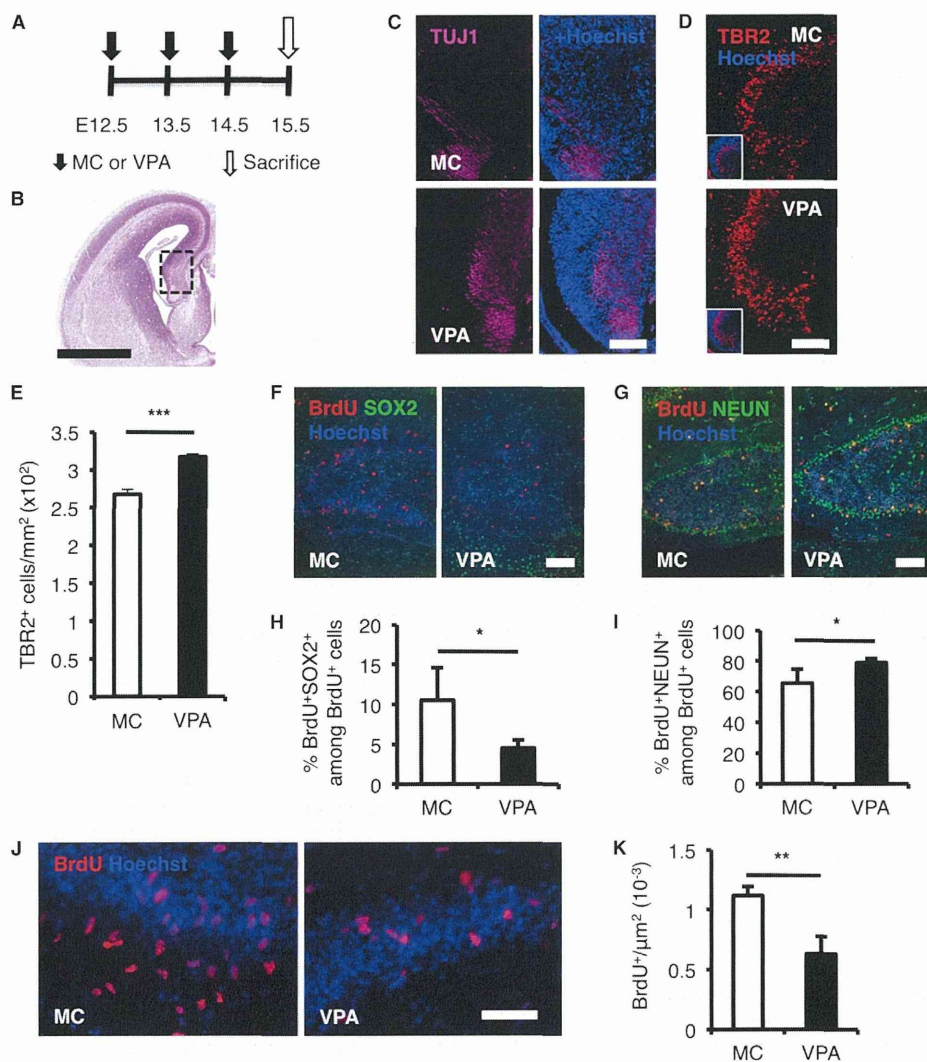
SUMMARY

Prenatal exposure to valproic acid (VPA), an established antiepileptic drug, has been reported to impair postnatal cognitive function in children born to VPA-treated epileptic mothers. However, how these defects arise and how they can be overcome remain unknown. Using mice, we found that comparable postnatal cognitive functional impairment is very likely correlated to the untimely enhancement of embryonic neurogenesis, which led to depletion of the neural precursor cell pool and consequently a decreased level of adult neurogenesis in the hippocampus. Moreover, hippocampal neurons in the offspring of VPA-treated mice showed abnormal morphology and activity. Surprisingly, these impairments could be ameliorated by voluntary running. Our study suggests that although prenatal exposure to antiepileptic drugs such as VPA may have detrimental effects that persist until adulthood, these effects may be offset by a simple physical activity such as running.

INTRODUCTION

Epilepsy is one of the most common neurological disorders in the world and is characterized by uncontrollable seizures (Chang and Lowenstein, 2003). Epilepsy can affect anyone, at any age, and there are an estimated 50 million afflicted people worldwide (Meinardi et al., 2001; Ngugi et al., 2010; Joint Epilepsy Council, 2011). The incidence of epilepsy is estimated to be higher than 0.5 cases per 1,000 of population per year (Sander, 2003). Around 30% of sufferers are women of child-bearing age (Joint Epilepsy Council, 2011). During pregnancy, epileptic patients must balance the maternal and fetal risks associated with seizures against the potential teratogenicity of antiepileptic drugs (AEDs) (Battino and Tomson, 2007). Although it was recently reported that several commonly used AEDs could produce postnatal impairment of cognitive function if taken during pregnancy (Meador et al., 2009, 2011, 2012, 2013), the precise pathology underlying such impairment remains unknown, and effective treatments for affected children of epileptic mothers who took AEDs during their pregnancy are therefore currently unavailable.

Valproic acid (VPA [2-propylpentanoic acid]) is an established drug in the long-term treatment of epilepsy (Blaheta and Cinatl, 2002). Several studies have revealed that VPA can directly inhibit histone deacetylase (HDAC) activity and cause hyperacetylation of histones, thereby activating gene transcription (Göttlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001). VPA significantly impairs postnatal cognitive function (Meador et al., 2009, 2011, 2012, 2013) and can lead to severe developmental defects if taken in early gestational stages (DiLiberti et al., 1984; Nau et al., 1991). We have previously shown, in several culture systems, that VPA enhances neurogenesis and drives neural precursor cells (NPCs) into the neuronal lineage over the glial lineage by a process involving HDAC inhibition (Hsieh et al., 2004; Abematsu et al., 2010; Juliandi et al., 2012). Here, we show that comparable postnatal cognitive functional impairment after prenatal VPA exposure in mice is caused by the untimely enhancement of embryonic neurogenesis, which leads to depletion of the NPCs pool and consequently a decreased level of adult neurogenesis in the hippocampus. We further show that hippocampal neurons in the offspring of VPA-treated mice have an abnormal morphology and activity. Nevertheless, these impairments can be alleviated by voluntary running.



(legend continued on next page)



RESULTS

VPA Enhances Embryonic Neurogenesis and Alters Global Gene Expression through HDAC Inhibition

We orally administered VPA or vehicle (methylcellulose [MC]) to pregnant mice on embryonic day (E)12.5 to E14.5, a mid-gestational period when neurogenesis is prominent (Figure 1A). We found that VPA increased global histone acetylation (Figures S1B–S1D) and enhanced neurogenesis as shown by the increased thickness of TUJ1 stained region in the cortical hem of VPA-treated mice (Figure 1C) and increased production of TBR2-positive intermediate neuronal progenitors born in the dentate neuroepithelium (Figures 1D and 1E) in the developing mouse brain (Figures 1B and S1A; see Figures S1E–S1G for embryonic cortex). We also found that VPA depleted the NPC pool (Figures 1F and 1H, hippocampus; Figures S1E and S1F, cortex) and reduced the number of proliferating NPCs (Figures 1J and 1K, hippocampus; Figures S1H and S1I, cortex). These results were compatible with our previous *in vitro* observations (Hsieh et al., 2004; Abematsu et al., 2010; Juliandi et al., 2012). Moreover, we found that the fraction of cells that had exited the cell cycle (i.e., differentiated) was higher in the E15.5 forebrain of VPA-treated mice, as shown by an increased number of BrdU-retaining cells that were negative for the proliferation marker KI-67 compared to BrdU-retaining cells that were still KI-67-positive, after a single injection of BrdU on E14.5 to label proliferating cells (Figures S1J and S1K). These results show that VPA treatment enhances embryonic neurogenesis and reduces the pool of NPCs.

Phenotypic changes should be generally induced by gene expression changes, and we wanted to examine whether VPA-induced gene expression change is due to its HDAC-inhibiting property. To this end, we administered VPA or valpromide (VPM), an analog AED without HDAC-inhibiting activity, and performed transcriptome analyses at three time points after the final administration. We found that 3 hr after the last administration, global gene expression in the E14.5 telencephalon was changed substantially by VPA, but not by VPM (Figure S1L; GEO: GSE 42904). This global change had almost completely disappeared in both cortex and hippocampus at E18.5 and in hippocampus at P84, although several genes still displayed differential expression levels (Figure S1L). We have found previously that VPM treatment increased neither global histone acetylation nor neurogenesis (Abematsu et al., 2010). Although VPA and VPM might have another pharmacological activ-

ity differences beside HDAC-inhibiting activity, taken together our results strongly suggest that VPA alters global gene expression mainly through its HDAC-inhibiting property, and this alteration is short-lived, being restricted mainly to the period when VPA was being given to the mice.

Prenatal VPA Treatment Has the Long-Term Effect of Impairing Adult Neurogenesis, Learning, and Memory

We next investigated whether the enhancement of neurogenesis and changes in gene expression caused by prenatal VPA exposure during the period of prominent neurogenesis could lead to postnatal impairment of cognitive function, as reported in humans (Meador et al., 2009, 2011, 2012, 2013). We conducted several behavioral tests on 12- to 13-week-old male mice (Figure 2A). Although the locomotor activity of VPA-treated mice declined, the decline rate was very slight (Tables S1 and S2) so that we could measure the emotional or cognitive behaviors. We found indeed that VPA-treated mice performed poorly mainly in tests that assessed learning and memory, such as Y-maze (Figure 2B) and contextual and cued fear associative tests (Figures 2C–2E, S4A, S4C, and S4E; Table S1), but not in the other tests (Table S1). VPA-treated mice have a lower correct-arm alternation in Y-maze. VPA-treated mice also have a lower freezing response in contextual and cued fear associative tests than MC-treated mice (control), despite the fact that both groups have similar fear response to foot shock during conditioning (Table S1), indicating that hippocampal-dependent learning and memory (Sarnyai et al., 2000; Van der Borght et al., 2007) are impaired in the VPA-treated mice.

In light of these results, we decided to focus on adult NPCs in the hippocampal dentate gyrus (DG), as they have been shown to play a functional role in learning and memory processes by undergoing neurogenesis to generate adult-born neural cells (Zhao et al., 2008). We injected BrdU once a day for 7 days into 12-week-old mice to label proliferating NPCs in the DG and then sacrificed the mice 1 day (to assess cell proliferation) or 4 weeks (to assess cell survival and fate) after the last BrdU injection (Figure 3A). We found that the number of BrdU-retaining cells in VPA-treated mice was lower at both time points than that in MC-treated control mice (Figures 3B and 3C). We also found fewer proliferating KI-67-positive cells in VPA-treated mice (Figures S2A and S2B). When we traced the fate of BrdU-retaining cells 4 weeks after the last BrdU injection (Figure 3A), we found that a lower proportion

(J and K) Embryonic VPA treatment reduces the number of highly proliferating NPCs (red) labeled by 30 min single-pulse BrdU injection in the P7 DG. See also Figure S1 for other immunostaining data in the cortex of embryonic forebrain.

MC, prenatal methylcellulose (vehicle); VPA, prenatal valproic acid. Data are represented as means. $n = 3$ for each group. Error bars indicate the SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-tailed *t* test. Scale bar, 50 μm . See also Figure S1.

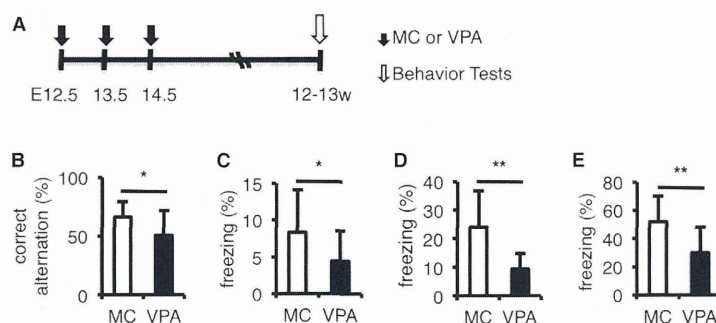


Figure 2. VPA-Treated Mice Perform Poorly in Learning and Memory Tests

(A) Experimental timeline of prenatal VPA treatment and postnatal behavior tests. E, embryonic day; w, weeks old.

(B) VPA-treated mice have a lower correct-arm alternation than MC-treated mice (control).

(C–E) VPA-treated mice have a lower freezing response than MC-treated mice (control) in conditioning (C; day 1), contextual (D; day 2), and cued fear associative tests (E; day 3). See also Figures S4A, S4C, and S4E for time course of freezing response and Table S1 for a summary of behavior data.

MC, prenatal methylcellulose (vehicle); VPA, prenatal valproic acid. Data are represented as means. $n = 12$ for each group. Error bars indicate the SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, two-tailed t test. See also Figure S4 and Table S1.

of BrdU-retaining cells had differentiated into NEUN-positive neurons and S100 β -positive astrocytes in VPA-treated mice than in MC-treated mice (Figure 3D). The possibility that more BrdU-retaining cells had died in VPA-treated mice during the 4-week period can be ruled out, because the survival rate of BrdU-retaining cells in these mice was similar to that in MC-treated mice (Figure 3E). These results imply that BrdU-retaining cells in VPA-treated mice either differentiated to another cell type(s) or differentiated more slowly than those in MC-treated mice. The latter explanation is more plausible, because we found that a higher proportion of BrdU-retaining cells in VPA-treated mice still expressed SOX2 (an NPC marker) and KI-67 (a proliferation marker) even 4 weeks after the last BrdU injection (Figures S2C–S2E). We also found that 1 day after the last BrdU injection, almost all BrdU-positive cells were still KI-67-positive in VPA-treated mice, whereas several BrdU-positive but KI-67-negative cells already existed in MC-treated mice (Figure S2F). We also examined amygdala and cortex, other brain regions that were suggested to play important roles in the regulation of memory and fear associative responses (LeDoux, 2003; van Strien et al., 2009). It has been shown previously that amygdala volume associates with differences in fear associative responses (Yang et al., 2008). However, we found that VPA-treated mice have a similar amygdala size to that of MC-treated mice, both at P7 and P84 (Figures S3A–S3D). We also found no significant difference in the expression level of cortical layer-specific genes such as *Cux1*, *Satb2*, and *Ctip2* (Molyneaux et al., 2007) in the cortex of P84 VPA-treated mice (Figures S3E–S3G). Taken together, these results suggest that prenatal VPA treatment has the long-term effect of impairing adult neurogenesis and contribute to the poor performance of VPA-exposed mice in learning and memory tests.

Voluntary Running Restores Learning and Memory Deficiencies in VPA-Treated Mice, Probably through Increased Neurogenesis that Yields Neurons with Normal Morphology

Voluntary running can increase adult neurogenesis in the hippocampal DG (van Praag et al., 1999a, 1999b). We next provided the mice with a running wheel (RW) after they had weaned and repeated the same BrdU-injection experiment when they reached 12 weeks (P84; Figure 3A). We observed an increased number of BrdU-retaining cells in MC- and VPA-treated mice with the RW, both 1 day and 4 weeks after the last BrdU injection (Figures 4A and 4B). We also found an increased proportion of BrdU-retaining cells that had differentiated into NEUN-positive neurons and a reduced proportion of BrdU-retaining cells that still SOX2-positive in MC- and VPA-treated mice with the RW, 4 weeks after the last BrdU injection (Figures 3A, 4C, and 4D). Voluntary running also enabled VPA-treated mice to perform better in hippocampus-dependent learning and memory test, the correct alternation in Y-maze ($F(1, 13) = 22.74$, $p < 0.001$, one-way ANOVA), and this performance was not significantly different in comparison to MC-treated mice (Figure 4E; Table S2). Moreover, we found that voluntary running also led VPA-treated mice performing better in conditioning ($F(1, 13) = 3.06$, $p = 0.10$, one-way ANOVA) and cued fear tests ($F(1, 13) = 6.80$, $p < 0.05$, one-way ANOVA), although not in contextual fear test ($F(1, 13) = 0.47$, $p = 0.50$, one-way ANOVA). As each mouse showed similar normal fear response, the performance of VPA-treated mice after voluntary running in conditioning and cued fear tests, but not in contextual fear test, recovered to levels that were not significantly different from that of MC-treated mice (Figures 4F–4H, S4B, S4D, and S4F; Table S2). However, when we analyzed all experimental groups by two-way ANOVA with both