

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：30109

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23700920

研究課題名(和文)胎児期の葉酸欠乏と過剰摂取による生活習慣病への影響

研究課題名(英文)the effects of overintake of folic acid during pregnancy on its fetus and postnatal development

研究代表者

金高 有里(KINTAKA, YURI)

酪農学園大学・農食環境学群・講師

研究者番号：80420909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠期の葉酸過剰摂取が仔へ及ぼす影響をマウスで検討した。妊娠期に葉酸過剰摂取(20倍)をした母獣の胎児(FA)を用いてDNAマイクロアレイによる解析をしたところ、コントロール(CN)と比較して脳では計138、肝臓では計68の遺伝子変動が見られた。動いた遺伝子をRT-PCRで確認した結果、ins2、hmgcs1、ifng、bdfn遺伝子がアレイの結果と一致した。胎児期、新生児期の組織を用いてKi-67染色(細胞増殖の指標)の陽性細胞率を検討した結果、FAでは胎児期の肝臓、膵臓において有意に増加が見られた。以上の結果から、妊娠期の葉酸は胎児の遺伝子や細胞増殖へ影響を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the effects of overintake of folic acid (FA) during pregnancy on its fetus and postnatal development, we carried out DNA microarray analysis and histological examinations. The pregnant mice were fed control diet (containing 2mg/kg of FA, CN), and FA supplementation diet (containing 40mg/kg of FA, FA) on gestational days 0-18. The fetal tissues were analyzed utilizing an agilent 4x44K whole genome chip in conjunction with a dye-swap approach. FA regulated 138 genes in the brain, and 68 genes in the liver. RT-PCR analysis confirmed expression change of ins2, hmgcs1, ifng, and bdnf genes. Immunohistological examination using Ki-67 antibody (a marker of proliferation) revealed that FA increased proliferation in the fetal liver and pancreas. However these increases in proliferation cells were not observed in the neonatal tissues. Our study suggests that overintake of FA during pregnancy may alter gene expression and cell proliferation in the developing fetal tissues.

研究分野：栄養学

キーワード：DOHaD説 葉酸 妊娠期 胎児 DNAマイクロアレイ 新生児 葉酸サプリメント 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

「胎芽期、胎児期、乳児期に低栄養の状態にさらされると成人病の素因が形成される」とする「成人病胎児期発生説」

(Barker: J Adolesc Health Care. 1986; 7 (2): 112-7) がイギリスの David Barker 氏によって提唱された。この考えにもとづき、胎児期の栄養環境が出生後の疾病発症に影響を及ぼすとする DOHaD

(Developmental Origins of Health and Diseases) 説が提唱されるようになった。

このような背景の中、諸外国の疫学研究の積み重ねにより、妊娠期の葉酸欠乏により胎児の二分脊椎症などの神経管閉鎖障害の発症リスクをあげるという結果が実証され、葉酸摂取の重要性が見直されるようになった。そこで、米国、カナダでは国の対策としてシリアルなど全ての穀物製品に葉酸を付加することとし、日本においても厚生労働省は胎児の神経管閉鎖障害の発症リスク低減のために、母親に対する葉酸摂取やサプリメントの啓発・普及にあたるなど国としての取り組みが行われている。

葉酸は水溶性ビタミン B 群のひとつであり、過剰摂取した場合は尿中排泄されると言われている。このため、過剰による影響について、以前はあまり注目されていなかった。しかし、最近の研究により葉酸過剰摂取により葉酸過剰による亜鉛の吸収障害や悪性貧血の潜在化、発がんリスクの上昇、喘息の発症リスクの上昇などがわかってきた。

厚生労働省の呼びかけにより妊婦への葉酸のサプリメントが普及する一方で、葉酸過剰のリスクが明らかにされつつあるが、母親の葉酸過剰がもたらす胎児への影響については不明であった。

2. 研究の目的

DOHaD 説に基づいた胎児環境に着目した研究は、母胎の栄養状態が胎児にもたらす疾患の原因究明と治療に新たな道を開く可能性が考えられる。このことから、本研究では、環境要因を厳密に調整することが可能であり、遺伝学的な背景が均一（マイクロアレイ解析が可能）な C57BL/6J 系マウスを用いて、その胎児期に母動物への栄養環境を変え、妊娠期とそれが仔の世代に及ぼす影響について遺伝子学的手法、免疫組織学的手法を用いて検討することを目的として行った。

本研究のターゲットは、妊娠期全体を通じた母獣の葉酸過剰摂取が及ぼす影響を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

1-(1) C57BL/6J 系成熟雌マウスを用いて 2 群に分けて正常雄マウスと交配させ、プラグの確認後各群に組成の異なる飼料（普通飼料 CE-2 (Control: 葉酸含量 2mg/kg、以下 CN 群)、葉酸過剰付加飼料 CE-2+葉酸 (葉酸過剰食: 40mg/kg、以下 FA 群) をそれぞれ与え飼育した。プラグ確認をした日を妊娠 0 日とし、18 日目 (GD18.5) に各群の雌マウスの解剖により胎児を取り出し、性別判定、胎児数、胎児体重を測定後速やかに肝臓、膵臓、および脳を取り出し、液体窒素にて凍結保存した。また組織を検討するため、残りの胎児はホルマリン固定を行った。摂食量は毎日測定した。

1-(2) 胎児の組織に何が起きているのかを検討するために、アジレント社のチップを用いた Dye-Swap 法を用いて DNA マイクロアレイ解析により遺伝子発現の網羅的な解析を行った。さらに、DNA マイクロアレイ解析の結果からいくつかの候補遺伝子を絞り、アレイデータの検証のための PCR による検討を行った。

1-(3) 組織学的な検討として、発達に及ぼす影響を明らかにするために HE 染色および Ki-67 染色を行った。また膵臓においては膵ホルモンであるインスリン・グルカゴン・ソマトスタチン染色を行い、胎生期の葉酸過剰および葉酸欠乏が組織に及ぼす影響を検討した。

2-(1) C57BL/6J 系成熟雌マウスを用いて 3 群に分けて正常雄マウスと交配させ、プラグの確認後各群に組成の異なる飼料 (普通飼料 AIN93G (Control : 葉酸含量 2mg/kg、以下 CN 群)、葉酸過剰付加飼料 (40mg/kg、以下 FA 群)、葉酸欠乏飼料 (0.007mg/kg、以下 FD 群) をそれぞれ与え飼育した。プラグ確認をした日を妊娠 0 日とし、18 日目 (GD18.5) に各群の雌マウスより胎児を取り出し、性別判定、胎児数、胎児体重を測定後速やかに肝臓、膵臓、および脳を取り出し、液体窒素にて凍結保存した。また組織を検討するため、残りの胎児はホルマリン固定を行った。さらに、出生後の検討を行うため、同様な環境で出産させ、新生児 (出生 8 日、22 日 (PD8、22)) の組織を採取し、同様に凍結保存およびホルマリン固定を行った。

2-(2) 母親が葉酸過剰摂取した仔マウスの胎児期・新生児期・離乳期に解剖を行い、葉酸が関与する候補遺伝子や発達・生活習慣病に関わるこれらの時期における変化を検討した。

組織学的な検討としては、発達に及ぼす影響を明らかにするために肝臓・膵臓・脳 (海馬) において HE 染色および Ki-67 染色を行った。Ki-67 染色の陽性細胞数をカウントし、細胞増殖能の指標として MIB-1 Labeling index (細胞 1000 個辺りの Ki-67 陽性細胞数) を用いて 3 群間の比較を行い、胎生期の葉酸過剰お

よび葉酸欠乏が発達に及ぼす影響を検討した。

4 . 研究成果

1-(1) CE-2 (Control : 葉酸含量 2mg/kg) と CE-2+葉酸 (葉酸過剰食 : 40mg/kg) を用いて検討を行ったところ、GD18.5 における各群の母獣の体重は CN 群 (n=11) で $38.55 \pm 0.88g$ と、FA 群 (n=10) で $35.90 \pm 0.85g$ となり、2 群間に差は見られなかった。妊娠 0~18 日における各群の母獣の摂餌量は、FA 群で GD14.5 においてのみ、CN 群と比較して一過性に有意な低下が認められたものの、他の測定日においては、有意差が認められなかった。

平均胎児数は CN 群が 8.64 ± 0.39 匹、FA 群が 7.10 ± 0.59 匹であり、FA 群が CN 群に比べて有意に少なかった ($p < 0.05$)。雌雄それぞれの平均胎児体重を比較した結果、雄では CN 群で $1.10 \pm 0.02g$ 、FA 群では $1.12 \pm 0.02g$ であった。雌では CN 群で $1.07 \pm 0.01g$ 、FA 群で $1.08 \pm 0.01g$ となり、雌雄ともに有意差は見られなかった。

1-(2) DNA マイクロアレイの結果では、脳において亢進と減弱、合わせて 138 個の遺伝子が見出された。DOHaD に関連するカテゴリーを検索すると、Epigenetic Chromatin Modification Enzymes において、3つの遺伝子 (*myst3*, *esco1*, *hdac9*) Epigenetic Chromatin Remodeling Factors で 2 つの遺伝子 (*smarca2*, *chd3*) がいずれも減弱していた。神経関係では、Neurotrophin and Receptors において 2 つの遺伝子 (*nf1*, *mef2c*) がいずれも減弱していた。GPCR のカテゴリーにおいて *gpr26* 遺伝子の発現が減弱していた。また *apoa1* 遺伝子の発現が亢進していた。

肝臓においては、亢進と減弱で合わせて 68 個の遺伝子が見出された。カテゴリー解析では、NF- κ B signaling pathway 及び、免疫系に関与するカテゴリーに含まれる *Ita* 遺伝子の亢進及び *ifng* 遺伝子の減弱が見出された。

DNA マイクロアレイの結果から、葉酸の過剰摂取により発現の変動が見られた遺伝子について RT-PCR を行った結果、脳で *apoa1* 遺伝子の確認を行ったが発現亢進は確認できなかった。肝臓においては *ins2* 遺伝子、*ifng* 遺伝子、*hmgcs1* 遺伝子

、*bdnf*遺伝子はいずれも発現が減弱しており、DNA microarrayの結果と一致した。しかし、*srebf-2*遺伝子及び*hmgcr*遺伝子については、明らかな変化は観察されなかった。

1-(3) Ki-67染色を行った結果、GD18.5の肝臓ではCN群と比較してFA群で陽性細胞が増加していたが、PD8の肝臓では両群間に有意差はみられなかった。また膵臓においては膵ホルモンであるインスリン・グルカゴン・ソマトスタチン染色を行った。胎児膵臓において抗インスリン染色を行い、CN群とFA群を比較した結果、FA群でインスリン陽性細胞が減少している傾向がみられた。グルカゴン、ソマトスタチンでは両群間に変化は見られなかった。

2-(1) 胎児マウス(GD18.5)の平均体重を比較したところ、CN群(n=8)で 1.06 ± 0.08 g、FA群(n=8)で 1.10 ± 0.04 g、FD群(n=8)で 1.05 ± 0.17 gであり、3群間で有意な差は認められなかった。胎児の匹数はCN群で 7.4 ± 1.2 匹、FA群で 7.4 ± 1.8 匹、FD群で 6.8 ± 2.3 匹であり、3群間で有意差は認められなかった。

新生児マウス(PD8)の平均体重はCN群(n=8)で 3.91 ± 0.24 g、FA群(n=10)で 3.67 ± 0.31 g、FD群(n=6)で 4.01 ± 0.44 gであり、3群間で有意な差は認められなかった。新生児の匹数はCN群で 6.3 ± 2.1 匹、FA群で 6.4 ± 2.1 匹、FD群で 6.2 ± 1.9 匹であり、3群間で有意な差は認められなかった。

摂餌量についても3群間に有意な差は見られなかった。

2-(2) 免疫組織学的検討において、Ki-67染色を用いて肝臓、膵臓、脳の組織についてMIB Labeling index(陽性細胞数/細胞1000個)の検討を行った。

胎児肝臓における結果は、胎児ではCN群で 363 ± 87 、FA群では 588 ± 65 、FD群では 198 ± 80 となり、CN群に比べFA群で陽性細胞数が有意に増加していた。

新生児肝臓では、CN群で 243 ± 55 、FA群で 317 ± 24 、FD群で 286 ± 29 となり、3群間の陽性細胞数に有意な差は見られなかった。しかしながら、FA群の新生児マウス肝臓における小葉間静脈の周囲で、特にKi-67陽性細胞が多く観察された。

同様に、膵臓におけるKi-67染色によるMIB Labeling indexの検討の結果、胎児

(GD18.5)ではCN群で 210 ± 121 、FA群では 354 ± 55 、FD群では 98 ± 20 となり、CN群、FD群に比べFA群は有意に陽性細胞数の増加が有意に観察された。

また新生児(PD8)では、CN群で 147 ± 2 、FA群で 192 ± 56 、FD群で 82 ± 1 となり、FD群に比べFA群において有意に陽性細胞数が増加していた。

胎児脳(海馬)におけるKi-67染色による検討の結果、CN群と比較してFA群胎児脳において陽性細胞数が増加している傾向がみられたが、新生児脳では、3群間に差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

現在執筆中

[学会発表](計 10件)

Folic acid supplementation during pregnancy and its effect on the fetus and neonate.

Yuri Kintaka, Nobuhiro Wada, Yumika Maruo, Kouya Soba, Mayuu Fukita, Kotono Watabe, Ami Kanayama, Seiji Shioda, 13th Asian Congress of Nutrition(at PACIFICO Yokohama)

May14-18, 2015

マウスにおける妊娠期の葉酸過剰が仔の発達に及ぼす影響

曾場滉也、丸尾侑美佳、金山亜美、吹田万侑、渡部琴乃、金高有里

第12回日本栄養改善学会

北海道支部学術総会(於：藤女子大学)

平成26年12月6日

学会奨励賞受賞

マウスの妊娠期における葉酸過剰が胎児及び新生児に与える影響

丸尾侑美佳、曾場滉也、金高有里

第61回日本栄養改善学会学術総会(於：パシフィコ横浜)

平成26年8月21日

妊娠マウスにおける葉酸過剰が新生児に及ぼす影響

金高有里、曾場滉也、丸尾侑美佳、和田亘弘、塩田清二

第3回日本DOHaD研究会学術集会

(於：国立成育医療研究センター)

平成26年7月25日

高葉酸環境に曝露されたマウス胎児の組織学的観察

曾場滉也、丸尾侑美佳、和田亘弘 Randeep Rakwal、柴藤淳子、小川哲郎、塩田清二、金高有里

第 68 回日本栄養・食糧学会大会（於：酪農学園大学）
平成 26 年 6 月 1 日

マウスにおける胎児の葉酸過剰が及ぼす影響

丸尾侑美佳、曾場滉也、金高有里

第 11 回日本栄養改善学会北海道支部学術総会（於：北海道大学）
平成 25 年 12 月 1 日

妊娠期の葉酸の過剰摂取による胎児への影響

和田亘弘、小川哲郎、塩田清二、Randeep Rakwal、柴藤淳子、齋藤智美、平子哲史、中川咲、金高有里

第 67 回日本栄養・食糧学会大会（於：名古屋大学）
平成 25 年 5 月 26 日

高葉酸環境に曝露されたマウス胎児の組織学的検討

和田亘弘、金高有里、小川哲郎、Randeep Rakwal、柴藤淳子、齋藤智美、平子哲史、中川咲、塩田清二

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会（於：サンポートホール高松・かがわ国際会議場）

平成 25 年 3 月 28 日

妊娠マウスの葉酸の過剰摂取が胎児の脂質代謝に及ぼす影響

和田亘弘、金高有里、小川哲郎、Randeep Rakwal、柴藤淳子、齋藤智美、平子哲史、中川咲、塩田清二

第 27 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会（於：JA 共済ビル）
平成 25 年 2 月 23 日

低栄養環境に曝露されたマウス胎児の組織学的観察

金高有里、小川哲郎、和田亘弘、中川咲、齋藤智美、村山綾、桑形麻樹子、塩田清二

第 51 回日本先天異常学会学術集会（於：JA 共済ビル）

平成 23 年 7 月 22 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金高 有里 (Kintaka, Yuri)
酪農学園大学農食環境学群・酪農学園大学大学院・講師（～2015）
研究者番号：80420909

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：