

2012 年度

修士論文

妊娠マウスの葉酸の過剰摂取が
胎児に及ぼす影響

21134006 和田 亘弘

指導教員

臨床栄養学研究室 寺井 格 教授

酪農学園大学 大学院 酪農学研究科

食品栄養科学専攻 修士課程

本論文内では以下の略称を用いる。

BDNF : Brain-derived neurotrophic factor(脳由来神経栄養因子)

CD36 : Cluster of Differentiation 36

cDNA : Complementary Deoxyribo Nucleic Acid(相補的デオキシリ
ボ核酸)

CLPS : Colipase pancreatic

dNTP : DeoxyriboNucleotide TriPhosphate(デオキシリボヌクレオチ
ド 3 リン酸)

DTT : Dithiothreitol(ジチオトレイトール)

D.W. : Distilled Water(蒸留水)

ESCO1 : Establishment of cohesion 1 homolog 1

GD : Gestational Days(在胎日数)

GPCR : G-Protein-Coupled Receptor(G タンパク質共役受容体)

HDAC9 : Histone deacetylase 9(ヒストン脱アセチル化酵素 9)

HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase(ヒドロキシメチ
ルグルタリル CoA 還元酵素)

HMGCS1: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthesis1(ヒドロキシメチ
ルグルタリル CoA 合成酵素 1)

HSL : Hormone Sensitive Lipase(ホルモン感受性リパーゼ)

Ins2 : Insulin II (インスリン II)

LPL : Lipo Protein Lipase(リポタンパク質リパーゼ)

LTA : Lymphotoxin A(リンフォトキシン A)

MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase(分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ)

MYST3 : MYST histone acetyltransferase 3(MYST ヒストンアセチル基転移酵素)

NF- κ B : Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells

PCR : Polymerase Chain Reaction(ポリメラーゼ連鎖反応)

RNA : Ribo Nucleic Acid(リボ核酸)

R.T. : Room Temperture(室温)

RT-PCR : Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction(逆転写ポリメラーゼ反応)

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate(ドデシル硫酸ナトリウム)

S.D.W. : Sterile Distilled Water(滅菌蒸留水)

SREBP : Sterol Regulatory Element-binding Proten(ステロール調節エレメント結合タンパク質)

SOX17 : SRY-box containing gene 17

TAE : Trishydroxymethylaminomethane Acetate
EthyleneDiamineTetraAcetate(トリス酢酸エチレンジアミン四酢酸)

ZFY-1 : Zinc finger protein 1(亜鉛フィンゲータンパク質 1)

目次	
1.緒言	・ ・ ・ 1
2.材料と方法	・ ・ ・ 5
2.1 特殊飼料の作製	・ ・ ・ 5
2.2 使用動物	・ ・ ・ 5
2.3 サンプル調製	・ ・ ・ 6
2.4 性別判定	・ ・ ・ 7
2.5 RNA 抽出	・ ・ ・ 9
2.6 DNA microarray	・ ・ ・ 10
2.7 RT-PCR 用の cDNA 合成	・ ・ ・ 13
2.8 RT-PCR	・ ・ ・ 14
2.9 統計解析	・ ・ ・ 14
3.結果	・ ・ ・ 16
3.1 母動物の体重及び摂餌量	・ ・ ・ 16
3.2 胎児数及び胎児体重	・ ・ ・ 16
3.3 DNA microarray 解析	・ ・ ・ 17
3.4 RT-PCR	・ ・ ・ 19

4.考察	・ ・ ・ 20
5.総括	・ ・ ・ 27
6.謝辞	・ ・ ・ 31
7.参考文献	・ ・ ・ 32
8.図表	・ ・ ・ 41

1. 緒言

近年、Developmental Origins of Health and Disease(DOHaD)説が注目されている。DOHaD 説とは、1980 年代にイギリスの Barker らが提唱した説である。Barker らは、第二次世界大戦末期の 1944～1945 年の冬、ドイツ占領下のオランダで発生した飢饉(Dutch Hunger Winter)時に妊娠していた女性から生まれた子供達で、成人後に生活習慣病を発症するリスクが増加したことから、「胎児期から乳幼児期に至る栄養環境が成人期及び老年期の生活習慣病の発症リスクを増加させる」と報告した (Barker et al., 2004)。この DOHaD 説に基づいて世界中で様々な研究が行われてきている。胎児期の低栄養環境により出生後の心血管疾患や糖尿病などのリスクが増加することが明らかになっている(Barker et al., 1989, 1990, Hales et al., 1991, Fall et al., 2012)。また、葉酸不足による二分脊椎症や無脳症などの神経管閉鎖障害の誘発が古くから報告されている(Czeizel., 1992)。日本の厚生労働省は、妊娠時の葉酸の摂取を推奨しており、同省が作成した【日本人の食事摂取基準 2010 年版】では、18～29 歳の非妊娠時の女性に対して 1 日 200 μ g の葉酸の摂取を推奨しており、妊娠時にはその推奨量に 200 μ g を付加させ、1 日 400 μ g 摂取することと述べている(Health, Labour and Welfare Ministry., 2010)。この葉酸の摂

取量の値は欧米諸国を中心に、神経管閉鎖障害のリスク低減のために行われた米国サウスカロライナ州(Smith et al., 2007)や、カナダでの介入研究 (Food and nutrition board., 1988)の結果を基に、算出された。葉酸はビタミン B 群の 1 つでビタミン B9、ビタミン M と呼ばれる水溶性ビタミンであり、葉酸という言葉はほうれん草の葉から抽出されたことから名付けられた。葉酸には食品由来のプテロイルポリグルタミン酸(食事性葉酸)とサプリメントに含まれるプテロイルモノグルタミン酸(人工性葉酸)の 2 種類がある。プテロイルポリグルタミン酸はプテロイン酸に多数のグルタミン酸が結合しており、プテロイルモノグルタミン酸はプテロイン酸に 1 つのグルタミン酸が結合している。プテロイルポリグルタミン酸はプテロイルモノグルタミン酸と比べて生体内での利用効率が低いことが前述の食事摂取基準 2010 年版で報告されている。経口から摂取された食品由来のプテロイルポリグルタミン酸は体内で消化を受け、プテロイルモノグルタミン酸の形で小腸から能動輸送の形で吸収され、肝臓に貯蔵される。肝臓に取り込まれたプテロイルモノグルタミン酸は、肝臓中で再びプテロイルポリグルタミン酸の形に再合成され、血中及び胆汁中に放出される。その後、腸肝循環し、一部は尿中に排泄される。生体内での葉酸の代謝を Fig.1 に示した。プテロイルモノグルタミン酸はホモシステインからメチオニンへの代謝の触媒を行う栄

養素である。この葉酸の欠乏により高ホモシステイン血症(Durand et al., 1996)、無脳症、二分脊椎を引き起こすことが報告されており葉酸は妊娠時、非妊娠時に関わらず必須の栄養素である(Milunsky et al., 1989, Rao et al., 2001)。葉酸はメチル基供与体としても働き、DNAのメチル化にも関与する。このメチル化は DNA のプロモーター上の CpG 領域に起こりやすく、DNA メチルトランスフェラーゼによって葉酸からシトシンへとメチル基が受け渡される。メチル化が生じることで遺伝子は不活性化し、肝臓のグルコルチコイド受容体と PPAR α の発現が減少することが報告されている(Lillycrop et al., 2005)。また、妊娠期のメチル基供与体の欠乏によって、ヒトにおける情緒行動のリスク増加(Steenweg-de et al., 2012)や仔ラットにおいても不安行動の増加が報告(Konycheva et al., 2011)されており、葉酸という栄養素が神経管閉鎖障害を主とした形態学的異常以外にも、中枢神経系の機能的異常を誘発することが示唆されている。このように胎生期の葉酸は、重要な栄養生理的役割を果たしていると考えられるが、その詳細は未だ明らかになっていない。

これまでの研究の大半は、葉酸不足の影響について検討されたものであったが、近年の研究から妊娠初期及び中期のプテロイルモノグルタミン酸の高用量摂取(5mg/kg)は、早産や低出生体重児を防ぐ(Papadopoulou et al., 2012)一方、母体における大腸がんなどの発がん

リスクの増加(Fife et al., 2011)や亜鉛の吸収障害(Milne et al., 1984)、胎児の発生初期における発達遅延(Pickell et al., 2011)の誘発を生じることが報告されている。また、インドで行われた DOHaD 研究により、妊娠期の赤血球葉酸の高値が、低出生体重児の出産リスクの増加や、6 歳児におけるインスリン抵抗性増加をもたらし、成人後の生活習慣病に罹患するリスクを増加させることが明らかにされている(Yajnik et al., 2008)。これらのことは、これまで生活習慣病との関連が注目されていなかった胎児期の葉酸過剰曝露が生活習慣病のリスク因子に加えられる可能性を示唆している。従って、妊娠期の葉酸過剰摂取による胎児への影響を動物実験で検証することが重要であると考えた。そこで本研究では、妊娠期の葉酸過剰摂取が胎児に与える影響を明らかにすることを目的として、妊娠させたマウスに葉酸過剰食を摂餌させ、胎児に与える影響及び種々の遺伝子発現に与える影響を検討した。その結果を基に葉酸と生活習慣病との関連について DOHaD 説を基に考察を試みた。

2.材料と方法

2.1 特殊飼料の作製

プテロイルモノグルタミン酸を添加用の葉酸として和光純薬工業(大阪府)から購入し、葉酸過剰食の作製を日本クレア株式会社(東京都)に委託した。標準飼料 CE-2(以下、CN 食)に+38mg/kg の葉酸の添加を依頼し、これを葉酸過剰食(以下、FA 食)とした。

なお、CN 食には既に 2mg/kg の葉酸が含まれており、FA 食は最終的に 40mg/kg の葉酸を含有する。FA 食の葉酸含量は、Pickell et al.(2011)の報告に基づいて設定した。

2.2 使用動物

動物は、C57BL/6J 系マウス(日本エスエルシー株式会社、浜松市)を用いた。生後 6 週齢の雄マウス 6 匹、雌マウス 21 匹(18~20g)を購入し、14 日間の予備飼育後、雄 1:雌 2~3 匹で雄ゲージに一晩同居させた。翌朝、交配が行われた場合には雌マウスの膣に白い膣栓(以下、プラグ)が見られる。このプラグを確認できた日を妊娠 0 日とした。妊娠 0 日より CN 食で飼育したマウスを対照(以下、CN)群(n=11)、妊娠 0 日より FA 食で飼育したマウスを葉酸(以下、FA)群(n=10)とし、それぞれ飲水と共に自由摂取させた。実験期間を通し

て室温 20～22℃、湿度 40～60%、12 時間の明暗サイクル(明期 8:00～20:00)で飼育を行った。実験期間中、摂餌量は毎朝測定した。両群のマウスは妊娠 18 日目に母獣の体重測定後、頸椎脱臼により安楽死させ、速やかに胎児を取り出し、目的の臓器(肝臓・脳)を採取後、2mL のアシスト凍結保存チューブ(ザルスタット株式会社,東京都)に入れ、即時に液体窒素により凍結した。採取した組織は実験を行うまで-80℃で保存した。なお本実験は、酪農学園大学動物実験ガイドラインを遵守して行った。

2.3 サンプル調製

得られた組織から RNA を抽出するための前準備として、乳鉢を用い、組織をパウダー状に破碎した。実験に用いた乳棒及び乳鉢、スパーテルはあらかじめ液体窒素で冷却した。組織をパウダー状に破碎することで、同一サンプルをタンパク質解析、遺伝子解析、エピジェネティクス解析に用いることができるという利点がある。

乳棒及び乳鉢が十分に冷却されていることを確認し、乳鉢に組織を加え乳棒で粉碎した。乳棒で十分磨り潰したことを確認した後、更に力を入れて組織を磨り潰した。組織をパウダー状に磨り潰した後、スパーテルを用いて 2mL の Eppendorf チューブ(Eppendorf co, 東京都)に移し、使用まで-80℃で保存した。

2.4 性別判定

我々は、低栄養と葉酸過剰及び欠乏との間に共通して変動する遺伝子を特定することを次の段階の目的としている。そのため妊娠期の低栄養が胎児に及ぼす影響の研究結果と、葉酸により変動した遺伝子とを比較検討するため、Ogawa ら(2011)が行った条件と揃えることを目的とし、本実験での DNA microarray 解析には雄サンプルのみを用いた。万が一、1 匹でも雌が混入すると、正確な解析は行えない。そこでサンプル調製で得られたパウダーを用いて PCR 法で ZFY-1 遺伝子の発現を検出することにより胎児の雌雄判定を行った。なお、ポジティブコントロールとして第 1 染色体上に存在する SOX17 遺伝子を使用した(Ye et al., 2011)。

DNA を精製するため、以下の操作を行った。極微量のパウダーを採取し、10 μ L の 0.5% SDS(和光純薬工業,大阪府)溶液に溶解し、Block Incubator(ASTEC,福岡県)で加熱(95 $^{\circ}$ C 5 分間)した。加熱した溶液を遠心分離(15000 \times g, 2 分間, R.T.)し、得られた上清に 100 μ L の D.W. と 100 μ L のフェノールクロロホルムを加え、良く攪拌した後、遠心分離(15000 \times g, 5 分間, R.T.)した。得られた上清に 250 μ L の 100% エタノール(和光純薬工業,大阪府)と 7 μ L の 5M NaCl を加え、遠心分離(15000 \times g, 20 分間, 4 $^{\circ}$ C)し、得られた沈殿物に 250 μ L の 70% エタノールを加え、遠心分離(15000 \times g, 5 分間, 4 $^{\circ}$ C)した。得られた沈殿物

を風乾させた後、50 μ L の D.W.を加え加熱(65 $^{\circ}$ C 10 分間)し、溶解させた後、氷上で冷却し DNA サンプルとした。PCR を行うに当たり 6 μ L の EmeraldAmp PCR MasterMix(タカラバイオ株式会社,滋賀県)、0.14 μ L の Forward Primer 及び Reverse Primer、1 μ L の調製した DNA、4.72 μ L の D.W.を加え最終容量 12 μ L の反応系とした。PCR に使用したプライマーの塩基配列を Table 1 に示した。またプライマーはオペロンバイオテクノロジー株式会社(東京都)で OPC カラム精製されたものを使用した。サーマルサイクラーコンディションは 95 $^{\circ}$ C 5 分間の initial step ののち、98 $^{\circ}$ C で 10 秒間、62 $^{\circ}$ C で 30 秒 72 $^{\circ}$ C で 60 秒間の 3 ステップを 1 サイクルとし 35 サイクルの反応とし、サーマルサイクラーは S1000TM CirmalCycler(Bio-Rad,東京都)を用いた。PCR 後のサンプルを 1.6%アガロースゲル(アガロース ME, 岩井化学薬品株式会社, 東京都)にアプライ後、1 \times TAE buffer(50 \times TAE buffer, 株式会社ニッポンジーン, 東京都)を用いて電気泳動(100V, 25 分間)を行い、エチジウムブロマイド(和光純薬工業,大阪府)を 10ng/ μ L 加えて 10 分間染色を行った。撮影及び解析は ChemidocTM XRS⁺ with ImageLabTM (Bio-Rad,東京都)を用い、出現したバンドで性別を確認した。ZFY-1 は Y 染色体に位置する遺伝子で雄の胎児組織のみで、200bp の位置にバンドが出現する(Nagamine et al., 1990)。SOX17 は雌雄に関係なく 400bp の位置にバンドが出現するため、200bp にバ

ンドが出現したサンプルを雄と判定することができた(Fig.2)。

2.5 RNA 抽出

RNA 抽出には、RNeasy Mini Kit(QIAGEN, U.S.A)を用いた。サンプル調製により得られたパウダーに 1mL の QIAzolLysis Reagent(QIAGEN, U.S.A)を加えて溶解させ、よく攪拌した後、5 分間静置した。その後、200 μ L のクロロホルム(和光純薬工業,大阪府)を加えて攪拌後、5 分間静置し、遠心分離(15000 \times g, 15 分間, 4 $^{\circ}$ C)を行った。次に、沈殿層を吸わないように上清を回収し、新しいチューブに移した。その後、550 μ L の 70%エタノールを加え、よく混ぜた後カラムチューブに溶液を移し、遠心分離(8000 \times g, 15 秒間, R.T.)を行った。遠心分離後、350 μ L の RW1[®]buffer を加え、再び遠心分離(15000 \times g, 15 秒間, R.T.)を行った。その後、80 μ L の DNase I incubation mix(QIAGEN, U.S.A)を加えて 15 分間静置した。静置後、カラムチューブに 350 μ L の RW1[®]buffer を加えて遠心分離(15000 \times g, 15 秒間, R.T.)した後、500 μ L の RPE[®]buffer を加え遠心分離 (15000 \times g, 15 秒間, R.T.)を行った。遠心分離後、再び 500 μ L の RPE[®]buffer を加え再度遠心分離(15000 \times g, 1 分間, R.T.)を行った。遠心分離後、カラムチューブを 2mL のチューブに移し遠心分離(15000 \times g, 2 分間, R.T.)を行った後、カラムチューブを 1.5mL のチューブに移し、40 μ L の

RNase-Free Water を加えて 1 分間静置後、遠心分離(15000×g, 1 分間, R.T.)を行った。得られた 2μL の RNA 溶液を Nanodrop (BIO-RAD, 東京都)に載せ、吸光度 260/280 及び 260/230 の比率を測定した。一定条件以上に精製(260/280 \geq 1.8, 260/230 \geq 1.8)されたサンプルを RNA が抽出されたとみなし、そのサンプルに対してホルマリンアガロース電気泳動(50V, 45 分間)を行った。電気泳動の方法は、QIAGEN 社の RNeasy mini Handbook に記載されている方法に従った(P.67～P.69)。電気泳動を行い、rRNA の 18S 及び 28S が明瞭に確認できたサンプルを DNA microarray に用いた(Fig.3)。

2.6 DNA microarray

赤色の Cy3 及び緑色の Cy5(Cyanine CTP Dye, Agilent Technology, 東京都)の 2 種類の蛍光色素を入れ替える Dye-swap 法を用いて、DNA microarray を行った。Dye-swap 法とは、1 試験区内において CN 群を Cy3 でラベリングし、FA 群を Cy5 でラベリングしたのに対して、もう 1 つの試験区内において Cy3 と Cy5 を入れ替えた 2 群間で比較検討する方法である。Cy3 と Cy5 の分子構造が異なることから、標識とするサンプルへの取り込み効率や分解に差が生じるため、色素を入れ替えてハイブリダイズさせ、DNA microarray 解析の精度を高めた。解析は各群の組織を 2 つのグループにプールして行った。

すなわち CN 群の最初の 6 匹の組織を CN 群第 1 グループとし、残りの 5 匹を CN 群第 2 グループとした。FA 群も同様に最初の 5 匹を FA 群第 1 グループとし、残りの 5 匹を FA 群第 2 グループとした。両群の第 1 グループ及び第 2 グループを別々のチップで 2 度解析することにより、2 グループで共通して変動した遺伝子を葉酸により変動した遺伝子と評価した。我々は、Dye-swap 法と併せて 2 グループで共通して変動する遺伝子を同定することで DNA microarray 解析の精度を高めた。

DNA microarray に用いるサンプルは以下の手順で調製した。

まず、分けた各群の RNA 溶液を混ぜあわせ、最終溶液濃度を 100ng/ μ L になるように調整した。cDNA の合成及び cRNA の合成には LowInput QuickAmp Labeling Kit(Agilent Technology, 東京都)を用いた。0.8 μ L の T7 promoter primer、2 μ L の RNA 溶液、2 μ L の SpikeA、B 溶液、0.5 μ L の Nuclease-FreeWater を加え計 5.3 μ L の溶液を調製し、65 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した。加熱した溶液に 2 μ L の 5 \times First Strand Buffer、1 μ L の 0.1M DTT、0.5 μ L の 10mM dNTP、1.2 μ L の Affinity Script RNase Block mix を加え計 10.0 μ L の cDNA mix 溶液を調製し、40 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし、その後、70 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートし、cDNA 溶液を作製した。cDNA 溶液に 5.4 μ L の 5 \times Transcription buffer、0.6 μ L の 0.1M DTT、1 μ L の NTPmix、0.21 μ L の T7 RNA

Polymerase Blend、0.24 μ L の Cy3-CTP(or Cy5-CTP)を加え 40 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし、cRNA 溶液を作製した。cRNA の精製は RNeasy Mini kit(QIAGEN, U.S.A.)を用いた。cRNA 溶液に 84 μ L の Nuclease-free water を加え、その後 350 μ L の RLT[®]buffer を加え、Wash を行った。その後 250 μ L の 100%エタノールを加え RNeasy mini column に溶液を移し、遠心分離(15,000 \times g, 30 秒間, R.T.)を行った。その後 500 μ L の RPE[®]buffer を加え Wash する操作を 2 回繰り返した。Wash 後 RNeasy mini column を 2mL の Eppendorf チューブに移し、風乾させた後、50 μ L の RNase-free water を加えた。その後遠心分離 (15000 \times g, 1 分間, R.T.)を行い、精製された cRNA 溶液を得た。得られた溶液は Nanodrop を用いて精製度及びラベリングの度合いを確認した。ハイブリダイゼーション溶液の調製には Agilent Gene Expression Hybridization Kit(Agilinet Technology, 東京都)を用いた。精製した cRNA 溶液から 825ng の RNA が含まれるように濃度調整を行い、その後、11 μ L の 10 \times blocking agent、52.8 μ L の Nuclease-free water、2.2 μ L の 25 \times Fragmentation Buffer を加えた後、60 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱した。その後、55 μ L の 2 \times GEx Hybridization buffer を加えハイブリダイゼーション溶液を作製した。作製した溶液 100 μ L をマウス 4 \times 44K Whole genome oligo DNA microarray chip(G4122F, Agilent Technology, 東京都)に載せ、dye-swap 法を用いて 65 $^{\circ}$ C で 17 時間ハ

イブリダイズさせた。その後、G2505C DNA microarray scanner high resolution(Agilent Technology, 東京都)を用いて網羅的に遺伝子発現の変動を検出した。

データの解析は Hori ら(2012)の方法に従って行った。既知の遺伝子を 113 のカテゴリーに分け、今回検索された遺伝子がいずれのカテゴリーに含まれるか、またサブカテゴリーに含まれるかを確認することにより解析した(Table 2)。以下、カテゴリー名はイタリック表記で示す。

2.7 RT-PCR 用の cDNA 合成

cDNA の合成は以下の手順で行った。cDNA の合成は Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit(Agilent Technology, 東京都)を使用した。各群から最終濃度を 100ng/ μ L になるように RNA を集め、そこに 10 μ L の first strand master mix、3 μ L の oligo(dT)primer、1 μ L の Affinity Script RT-RNase Block enzyme mixture、S.D.W.を加え総量 20 μ L の溶液を調製し、25 $^{\circ}$ C で 5 分間、42 $^{\circ}$ C で 5 分間、55 $^{\circ}$ C で 40 分間、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、cDNA を合成した。得られた cDNA 溶液に 30 μ L の S.D.W.を加えた後、実験に使用した。

2.8 RT-PCR

DNA microarray 解析により検索された遺伝子及び生活習慣病に関連する遺伝子のうち、興味のあるものの発現を RT-PCR で確認した (APOA1, Ins2, IFNG, HMGCS1, MAPK8, HMGCR, SREBF-2, BDNF,)。RT-PCR に用いたプライマー及びその塩基配列については Table1 に示した。またプライマーはオペロンバイオテクノロジー株式会社(東京都)で OPC カラム精製されたものを使用した。6 μ L の Emerald PCR Master Mix、0.14 μ L の Forward primer 及び Reverse primer、0.6 μ L の cDNA 溶液、5.12 μ L の S.D.W.を加え最終容量 12 μ L の反応系とした。サーマルサイクラーコンディションは 97 $^{\circ}$ C で 5 分間の initial step の後、95 $^{\circ}$ C で 45 秒間、55 $^{\circ}$ C で 45 秒間、72 $^{\circ}$ C 60 秒間の 3 ステップを 1 サイクルとし、20~45 サイクル繰り返した。T_m 値はプライマーの設計に併せてその都度変更した。撮影及び画像解析は ChemidocTM XRS⁺ with ImageLabTM (Bio-Rad,東京都)を用いた。各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である β -actin の RT-PCR を行い、その発現に対する比率で示した。

2.9 統計解析

胎児に関するデータ解析では、同腹での値を平均し、平均値を 1

単位として扱った。母獣体重、母獣摂餌量、胎児体重及び胎児数は Mean±SEM で示し、検定はデータの正規性を確認するために、Shapiro-wilk 検定を行った。その後、2 標本 t 検定を行い、有意水準は 5%未満とした ($p < 0.05$)。なお、解析用ソフトウェアには SPSS for Macintosh ver.20.0(IBM, 東京都)を用いた。

3.結果

3.1 母動物の体重及び摂餌量

Fig.4に妊娠18日目における各群(CN:n=11, FA:n=10)の母獣の体重を示した。CN群で $38.55\pm 0.88\text{g}$ と、FA群 $35.90\pm 0.85\text{g}$ で2群間に差は見られなかった。

Fig.5に妊娠0~18日における各群(CN:n=11, FA:n=10)の母獣の摂餌量を示した。FA群で妊娠14日目においてのみ、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。14日目でCN群 $6.55\pm 0.61\text{g}$ と、FA群 $5.00\pm 0.28\text{g}$ であり、FA群がCN群に比べて有意に少なかった($p<0.05$)。前日の値に比しFA群では低下が少なく、CN群では上昇が著しいため、偶発的にCN群で上昇し有意差が生じたように考えられた。

3.2 胎児数及び胎児体重

平均胎児数はCN群が 8.64 ± 0.39 匹、FA群が 7.1 ± 0.59 匹であり、FA群がCN群に比べて有意に少なかった($p<0.05$, Fig.6)。雌雄それぞれの平均胎児体重を比較した結果、雄CN群で $1.10\pm 0.02\text{g}$ 、雄FA群で $1.12\pm 0.02\text{g}$ であり、雌CN群で $1.07\pm 0.01\text{g}$ 、雌FA群で $1.08\pm 0.01\text{g}$

であり、雌雄ともに有意差は見られなかった(Fig.7)。

3.3 DNA microarray 解析

本研究では、DNA microarray 解析を行う際に、dye-swap 法を用いてアレイ解析の精度を高めている。また、各群の組織を2つのプールにし、プール間で共通して変動した遺伝子を RT-PCR で追跡することでも DNA microarray 解析の精度を高めている。発現変動をどの程度まで追跡するかは各研究内容で異なるが、我々は葉酸の過剰曝露により胎児遺伝子の僅かな変化を追跡することを考え、発現亢進を 1.5 倍以上、発現減弱を 0.75 倍以下に設定した。また、Ogawa et al.(2011)も同様の変動量を追跡していたことから、本研究においても同様の変動量を設定した。DNA microarray の結果から CN 群に比し、FA 群で 1.5 倍以上の発現亢進、あるいは 0.75 倍以下の減弱が認められた遺伝子を検索し、Table 3,4,5,6 に示した。

脳で発現が亢進した遺伝子はグループ 1 で 352 個、グループ 2 で 96 個、グループ間で共通した遺伝子が 3 個だった。発現が減弱した遺伝子はグループ 1 で 346 個、グループ 2 で 492 個、グループで共通して変動した遺伝子は 135 個であった(Fig.8)。

肝臓で発現が亢進した遺伝子はグループ 1 で 863 個、グループ 2 で 445 個、グループ間で共通の遺伝子は 30 個であった。発現が減弱

した遺伝子はグループ 1 で 662 個、グループ 2 で 441 個、グループ間で共通の遺伝子は 38 個だった(Fig.9)。カテゴリー解析の結果を Table 7,8 に示した。上述のように脳のアレイ解析では、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。なお、MEF2C においては *Neurogenesis and Neural Stem cells* のカテゴリーにも含まれるものであった。*GPCR* のカテゴリーにおいて、オーファン受容体に属する GPR26 遺伝子の発現が減弱していた。また、*Atherosclerosis* 及び *Alzheimer's Disease* に属する APOA1 遺伝子の発現が亢進していた(Table 7)。

肝臓のカテゴリー解析では、*NF- κ B signaling pathway* 及び、*Th1-Th2-Th3* などの免疫系に関与するカテゴリーに含まれる遺伝子である LTA 遺伝子及び IFNG 遺伝子が見出された。また、*Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptors*、*Autophagy*、*Molecular Toxicology Patyway Finder*、*Inflammasomes*、*Skeltal Muscle*、*P13K-AKT Signaling*、*Unfolded Protein Response* の計 7 つのカテゴリーに属する MAPK8 遺

伝子の発現減弱が見出された。DOHaD 関連で興味のあるカテゴリーを見ると、*Atherosclerosis* 及び *Diabetes* において、上述の IFNG 遺伝子が、*Obesity* において *Ins2*, *CLPS*, *BDNF* の 3 つの遺伝子の発現がいずれも減弱していた。また、*Amino Acid Metabolism* において *HMGCS1* 遺伝子の発現が減弱していた。

3.4 RT-PCR

DNA microarray の結果から、葉酸の過剰摂取により発現が変化すると考えられた遺伝子について検討するため、サンプルを各群内で 2 群に分け RT-PCR を行った。脳で *APOA1* 遺伝子の確認を行ったが発現亢進は確認できず、DNA microarray の結果と相反した結果が得られた (Fig.10)。

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。また、*MAPK8* 遺伝子は DNA microarray の結果では発現が減弱していたが、RT-PCR では上述の変動を確認できず、DNA microarray の結果と相反した結果が得られた (Fig.11)。

4. 考察

本研究では、母親の妊娠期における葉酸の過剰摂取が胎児にどのような影響を及ぼすかについて C57BL/6J マウスを用いて検討した。妊娠 0 日～18 日に葉酸過剰食を与え、胎生 18 日の脳及び肝臓について DNA microarray 解析を行った。解剖時の胎児に関する観察で、FA 群の生存胎児数が僅かではあるが CN 群と比較して減少し、着床阻害あるいは胚子の初期死亡が示唆された。これまでの報告では、本研究と同用量の葉酸過剰食を摂取させた妊娠マウスでは、コントロール群と比較して着床数に有意な差は見られていない(Pickell et al., 2011)。これはマウスの系統差によるものであることが考えられる。通常では胎児数の減少は胎児体重の増加につながるが、本研究の胎児体重には減少傾向が認められた。これまでの報告においても、葉酸の過剰曝露によって胎生中期(胎生 14 日)における胚子重量の低下が報告されている(Pickell et al., 2011)。以上のことから、葉酸の過剰曝露が胎児の発育遅延を誘発することが示唆された。

近年、DNA microarray 技術の進歩により、膨大な遺伝子発現の解析を迅速に行うことができるようになった。DNA microarray 解析はチップ上に配置された約 44,000 個のプローブと cRNA をハイブリダイズし、Cy3 もしくは Cy5 の強度によって、発現量の差を検討する

方法である。このため、1 度に多量のデータが得られる反面、一般的に遺伝子の検討に用いられる RT-PCR 及びリアルタイム PCR に比べると感度は落ちる。DNA microarray 解析は、高価な技術であるため何例かの組織をプールして解析を行うことが多い。しかし、プールすることは個体間差の配慮を欠くという欠点につながり、各個体での RT-PCR で変動を確認できないケースが多発する。近年、Ogawa ら(未公表データ)は、各群を 2~3 のプールに分け、2~3 アレイを用いて解析を行うと、変動した遺伝子を RT-PCR で確認される率が極めて高まる結果を得ている。本研究においても、サンプルを 2 つのプールに分け、プール間で共通して変動する遺伝子を検索することにより、アレイ解析の精度を高めた。その結果、脳では 3 個の遺伝子発現の亢進、135 個の遺伝子発現の減弱、肝臓では 30 個の遺伝子発現の亢進、38 個の遺伝子発現の減弱が確認された。変動した遺伝子のカテゴリ解析の結果、次に述べるような 4 つの興味深い遺伝子を見出すことができた。

第 1 に、IFNG 遺伝子の発現に減弱が認められたことである。この遺伝子はインターフェロン γ をコードする遺伝子である。インターフェロン γ は免疫系で働くことがよく知られており、胎児の肝臓は造血器官として働くことを考えると、IFNG 遺伝子の発現変動は、免疫系の発達に葉酸が関与する可能性を示唆している。インターフ

インターフェロン γ は Th1 細胞によって調節を受けヘルパーT 細胞から放出される。また、インターフェロン γ 自身も Th1 細胞を調節し、インターフェロン γ が増加することで Th1 細胞から更にインターフェロン γ が分泌される。インターフェロン γ は気管支喘息を引き起こすファクターの 1 つであり、血中インターフェロン γ の増加により気管支喘息を引き起こすことや、妊娠期の葉酸の摂取により幼児期に気管支喘息の発症リスクが増加することが報告されている (Whitrow et al., 2009)。しかし、本研究の結果では妊娠期の葉酸の過剰摂取により胎児期において IFNG 遺伝子の発現減弱が認められたことは、インターフェロン γ の低下すなわち気管支喘息の罹患リスクの低下を示唆し、これまでの研究の結果と異なっている。また、Troen ら (2006)により更年期以降の女性に葉酸を過剰投与することで、自然免疫系へ影響を及ぼす(ナチュラルキラー細胞の細胞毒性が有意に低下する)という結果が報告されている。以上のことを総合的に考えると、葉酸は成熟後のインターフェロン γ を中心とした免疫機能に影響を与えることは明白であるが、その詳細については更なる検討が必要と考えた。免疫系で注目したインターフェロン γ の欠乏によって、耐糖能の改善及び体重減少を示すことが近年明らかになっている (Wong et al., 2011)。この事実は葉酸過剰により IFNG 遺伝子が低下すると出生時のインスリン抵抗性が下がる可能性があることを

示唆している。胎生期の葉酸過剰摂取によるインスリン抵抗性の低下が出生後の糖代謝にどのような影響を及ぼすかについては今後の課題である。

第 2 としては、**Ins2** 遺伝子の発現減弱が認められたことである。この遺伝子は糖質及び脂質の代謝に関わるインスリン II をコードする遺伝子である。インスリンにはヒトで一般的に知られているインスリン I と、齧歯類特異的であり、胎生期の間は肝臓でも発現することが知られているインスリン II の 2 種類が報告されている (Giddings et al., 1990)。興味深いことに、**Ins2** 遺伝子に変異をもつ Akita マウスでは糖尿病を誘発することが知られている (Grasemann et al., 2012)。このことから、葉酸過剰摂取が児の **Ins2** 遺伝子の発現減弱を介して、出生後の糖尿病誘発リスクに関与する可能性が考えられる。しかし、**Ins2** 遺伝子は齧歯類のみにおいて発現する遺伝子であるので、単純にヒトへの外挿は難しいと考えられる。また、齧歯類を用いての DOHaD 研究においては、このような齧歯類特異的な遺伝子の発現変動があることについて留意して結果の解析を行う必要がある。

第 3 に **BDNF** 遺伝子の変動がある。**BDNF** 遺伝子は **BDNF** 蛋白質をコードする遺伝子であるが、葉酸過剰摂取によって発現の減弱が認められた。**BDNF** 蛋白質は標的細胞表面上にある特異的受容体

TrkB に結合し、神経細胞の生存・成長・シナプスの機能亢進に働く液性タンパク質である。近年の研究から BDNF 遺伝子は神経組織以外でも発現が認められ、肥満及び過食症の誘発に関与することも報告されている(Unger et al. 2007)。肥満モデルマウスに BDNF 蛋白質を投与することによって、糖代謝及び脂質代謝を改善することも明らかになっている(Tsuchida et al., 2002, Kuroda et al., 2003)。このことから、葉酸過剰摂取は BDNF 遺伝子の発現減弱を介して、出生後の肥満の誘発に関与することが示唆された。

第 4 の注目遺伝子としては、*Amino Acid Metabolism* のカテゴリーに含まれ、コレステロール合成にも関与する HMGCS1 遺伝子(Vock et al., 2008, Suzuki et al., 2010)がある。この遺伝子は葉酸の過剰摂取で発現が減弱したため、過剰摂取動物ではコレステロール合成の低下が引き起こされることが示唆された。McNeil ら(2008, 2009)は、妊娠期の葉酸の欠乏により胎児期の肝臓において、脂質代謝に関与する SREBP-1c 遺伝子、アセチル CoA カルボキシラーゼ 1 遺伝子及び CD36 遺伝子の発現減弱、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子の発現亢進を報告している。逆に葉酸を過剰摂取させた本研究では、これらの遺伝子が逆方向に変動することはなかった。このことから、同じ栄養素でも過剰摂取させた場合と欠乏させた場合に変動する遺伝子が異なることが示唆された。

妊娠ラットに葉酸過剰食(5mg/kg)を摂取させると、PPAR α 、PPAR γ 、LXR α などの遺伝子発現が有意に低下するという報告(Chmurzynska et al., 2012)もあるが、マウスを用いた本研究では、これらの遺伝子発現に変化は認められなかった。このことから、葉酸の影響について種差が存在する可能性もあり、この結果を人に外挿する際は注意しなければならない点であると考えられた。

胎生期に加え、新生時期から幼若時期における環境も個体の遺伝子発現を老齢期に至るまで変動させることが知られている(Weaver et al., 2004)。胎生期の影響を検討する上で、出生後の飼育環境を管理することは非常に重要なことであるが、出生児数及び母動物の保育行動を実験的に均一にすることは困難である。従って、胎生期の影響の評価においては、曝露直後に相当する胎生末期での解析と出生後の解析の両者を行う必要がある。本研究では、胎生末期を中心に解析を行ったが、本研究で認められた変化が成熟期まで至るか否かについては今後の課題である。

本研究の結果から、妊娠期の葉酸の過剰摂取が胎児の免疫系、糖代謝並びに脂質代謝に対して影響を及ぼすことが示唆された。そのメカニズムとして、エピジェネティックな変化を介することが本研究から示唆された。すなわち、DNA microarrayの結果からエピジェネティクスのカテゴリーに属する遺伝子である *Myst3*、*Esco1*、*Hdac9*

などヒストンのアセチル化及び脱アセチル化に関与する遺伝子に変動が観察された。ヒストンタンパク質がアセチル化修飾を受けることで、ヒストンと DNA との巻きつきが緩くなり、また脱アセチル化が生じることでヒストンと DNA との巻きつきが強くなることで遺伝子の発現が制御されることは良く知られている(Miremedi et al., 2007)。更に葉酸自身はメチル基供与体として働き、DNA のプロモーター上に結合することでメチル化を引き起こし、様々な遺伝子の発現制御を行う。本研究の結果から、葉酸過剰摂取がエピジェネティクス関連遺伝子の調節を介することにより、様々な遺伝子の発現を変化させることが強く示唆された。本研究では、胎児組織での遺伝子発現を検討したが、ここで見出した変化が出生後も継続する可能性を明らかにするためには、更に DNA のメチル化解析を行う必要がある。

本研究の結果からは、上述した以外に多くの機能不明遺伝子の発現変化も見出された。これらの遺伝子に関しては、更に葉酸欠乏による影響の検討の結果などを踏まえた上で数を絞り、検討を進めることにより新たな DOHaD 責任遺伝子の発見につながることを期待される。

5.総括

近年、注目されている **Developmental Origins Health and Disease(DOHaD)**説では、「胎児期から乳幼児に至る栄養環境が成人期及び老年期の生活習慣病の発症リスクを増加させる」ことが提唱されている。発達期の栄養を考えた時、葉酸は胎児の発達において必要不可欠な栄養素であり、その欠乏によって二分脊椎、無脳症などの神経管閉鎖障害の発症リスクが増加することが報告されており、厚生労働省では妊娠時の葉酸の摂取を推奨している。一方で妊娠時に葉酸を過剰摂取すると、母体の大腸がんのリスクの増加や亜鉛の吸収障害が生じることが最近明らかになっている。このことは葉酸の過剰摂取が生体に種々の影響を与えることを示唆するが、現在葉酸の過剰摂取が胎児に及ぼす影響について検討した報告はされていない。そこで本研究では母親の妊娠期における葉酸の過剰摂取が胎児にどのような影響を及ぼすかについて **C57BL/6J** マウスを用いて検討した。妊娠 0 日～18 日に葉酸過剰食を与え、胎生 18 日の脳及び肝臓について **DNA microarray** 解析を行った。葉酸の過剰摂取によって胎児の脳では 3 個の遺伝子発現が亢進し、135 個の遺伝子発現が減弱した。肝臓では 30 個の遺伝子発現が亢進し、39 個の遺伝子発現が減弱していた。同定した変動遺伝子の中で胎児肝臓において、

免疫系に關与する IFNG、糖代謝に關与する Ins2、糖代謝並びに脂質代謝に關連する BDNF、コレステロール合成に關与する HMGCS1 の発現減弱が確認された。これらの遺伝子の變動から妊娠期の葉酸の過剰摂取によって免疫能の低下、糖質、脂質代謝の低下が起きている可能性が示唆された。このことは、欠乏が問題とされていた葉酸の過剰摂取も胎児に悪影響を及ぼす可能性があることを示した。今後、葉酸欠乏の影響との比較を試みるとともに胎児期の影響が新生児及び成熟後の生体機能にどのような変化をもたらしていくのかを解明していく必要がある。

Barker DJ have propounded “the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis proposes that environmental conditions during fetal and early post-natal development influence lifelong health and capacity through permanent effects of growth, structure and metabolism” (J epidemiol community health. 2004). One such “environmental factor” is the vitamin – folic acid (FA). The risk of having fetus affected with neural tube defects can be reduced by maternal periconceptional FA supplementation (Health, Labor and Welfare Ministry of Japan). Previous studies have reported that high intake of FA during pregnancy causes many adverse effects in pregnant women. However, the effect of excessive intake of FA on the fetus has not been reported. This study investigated the effects of excessive intake FA during pregnancy on the fetus in a mice model.

In this study, mice were fed control (CN) diet (FA content: 2 mg/kg) and FA (40mg/kg) diet for gestational day (GD) 0 to 18. The CN and FA groups were supplied with chow *ad libitum* until sacrifice. The brain and liver were removed from the fetus after dams were sacrificed on GD18. As this study was directed toward identifying the molecular factors affected by FA content in the diet, we utilized the high-throughput whole genome DNA microarray (Agilent 4x44K) analysis for screening

genome-wide transcriptomic changes in the brain and liver. In the fetal brain, three genes were found to be up-regulated while 135 genes were down-regulated after FA treatment. In the fetal liver 30 and 39 genes were up-regulated and down-regulated by FA. Some of the differentially expressed genes after FA treatment, namely IFNG, BDNF, Ins2, and HMGCS1 that are down-regulated in the fetal liver were also confirmed by semi-quantitative RT-PCR analysis. Our study suggests that high FA intake may have adverse effects on fetal mouse development including some changes in the metabolism. Further studies will be required to consider the genetic effects by excessive FA and to know whether the effects are also observed post-natal and during adult span.

6.謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導ご鞭撻頂きました酪農学園大学給食経営管理学研究室 金高有里講師、中川咲様、臨床栄養学研究室 寺井格教授、獣医学群 獣医保健看護学類 動物看護学 北澤多喜雄教授、実験のご指導を頂きました筑波大学大学院生命環境科学研究科 Randeep Rakwal 教授、昭和大学第一解剖学教室 柴藤淳子様、齋藤智美様、平子哲史博士研究員、小川哲郎講師、塩田清二教授に厚く御礼申し上げます。

7.参考文献

Barker DJ: Developmental origins of adult health and disease. *J epidemiol community health.* 58: 114-115, 2004.

Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME: Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.* 298(6673): 564-567, 1989.

Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ: Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ.* 301(6746): 259-262, 1990.

Chmurzynska A, Stachowiak M, Gawecki J, Pruszyńska Oszmerek E, Tubacka M: Protein and folic acid content in the maternal diet determine lipid metabolism and response to high-fat feeding in rat progeny in an age-dependent manner. *Genes Nutr.* 7: 223-234, 2012.

Czeizel AE, Dudas I: Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med.* 327(26): 1832-1835, 1992.

Durand P, Fortin LJ, Lussier-Cacan S, Davignon J, Blache D:

Hyperhomocysteinemia induced by folic acid deficiency and methionine load—applications of a modified HPLC method. *Clin Chim Acta.* 252(1): 83-93, 1996.

Fall CH: Fetal programming and the risk of noncommunicable disease.

Indian J Peadiatr. (Epub ahead of print) 2012.

Fife J, Raniga S, Hider PN, Frizelle FA: Folic acid supplementation and colorectal cancer risk : a meta-analysis. *Colorectal Dis.* 113(2): 132-137, 2011.

Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Folate. In: Institute of Medicine, ed:Dietary reference intakes: for thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline.

National Academy Press, Washington D.C.: 196–305, 1998

Giddings SJ, Carnaghi LR: Selective expression and developmental regulation of the ancestral rat insulin II gene in fetal liver. *Mol Endocrinol.* 4(9): 1363-1369, 1990.

Grasemann C, Devlin MJ, Rzczkowska PA, Hermann R, Horsthemke B, Hauffa BP, Grynypas M, Alm C, Bouxsein ML, Palmert MR: Parental Diabetes: The Akita mouse as a model of the effects of maternal and paternal hyperglycemia in wildtype offspring. PLoS one. 7(11):1-11, 2012.

Health, Labour and Welfare Ministry: Dietary reference intakes. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/sessyu-kijun.html>, 2010.

Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD: Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. BMJ. 303(6809): 1019-1022 1991.

Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Nakamura K, Wada Y, Tsuchikawa D, Yoshikawa A, Tamaki K, Shioda S: Unraveling the ischemic brain transcriptome in a permanent middle cerebral artery occlusion mouse by DNA microarray analysis. Dis Model Mech. 5(2): 270-283, 2012.

Konycheva G, Dziadek MA, Ferguson LR, Krageloh CU, Coolen MW, Breier BH: Dietary methyl donor deficiency during pregnancy in rats shapes learning and anxiety in offspring. *Nutr Res.* 31(10): 790-804, 2011.

Kuroda A, Ymasaki Y, Matsuhisa M, Kubota M, Nakahara I, Nakatani Y, Hoshi A, Gorogawa S, Umayahara Y, Itakura Y, Nakagawa T, Taiji M, Kajimoto Y, Hori M: Brain-derived neurotrophic factor ameliorates hepatic insulin resistance in Zucker fatty rats. *Metabolism.* 52(2): 203-208, 2003.

Lillycrop KA, Philips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC: Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevented epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr.* 135(6): 1382-1386, 2005.

McNeil CJ, Hay SM, Rucklidge GJ, Reid M, Duncan G, Maloney CA, Rees WD: Disruption of lipid metabolism in the liver of the pregnant rat fed folate-deficient and methyl donor-deficient diets. *Br J Nutr.* 99(2): 262-271, 2008.

McNeil CJ, Hay SM, Ruckidge GJ, Reid MD, Duncan GJ, Rees WD:
Maternal diets deficient in folic acid and related methyl donors modify
mechanisms associated with lipid metabolism in the fetal liver of the rat.
Br J Nutr. 102(10): 1445-1452, 2009.

Milne DB, Canfield Wk, Mahalko JR, Sandstead HH: Effect of oral folic
acid supplements on zinc, copper, and iron absorption and excretion. Am
J Clin Nutr. 39(4): 535-539, 1984.

Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ,
Willett W: Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy
reduces the prevalence of neural tube defects. JAMA. 262(20):2847-2852,
1989.

Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, Caldas C: Cancer genetics of
epigenetics genes. Hum Mol Gemet. 16(1):28-49, 2007.

Nagamine CM, Chan K, Hake LE, Lau YF: The two candidate
testis-determining Y genes (Zfy-1 and Zfy-2) are differentially expressed
in fetal and adult mouse tissues. Genes Dev. 4(1): 63-74, 1990.

Ogawa T, Rakwal R, Shibato J, Sawa C, Saito T, Murayama A, Kuwagata M, Kageyama H, Yagi M, Satoh K, Shioda S: Seeking gene candidates responsible for developmental origins of health and disease. *Congenit Anom (Kyoto)*. 51(3): 110-125, 2011.

Papadopoulou E, Stratakis N, Roumeliotaki T, Sarri K, Merlo DF, Kogevinas M, Chatzi L: The effect of high doses of folic acid and iron supplementation in early-to-mid pregnancy on prematurity and fetal growth retardation: the mother-child cohort study in Crete, Greece (Rhea study). *Eur J Nutr.* (Epub ahead of print): 2012.

Pickell L, Brown K, Li D, Wang XL, Deng L, Wu Q, Selhub J, Luo L, Jerome-Majewska L, Rozen R: High intake of folic acid disrupts embryonic development in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 91(11): 8-19, 2011.

Rao S, Yajnik CS, Kanade A, Fall CH, Margetts BM, Jackson AA, Shier R, Joshi S, Rege S, Lubree H, Desai B: Intake of micronutrient-rich foods in rural Indian mothers is associated with the size of their babies at birth: Pune Maternal Nutrition Study. *J Nutr.* 131(4): 1217-1224,2001.

Smith AD: Folic acid fortification:the good, the bad, and the puzzle of vitamin B-12. *Am J Clin Nutr.* 85(1): 3-5, 2007.

Steenweg-de Graaff J, Roza SJ, Steegers EA, Hofman A, Verhulst FC, Jaddoe VW, Tiemeier H: Maternal folate status in early pregnancy and child emotional and behavioral problems: the Generation R Study. *Am J Clin Nutr.* 95(6): 1413-1421, 2012.

Suzuki R, Lee K, Jing E, Biddinger SB, McDonald JG, Montine TJ, Craft S, Kahn CR: Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. *Cell Metab.* 12(6): 567-579, 2010.

Troen AM, Mitchell B, Sorensen B, Wener MH, Johnston A, Wood B, Selhub J, McTiernan A, Yasui Y, Oral E, Potter JD, Ulrich CM: Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. *J Nutr.* 136(1): 189-194, 2006.

Tsuchida A, Nonomura T, Nakagawa T, Itakura Y, Ono-Kishino M, Yamanaka M, Sugaru E, Taiji M, Noguchi H: Brain-derived neurotrophic

factor ameliorates lipid metabolism in diabetic mice. *Diabetes Obes Metab.* 4(4): 262-269, 2002.

Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M: Selective deletion of *Bdnf* in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *J Neurosci.* 27(52): 14265-14274, 2007.

Vock C, Doring F, Nitz I: Transcriptional regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase genes by human ACBP. *Cell Physiol Biochem.* 22(5-6): 515-524, 2008.

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Secki JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ: Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 7(8): 847-854, 2004.

Whitrow MJ, Moore VM, Rumbold AR, Davies MJ: Effect of supplemental folic acid in pregnancy on childhood asthma: a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol.* 170(12): 1486-1493, 2009.

Wong N, Fam BC, Cempako GR, Steinberg GR, Walder K, Kay TW, Proietto J, Andrikopoulos S: Deficiency in interferon-gamma results in reduced body weight and better glucose tolerance in mice. *Endocrinology*. 152(10): 3690-3699, 2011.

Yajnik CS, Deshmukh US: Maternal nutrition, intrauterine programming and consequential risks in the offspring. *Rev Endocr Metab Disord*. 9(3): 203-211, 2008.

Ye YW, Wu JH, Wang CM, Zhou Y, Du CY, Zheng BQ, Cao X, Zhou XY, Sun MH, Shi YQ: Sox17 regulates proliferation and cell cycle during gastric cancer progression. *Cancer Lett*. 307(2): 124-131, 2011.

8. 図表

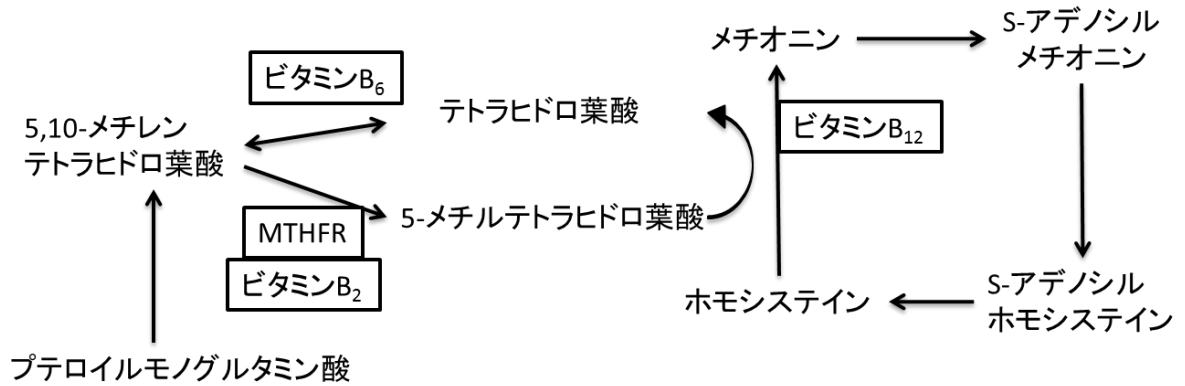


Fig.1 Folic acid metabolism

口腔から摂取された葉酸(プテロイルポリグルタミン酸)はプテロイルモノグルタミン酸に分解されて小腸から吸収される。プテロイルモノグルタミン酸は 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸に代謝され、メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ(MTHFR)によって、5-メチルテトラヒドロ葉酸に代謝される。

5-メチルテトラヒドロ葉酸はホモシステインからメチオニンへの代謝を触媒すると同時に自身はテトラヒドロ葉酸に変化する。

また、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸からテトラヒドロ葉酸への反応はビタミン B6 によって触媒され可逆的に反応する。

Table 1 Sequence of forward and reverse primer by using PCR

Accession(Gene)	Forward primer Nucleotide sequence(5'-3')	Reverse primer Nucleotide sequence(5'-3')	Product size (bp)	Description		
NM_009570	accaagatgctcagggttta	taatggatggaacaaggatgc	233	ZFY-1		
NM_011441	gacctacactaagctccagt	atgctgggtagtgcataagt	511	SOX17		
RT-PCR						
Accession(Gene)	Primer name	Forward primer Nucleotide sequence(5'-3')	Primer name	Reverse primer Nucleotide sequence(5'-3')	Product size (bp)	Description
NM_007393	MS101	acggtgacatccgtaagaacct	MS102	gggtgaatacgcgctcagtaa	302	β -actin
NM_008337	MS163	cagcaacacataaagcgtcatt	MS164	aaattcaataatagctgctcaga	267	IFNG
NM_001185083	MS603	ccctaagatgacccctacaac	MS604	gggcagcactgctctacaatg	350	Ins2
AK078743	MS659	ccaaacgctctctaatcttttg	MS660	tcacattatgacacctgcctcc	261	HMGCS1
NM_009692	MS665	acgnattccagaagaatggaa	MS666	gtggtactcctgctcagggtagggg	269	APOA1
NM_033218	MS745	atctccctctctcttcctgic	MS746	aatcagctctgctcttctctctc	295	SREBF2
NM_008255	MS747	tcacatgggtcacacaagatca	MS748	cacatctggaggctctctgctc	258	HMGCR
NM_016700	MS749	caacgctctggtatgctcctca	MS750	tagctcatctacagcagcccca	330	MAPK8
NM_007540	MS529	aaagccgaactctcacatgat	MS530	caaaagtgctagccagtgatgt	328	BDNF

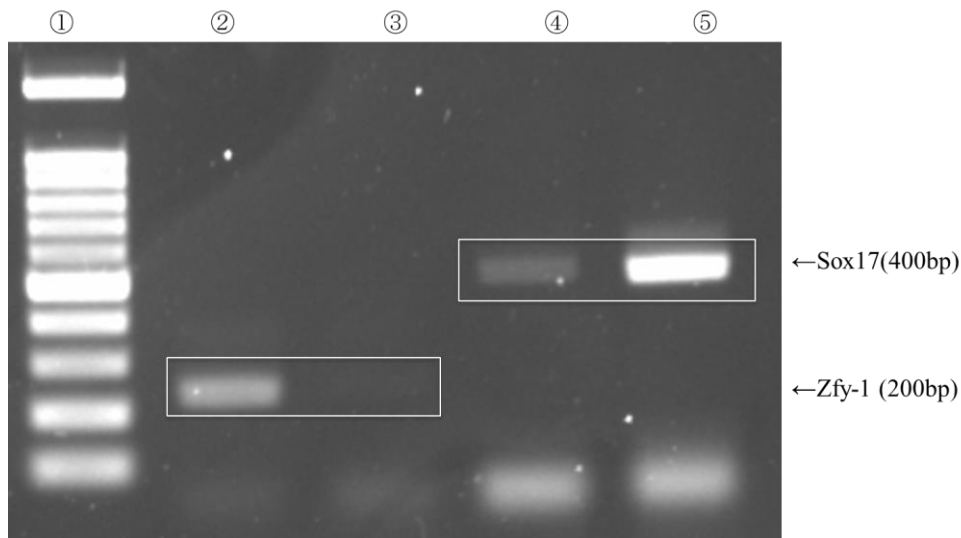


Fig.2 Sex determination by using PCR

①Base pair marker

②male sample(ZFY-1) ④male sample(SOX17)

③female sample(ZFY-1) ⑤female sample(SOX17)

胎児の性別判定を PCR 法で確認した。①レーンは BasePair Marker である。②及び④レーンは雄サンプル、③及び⑤レーンは雌サンプルである。②及び③レーンは Y 染色体上にのみ存在する ZFY-1 遺伝子プライマーを使用し、④及び⑤レーンは第 1 染色体上に存在する SOX17 遺伝子プライマーをポジティブコントロールとして使用した。ZFY-1 は 200bp、SOX17 は 400bp の位置にバンドが出現する。ZFY-1 のバンドが確認された場合のみ雄と判定した。

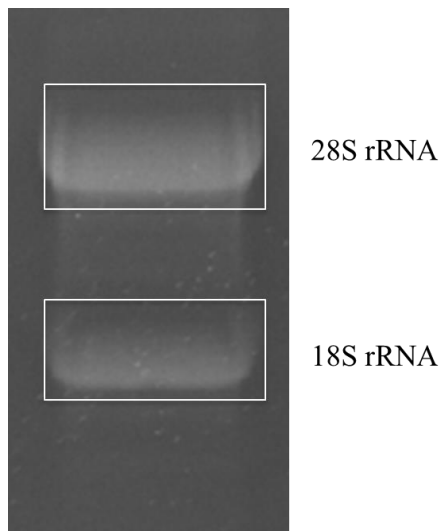


Fig.3 Quality check after RNA extraction

RNA 抽出により得られたサンプルに対してホルマリンアガロース電気泳動を行った。抽出サンプル中の RNA を電気泳動することにより 28S rRNA と 18S rRNA のバンドが出現する。28S と 18S のバンドが 2:1 の割合で出現した場合に、精製度の高い RNA が得られたと判断し、DNA microarray 解析に用いた。

Table 2 Category Name

Category Name					
1	Adipogenesis	39	G-Protein-Coupled Receptor Signaling Pathway Finder	77	Nuclear Receptors and Coregulators
2	Alzheimer's Disease	40	Glucose Metabolism	78	Obesity
3	Amino Acid Metabolism I	41	Glycosylation	79	Osteogenesis
4	Amino Acid Metabolism II	42	Growth Factor	80	Oxidative Stress and Antioxidant Defense
5	Angiogenesis	43	Heat Shock Proteins	81	p53 Signaling Pathway
6	Antiviral Response	44	Hedgehog Signaling Pathway	82	Parkinson's Disease
7	Apoptosis	45	Hematopoietic Stem Cells and Hematopoiesis	83	PI3K-AKT Signaling
8	Atherosclerosis	46	Hepatotoxicity	84	Polycomb & Trithorax Complexes
9	Autophagy	47	Homeobox(HOX) Genes	85	Polycomb & Trithorax Target Genes
10	Cardiotoxicity	48	Huntington's Disease	86	Primary Cilia
11	Cell Cycle	49	Hypertension	87	Protein Phosphatases
12	Cell Death Pathway Finder	50	Hypoxia Signaling Pathway	88	Signal Transduction Pathway Finder
13	Cell Lineage Identification	51	Inflammasomes	89	Skeletal Muscle: Myogenesis & Myopathy
14	Cell Motility	52	Inflammatory Cytokines & Receptors	90	Stem Cell
15	Cell Surface Markers	53	Inflammatory Response and Autoimmunity	91	Stem Cell Signaling
16	Cellular Senescence	54	Innate and Adaptive Immune Response	92	Stem Cell Transcription Factors
17	Chemokines & Receptors	55	Insulin Signaling Pathway	93	Stress & Toxicity
18	Common Cytokines	56	Interferon (IFN) and Receptor	94	Stress & Toxicity Pathway Finder
19	Cytoskeleton Regulators	57	Interferon α , β Response	95	Stress Response to Cellular Damage
20	Dendritic and Antigen Presenting Cell	58	JAK / STAT Signaling Pathway	96	Synaptic Plasticity
21	Diabetes	59	Lipoprotein Signaling	97	T Cell Activation
22	DNA Damage Signaling Pathway	60	MAP Kinase Signaling Pathway	98	T Helper Cell Differentiation
23	DNA Repair	61	Mesenchymal Stem Cell	99	T-cell Anergy and Immune Tolerance
24	Drug Metabolism	62	Mitochondria	100	Telomeres & Telomerase
25	Drug Metabolism: Phase I Enzymes	63	Mitochondrial Energy Metabolism	101	Terminal Differentiation Markers
26	Drug Metabolism: Phase II	64	Molecular Toxicology Pathway Finder	102	TGF β / BMP Signaling Pathway
27	Drug Transporters	65	mTOR Signaling	103	Th1-Th2-Th3
28	EGF / PDGF Signaling	66	Multiple Sclerosis	104	Th17 for Autoimmunity & Inflammation
29	Embryonic Stem Cells	67	Necrosis	105	Toll-Like Receptor Signaling Pathway
30	Endothelial Cell Biology	68	Nephrotoxicity	106	Transcription Factors
31	Epigenetic Chromatin Modification Enzymes	69	Neurogenesis and Neural Stem Cells	107	Tumor Metastasis
32	Epigenetic Chromatin Remodeling Factors	70	Neuroscience Ion Channels & Transporters	108	Tumor Necrosis Factor (TNF) Ligand and Receptor
33	Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)	71	Neurotoxicity	109	Ubiquitination (Ubiquitylation) Pathway
34	Estrogen Receptor Signaling	72	Neurotransmitter Receptors and Regulators	110	Unfolded Protein Response
35	Extracellular Matrix and Adhesion Molecules	73	Neurotrophin and Receptors	111	VEGF Signaling
36	Fatty Acid Metabolism	74	NF κ B Signaling Pathway	112	WNT Signaling Pathway
37	Fibrosis	75	Nitric Oxide Signaling Pathway	113	Wound Healing
38	G-Protein Coupled Receptors	76	Notch Signaling Pathway		

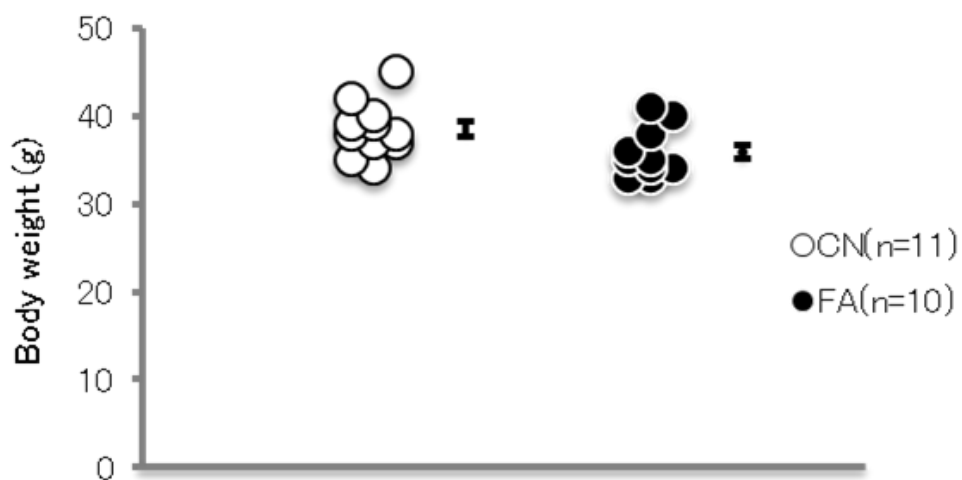


Fig.4 Body weight for dams on GD 18.

妊娠 18 日目における CN 群(n=11)及び、FA 群(n=10)の母獣平均体重を示した。

CN 群(38.55 ± 0.88 g)と比較して FA 群(35.90 ± 0.85 g)で有意差は見られなかった。

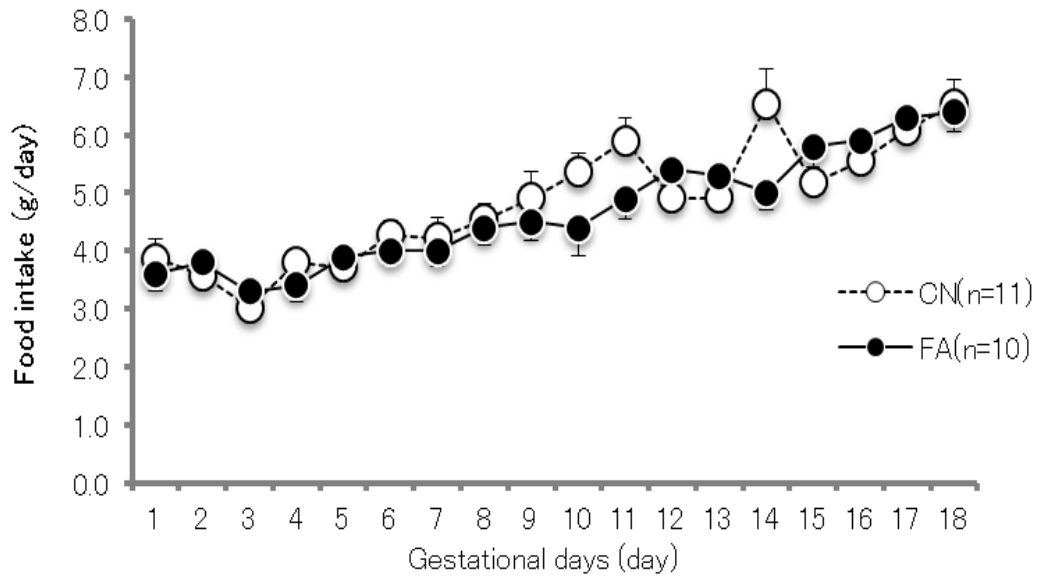


Fig.5 Comparison of food intake between CN and FA groups

飼育期間中における、各群(CN:n=11, FA:n=10)の母獣の平均摂餌量を示した。

妊娠 14 日目において、CN 群($6.55 \pm 0.61\text{g}$)と比較して FA 群 ($5.00 \pm 0.28\text{g}$)では平均摂餌量は有意に低かった($p < 0.05$)。

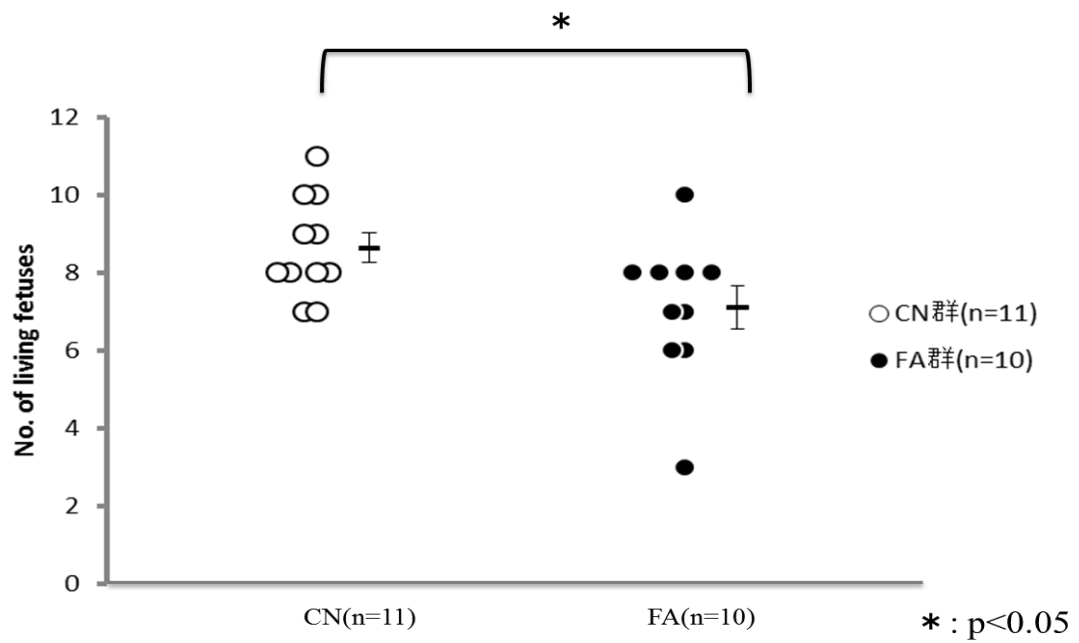


Fig.6 Number of live fetuses affected by folic acid

各腹(CN:n=11, FA:n=10)の平均胎児数を示した(Mean±SEM)。

CN 群(8.64±0.39 匹)と比較して FA 群(7.10±0.59 匹)で、FA 群は CN 群に比べて有意に少なかった(p<0.05)。

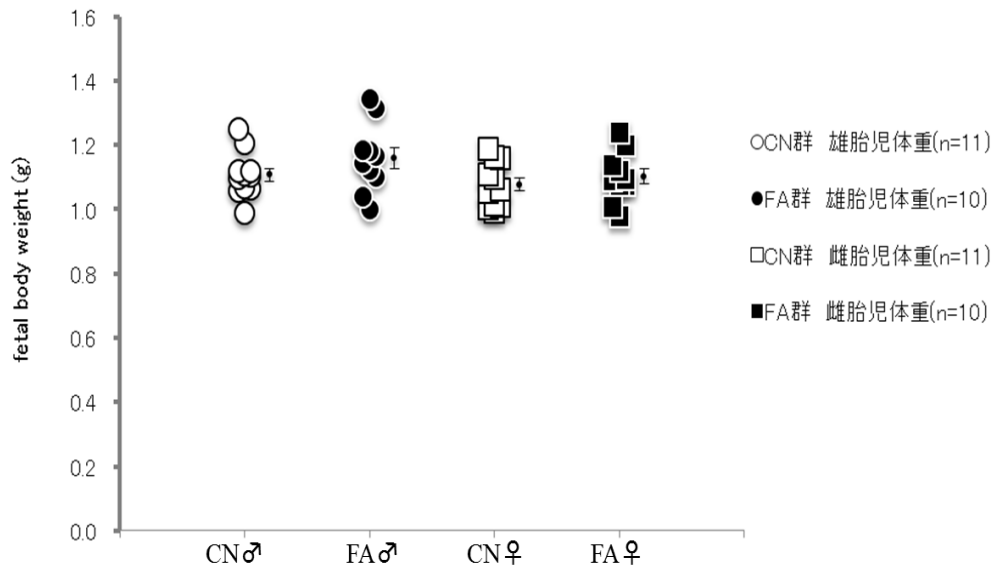


Fig.7 Fetal body weight

各腹(CN:n=11, FA:n=10)の性別ごとの平均胎児体重を示した (Mean±SEM)。性別毎に比較した結果、雄の CN 群(1.10±0.02g)と FA 群(1.12±0.02g)及び、雌の CN 群(1.07±0.01g)と FA 群(1.08±0.01g)で各群で有意差は見られなかった。

Table 3 Up regulated genes by excessive folic acid in fetal brain

Symbol	Fold Change	Accession No.	Entrez Gene Name
APOA1	↑ 7.970	NM_009692	apolipoprotein A-1
DMPK	↑ 2.084	NM_032418	dystrophia myotonica-protein kinase
Muc2 (mouse)	↑ 1.605	NM_023566	mucin 2

Table 4-1 Down regulated genes by excessive folic acid in fetal brain

Symbol	Fold Change	Accession No.	Entrez Gene Name
PRM1 (includes EG:19118)	▼-3.277	NM_013637	protamine 1
A230106O10Rik	▼-2.909	AK020718	RIKEN cDNA A230106O10 gene
DGCR8	▼-2.675	AK044890	DiGeorge syndrome critical region gene 8
SMARCA2	▼-2.583	NM_011416	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2
Ylpm1	▼-2.527	AK054220	YLP motif containing 1
Ncapg	▼-2.319	NM_019438	non-SMC condensin I complex, subunit G
SMGP	▼-2.276	NM_008574	sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein
RAI14	▼-2.254	NM_030690	retinoic acid induced 14
SBSN	▼-2.239	NM_172205	suprabasin
GABPB2	▼-2.201	AK007509	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2
CHD3	▼-2.176	NM_146019	chromodomain helicase DNA binding protein 3
NAA35	▼-2.165	AK052852	N(alpha)-acetyltransferase 35, NatC auxiliary subunit
METTL7A	▼-1.982	AK087309	methyltransferase like 7A
NPNT	▼-1.982	NM_033525	nephronectin
KDM5B	▼-1.976	NM_152895	lysine (K)-specific demethylase 5B
PAIP2	▼-1.955	AK043980	poly(A) binding protein interacting protein 2
HIST1H1B	▼-1.929	NM_020034	histone cluster 1, H1b
ROPNI	▼-1.923	NM_030744	rhophilin associated tail protein 1
KIAA0922	▼-1.915	AK153996	KIAA0922
LARS	▼-1.898	NM_134137	leucyl-tRNA synthetase
Cald1	▼-1.892	NM_145575	caldesmon 1
JMY	▼-1.870	NM_021310	junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor
GIGYF2	▼-1.863	NM_146112	GRB10 interacting GYF protein 2
RNF150	▼-1.863	AK032722	ring finger protein 150
DDX23	▼-1.862	NM_001080981	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23
Rims1	▼-1.850	NM_001012625	regulating synaptic membrane exocytosis 1
CLIP1	▼-1.846	NM_019765	CAP-GLY domain containing linker protein 1
ANKRD11	▼-1.835	NM_001081379	ankyrin repeat domain 11
GPR26	▼-1.834	NM_173410	G protein-coupled receptor 26
UBR4	▼-1.822	NM_001160319	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 4

Table 4-2 Down regulated genes by excessive folic acid in fetal brain

Symbol	Fold Change	Accession No.	Entrez Gene Name
GOLGB1	-1.809	NM_030035	golgin B1
RNF6	-1.809	NM_028774	ring finger protein (C3H2C3 type) 6
NOLC1	-1.802	NM_001039352	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1
RACGAP1	-1.800	NM_012025	Rac GTPase activating protein 1
U2SURP	-1.793	NM_026476	U2 snRNP-associated SURP domain containing
NF1 (includes EG:18015)	-1.788	AK053192	neurofibromin 1
BACH1	-1.775	NM_007520	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1
CKAP5	-1.767	NM_029437	cytoskeleton associated protein 5
SKI	-1.761	NM_011385	v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)
ZNF146	-1.754	AK037311	zinc finger protein 146
KAT6A	-1.752	NM_001081149	K(lysine) acetyltransferase 6A
SP4	-1.751	NM_009239	Sp4 transcription factor
ARHGEF6	-1.746	NM_152801	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
SLK	-1.744	NM_009289	STE20-like kinase
PRKRIR	-1.740	NM_028410	protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor)
AFF3	-1.739	NM_010678	AF4/FMR2 family, member 3
MEF2C	-1.725	AK044643	myocyte enhancer factor 2C
LOC545261	-1.721	CB182661	uncharacterized LOC545261
C7orf41	-1.719	NM_026629	chromosome 7 open reading frame 41
ARHGAP19	-1.698	NM_027667	Rho GTPase activating protein 19
F830010H11Rik	-1.688	AK089716	RIKEN cDNA F830010H11 gene
TTC1	-1.687	NM_133795	tetratricopeptide repeat domain 1
DDX46	-1.672	NM_145975	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46
MALAT1	-1.667	NR_002847	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)
RRBP1	-1.654	NM_133626	ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog)
UPF3B	-1.654	NM_026573	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast)
RBM28	-1.647	NM_133925	RNA binding motif protein 28
DLGAP4	-1.642	AK047604	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 4
TAX1BP1	-1.642	NM_025816	Tax1 (human T-cell leukemia virus type 1) binding protein 1
Dpbt2	-1.641	NM_198866	DNA binding protein with his-thr domain

Table 4-3 Down regulated genes by excessive folic acid in fetal brain

Symbol	Fold Change	Accession No.	Entrez Gene Name
TBC1D16	▼-1.640	NM_172443	TBC1 domain family, member 16
SCLT1	▼-1.626	NM_001081411	sodium channel and clathrin linker 1
RIF1 (includes EG:295602)	▼-1.625	NM_175238	RAP1 interacting factor homolog (yeast)
SLC7A14	▼-1.624	NM_172861	solute carrier family 7 (orphan transporter), member 14
KLHL22	▼-1.623	XM_001475578	kelch-like 22 (Drosophila)
GPSF2	▼-1.621	NM_016856	cleavage and polyadenylation specific factor 2, 100kDa
ME3	▼-1.620	AK133593	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial
ZC3H13	▼-1.618	NM_026083	zinc finger CCH-type containing 13
UTRN	▼-1.617	NM_011682	utrophin
UBXN4	▼-1.615	NM_026390	UBX domain protein 4
Gm5065	▼-1.605	NR_003622	predicted gene 5065
AUTS2	▼-1.604	AK052418	autism susceptibility candidate 2
SCAPER	▼-1.597	ENSMUST00000098748	S-phase cyclin A-associated protein in the ER
TAF1 (includes EG:270627)	▼-1.596	NM_001081008	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 250kDa
ZFYVE20	▼-1.596	NM_030081	zinc finger, FYVE domain containing 20
CDK13	▼-1.593	NM_027118	cyclin-dependent kinase 13
PPFIBP1	▼-1.593	NM_026221	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)
LRRN1	▼-1.588	AK012914	leucine rich repeat neuronal 1
PAM	▼-1.585	NM_013626	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
SGOL2	▼-1.579	NM_199007	shugoshin-like 2 (S. pombe)
SREK1	▼-1.576	NM_172592	splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1
FER	▼-1.570	NM_001037997	fer (fps/fes related) tyrosine kinase
ARFGEF1	▼-1.567	NM_001102430	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1 (brefeldin A-inhibited)
WAPAL	▼-1.563	NM_001004436	wings apart-like homolog (Drosophila)
ANKRD52	▼-1.562	AK144017	ankyrin repeat domain 52
PDE4DIP	▼-1.556	AK083867	phosphodiesterase 4D interacting protein
ESCO1	▼-1.552	NM_001081222	establishment of cohesion 1 homolog 1 (S. cerevisiae)
MYO1B	▼-1.549	NM_010863	myosin IB
RPS8KB1	▼-1.545	NM_028259	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
C17orf63	▼-1.532	AK079318	chromosome 17 open reading frame 63

Table 4-4 Down regulated genes by excessive folic acid in fetal brain

Symbol	Fold Change	Accession No.	Entrez Gene Name
SMC4	-1.524	AK048650	structural maintenance of chromosomes 4
ZBTB38	-1.524	NM_175537	zinc finger and BTB domain containing 38
PLEKHA5	-1.519	NM_144920	pleckstrin homology domain containing, family A member 5
D230040A04Rik	-1.518	AK084411	RIKEN cDNA D230040A04 gene
HDAC9	-1.514	NM_024124	histone deacetylase 9
HELZ	-1.511	ENSMUST00000106746	helicase with zinc finger
D030004A10Rik	-1.510	AK083416	RIKEN cDNA D030004A10 gene
FAM175B	-1.499	NM_198017	family with sequence similarity 175, member B
C12orf51	-1.495	ENSMUST00000055859	chromosome 12 open reading frame 51
ATG14 (includes EG:100504663)	-1.493	NM_172599	ATG14 autophagy related 14 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
CCDC66	-1.482	NM_177111	coiled-coil domain containing 66
PGAP1	-1.473	AK051360	post-GPI attachment to proteins 1
SH3KBP1	-1.469	AK041425	SH3-domain kinase binding protein 1
SLTM	-1.460	NM_026337	SAFB-like, transcription modulator
ZNF397	-1.449	AK046270	zinc finger protein 397
SPTAN1	-1.415	NM_001076554	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)

Table 5 Up regulated genes by excessive folic acid in fetal mouse liver

Symbol	Fold Change	Accession No.	Entrez Gene Name
TM4SF20	3.901	NM_025453	A_51_P501554 transmembrane 4 L six family member 20
TRIM31	2.943	NM_146077	A_51_P490840 tripartite motif containing 31
ESM1	2.917	NM_023612	A_52_P257625 endothelial cell-specific molecule 1
MT2A	2.859	NM_008630	A_51_P246317 metallothionein 2A
MAPK8	2.516	NM_016700	A_51_P357182 mitogen-activated protein kinase 8
LTA	2.431	NM_010735	A_51_P351015 lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
SLC28A2	2.395	AK040292	A_51_P427229 solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2
GDK17	2.354	BC031778	A_52_P60952 cyclin-dependent kinase 17
PAQR3	2.211	AK030634	A_52_P341016 progesterin and adipoQ receptor family member III
SOCS6	2.136	AK053803	A_52_P389658 suppressor of cytokine signaling 6
RPL39L	2.098	NM_026594	A_52_P386544 ribosomal protein L39-like
ASIP	2.054	NM_015770	A_52_P90577 agouti signaling protein
FCGBP	2.005	NM_001122603	A_51_P380078 Fc fragment of IgG binding protein
HAS1	1.945	AK053726	A_52_P440436 hyaluronan synthase 1
NEO1	1.921	AK019159	A_52_P907073 neogenin 1
DLG4	1.757	NM_007864	A_52_P153721 discs, large homolog 4 (Drosophila)
MEAF6	1.744	ENSMUST0000154689	A_52_P370731 MYST/ Esa1-associated factor 6
Cnp1l	1.687	ENSMUST0000141601	A_51_P483241 canopy 1 homolog (zebrafish)
KIAA0232	1.687	NM_001081232	A_51_P486289 KIAA0232
RET	1.635	NM_009050	A_51_P324191 ret proto-oncogene
DNAH17	1.634	NM_001167746	A_51_P252054 dynein, axonemal, heavy chain 17
5730507A11Rik	1.615	AK020490	A_52_P78078 RIKEN cDNA 5730507A11 gene
Zscan18	1.608	NM_001017955	A_52_P36042 zinc finger and SCAN domain containing 18
TTL5	1.597	NM_001081423	A_52_P458631 tubulin tyrosine ligase-like family, member 5
Cmva5	1.590	NM_023821	A_52_P101454 cardiomyopathy associated 5
NPPA	1.588	NM_008725	A_51_P361340 natriuretic peptide A
AIFL1	1.535	NM_053245	A_52_P130639 aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1
KBTBD5	1.512	NM_028202	A_51_P235139 kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 5
ATAD2	1.489	NM_027435	A_51_P343129 ATPase family, AAA domain containing 2
SEL1L3	1.457	NM_172710	A_51_P291078 sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)

Table 6-1 Down regulated genes by excessive folic acid in fetal mouse liver

Symbol	Fold Change	Accession No.	Entrez Gene Name
CTRC	-8.708	NM_001033875	chymotrypsin C (caldeorin)
PRSS1/PRSS3	-4.800	NM_009430	protease, serine, 1 (trypsin 1)
CPA2 (includes EG:1358)	-4.080	NM_001024698	carboxypeptidase A2 (pancreatic)
Prss3 (includes others)	-3.260	NM_011645	protease, serine, 3
MGP	-3.204	NM_008597	matrix Gla protein
CYP4A11	-2.762	NM_010011	cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11
Cyp4a14	-2.646	NM_007822	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14
Cyp4a31	-2.531	NM_201640	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 31
HSD17B6	-2.466	NM_013786	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog (mouse)
Igfv1	-2.383	AY151141	immunoglobulin lambda variable 1
COL4A5	-2.348	NM_007736	collagen, type IV, alpha 5
HSPA13	-2.328	AK021006	heat shock protein 70kDa family, member 13
IFNG (includes EG:15978)	-2.168	NM_008337	interferon, gamma
MAPK8	-2.035	NM_016700	mitogen-activated protein kinase 8
INS	-2.027	NM_008387	insulin
TTC18	-2.006	NM_001163638	tetratricopeptide repeat domain 18
BDNF	-1.930	NM_007540	brain-derived neurotrophic factor
NTNG1	-1.912	XM_001479688	netrin G1
DMKN	-1.835	NM_172899	dermokine
MSMO1	-1.834	AK033099	methylsterol monooxygenase 1
HMGCS1	-1.826	AK078743	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)
TRAPP12	-1.813	AK084171	trafficking protein particle complex 12
D630045M09Rik	-1.808	AK131952	RIKEN cDNA D630045M09 gene
SERP1NB9	-1.806	NM_009256	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9
RTKN2	-1.775	ENSMUST0000068994	rhotekin 2
LIMCH1	-1.722	NM_001001980	LIM and calponin homology domains 1
Serpina3k (includes others)	-1.713	NM_011458	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K
CELA3B	-1.652	NM_026419	chymotrypsin-like elastase family, member 3B
CPA1 (includes EG:109697)	-1.602	NM_025350	carboxypeptidase A1 (pancreatic)
IL36G	-1.587	NM_153511	interleukin 36, gamma

Table 6-2 Down regulated genes by excessive folic acid in fetal mouse liver

Symbol	Fold Change	Accession No.	Entrez Gene Name
Krt19	▼-1.549	NM_008471	keratin 19
ACVR2A	▼-1.538	NM_007396	activin A receptor, type IIA
DNAJC27	▼-1.528	Dnajc27	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27
Gm8267	▼-1.527	NM_001162954	predicted gene 8267
CLPS	▼-1.477	NM_025469	colipase, pancreatic
ADAMTS16	▼-1.462	NM_172053	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 16

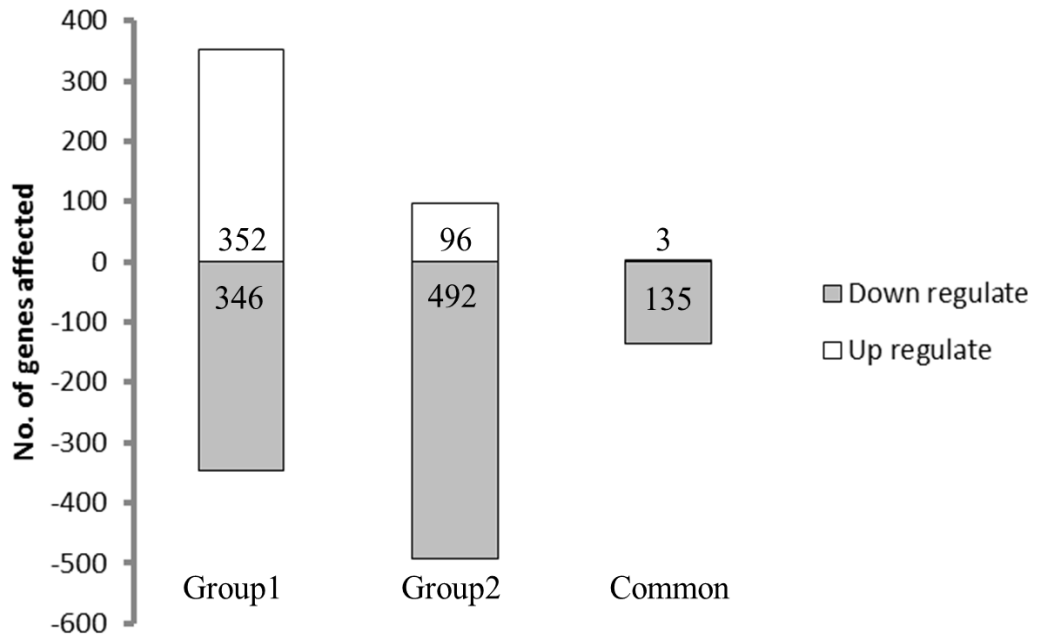


Fig.8 Effect of prenatal excessive folic acid on gene expression in the fetal brain.

葉酸の過剰摂取により脳で影響を受けた遺伝子の数を示した。

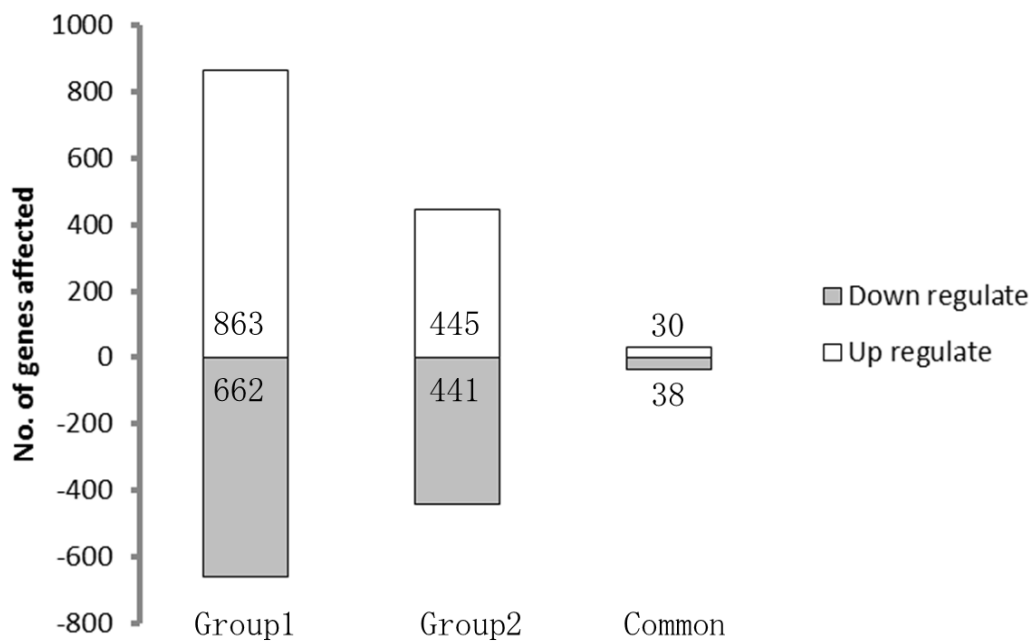


Fig.9 Effect of prenatal excessive folic acid on gene expression in the fetal liver.

葉酸の過剰摂取により肝臓で影響を受けた遺伝子数を示した。

Table 7-1 Categorized regulated genes by excessive folic acid in fetal brain

Category Name	Gene name	SubCategory	Average Fold
Cytoskeleton Regulators	Cald1	Actin Filaments; Interacting Proteins	0.47
	Cald1	Cell Motility / Migration	0.47
	Cald1	Calmodulin / Calcineurin	0.47
	Clip1	Microtubules; Interacting Proteins	0.54
	Clip1	Microtubules; Spindle Organization & Biogenesis	0.54
	Clip1	Cell Cycle; Mitosis	0.50
	Racgap1	Microtubules; Interacting Proteins	0.50
	Racgap1	Microtubules; Spindle Organization & Biogenesis	0.50
	Racgap1	Cell Cycle; Cytokinesis	0.50
	Racgap1	G-Protein Signaling	0.50
Skeletal Muscle; Myogenesis & Myopathy	Dmpk	Skeletal Muscle Contractility Other	2.00
	Utrn	Skeletal Myogenesis	0.56
	Utrn	Skeletal Muscle Wasting/Atrophy Dystrophy	0.56
	Merf2c	Skeletal Myogenesis	0.57
	Rps6kb1	Skeletal Muscle Contractility Other	0.62
	Rps6kb1	Skeletal Myogenesis	0.62
	Rps6kb1	Skeletal Muscle Hypertrophy	0.62
	Rps6kb1	Skeletal Muscle Wasting/Atrophy Autophagy	0.62
	Apoa1	HDL Associated Proteins	3.40
	Apoa1	Cholesterol Transporters	3.40
Atherosclerosis	Apoa1	Cholesterol Efflux	3.40
	Apoa1	Reverse Cholesterol Transport	3.40
	Apoa1	Cholesterol Homeostasis	3.40
	Apoa1	Extracellular Molecules Other Extracellular Molecules	3.40
	Apoa1	Lipid Transport and Metabolism Cholesterol Metabolism	3.40
	Apoa1	Lipid Transport and Metabolism Lipid Transport	3.40
	Apoa1	Lipid Transport and Metabolism Lipoprotein Metabolism	3.40
	Hdac9	Cell Cycle Regulators; Other Regulators of the Cell Cycle	0.60
	Hdac9	Blood Cell Activation; B-Cell Activation	0.60
	Hdac9	Cell Differentiation; B-Cell Differentiation	0.60
Cardiotoxicity	Hdac9	Transcription Factors and Regulators	0.60
	Rps6kb1	Down-Regulated; Muscle Contraction	0.62
	Rps6kb1	Down-Regulated; Signal Transduction	0.62
	Rps6kb1	Down-Regulated; Development	0.62
	Rps6kb1	Down-Regulated; Migration / Motility	0.62
	Myst3	Histone Acetyltransferase	0.52
	Eso1	Histone Acetyltransferase	0.64
	Hdac9	Histone Deacetylases	0.60
	Smarca2	SWI/SNF Complex Components	0.34
	Chd3	Chromodomain / Helicase / DNA-Binding Domain (CHD) Proteins	0.40
Chd3	Nucleosome-Remodeling and Histone Deacetylase (NuRD) Complex Components	0.40	
mTOR Signaling	Rps6kb1	mTOR Downstream Effectors mTORC1 Positive Regulation	0.62
	Rps6kb1	mTOR Downstream mTORC2 Positive Regulation	0.62
	Rps6kb1	Cellular Processes Translation	0.62

Table 7-2 Categorized regulated genes by excessive folic acid in fetal brain

T-cell Energy and Immune Tolerance			
Hdace9	B-Cell Regulators		0.60
Hdace9	Transcriptional Regulators		0.60
PI3K-AKT Signaling			
Rps6kb1	Genes Involved in the mTOR Signaling Pathway		0.62
Rps6kb1	Regulation of eIF4e and p70 S6 Kinase		0.62
EGF / PDGF Signaling			
Rps6kb1	Intracellular Signaling Molecules: Other Intracellular Signaling Molecules		0.62
Rps6kb1	Metabolism: Protein Metabolism		0.62
Neurotrophin and Receptors			
Nf1	Cell Growth and Differentiation: Cell Differentiation		0.52
Mef2c	Transcription factors and regulators; Other transcription factors and regulators		0.57
Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)			
Cald1	Genes Up-Regulated During EMT		0.47
Cald1	Migration & Motility		0.47
Alzheimer's Disease			
Apoa1	Cholesterol Metabolism		3.40
Apoa1	Lipid and Lipoprotein Metabolism		3.40
Telomeres & Telomerase			
Rif1	Other Genes Associated with Telomeres		0.62
p53 Signaling Pathway			
Nf1	Cell Growth, Proliferation and Differentiation: Cell Differentiation		0.52
Transcription Factors			
Mef2c	MAPK Signaling Pathway: Other MAPK Signaling Pathways		0.57
Neurogenesis and Neural Stem Cells			
Mef2c	Regulation of Transcription		0.57
Autophagy			
Rps6kb1	Regulation of Autophagy: Autophagy in Response to Other Intracellular Signals		0.62
G Protein Coupled Receptors			
Gpr26	Orphan G Protein-Coupled Receptors		0.50
Polycomb & Trithorax Complexes			
Smarca2	Trithorax Complexes: Core Components		0.34
Notch Signaling Pathway			
Nitric Oxide Signaling Pathway			
Unfolded Protein Response			
Ubxn4	ER Associated Degradation (ERAD)		0.59
Ubxn4	Ubiquitination		0.59
Tumor Necrosis Factor (TNF) Ligand and Receptor			
Spna2	Genes Involved in the TNF Signaling Pathway: Other Genes Involved in the TNFR1 Signaling		0.63
MAP Kinase Signaling Pathway			
Mef2c	Activated Transcription Factors		0.57
Molecular Toxicology Pathway Finder			
Ubxn4	ER Stress & Unfolded Protein Response		0.59
Amino Acid Metabolism I			
Lars	Leucine Metabolism		0.48
DNA Damage Signaling Pathway			
Sik	DNA Repair: Nucleotide-excision Repair		0.56
DNA Repair			
Sik	Nucleotide Excision Repair (NER)		0.56
Cell Cycle			
Pim1	M Phase		0.40
Cell Death Pathway Finder			
Rps6kb1	Autophagy		0.62

Table 8-1 Categorized regulated genes by excessive folic acid in fetal liver

Category Name	Gene name	SubCategory	Average Fold	
NFκB Signaling Pathway	Lta	NFκB Responsive Genes: Cytokines	2.49	
	Lta	NFκB Responsive Genes: Ligands and Receptors	2.49	
	Iffng	Other Factors Involved in the NFκB Pathway: Ligands and Receptors	0.48	
	Iffng	NFκB Responsive Genes: Cytokines	0.48	
	Iffng	NFκB Responsive Genes: Ligands and Receptors	0.48	
	Iffng	Other Factors Involved in the NFκB Pathway: Ligands and Receptors	0.48	
	Iffng	Other Factors Involved in the NFκB Pathway: Transcription Factors	0.48	
JAK / STAT Signaling Pathway	Iffng	Transcription Factors or Regulators that Interact with STAT Proteins: Positive Regulation of Transcription	0.48	
	Iffng	Transcription Factors or Regulators that Interact with STAT Proteins: Transcriptional Activator Activi	0.48	
	Iffng	Genes Induced by STAT Proteins: Stat4	0.48	
	Iffng	Apoptosis	0.48	
	Iffng	Cell Growth and / or Maintenance: Cell Growth	0.48	
	Iffng	Immune Response: Inflammatory Response	0.48	
	Iffng	Immune Response: Lymphocyte Activation	0.48	
EGF / PDGF Signaling	Lta	Response to Stimulus: Response to Other Stimuli	2.49	
	Mapk8	Intracellular Signaling Molecules: JNK Cascade	0.54	
	Mapk8	Intracellular Signaling Molecules: MAPKKK Cascade	0.54	
	Mapk8	Metabolism: Protein Metabolism	0.54	
	Mapk8	Response to Stimulus: Response to Other Stimuli	0.54	
	Mapk8	CD4+T Cell Markers	0.54	
	Iffng	TH1 Cytokines and Related Genes	0.48	
Th1-Th2-Th3	Iffng	Immune Cell Activation: B-cell Activation	0.48	
	Iffng	T-helper 1 Type Immune Response	0.48	
	Iffng	Transcription Factors and Regulators:	0.48	
	Iffng	Positive Regulation of Transcription	0.48	
	Iffng	Transcription Factors and Regulators: Transcriptional Activator Activity	0.48	
	Huntington's Disease	Dlg4	Huntingin Cofactors	4.67
		Dlg4	Transcription Factor Targets: REST	0.52
Bdnf		Transcription Factor Targets: SPI	0.52	
Bdnf		Transcription Factor Targets: REST	0.52	
Bdnf		Regulation of Synaptic Transmission	0.52	
Bdnf		Dysregulated Processes: Apoptosis	0.52	
Multiple Sclerosis		Iffng	Myelination	0.48
	Iffng	T Cell Activation/Signaling	0.48	
	Iffng	Adaptive Immunity	0.48	
	Iffng	Cytokine/Chemokine	0.48	
	Iffng	Inflammation: Genera	0.48	
	Iffng	Cellular Stress	0.48	
	Atherosclerosis	Iffng	Response to Stress Inflammatory Response	0.48
Iffng		Other Genes Related to Apoptosis	0.48	
Iffng		Extracellular Molecules Other Extracellular Molecules	0.48	
Iffng		Cell Growth and Proliferation Other Genes Involved in Cell Growth and Proliferation	0.48	
Iffng		Cell Growth and Proliferation Other Transcription Regulators	0.48	
Tumor Necrosis Factor (TNF) Ligand and Receptor		Lta	TNF Superfamily Members: Other Apoptosis Genes	2.49
		Lta	TNF Superfamily Members: Genes Involved in the Inflammatory Response	2.49
	Lta	Genes Involved in the TNFR2 Signaling Pathway: Apoptosis	2.49	
	Lta	Genes Involved in the TNFR2 Signaling Pathway: Genes Involved in the Inflammatory Response	2.49	
	Mapk8	Genes Involved in the TNFR1 Signaling Pathway: Genes Involved in the JNK Signaling Pathway	0.54	

Table 8-2 Categorized regulated genes by excessive folic acid in fetal liver

Autophagy	Mapk8	Regulation of Autophagy: Co-Regulators of Autophagy and Apoptosis	0.54
	Ins2	Regulation of Autophagy: Co-Regulators of Autophagy and Apoptosis	0.57
	Ifng	Regulation of Autophagy: Co-Regulators of Autophagy and Apoptosis	0.48
	Ifng	Regulation of Autophagy: Co-Regulators of Autophagy and the Cell Cycle	0.48
	Ifng	Regulation of Autophagy: Autophagy Induction by Intracellular Pathogens	0.48
Terminal Differentiation Markers	Nppa	Muscle: Cardiomyocyte	1.82
	Krt19	Liver: Cholangiocyte	0.65
	Ins2	Pancreas: Beta Cell	0.57
	Cpa1	Pancreas: Exocrine Cel	0.57
Molecular Toxicology PathwayFinder	Mapk8	Steatosis	0.54
	Serpina3k	Immunotoxicity	0.61
	Cyp4a14	Immunotoxicity	0.48
	Ifng	Immunotoxicity	0.48
Neurotrophin and Receptors	Bdnf	Neurotrophins and Receptors	0.52
	Bdnf	Neurogenesis: Dendrite Morphogenesis	0.52
	Bdnf	Cell Growth and Differentiation: Growth Factors and Receptors	0.52
	Bdnf	Apoptosis: Anti-apoptosis	0.52
Toll-Like Receptor Signaling Pathway	Ifng	Pathogen-Specific Responses: Viral	0.48
	Ifng	Downstream Pathways and Target Genes: JAK/STAT Pathway	0.48
	Ifng	Downstream Pathways and Target Genes: Interferon Regulatory Factor (IRF) Pathway	0.48
	Ifng	Regulation of Adaptive Immunity	0.48
Cell Lineage Identification	Nppa	Terminal Differentiation: Mesoderm: Cardiomyocyte	1.82
	Krt19	Progenitors: Endoderm:	0.65
	Ins2	Pancreatic Islet Cell	0.57
	Cpa1	Terminal Differentiation: Endoderm:	0.59
	Cpa1	Terminal Differentiation: Endoderm:	0.59
Neurotoxicity	Lta	Down-Regulated: Apoptosis	2.49
	Lta	Down-Regulated: Development	2.49
	Bdnf	Down-Regulated: Development	0.52
	Bdnf	Down-Regulated: Metabolism (Regulation & Mechanism)	0.52
T-cell Anergy and Immune Tolerance	Lta	Cytokines, Receptors and their related Proteins	2.49
	Lta	TNF Superfamily Members and their Receptors	2.49
	Ifng	Cytokines, Receptors and their related Proteins	0.48
	Ifng	Transcriptional Regulators	0.48
Stress & Toxicity	Mt2	Oxidative or Metabolic Stress	2.18
	Cyp4a10	Oxidative or Metabolic Stress	0.52
	Cyp4a14	Oxidative or Metabolic Stress	0.48
Common Cytokines	Lta	TNF Superfamily	2.49
	Ifng	Interferons	0.48
	Il119	Interleukins	0.50
Stress & Toxicity PathwayFinder	Mt2	Oxidative or Metabolic Stress	2.18
	Cyp4a10	Oxidative or Metabolic Stress	0.52
	Cyp4a14	Oxidative or Metabolic Stress	0.48
Obesity	Ins2	Anorectic Genes Pancrease Derived Peptides and Receptors	0.57
	Cps	Pancreatic Genes Pancrease Derived Peptides and Receptors	0.57
	Bdnf	Anorectic Genes Neuropeptides and Receptors	0.52
Fibrosis	Ifng	Anti-Fibrotic	0.48
	Ifng	Inflammatory Cytokines & Chemokines	0.48

Table 8-3 Categorized regulated genes by excessive folic acid in fetal liver

Innate and Adaptive Immune Response	Mapk8 Ili1f9	IL-1R / TLR Members and Related Genes: Other Genes Involved in the IL-1R Pathway IL-1R / TLR Members and Related Genes: Cytokines	0.54 0.50
TGFβ / BMP Signaling Pathway	Acvr2a Acvr2a	Receptors Adhesion and Extracellular Molecules: Other Extracellular Molecules	0.57 0.57
Neurogenesis and Neural Stem Cells	Dlg4 Bdnf	Genes Involved in Synaptic Functions: Synaptic Transmission Growth Factors and Cytokines: Growth Factors	1.67 0.52
Inflammatory Response and Autoimmunity	Lta Ifng	Cytokines Other Cytokines Other Cytokines	2.49 0.48
Inflammasomes	Mapk8 Ifng	NOD-Like Receptors: Downstream Signaling Inflammasomes: Downstream Signaling	0.54 0.48
Synaptic Plasticity	Bdnf Bdnf	Immediate-Early Response Genes (IEGs) Long Term Potentiation (LTP)	0.52 0.52
Primary Cilia	Ins2 Ins2	Cellular Signaling mTOR Cell Cycle	0.57 0.57
T Cell Activation	Ifng	T-cell Activation: Genes Involved in Th1 / Th2 Differentiation	0.48
Cellular Senescence	Ifng	Senescence Initiators: Interferon Related	0.48
Chemokines & Receptors	Bdnf	Other Chemokines and Related Genes	0.52
Dendritic and Antigen Presenting Cell	Ifng	Cytokines, Chemokines and Their Receptors	0.48
Stem Cell Signaling	Acvr2a Ifng	TGFβ Superfamily Signaling Pathway: Receptors & Coreceptors Cytokines	0.57 0.48
Th17 for Autoimmunity & Inflammation	Ifng	Interferons: Ligand for Interferon-γ Receptors	0.48
Interferon (IFN) and Receptor	Ifng	Interferons: Ligand for Interferon-γ Receptors	0.48
Growth Factor	Bdnf Bdnf Bdnf	Apoptosis Regulators Cell Differentiation Morphogenic Factors	0.52 0.52 0.52
Mesenchymal Stem Cell	Ins2 Ifng Bdnf	Stemness Markers Other Genes Associated with MSC Other Genes Associated with MSC	0.57 0.48 0.52
Cell Death PathwayFinder	Ins2 Ifng	Autophagy Autophagy	0.48 0.48
Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)	Krt19 Krt19	Genes Down-Regulated During EMT Signaling Pathways: Estrogen Receptor	0.65 0.65
Estrogen Receptor Signaling	Krt19 Krt19	Genes Directly Associated with Breast Cancer Genes Associated with Breast Cancer Prognosis	0.65 0.65
Notch Signaling Pathway	Ifng Ifng	Notch Signaling Pathway Target Genes: Apoptosis Genes Notch Signaling Pathway Target Genes: Regulation of Transcription	0.48 0.48
mTOR Signaling	Ins2 Ins2	mTOR Upstream Regulators mTORC1 Positive Regulators Cellular Processes Insulin Signaling	0.57 0.57

Table 8-4 Categorized regulated genes by excessive folic acid in fetal liver

Inflammatory Cytokines & Receptors		
	Lta	Cytokine Genes
Drug Metabolism	Mt2	Drug Transporters: Metallothioneins
Lipoprotein Signaling	Hmgcs1	Cholesterol Biosynthesis
Cardiotoxicity	Kbtbd5	Up-Regulated: Other
Angiogenesis	Ifng	Other factors involved in angiogenesis: Cytokines and chemokines
Fatty Acid Metabolism	Hmgcs1	Ketogenesis
Drug Metabolism: Phase I Enzymes	Cyp4a10	Cytochrome P450s
Embryonic Stem Cells	Ins2	Selected Embryonic Stem Cell Differentiation / Lineage Markers: Pancreas
Diabetes	Ifng	Secreted Factors
Wound Healing	Ifng	Inflammatory Cytokines & Chemokines
Skeletal Muscle: Myogenesis & Myopathy	Mapk8	Skeletal Muscle Wasting/Atrophy Dystrophy
Drug Metabolism: Phase II	Has1	N-Acetyltransferases
Alzheimer's Disease	Bdnf	Synaptic Formation: Other Synaptic Functions
T Helper Cell Differentiation	Ifng	Epigenetically Regulated Genes: Th1 Cells
Nephrotoxicity	Mgp	Up-Regulated: Extracellular Matrix
Amino Acid Metabolism I	Hmgcs1	Leucine Metabolism
PI3K-AKT Signaling	Mapk8	IGF-1 Signaling Pathway
Stress Response to Cellular Damage	Cyp4a10	Xenobiotic Metabolism: Cytochrome P450s
Nitric Oxide Signaling Pathway	Dlg4	Genes Involved in the Nitric Oxide Signaling Pathway
Unfolded Protein Response	Mapk8	Apoptosis
Parkinson's Disease	Bdnf	Apoptosis: Anti-Apoptosis

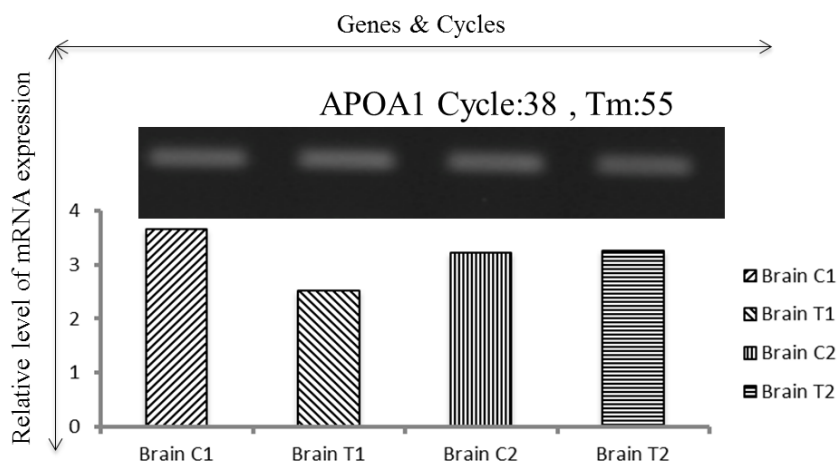


Fig.10 Results of RT-PCR in fetal brain

DNAmicroarray の結果の中から、葉酸によって発現が変動した APOA1 遺伝子を RT-PCR を用いて解析した。Brain C1、C2 は CN、Brain T1、T2 は FA 群のマウスから得た胎児の脳での成績を示している。各カラムは C1(n=6)、C2(n=5)、T1(n=5)、T2(n=5)例の平均を示している。

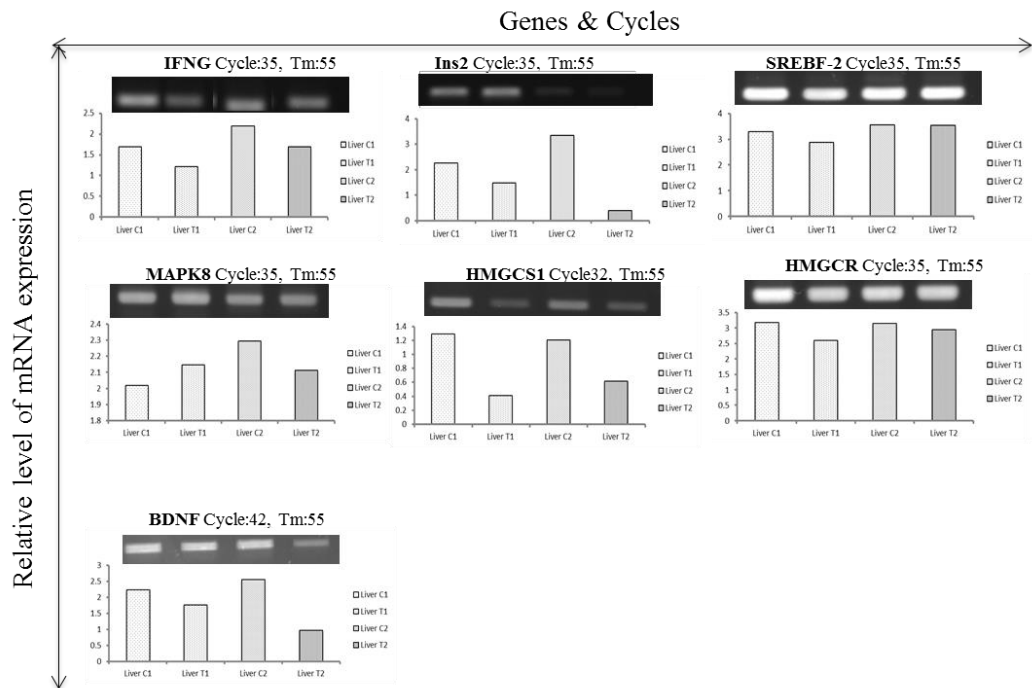


Fig.11 Results of RT-PCR in fetal liver

DNAmicroarray の結果の中から、葉酸によって変動が変化した遺伝子とそれに関連した遺伝子の変化を RT-PCR を用いて解析した。Liver C1、C2 は CN、Liver T1、T2 は FA 群のマウスから得た胎児の肝臓での成績を示している。各カラムは C1(n=6)、C2(n=5)、T1(n=5)、T2(n=5)例の平均を示している。