

博士論文要旨

十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科食物栄養学専攻

(学位申請者 21DA001 奥田明日香)

妊娠期母獣の難消化性オリゴ糖摂取による腸内細菌由来水素ガスが 母獣ならびに胎仔の酸化ストレスへ及ぼす影響に関する研究 —妊娠期葉酸過剰モデルマウスの出生仔に惹起する糖代謝異常の要因検討—

【背景ならびに目的】

難消化性オリゴ糖は、経口摂取後、宿主の腸内細菌により発酵を受け、その代謝産物として腸内細菌由来水素ガス (Intestinal microbes-derived hydrogen gas, 以下 IMDH) や短鎖脂肪酸, ビタミン等が産生される。奥らは、フラクトオリゴ糖 (FOS) の生体利用性と新規な生理作用について研究しており、これまでに、FOS 摂取により老化促進モデルマウスの学習記憶障害や骨粗鬆症の発症を遅延すること、またその機序として IMDH の抗酸化や抗炎症作用が関連することを明らかにしている。一方、外因性水素ガスを用いた研究では、肝障害や皮膚侵襲モデル動物において、抗酸化や抗炎症作用を介して症状が緩和されることが報告されている。妊娠期には、母体の酸化ストレスが亢進することが報告されているが、妊娠期を対象とした外因性水素ガスや IMDH の抗酸化作用についての研究は、検索した限り見当たらない。本研究の最終目的は、難消化性オリゴ糖の新規な生理作用を明らかにし、母子の健康の保持増進に寄与することである。

近年、National Institute of Health は、母体の葉酸過剰摂取による母体と胎児への影響について調査し、妊娠期の葉酸過剰摂取は、児の成長後に肥満やインスリン抵抗性などの発症リスクを高めることを報告している。金高らは、この機序を検討することを目的として妊娠期葉酸過剰モデルマウス (Pregnant excessive folic acid model mouse, 以下 PEFAM) を確立している。PEFAM は、C57BL/6J マウスの妊娠期母獣に葉酸過剰飼料を給餌すると、雌性出生仔が 7 週齢時に糖代謝異常を発症するモデルである。私は、PEFAM においては、葉酸過剰摂取により酸化ストレスが亢進し、胎仔の膵臓ランゲルハンス島 β 細胞の機能不全を惹起したと推察し、このモデルマウスを用いて次の仮説を検討することとした。仮説は、PEFAM に FOS を妊娠期に摂取させると、母獣の IMDH が胎仔へ移行し、母獣、ならびに胎仔において葉酸過剰による酸化ストレス亢進を抑制し、胎仔の膵臓ランゲルハンス島 β 細胞の機能を調節する、である。この仮説を検証するため、母獣、ならびに胎仔の葉酸量、IMDH 濃度、酸化ストレス指標、抗酸化酵素、ならびにこれらの核内転写因子である nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) を検討した。また、胎仔の膵臓ランゲルハンス島

β 細胞の分化等に関わる pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1), forkhead box protein O1 (FoxO1), ならびに Insulin の発現を検討した。仮説の検証に PEFAM を用いることに先立ち、通常ラットを用いて FOS 飼料を摂取させ、IMDH 排出へ及ぼす絶食の影響、ならびに妊娠ラットを用いて FOS 継続摂取後の IMDH 体内分布と胎仔への移行を検討した。

【試験物質】

FOS (株式会社明治) を使用した。FOS のオリゴ糖画分の純度は 98%, 平均分子量は 608 である。

【実験方法】

実験 I

1. 実験動物、飼育飼料、ならびに群分け

8 週齢 Wistar 系通常雄性ラット (日本クレア株式会社) 12 匹を購入し、飼料は、AIN-93G 飼料組成中の食物繊維源であるセルロースをコーンスターチに置換したものを対照 (CONT) 飼料とし、CONT 飼料中の 10% スクロースの 8 割を FOS に置換した飼料 (8% FOS) を給餌した。また、妊娠 2 日目の Wistar 系ラット (日本クレア株式会社) を 20 匹購入し、CONT 飼料と CONT 飼料中のスクロースの半分を置換した飼料 (5% FOS) を給餌した。給餌と給水は、いずれも *ad libitum* とした。

2. 測定項目、ならびに方法

安楽死後、雄性ラットは、体外排出ガスや血液等を、妊娠ラットは、血液、各臓器、ならびに胎仔を採材した。IMDH 濃度は、ガスクロマトグラフィーを搭載した水素／メタン測定装置を用いて、duplicate で測定した。

3. 統計解析

平均値、ならびに標準偏差を算出し、正規性と等分散性の検定後、対応のある *t* 検定、または対応のない Student の *t* 検定を行った。統計解析は、SPSS ver. 26 を使用し、有意確率 5%未満を統計的有意とした。

実験 II

1. 実験動物、飼育飼料、ならびに群分け

妊娠 1 日目の C57BL/6J マウスを以下の 3 種類の飼料で飼育し、妊娠 18 日目に安楽死後解剖した。飼料は、対照 (CONT) 飼料として葉酸 2 mg/kg 飼料を含む AIN-93G 精製飼料、PEFAM の定義に従い CONT 飼料に葉酸 38 mg/kg を添加した葉酸過剰 (EFA) 飼料、EFA 飼料中の 10% スクロースの半分を FOS に置換した飼料 (EFA-FOS) を給餌した。妊娠期の摂餌・摂水制限はストレスとなるため、*ad libitum* とした。妊娠 15 日目に母獣の尿を採材し、妊娠 18 日目に母獣を安楽死後、解剖し、胎仔、ならびに肝臓等の臓器を採材した。胎仔の成長は速いため、同一条件下でサンプルを採材できるように、同じ飼育実験を繰り返し実施した。

2. 測定項目，ならびに方法

母獣肝臓，ならびに胎仔の IMDH 濃度の測定方法は実験 I と同一である。母獣肝臓，尿，ならびに羊水の葉酸量，8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)，malondialdehyde (MDA)，肝臓ミトコンドリア画分の抗酸化酵素活性は，それぞれ専用キットを用いて測定した。母仔肝臓抗酸化酵素と母獣肝臓 Nrf2 のタンパク質発現量は Western blotting，抗酸化酵素とサイトカインの mRNA 発現量は realtime RT-PCR で測定し，*Tbp* または *Actb* で補正した。胎仔肝臓 Nrf2 と脾臓 Pdx1，FoxO1，ならびに Insulin は免疫組織化学染色後，ImageJ を用いて定量解析した。

3. 統計解析

平均値，ならびに標準偏差を算出し，正規性と等分散性の検定後，一元配置分散分析を実施し，Tukey HSD 検定を行った。統計解析は，SPSS ver. 26 を使用し，有意確率 5%未満を統計的有意とした。

【動物実験の倫理審査】

実験 I と II で行った動物実験は，十文字学園女子大学動物実験委員会の承認を経て実施した（承認番号：1905, 1908, 2102, 2101, 2106, 2110, 2203）。

【結果，ならびに考察】

実験 I

通常雄性ラットにおいて，8% FOS の IMDH 濃度は絶食時には検出限界以下であったが，非絶食時には有意に高値を示した ($p<0.05$)。妊娠ラットでは，5% FOS の血液，子宮，胎仔，肝臓，腎臓周囲脂肪組織の IMDH 濃度は，CONT 群と比較して有意に高値を示した ($p<0.05$)。以上の結果より，FOS を継続摂取させることにより，IMDH が生体内に連続的に分布すること，また，母獣ラットへ FOS を継続摂取させることにより，母獣の IMDH が胎盤を透過して胎仔へ移行することが明らかになった。

実験 II

EFA と EFA-FOS の母獣肝臓と羊水の葉酸量は，CONT と比較して有意に高値を示したが ($p<0.05$)，EFA と EFA-FOS の群間には統計学的有意差は観察されなかった。一方，胎仔肝臓中の葉酸は，3 群間に統計的有意差は観察されなかった。また，EFA-FOS の母獣肝臓と胎仔の IMDH 濃度は，CONT，ならびに EFA 群と比較して有意に高値を示した ($p<0.05$)。これらのことより，母獣が過剰摂取した葉酸の胎仔への移行は，母獣の葉酸摂取量に依存せず，有意差がないことが明らかになった。また，FOS を摂取した PEFAM において，母獣の IMDH が胎仔へ移行することが明らかになった。

母獣尿中と胎仔羊水の 8-OHdG は，CONT と比較して EFA-FOS に統計学的有意差は観察されなかったが，EFA では有意に高値を示した ($p<0.05$)。MDA は 3 群間に統計学的有意差は観察されなかった。母獣肝臓 superoxide dismutase (SOD) と heme

oxygenase 1 (HO-1) の酵素活性, タンパク質発現量, ならびに mRNA 発現量と *Interleukin-1 β* の mRNA 発現量, ならびに Nrf2 タンパク質発現量は, CONT と比較して EFA-FOS に統計学的有意差は観察されなかったが, EFA では有意に高値を示した ($p<0.05$)。胎仔肝臓 SOD のタンパク質, ならびに mRNA 発現量と Nrf2 タンパク質発現量は, CONT と比較して EFA-FOS に統計学的有意差は観察されなかったが, EFA では有意に高値を示した ($p<0.05$)。これらの結果は, EFA-FOS では, FOS 摂取により産生した IMDH が核内転写因子 Nrf2 を介し, EFA 摂取による酸化ストレス亢進を抑制したことを示唆している。胎仔 HO-1 に 3 群間の統計学的有意差が観察されなかった 1 つの要因には, 胎仔期のヘム代謝が未成熟であることが考えられる。

胎仔膵臓ランゲルハンス島 β 細胞における Pdx1, FoxO1, ならびに Insulin のタンパク質発現量は, CONT と比較して EFA では有意に低下したが, EFA-FOS には統計学的有意差は観察されなかった ($p<0.05$)。このことは, 母獣の FOS 摂取によって産生した IMDH の抗酸化作用を介して, 胎仔膵臓ランゲルハンス島 β 細胞におけるこれらのタンパク質発現量が維持されたことを示唆している。

【結論】

本研究では, 母獣へ FOS を継続摂取させることにより, 母獣ラットの IMDH が胎盤を透過して胎仔へ移行することを初めて明らかにした。PEFAM では, 母獣, ならびに胎仔の酸化ストレスが亢進すること, 一方, PEFAM へ FOS を継続的に摂取させることにより, 母獣の IMDH が胎仔へ移行し, 母獣, ならびに胎仔の酸化ストレスを抑制し, 胎仔膵臓ランゲルハンス島 β 細胞における Pdx1, FoxO1, ならびに Insulin の発現を調節することが明らかになった。また, IMDH の抗酸化作用の機序は, 外因性水素ガスの機序と同じ Nrf2 を介する経路であることを初めて明らかにした。以上のことより, 本研究仮説を証明することができたと考える。

本研究は, FOS 摂取による IMDH の新規な機能を明らかにし, 将来的には妊娠期の母子の健康の保持増進に寄与すると考える。

なお, 実験 I と実験 II の研究成果は, それぞれ以下の学術論文として公表した。

- 1) 奥田明日香, 金高有里, 後田ちひろ, 山崎優子, 倉若美咲樹, 田辺賢一, 渡辺章夫, 下内章人, 奥恒行, 中村禎子. 母獣ラットの難消化性糖質継続摂取による腸内細菌由来水素ガスの体内分布と胎仔への移行, 安定同位体と生体ガス医学応用 2021; 13: 13-21. <http://masib.jp/gakkaishi/detail/D13.html>
- 2) Okuda A, Kintaka Y, Tanabe K, Nakayama T, Shimouchi A, Oku T, Nakamura S. Fructooligosaccharide feeding during gestation to pregnant mice provided excessive folic acid decreases maternal and female fetal oxidative stress by increasing intestinal microbe-derived hydrogen gas. *Nutr Res* 2023; 120: 72-87. doi: 10.1016/j.nutres.2023.09.008.

Abstract of doctoral thesis
Department of Food and Nutritional Sciences,
Graduate school of Human Life Sciences, Jumonji University
(Candidate 21DA001 Asuka Okuda)

Study on the effects on maternal and fetal oxidative stress via intestinal microbes-derived hydrogen gas produced by feeding of nondigestible oligosaccharide to pregnant mother

- Investigation of factors that offspring of pregnant excessive folic acid model mouse induces abnormal glucose metabolism –

【Background and objectives】

Nondigestible oligosaccharides which is orally ingested, are fermented by host intestinal microbes to produce intestinal microbes-derived hydrogen gas (IMDH), short-chain fatty acids, vitamins, etc. as their metabolites. Oku *et al.* have been studying the bioavailability of fructooligosaccharide (FOS) and its novel physiological effects, and has shown that FOS feeding delays the onset of learning and memory disorder and osteoporosis in a senescence accelerated model mice, and that the mechanism of the delay is related to the antioxidant and anti-inflammatory effects of IMDH. On the other hand, it has reported that exogenous hydrogen gas alleviates symptoms via antioxidant and anti-inflammatory effects in animal models of liver disease and skin invasion. Although it has been reported that maternal oxidative stress is increased during pregnancy, no study on the antioxidant effects of exogenous hydrogen gas and IMDH during pregnancy were found in my literature review. The final purpose of this research is to clarify the novel physiological effects of nondigestible oligosaccharides and contribute to maintain and promote the health of mothers and children.

Recently, the National Institute of Health investigated the effects of maternal excessive folic acid (EFA) on the health problems in mother and fetus and reported that EFA during gestation increases the risk of developing obesity and insulin resistance after the children are grown. Kintaka *et al.* established the mouse model of the pregnant excessive folic acid model mouse (PEFAM) in order to investigate this mechanism. The definition of PEFAM is that the female offspring develop abnormal glucose metabolism at the age of 7 weeks after feeding of EFA diet to gestating mother of C57BL/6J mice. I speculated that in PEFAM, the feeding of EFA increased

oxidative stress and induced dysfunction of pancreatic islet of Langerhans β -cells in the fetuses, and decided to examine the following hypothesis using this mouse model. My hypothesis is that when PEFAM are fed FOS during gestation, IMDH from the mother is transferred to the fetus, suppresses the increase in oxidative stress caused by EFA in the mother and fetus, and maintaining the function of pancreatic islet of Langerhans β -cells to the normal status in the fetus. To clarify my hypothesis, I examined folic acid accumulation, IMDH concentrations, oxidative stress indices, antioxidant enzymes, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), a nuclear transcription factor, in mothers and fetuses. I also examined the expression of pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1), forkhead box protein O1 (FoxO1), and insulin, which are involved in the differentiation of pancreatic islet of Langerhans β -cells in fetuses. Prior to the experiment using PEFAM toward my hypothesis, I examined the effects of fasting on IMDH excretion in normal male rats fed the FOS diet, and the distribution of IMDH in the body and its transfer to the fetus after continuous intake of FOS in pregnant rats.

【Test substance】

I selected FOS provided from Meiji Co., Ltd. as my test substance. The oligosaccharide fraction of FOS has a purity of 98% and an average molecular weight of 608.

【Experimental methods】

Experiment I

1. Experimental animals, diets, and grouping

Twelve 8-week-old male Wistar rats (Crea Japan Co., Ltd.) were purchased and fed a control (CONT) diet in which cellulose, the dietary fiber source in the AIN-93G diet, was replaced with cornstarch, and a diet in which 80% of the sucrose in the CONT diet was replaced with FOS (8% FOS). In addition, 20 Wistar rats (Crea Japan Co., Ltd.) were purchased on the second day of gestation (GD2) and fed the CONT diet or a diet in which half of the sucrose in the CONT diet was replaced with FOS (5% FOS). The rats were kept *ad libitum* for both feeding and water supply.

2. Assay items and their methods

After euthanasia, excreted gases from rat and blood were collected in male rats, while in pregnant rats, blood, organs, and fetuses were collected. IMDH concentrations were measured in duplicate using a hydrogen/methane analyzer equipped with gas chromatography.

3. Statistical analysis

Means and standard deviations were calculated, and after tests of normality and equal variance, paired *t*-test or Student's *t*-test were performed. Statistical analysis was performed using SPSS ver. 26, and a probability of significance of less than 5% was considered as a statistically significant.

Experiment II

1. Experimental animals, diets, and grouping

C57BL/6J mice on GD1 were reared on the following three diets and euthanized on GD18. The diets were: AIN-93G purified diet containing 2 mg/kg folic acid as a control (CONT) diet, EFA diet with 38 mg/kg folic acid added to the CONT diet according to the PEFAM definition, and a diet in which half of the 10% sucrose in the EFA diet was replaced with FOS (EFA-FOS). As the restriction of food and water intake during gestation was considered stressful, the supplies of diets and drinking water were *ad libitum*. On GD 15, the maternal urine was collected, and on the GD18, the mother was euthanized and dissected, and the fetuses and organs such as liver were collected. Because the fetuses growing are rapid, the same experiments were repeated so that samples could be collected under the identical conditions.

2. Measurement items and their methods

The methods for measuring IMDH concentrations in the maternal liver and fetuses were the same as in Experiment I. Folic acid, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), malondialdehyde (MDA), and antioxidant enzyme activity of the liver mitochondrial fraction were measured in the maternal liver and amniotic fluid using a specified kit. Protein expressions of antioxidant enzymes and Nrf2 in maternal liver were measured by Western blotting, and mRNA expression of antioxidant enzymes and cytokines were measured by real-time RT-PCR and corrected by *Tbp* or *Actb*. Nrf2 in fetal liver, and pancreatic Pdx1, FoxO1, and Insulin were quantitatively analyzed using ImageJ after immunohistochemical staining.

3. Statistical analysis

Means and standard deviations were calculated, and after testing for normality and equal variance, thereafter ANOVA and the Tukey *HSD* test were performed. Statistical analysis was performed using SPSS ver. 26, and a probability of significance of less than 5% was considered as a statistically significant.

【Results and discussion】

Experiment I

In normal male rats, IMDH concentration in the 8% FOS were less than the

detection limit after fasting, however, it was significantly higher during non-fasting than that after fasting ($p<0.05$). In pregnant rats, IMDH concentrations in blood, uterus, fetuses, liver, and perirenal adipose tissue of the 5% FOS were significantly higher than those of the CONT ($p<0.05$). These results indicate that IMDH is continuously distributed in the live body by continuous feeding of the FOS, and that IMDH from the mother rats is transferred to the fetuses across the placenta by continuous feeding of FOS to the mother rats.

Experiment II

The folic acid accumulation in the liver and amniotic fluid of mothers by the feeding of EFA, as well as EFA-FOS feeding, were significantly higher than those of the CONT ($p<0.05$), however, no statistically significant difference was observed between the EFA and EFA-FOS. On the other hand, no statistically significant difference in folic acid in fetal liver was observed among the three groups. In addition, IMDH concentration in the maternal liver and fetuses in the EFA-FOS were significantly higher than that in the CONT and EFA ($p<0.05$). These results indicate that the transfer of EFA from the mother to the fetuses was independent of the folic acid feeding of the mothers and did not differ significantly. It was also found that maternal IMDH was transferred to the fetus in PEFAM fed FOS.

Maternal urinary and fetal amniotic fluid 8-OHdG was significantly higher in the EFA-FOS than those in the CONT ($p<0.05$), although no statistically significant difference was observed in the EFA. Maternal liver superoxide dismutase (SOD) and heme oxygenase 1 (HO-1) enzyme activities, protein expressions, and mRNA expression, as well as *Interleukin-1 β* mRNA expression and Nrf2 protein expression, were not statistically higher in the EFA-FOS compared to the CONT ($p<0.05$), however they were significantly higher in the EFA. Protein and mRNA expressions of fetal liver SOD and Nrf2 protein expression were not significantly different between the EFA-FOS and the CONT groups, however, those in EFA group was significantly higher than those in the EFA-FOS group ($p<0.05$). These results suggest that in the EFA-FOS, IMDH produced by FOS feeding in mother suppressed the increase in oxidative stress induced by EFA feeding via the nuclear transcription factor Nrf2. As the immaturity of heme metabolism during fetal life, the lack of statistically significant differences in fetal HO-1 was observed among the three groups.

Protein expressions of Pdx1, FoxO1, and Insulin in fetal pancreatic islet of Langerhans β -cells were significantly lower in the EFA group compared to the CONT ($p<0.05$), however, no statistically significant difference was observed in the EFA-

FOS. The results suggest that the protein expressions in fetal pancreatic islet of Langerhans β -cells were maintained via the antioxidant effect of IMDH produced by maternal FOS feeding.

【Conclusion】

In this study, I clarified for the first time that IMDH in mother is transferred to the fetus through the placenta by continuous intake of FOS to the mother. Next, I clarified that the continuous feeding of FOS to PEFAM suppressed oxidative stress in mothers and fetuses by transferring maternal IMDH to fetuses, and maintained the protein expressions of Pdx1, FoxO1 and Insulin in fetal pancreatic islet of Langerhans β -cells. In addition, I clarified for the first time that the mechanism of the antioxidant effect of IMDH is Nrf2-mediated pathway that is the same as the mechanism of exogenous hydrogen gas. Based on my results, I believe that I could prove my research hypothesis.

I believe that this study reveals a novel function of IMDH by FOS ingestion and will contribute to maintain and improve the of maternal and child health during pregnancy in the future.

My research results of Experiment I and Experiment II were published in the following scientific papers, respectively.

- 1) Okuda A, Kintaka Y, Ushiroda C, Yamazaki Y, Kurawaka M, Tanabe K, Watanabe A, Shimouchi A, Oku T, Nakamura S. Distribution and permeation into fetus of hydrogen gas produced from intestinal microbes by continuous feeding of nondigestible saccharide in pregnant rat. J JSMASIBG 2021; 3: 13–21.
<http://masib.jp/gakkaishi/detail/D13.html> (in Japanese).
- 2) Okuda A, Kintaka Y, Tanabe K, Nakayama T, Shimouchi A, Oku T, Nakamura S. Fructooligosaccharide feeding during gestation to pregnant mice provided excessive folic acid decreases maternal and female fetal oxidative stress by increasing intestinal microbe-derived hydrogen gas. Nutr Res 2023; 120: 72-87.
doi: 10.1016/j.nutres.2023.09.008.