

一酸化窒素ラジカル誘導 PC12 細胞のアポトーシスと葉酸化合物による抑制

平良淳誠

一酸化窒素ラジカル(NO)の過剰発生による生体内酸化ストレスは、アポトーシスによる細胞死を誘導し、高血圧、糖尿病などの生活習慣病や癌の要因をつくる。本研究は 4-Ethyl-2-hydroxyamino-5-nitro-3-hexenamamide (NOR3)と Sodium nitroprusside (SNP)による NO 供与剤を添加した PC12 細胞で、アポトーシスが起ることを MTT 法、Turnel 法および Hochest33258 蛍光染色で確認した。また、SNP が細胞内に取り込まれてカスパーゼ-3,7 を活性化させて細胞死を誘導したが、細胞膜外で NO 放出を特徴とする NOR3 では、同カスパーゼ活性を介さないアポトーシス誘導であった。この NO 誘発アポトーシス系で、葉酸化合物(葉酸、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸)の作用を検討した結果、SNP と NOR3 による細胞死を抑制した。また、葉酸化合物による NO 誘導アポトーシスの抑制が、カスパーゼ-3,7 活性の阻害と NO のスカベンジの 2 つの機構で抑制していることを明らかにした。

1 緒言

一酸化窒素ラジカル(NO)は、工場、自動車のエンジン、家庭でのコンロやガスストーブの燃焼の過程で発生し、大気汚染物質の原因となる。この NO は生体内で NO 合成酵素により、L-アルギニンを NADPH と酸素の存在下で酸化する過程で L-シトルリンと一緒に産生される。NO の生理作用は、血圧調節、神経伝達、免疫調節などが明らかされており、特に最近ではメタボリックシンドロームによる高血圧や糖尿病発症の要因になっていることを示す研究報告も多くなっている¹⁾。

葉酸は DNA や RNA を構成している核酸の合成、赤血球の合成やアミノ酸(グリシン、セリン、メチオニン)の合成およびたんぱく質の生成を促進する作用がある²⁻³⁾。特にその重要な作用は、妊婦初期におけるもので、この期間の葉酸摂取不足は、胎児の神経管閉鎖障害を起こし脳形成に影響を及ぼし、下肢の運動障害までも引き起こす⁴⁻⁵⁾。厚生労働省は 1 日あたりの葉酸摂取量を成人男女で 200 μ g、妊婦においては 2 倍量の 400 μ g と定めている。また、最近では葉酸による大腸癌の予防効果も示され⁶⁻⁷⁾、その作用機構も遺伝子レベルで解明されつつある⁸⁾。

最近、NO が 10.5 日のラット胚における神経管閉鎖障害の要因であることが示された⁹⁾。また、葉酸はこの NO ストレスで生じる胚の神経管閉鎖障害を軽減することが示された。このように NO と葉酸の生理作用は、メタボリックシンドロームのような複合的に生じる病態を予防する上で、重要な研究課題の一つと考えられる。本研究は NO ストレス細胞におけるアポトーシスを検討し、本系における葉酸化

合物の生理作用を明らかにすることを目的に行った。

2 実験方法

2-1 実験材料

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)、葉酸(Folic acid, FA)は和光純薬、Sodium nitroprusside (SNP)、ジヒドロ葉酸(Dihydrofolic acid, DiFA)、テトラヒドロ葉酸(Tetrahydrofolic acid, TetraFA)は Sigma、および 4-Ethyl-2-hydroxyamino-5-nitro-3-hexenamamide (NOR3)は同仁化学で購入した。その他の試薬もすべて高純度の分析用試薬を用いた。

2-2 細胞調製

PC12 細胞(ATCC)は 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 2.5×10^4 細胞数/well に調製して実験に供した。

2-3 NO によるアポトーシス誘導細胞と葉酸化合物の評価

SNP (500 μ M)は 17 時間、また NOR3 (200 μ M)の場合は 3 時間インキュベーションを行い、アポトーシスを誘導させた。葉酸化合物(最終濃度 1%以下の DMSO に溶解)は 1 時間プレインキュベーション後に、SNP あるいは NOR3 を添加した。

2-4 細胞生存の測定

細胞の生存は MTT アッセイで判定した。MTT (0.5 mg/ml PBS)を添加後、3 時間インキュベーションを行い、培地をよく抜き取り、場合によっては

PBSで洗浄を行い、DMSO (100 μ l)で抽出した。抽出液は吸光度570 nm (対照 630 nm)をマイクロプレートリーダー (BIO-RAD Model 550、BIO-RAD)で測定した。細胞死の抑制率は、正常細胞100%の生存に対するSNP、NOR3あるいは葉酸化合物と一緒に添加した時の細胞生存率で示した。

2-5 カスパーゼ活性の測定

PC12細胞 (2.5 X 10⁴ cells/well)を96穴マイクロプレートで1日培養後、SNP (500 μ M)とNOR3 (200 μ M)を添加して、各々17時間および1時間インキュベーションを行った。カスパーゼ活性はCaspase-GloTM 3/7 assay kit (Promega)で測定した。すなわち、基質Z-DEVDをもつルシフェリン (Caspase-GloTM 3/7)は、活性化カスパーゼによってATPと酸素下で切断された後、ルシフェラーゼで発光する。この反応溶液100 μ lを各ウェルに加えて、遮光状態にして室温で2時間30分反応させた。カスパーゼの測定は、反応液全量を発光検出器 (CLD-110、Tohoku Electronic Industrial Co. LTD)を用いて測定した。

2-6 細胞のタンパク定量

細胞のタンパク量はBCA protein assay kit (Pierce)で測定した。

2-7 アポトーシス細胞の形態観察

2-7-1 TURNEL法

PC12細胞 (5.0 X 10⁴ cells/well)をpoly-L-lysineをコーティングしたチャンバースライド (Lab-Tek II Chamber slide system、Nalge Nurc International)上で培養して、Dead EndTM Colorimetric TURNEL System kit (Promega)によるTURNEL法でアポトーシス細胞を検出した。すなわち、アポトーシスを起こした細胞のヌクレオソームの断片化DNAの遊離3'-OH末端に、フルオロセイン-dUTPをターミナルトランスフェラーゼで標識後、パーオキシダーゼ標識フルオロセイン抗体とDAB発色基質-H₂O₂で検出して観察した。アポトーシス細胞は顕微鏡 (OLYMPUS IX70、Olympus)で観察し、撮影をした。

2-7-2 蛍光色素染色によるアポトーシス細胞

アポトーシスに伴う形態変化の特徴であるクロマチン凝縮を、DNAに特異的に結合する蛍光色素ヘキスト33258で染色した。マイクロプレートから回収した浮遊細胞液を遠心して上清を除去後、100 μ l PBSを加えて再度、遠心して上清を除去した。

10%中性ホルマリン液で固定して、室温で30分間静置した後、遠心 (900 r.p.m、5分間)で上清を除き、細胞を1mlのPBSに懸濁した。再度、遠心して上清を除き、20 μ lのPBSに懸濁した。4 μ lのヘキスト33258 (1mM)を加えて、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS DP70、Olympus)で観察した。

2-8 NO₂/NO₃ アッセイ

葉酸化合物によるNOスカベンジ作用を調べるため、NOR3 (200 μ M)のみ、あるいは各濃度の葉酸化合物を調製して、室温で反応させた。NOの測定は、その酸化物のNO₂をGriess法で測定した。96穴マイクロプレートに反応液の80 μ lを移し、緩衝液を20 μ l加えて全量100 μ lとした。1% sulfanilamideのリン酸溶液を50 μ l加えて5分間放置する。

0.1% N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride水溶液を加えて10分間、室温で静置後に、マイクロプレートリーダーで540 nmの吸光度を測定した。

2-9 トータルRNAの抽出とcDNAの合成

細胞は5 X 10⁶/mlに調製して、トータルRNAを、RNase Mini Kits (QIAGEN)を使用して抽出した。抽出したRNAはAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)で純度を評価した。RNAは、SuperScriptTM Choice System (Invitrogen)を使用して、手順マニュアルに従いcDNAを合成した。

2-10 一酸化窒素合成酵素のRT-PCR

細胞より調製したcDNAは、一酸化窒素合成酵素 (NOS)のプライマーを用いてPCRで増幅後に、10%アクリルアミドゲル電気泳動を行った。NOSのプライマーは、iNOS (F; CCTGTGTTCA GCTACG CCTTCとR; CTGAGG GCTCTGTTGAGGTC)、eNOS (F; TCTTCG TTCAGCCATCACAGとR; GGTGTGCT GGTGTC CAGAT)、nNOS (F; GAATC CAGGTG GACAGAGAとR; TCC TIGAGCTGGTAGGTGCT)およびGAPDH (TTGACCTCAACTACATGG)を用いて、PCRの条件は94 ; 2min、94 ; 30sec、60 ; 30sec、72 ; 1minをr-Taqポリメラーゼ (Takara)を使い30サイクルで行った。

2-11 HPLCの測定

葉酸のNOスカベンジ反応物を調べるため、NOR3 (200 μ M)と各濃度の葉酸をPBSに溶解して調製した溶液は、室温で反応させた後にHPLC測定を行った。カラムはYMC-Pack Pro C18 (250 X 4.6 mm ID、5 μ m、YMC)を用いて、次の分析条件で行った。流速: 0.8ml/min、カラムオープン温度: 40、UV検出: 210nm、注入量: 20 μ l、また溶出条件は、アセトニトリル溶液で5min保持後にTFA (0.025%、pH2.6)でグラジエント (25%

(11min) 40% (19min) を1分間保持、100% (25min)) を行い分析した。

2-12 DNA マイクロアレイによる遺伝子の発現解析

GeneChip による遺伝子の発現解析はOne-Cycle cDNA Synthesis 法を AFFYMETRIX Gene Chip (Affymetrix) を用いて行った。トータルRNA(1~8μg)にT7-オリゴdT プライマーを混合し、mRNA を逆転写してファーストストランド cDNA を合成した

(One-Cycle Target Labeling and Control Reagents、Affymetrix) 合成したcDNA を鋳型にしてRNase でRNA を消化しながら dsDNAs を合成し、スピカラムを使い精製した。次に、dsDNAs からピオチン標識 cRNA を作成し、精製した (One-Cycle Target Labeling and Control Reagents、Affymetrix) 作成したピオチン標識 cRNA は、94 で35分間反応させて断片化して (Sample Cleanup Module、Affymetrix) Agilent2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で純度を評価した。断片化cRNA はGene チップ (GeneChip、Affymetrix) に16時間かけてハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後に洗浄とストレプトアビジン-フィコエリスリンで蛍光染色を行い、スキャナーに取り込んで蛍光シグナル強度を数値化した。

3 実験結果

3-1 NO によるアポトーシス誘導細胞死と葉酸化合物の効果

3-1-1 SNP によるアポトーシスと葉酸化合物の効果

各濃度の SNP 添加による細胞死を検討した。図には示さないが、細胞は濃度依存で死滅した。500μM 濃度の SNP 処理では細胞生存率が 40%であった (図 1)。本研究における SNP の濃度は、全ての実験系において 500μM で行った。この細胞死がアポトーシスであることを、TURNEL 法で確認した (図 2)。図 2 に示されるように、無処理のコントロール細胞に対して、SNP 処理した細胞ではヌクレオソームの断片化した細胞が染色されたアポトーシス細胞が検出された。また、図 3 に示されるように、蛍光色素ヘキスト 33258 による染色では、矢印で示した細胞のようにクロマチンの凝縮した形態が観察された。

次に、この SNP 処理、すなわち NO による細胞死に対する葉酸化合物 (葉酸、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸) の効果を検討した。本系での評価の前に、使用した葉酸化合物の濃度に細胞毒性のないことを確認した。図 1 に示されるように、何れの葉酸化合物も、SNP による細胞死を 10μM の低濃度で有意に抑制した。テトラヒドロ葉酸は、処理した濃度に

依存して細胞死の抑制が観察された。葉酸処理した細胞では、SNP 処理によって起こるアポトーシスの細胞数が減少していたことを、顕微鏡で観察した (図 2)。

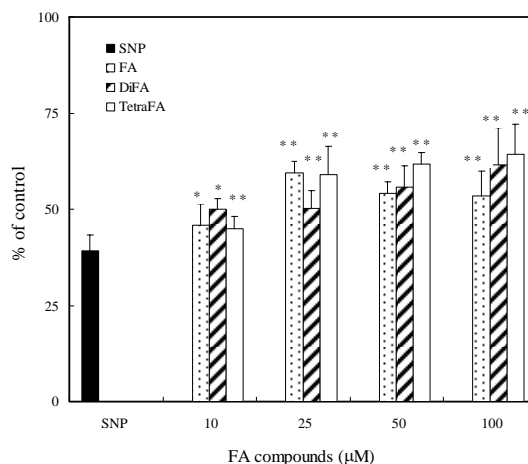


図 1 SNP による NO 誘導細胞死と葉酸化合物による抑制
FA: 葉酸、DiFA: ジヒドロ葉酸、TetraFA: テトラヒドロ葉酸
 $p < 0.05$, $** < 0.01$

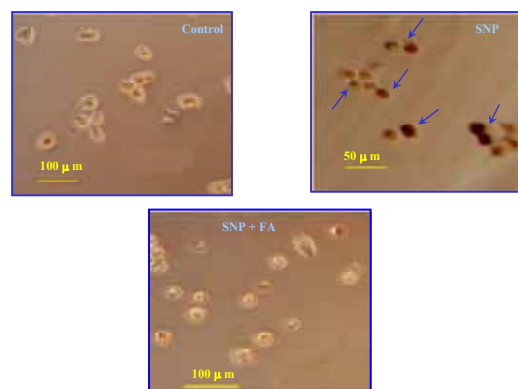


図 2 SNP による NO 誘導アポトーシス細胞と葉酸による抑制

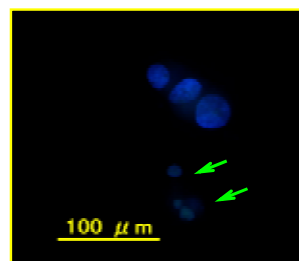


図 3 SNP による NO 誘導アポトーシス細胞のヘキスト 33258 による染色

→; クロマチン凝縮したアポトーシス細胞

3-1-2 NOR3 によるアポトーシスと葉酸化合物の効果

各濃度 (50-1000 μ M) の NOR3 を、1 および 3 時間処理した時の細胞死を図 4 A に示した。細胞死は NOR3 の処理時間と濃度に依存していた。また、NOR3 による細胞死がアポトーシスによることを TUNEL 法で観察した。SNP 同様にヌクレオソームの断片化したアポトーシス細胞が染色された (図 4 B、矢印で示した細胞)。

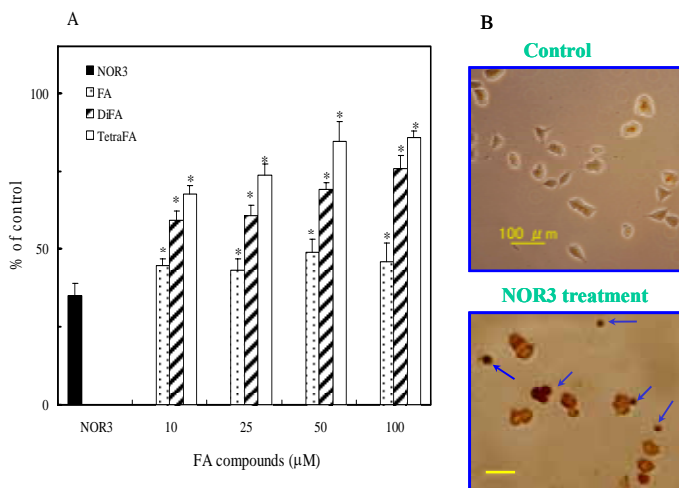


図 4 NOR3 による NO 誘導細胞死とアポトーシス
A: NO 誘導細胞死 * $p < 0.01$ 、B: アポトーシス細胞の検出
FA: 葉酸、DiFA: ジヒドロ葉酸、TetraFA: テトラヒドロ葉酸
→: アポトーシス細胞

次に 200 μ M の NOR3 から放出された NO による細胞死に対する葉酸化合物 (葉酸、デヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸) の効果を調べた (図 5)。SNP 処理の場合と同様に葉酸化合物が細胞死を 10 μ M の低濃度で有意に抑制した。ジヒドロ葉酸とテトラヒドロ葉酸は、処理した 100 μ M の範囲で濃度に依存して細胞死を抑制した。

3-2 DNA マイクロアレイによる遺伝子の発現解析

DNA マイクロアレイの結果から、SNP と NOR3 とともに FAS のアダプターである FADD に結合しているカスパーゼ-8 前駆体を抑制している FLIP (caspase-8-inhibitory protein) の発現の低下を認めた。従って、両 NO 供与剤も活性化カスパーゼ-8 誘導していることが推察された。また NOR3 は、カスパーゼ非依存のアポトーシス経路の小胞体ストレス経路にある Bid の発現や endonuclease G を活性化して、アポトーシスの誘導や DNA の分解を起こしていることが示唆された。

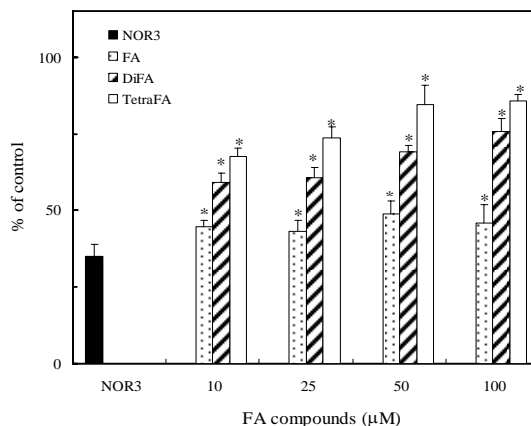


図 5 NOR3 による NO 誘導細胞死と葉酸化合物の抑制
FA: 葉酸、DiFA: ジヒドロ葉酸、TetraFA: テトラヒドロ葉酸
 $p * < 0.01$

3-3 NO によるカスパーゼ活性と葉酸化合物による抑制

SNP と NOR3 によるアポトーシス誘導がカスパーゼ活性化を伴うかを検討するため、アポトーシスシグナルの下流にあるカスパーゼ-3,7 活性を測定した (図 6)。SNP 添加の細胞で、コントロールに対して 4 倍のカスパーゼ-3,7 の活性を認めた。しかしながら、NOR3 を処理した細胞ではカスパーゼ-3,7 の誘導は認められなかった。SNP 処理により誘導されるカスパーゼ-3,7 活性が、葉酸化合物 (葉酸、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸) により抑制されるかを調べた。その結果、葉酸化合物でカスパーゼ-3,7 活性を低下させた。この結果は、図 2 に示した葉酸化合物による細胞死抑制の結果と一致した。この結果から SNP によるアポトーシスがカスパーゼ-3,7 を活性化させて誘導していること、葉酸化合物は、その酵素活性を阻害することで抑制していることが明らかとなった。

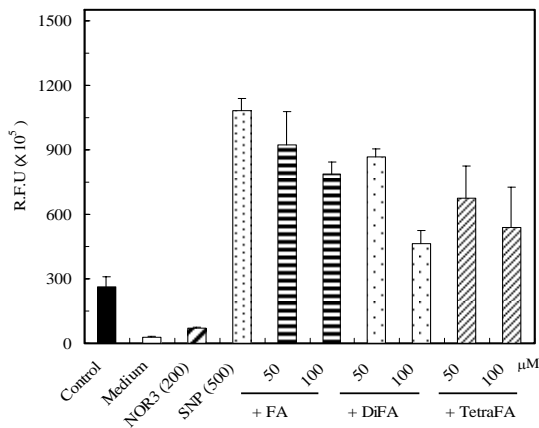


図 6 NO 誘導によるカスパーゼ-3,7 活性と葉酸化合物による抑制

3-4 葉酸化合物による NO スカベンジ

NO に対する葉酸化合物の抑制作用を検討した。反応系は NOR3 から放出される NO の葉酸化合物によるスカベンジを、NO₂ 生成の増減で調べた。図 7 に示されるように、NOR3 から放出された NO を葉酸およびその誘導体のジヒドロ葉酸とテトラヒドロ葉酸は、濃度依存にスカベンジした。NO 誘発細胞死が葉酸化合物で抑制される図 3 の結果を支持した。葉酸が NO と直接反応していることを確認するため、反応溶液を HPLC で分析した。NO と反応したため、葉酸のピークは減衰し、一方で、葉酸と NO の反応物と思われる 2 つのピーク、FA-NO1 と FA-NO2 が生成した (図 8)。従って、葉酸化合物には NO をスカベンジする作用があることが明らかとなった。

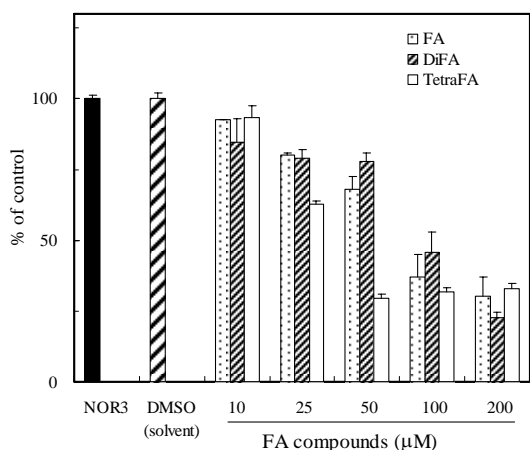


図 7 葉酸化合物による NO スカベンジ作用

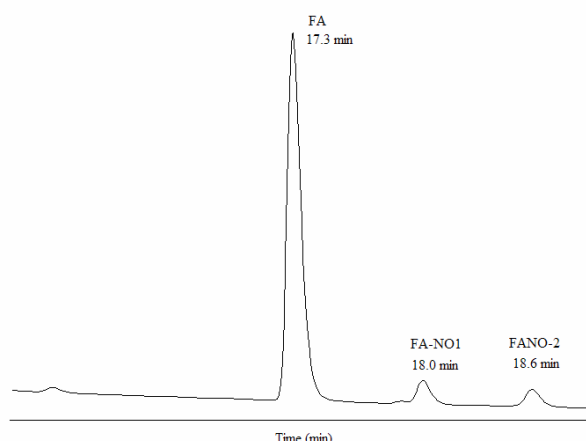


図 8 葉酸の NO スカベンジと反応物

FA: 葉酸、FA と NO の反応物; FA-NO1、FA-NO2

3-5 葉酸化合物による NOS 発現への影響

葉酸化合物による NOS 発現に及ぼす影響を調べた。図 9 に PC12 細胞での NOS 発現の RT-PCR の電

気泳動の結果を示した。PC12 細胞は正常な状態で、nNOS が発現していた。葉酸化合物で処理した PC12 細胞でも、nNOS が正常細胞と変らぬ発現で、iNOS と eNOS の何においても、発現は認められなかった。従って、葉酸化合物は、NOS 発現に影響を及ぼさないことが明らかとなった

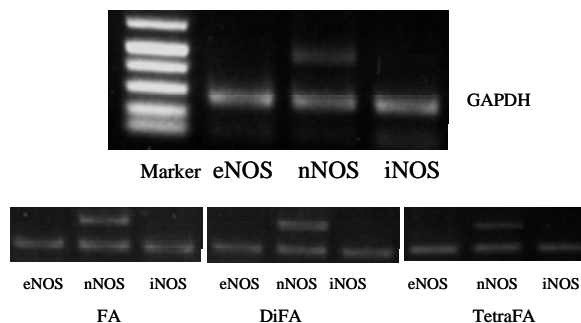


図 9 葉酸化合物と NOSs 発現

4 考察

これまでに一酸化窒素ラジカル (NO) の生理作用として、血圧調節、神経伝達、免疫調節などが明らかされた。最近では NO がメタボリックシンドロームによる高血圧や糖尿病の発症要因になっていることも明らかにされている¹⁾。

アポトーシスは生命の基本をなす生理作用 (細胞死) で、個体発生には必要なプロセスである。一方でメタボリックシンドロームにおける疾患や発癌においてもアポトーシスは避けられないプロセスでもある。

本研究は、PC12 細胞を用いて SNP と NOR3 のタイプの違う NO 供与剤による細胞死を観察した (図 1、4)。この細胞死が、ヌクレオソームの断片化、クロマチンの凝縮をおこすアポトーシス特有であることを示した (図 2、3、4)。DNA マイクロアレイの結果では、両 NO 供与剤とも、FADD に結合しているカスパーゼ-8 前駆体を抑制している FLIP (caspase-8-inhibitory protein) の発現抑制を認めた。即ち、アポトーシス誘導シグナルの開始がカスパーゼ-8 の活性化に伴うことを示唆した。カスパーゼ-8 の活性化によってカスパーゼ-3,7 が実行されてアポトーシスシグナル伝達が進む。事実、カスパーゼ-3,7 の活性が、SNP で処理した細胞で認められた。しかしながら、NOR3 の場合には活性が認められなかった (図 6)。NOR3 処理 1 日後にも、カスパーゼ-3,7 の活性は認められないことから、NOR3 のアポトーシスには、SNP とは異なるシグナル伝達経路が作用しているものと考えられる。DNA マイクロアレイの遺伝子発現では、NOR3 処理による PC12 細胞では小胞体ストレスによるアポトーシスシグナル経路にある Bad の発現が認

められていることから、カスパーゼに依存しない経路によるアポトーシスだと推察された。今後、両供与剤によるカスパーゼ8の活性を測定することで、明らかになるものと思われる。

葉酸はDNAやRNAを構成している核酸の合成、赤血球の合成やアミノ酸の合成などに関与している²⁻³⁾。特にその重要な作用は、妊婦初期におけるもので、この期間の葉酸摂取不足は、胎児の神経管閉鎖障害を起こし脳形成に影響を及ぼす⁴⁻⁵⁾。最近の研究報告で、NOが10.5日のラット胚における神経管閉鎖障害の要因であることが示された⁹⁾。また、葉酸はこのNOストレスで生じる胚の神経管閉鎖障害を軽減した。本報では、過剰なNOストレスでアポトーシス誘導したPC12細胞における葉酸化合物の作用を検討した。その結果、葉酸化合物がSNPおよびNOR3による細胞死を、軽減させていることを明かにした(図1、2、4)。本アポトーシス誘導系においては、葉酸化合物のみではNOSの発現に変動がないので、NOS由来のNOの産生、あるいはNOSそのものが系に及ぼす影響はないものと判断できる(図9)。

一方、葉酸化合物は、アポトーシスシグナル伝達に関与するカスパーゼ-3,7の活性の阻害をした(図6)。従って、図10のスキームに示したように、葉酸化合物はカスパーゼ-3,7前駆体が活性化カスパーゼ-3,7になる過程か、その上流の活性化カスパーゼ-8を阻害することでBidによるミトコンドリアからのチトクロームCの放出促進、それに続くApaf1の活性化を抑制しているものと推察される。あるいは、Apaf1によるカスパーゼ-9の活性化を制御しているBcl-2を抑制していることも考えられる。従って、今後の研究課題として、カスパーゼ-8および9の活性測定は機構解明に必要なものと思われる。またBcl-2タンパク発現の確認もすることで、SNPによるアポトーシス誘導シグナル経路と葉酸化合物による抑制機構も明確になるものと思われる。

NOR3はその分子内の50%のNOを30分で自発的に放出するNO供与剤である。NOR3から放出したNOによる細胞膜の攻撃で、アポトーシス誘導はかなり早い時間で起こっていた(図4)。このNOR3からのNO放出による細胞死の抑制には、葉酸化合物分子自体にNOスカベンジ作用を有していることが推察された。結果は、予想していたように、葉酸化合物によるNOスカベンジ作用が示された(図7)。また、葉酸化合物がNOを直接捕捉している反応物も確認できた(図8)。この結果は葉酸化合物のNO誘導アポトーシスの抑制には、カスパーゼ阻害の他に、NOのスカベンジ作用が機能していることを示唆している。

上述したように多様な生理作用を有する葉酸は、現在でもその新たな生理作用や機構解明の研究が進められている。本研究においても、葉酸およびその代謝体のデヒドロ葉酸とテトラヒドロ葉酸にNO誘導アポトーシスの抑制作用を初め

て明らかにした。

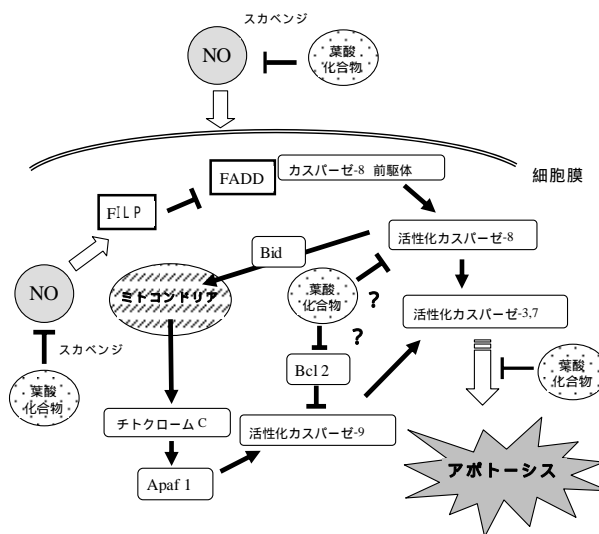


図10 NO誘導PC12アポトーシス細胞と葉酸化合物による抑制機構

本研究で明らかにされた葉酸化合物の機能性は、生体内における過剰なNOのアポトーシス誘導に対して、カスパーゼの阻害とNOスカベンジの2つの機構で調節しているものと推察される(図10)。

また、本報での結果は、葉酸の1日あたりの摂取量を増加させる必要性を支持する基礎的なデータにもなった。

5 まとめ

本研究は、NO誘導PC12細胞死が、カスパーゼ-3,7を介したアポトーシスであることを明らかにした。葉酸化合物(葉酸、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸)が、このNO誘導アポトーシスを、カスパーゼ-3,7活性阻害とNOスカベンジの両方の機構で抑制していることを明らかにした。

謝辞

本研究は平成17年度沖縄県先導・戦略的研究推進事業で行った。

参考文献

- 1) 第6回日本NO学会学術集会抄録集、2006(NITRIC OXIDE SOCIETY OF JAPAN)
- 2) Kamen B., Folate and antifolate pharmacology. Semin Oncol: 24. S18-30-S18-39(1997)

- 3) Zittoun J., Anemias due to disorder of folate, vitamin B12 and transcobalamin metabolism. *Rev. Prat*: 43 (11) 1358-1363 (1993)
- 4) Milunsky A., H. Jick, S.S. Jick, C.L. Bruell, D.S. MacLaughlin, K.J. Rotman and W. Willet. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *J. Am. Med. Assoc.*: 263 (20) 2747-2749 (1988)
- 5) Mulinare J., J.F. Coladero, J.D. Erickson and R.J. Berry. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *Int. J. Epidemiol.*: 260 (21) 3141-3145 (1989)
- 6) Freudenheim J.L., S. Graham, J.R. Marshall, S. Cholewinski and G. Wilkinson. Folate intake and carcinogenesis of colon and rectum. *Int. J. Epidemiol.*: 20 (2) 368-374 (1991)
- 7) Giovannucci E., M.J. Stampfer, G.A. Colditz, D.J. Hunter, C. Fuchs, B.A. Rosner, F.E. Speizer and W.C. Willett. Multivitamin use, folate and colon cancer in women in the nurses' health study. *Ann. Intern. Med.*: 129, 517-524 (1998)
- 8) Jaszewski R., B. Millar, J.S. Hatfield, K. Nogothu, R. Finkenauer, A.K. Rishi, J.A. Naumoff, O. Kucuk, B.N. Axelrod, A.P.N. Majumdar. Folic acid reduces nuclear translocation of β -catenin in rectal mucosal crypts of patients with colorectal adenomas. *Cancer Lett.*: 206, 27-33 (2004)
- 9) Weil, M., R. Abeles, A. Nachmany, V. Gold and E. Michael. Folic acid rescues nitric oxide-induced neural tube closure defects. *Cell Death and Differentiation*: 11, 361-363 (2004)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

TEL (098)929-0111

FAX (098)929-0115

URL : <http://www.pref.okinawa.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。