

## メタロチオネインノックアウトマウスを利用した毒性解析

佐藤 雅彦

## Analysis of Toxicity Using Metallothionein Knockout Mice

Masahiko SATOH

Laboratory of Pharmaceutical Health Sciences, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University,  
1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan

(Received August 2, 2006)

Two research groups produced metallothionein (MT)-I/II knockout mice with null mutation of *MT-I* and *MT-II* genes. In 1993, Choo et al. produced MT-I/II knockout mice with a mixed genetic background of 129/Ola and C57BL/6 strains. Palmiter et al. also produced MT-I/II knockout mice with a genetic background of 129/Sv strain in 1994. Subsequently, MT-I/II knockout mice have been used to clarify the biological function and physiological role of MT by many research groups. We were also provided MT-I/II knockout mice from Dr. Choo (Australia). F1 hybrid mice were mated with C57BL/6, and their offspring were back-crossed to C57BL/6 for ten generations. MT-I/II knockout ( $MT^{-/-}$ ) mice and wild-type ( $MT^{+/+}$ ) mice were obtained by mating of those heterozygous ( $MT^{+/-}$ ) mice. We have been investigating the susceptibility of MT-I/II knockout mice to toxicity of harmful factors and some diseases. Our present studies found that MT-I/II knockout mice have an increased sensitivity to harmful metals such as cadmium, mercury, and arsenic, oxidative stress, chemical carcinogenesis and neurodegenerative diseases. These results clearly indicate that MT plays an important role in defense of these toxicities. In this review, we present our findings and summarize recent reports with MT-I/II knockout mice concerning the role of MT as a biological protective factor.

**Key words**—metallothionein; knockout mice; harmful factors; toxicity; biological protective factor

## 1. はじめに

近年、遺伝子工学的手法を用いて、メタロチオネイントランスジェニックマウス（メタロチオネイン-I過剰発現マウス,<sup>1)</sup>メタロチオネイン-III過剰発現マウス,<sup>2)</sup>メタロチオネイン-IIA心臓過剰発現マウス<sup>3)</sup>）やメタロチオネインノックアウトマウス（メタロチオネイン-I/IIノックアウトマウス,<sup>4,5)</sup>メタロチオネイン-IIIノックアウトマウス<sup>6)</sup>）などのメタロチオネイン遺伝子改変マウスが作製され、メタロチオネインの生理機能の解明のための実験モデルとして広く利用されている（Table 1）。

メタロチオネイン-I/IIノックアウトマウスは、1993年と1994年にメタロチオネイン-I及びメタロチオネイン-IIの発現を抑えたマウスとしてChoo

ら<sup>4)</sup>とPalmiterら<sup>5)</sup>によってそれぞれ作製された。また、1997年にはメタロチオネイン-IIIノックアウトマウスがPalmiterらによって作製されている。<sup>6)</sup>なお、メタロチオネイン-I/IIノックアウトマウス及びメタロチオネイン-IIIノックアウトマウスはともに正常な繁殖能力を持ち、発達・成長等に不具合を生じることもない。したがって、少なくともメタロチオネインは生命維持に直接関与するタンパク質ではない。

その後、メタロチオネイン-I/IIノックアウトマウスは世界中に普及され、様々なメタロチオネイン研究に利用されている。これまでの研究成果を毒性についてまとめてみると、メタロチオネイン-I/IIノックアウトマウスは、有害金属、酸化ストレス、化学・放射線発がん及び神経変性疾患などに対して高感受性であり、さらに有害金属の動態、免疫応答並びに細胞増殖にも影響を及ぼすことが報告されている。われわれも、メタロチオネイン-I/IIノックアウトマウスを用いて、有害金属及び酸化的ス

愛知学院大学薬学部衛生薬学講座（〒464-8650 名古屋市千種区楠元町1-100）

e-mail: masahiko@dpc.agu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS40で発表したものを中心に記述したものである。

Table 1. Metallothionein (MT) Transgenic Mice

Mice	Strains	MT level	Year
MT transgenic mice			
MT-I transgenic mice	C57BL/6 & SJL	16-Fold in the liver	1993
MT-III transgenic mice	C57BL/6 & SJL	3.4-Fold in the brain	1995
Cardiac MT-IIa-overexpressing transgenic mice	FVB	10-Fold or 130-fold in the heart	1997
MT knockout mice			
MT-I/II knockout mice	C57BL/6 & OLA129	—	1993
MT-I/II knockout mice	129/Sv	—	1994
MT-III knockout mice	129/Sv	—	1997

トレスに起因した毒性や発がんにおけるメタロチオネインの役割について検討を進めている。

本稿では、生体内防御因子としてのメタロチオネインの役割について、メタロチオネイン-I/II ノックアウトマウスを用いたわれわれの研究成果並びに最近の知見を紹介したい。

## 2. 有害金属の毒性

**2-1. カドミウム** メタロチオネイン-I/II ノックアウトマウスを利用した毒性研究では、カドミウム毒性に関する研究が最も数多く報告されている。それらの結果をまとめると、カドミウムの主要な毒性である腎毒性<sup>7,8)</sup>を始め肝毒性<sup>9,10)</sup> 骨毒性<sup>11)</sup> 血液毒性<sup>12)</sup> 免疫毒性<sup>12)</sup> 及び胎仔毒性<sup>13)</sup> に対する感受性がいずれも野生型マウスに比べてメタロチオネイン-I/II ノックアウトマウスの方が高いことが示されている (Table 2)。さらに、メタロチオネイン誘導能を有する亜鉛の前投与によってカドミウムの急性肝毒性が野生型マウスでは軽減されるが、メタロチオネイン-I/II ノックアウトマウスでは全く影響を及ぼさないことが報告されている。<sup>9)</sup> このことは、亜鉛前投与によるカドミウム急性毒性の軽減作用があらかじめ亜鉛によって誘導合成されたメタロチオネインによることを示唆している。

また、カドミウム毒性の主要な標的組織である腎臓に取り込まれたカドミウムは、通常メタロチオネインと結合して毒性を示さない状態で腎臓に蓄積する。しかしながら、カドミウムが腎臓で過剰に蓄積するとメタロチオネインが飽和状態となり、メタロチオネインと結合しないカドミウムが増加するために、腎臓が障害されると考えられている。マウスにおいて腎臓中カドミウム濃度がおよそ 150  $\mu\text{g/g}$  組織を超えると腎障害が認められるが、メタロチオネ

Table 2. Metals: High Sensitivity of Metallothionein-I/II Knockout Mice

Metals	Toxicity
Cadmium	Nephrotoxicity, hepatotoxicity, bone toxicity, hematotoxicity, immunotoxicity, fetal toxicity
Inorganic mercury	Nephrotoxicity
Mercury vapor	Pulmonary toxicity, behavioural alterations
Zinc	Hepatotoxicity, pancreatic injury
Arsenic (arsenic trioxide)	Hepatotoxicity
Arsenic (dimethylarsenic acid)	Genotoxicity

イン-I/II ノックアウトマウスでは腎臓中カドミウム濃度が 10  $\mu\text{g/g}$  組織以下でも腎毒性を発症することが示されている。<sup>7,8)</sup> このように、カドミウムの腎毒性は腎臓でのメタロチオネインの発現量に依存している可能性があり、腎臓中メタロチオネイン濃度が低い場合には、日常レベルのカドミウムの摂取でも腎毒性が引き起こされるかもしれない。

培養細胞を用いた *in vitro* の実験系においてもカドミウムの細胞毒性に関する研究が進められている。メタロチオネイン-I/II ノックアウトマウス由来の線維芽細胞<sup>14,15)</sup> や肝細胞<sup>16)</sup> において、カドミウムに対する感受性が増大することが報告されている。以上のように、メタロチオネイン-I/II ノックアウトマウスを利用することによって、メタロチオネインがカドミウム毒性の軽減に重要な役割を果たしていることが示されている。

**2-2. 水銀** 筆者らはイオン型無機水銀 (塩化第二水銀) の皮下投与による腎毒性や金属水銀蒸気曝露による肺毒性に対してメタロチオネイン-I/II

ノックアウトマウスが高い感受性を示すことを明らかにしている。<sup>17,18)</sup> さらに、低濃度の水銀蒸気長期曝露による神経行動毒性についてオープンフィールドテスト及び受動回避学習テストを指標に検討したところ、水銀蒸気曝露されたメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて、探索行動の亢進や学習能力の低下が顕著に認められた。<sup>19,20)</sup> また、水銀蒸気を妊娠期間中曝露した際の仔マウスにおいてもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスで神経行動毒性が増強されることを見出ししている。<sup>21)</sup>

このように、メタロチオネインは、イオン型無機水銀による腎毒性や金属水銀蒸気曝露による肺毒性及び神経行動毒性に対して防御作用を示すことが明らかにされている (Table 2)。

**2-3. その他の金属類** 亜鉛の投与による膵臓障害に対しても、水銀やカドミウムの場合と同様に、メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスでは高い感受性を示すことが報告されている。<sup>22)</sup>

無機ヒ素化合物である亜ヒ酸の投与による肝毒性及び腎毒性に対してもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスが高感受性であることが報告されている。<sup>23)</sup> また、筆者らは、無機ヒ素の代謝物であるジメチルアルシン酸を投与したメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べて DNA 鎖切断及び酸化的 DNA 損傷が著しく増加することを見出ししている。<sup>24)</sup>

### 3. 有害金属の動態

**3-1. カドミウム** メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスにおけるカドミウムの体内動態が、筆者らを含めていくつかの研究グループによって検討されている。カドミウムを単回皮下投与した際、メタロチオネインは肝臓へのカドミウムの取り込みには関与しないが、肝臓中でのカドミウムの貯留に関与することを見出しされている。<sup>25,26)</sup> さらに、カドミウムを連続長期曝露したメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスの腎臓中カドミウム濃度は、野生型マウスの 1/5 程度 ( $10 \mu\text{g/g}$  組織) に減少していることが示されている。<sup>7,8)</sup>

カドミウムの腸管吸収については、カドミウムを高投与量 ( $2.0 \text{ mg/kg}$ ) 経口投与した際にはメタロチオネインは関与しないが、比較的低投与量 ( $0.1 \text{ mg/kg}$ ) では肝臓へのカドミウムの蓄積がメタロチ

オネイン -I/II ノックアウトマウスで増加することが報告されている。<sup>27)</sup> しかしながら、その一方で、カドミウムの腸管吸収にメタロチオネインが影響を及ぼさないとの報告もあり、<sup>28)</sup> カドミウムの腸管吸収に及ぼすメタロチオネインの役割については、いまだ明確な結論は得られていない。

また、妊娠 18 日目のメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスにカドミウムを静脈内投与した際、胎仔へのカドミウムの蓄積が野生型マウスに比べて高いことが見出しされている。<sup>29)</sup> さらに、低濃度のカドミウムを妊娠期間中あるいは妊娠期及び授乳期間中に経口曝露した際にもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスの胎仔あるいは新生仔へのカドミウムの蓄積が野生型マウスの場合に比べて高いことが報告されている。<sup>30,31)</sup>

以上のようにメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを用いた検討により、カドミウムの体内動態に及ぼすメタロチオネインの関与が明らかにされつつあり、今後の研究に期待したい。

**3-2. 水銀** 筆者らは、メタロチオネインが塩化第二水銀皮下投与後の腎臓や金属水銀蒸気曝露後の肺及び腎臓での水銀の蓄積・保持に深く関与することをメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを用いて明らかにしている。<sup>17,32)</sup> さらに、妊娠 16 日目のメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスに金属水銀蒸気を曝露して 24 時間後の胎仔中水銀濃度が、野生型マウスの場合に比べて有意に増加することを見出ししている。<sup>33)</sup>

**3-3. 亜鉛** 亜鉛投与による肝臓及び膵臓中での亜鉛の蓄積<sup>22,34)</sup> やエンドトキシン投与による肝臓中での亜鉛の蓄積<sup>35)</sup> さらには亜鉛の経口投与による腸管からの亜鉛の吸収<sup>36)</sup> に対しても、メタロチオネインが深く関与することがメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを利用することによって明らかにされている。また、*in vitro* の系においても、細胞内での亜鉛の蓄積にメタロチオネインが重要な役割を果たしていることがメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウス由来の肝細胞を用いた検討により示されている。<sup>34)</sup>

### 4. 酸化的ストレス

酸化的ストレスに対しては、種々のフリーラジカル誘導因子を用いて、それらの毒性に対するメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスの感受性が検

Table 3. Free Radical Inducing Substances: High Sensitivity of Metallothionein-I/II Knockout Mice

Free radical inducing substances	Toxicity
Paraquat	Hepatotoxicity, nephrotoxicity, Pulmonary toxicity
Carbon tetrachloride	Hepatotoxicity
Ethanol	Gastroduodenal mucosal injury
Radiation (X-ray)	Bone marrow toxicity
Ultraviolet B	Skin injury
Acetaminophen	Hepatotoxicity
Cisplatin	Nephrotoxicity, hepatotoxicity
Doxorubicin	Cardiotoxicity
Streptozotocin	Hepatotoxicity

討されている (Table 3). なお, メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスにおいて, スーパーオキシドジスムターゼ (SOD), カタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼ及びグルタチオンなどの抗酸化因子に変化は認められていない。

まずは, パラコートによる肝毒性及び腎毒性に対する感受性がメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスで増大することが報告された.<sup>37)</sup> その後, 筆者らは, パラコート毒性の主要な標的臓器である肺への毒性に対してもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスが高感受性であることを確認している。さらに, 筆者らは, 毒性の標的組織が異なる4種類のフリーラジカル誘導因子を用いて, メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスの感受性を検討したところ, アセトアミノフェンによる肝毒性,<sup>38)</sup> エタノールによる胃及び十二指腸の粘膜病変,<sup>39)</sup> シスプラチンによる腎毒性<sup>40)</sup>並びに X 線による骨髄障害<sup>41)</sup>に対してもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて著しく増強することを見出した。なお, アセトアミノフェンによる肝毒性やシスプラチンによる肝毒性及び腎毒性については, いくつかの研究グループからも同様の研究結果が報告されている。<sup>42-44)</sup> 上記フリーラジカル誘導因子のほかにも紫外線による皮膚障害,<sup>45,46)</sup> 四塩化炭素による肝毒性,<sup>47,48)</sup> ドキソルピシン (アドリアマイシン) による心毒性<sup>49)</sup>及びストレプトゾトシンによる肝毒性<sup>50)</sup>がいずれもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスで増強することが示されている。

また, *in vitro* の実験系においても, メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウス由来の細胞では *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) 及びパラコートによる細胞毒性が増強されることが報告されている。<sup>14,16)</sup> このように, メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを利用することにより, メタロチオネインが様々なフリーラジカル誘導因子の毒性発現に対して防御的な役割を果たしていることが明らかとなっている。

さらに, ごく最近, メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスがミトコンドリア呼吸阻害剤である 2,4-ジニトロフェノールによる肝毒性に対しても高い感受性を示すことが見い出されており,<sup>51)</sup> メタロチオネインがミトコンドリア内の酸化ストレスに対しても防御的役割を果たしていることが指摘されている。しかも, メタロチオネインがミトコンドリア内にも存在していること<sup>52)</sup>やミトコンドリア酸化ストレスによって誘導合成されること<sup>53)</sup>が示されていることから, メタロチオネインはミトコンドリア酸化ストレスに対する防御因子としても重要な働きを担っている可能性が示めされ, 今後の研究に期待したい。

これまでに, 様々なフリーラジカル誘導因子の毒性が, メタロチオネイン誘導能を有する金属化合物の前投与によって軽減されることが数多く報告されている。しかしながら, これらの研究では金属化合物それ自体の影響やメタロチオネイン以外の要因を拭うことができず, メタロチオネインの直接的な関与を解明することができなかった。このような金属化合物前投与の作用におけるメタロチオネインの役割を明確にするために, 筆者らはシスプラチン及び放射線の障害に対する亜鉛前投与の影響をメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを用いて検討した。その結果, 亜鉛を前投与した野生型マウスでは, シスプラチン及び X 線の標的組織である腎臓や骨髄中でメタロチオネイン濃度が有意に増加し, シスプラチンによる腎毒性並びに X 線による骨髄障害がともに軽減されたが, メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスでは, 亜鉛を前投与しても野生型マウスのような軽減効果は認められなかった。<sup>40,41)</sup> したがって, 亜鉛の前投与が示すシスプラチンの腎毒性及び放射線の骨髄障害の軽減効果は, あらかじめ毒性の標的組織で誘導合成されたメタロ

チオネインによるものであることが明らかとなった。一方、四塩化炭素やストレプトゾトシンの肝毒性が亜鉛の前投与によって野生型マウス及びメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスともに軽減されることが示されており、亜鉛前投与によるこれらの肝毒性の軽減には、メタロチオネイン以外の要因によることが確認されている。<sup>47,48,50</sup> このように、メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスは、メタロチオネイン誘導剤前投与による有害因子の毒性軽減作用におけるメタロチオネインの直接的な関与を明確にするための実験モデルとしても有用である。

以上のように、メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを用いることによって、酸化ストレスに対する生体内防御因子としてのメタロチオネインの重要性が明らかにされた。メタロチオネインが種々の活性酸素種 ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ) や活性窒素種 ( $NO$ ,  $ONOO^-$ ) を消去できること、メタロチオネインの  $\cdot OH$  消去作用がグルタチオンの 300 倍以上高いこと、酸化ストレスを始め様々な要因によってメタロチオネインが誘導合成されることなどを考え合わせると、<sup>54-56</sup> メタロチオネインは生体内における酸化ストレスに対して極めて重要な役割を果たしていると思われる。

### 5. 発がん・遺伝子損傷

発がんにおけるメタロチオネインの役割に関してもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを利用した研究が筆者らを含めていくつかの研究グループから報告されている (Table 4)。筆者らは、皮膚への 7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) 単独塗布や二段階皮膚発がんの実験モデルである DMBA/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 併用 (DMBA: initiator, TPA: promotor) による皮膚腫瘍 (パピローマ) の発生がメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスで著しく増強されることを見出ししている。<sup>57,58</sup> しかも、その際に誘発されたパピローマにおいて *c-Ha-ras* の codon 61 のアデニン ( $A^{182}$ ) からチミン (T) への点変異が認められたことから、<sup>58</sup> メタロチオネインが示す DMBA 皮膚発がんの抑制には *c-Ha-ras* の点変異の抑制が関与していることが示唆された。さらに、メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて、DMBA 単独経口投与による胃、肺及び肝臓での腫瘍の発生、<sup>59</sup> X 線の全身照射による胸腺リ

Table 4. Carcinogens: High Sensitivity of Metallothionein-I/II Knockout Mice

Carcinogens	Target organs
DMBA	Skin, stomach, lung, liver
DMBA/TPA	Skin
BBN	Bladder
Lead	Kidney
Cisplatin	Liver

DMBA: 7,12-dimethylbenz [a] anthracene, TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, BBN: *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine.

ンパ腫の発生<sup>60</sup>)並びに *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) による次世代マウスの肺腫瘍の発生<sup>61</sup>)に対していずれも高い感受性を示すことを明らかにしている。

*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) による膀胱腫瘍の発生が、メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスで増強されることが報告されている。<sup>62</sup> また、亜鉛を前投与した野生型マウスでは BBN による膀胱腫瘍の発生が抑制されるが、メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスではこのような抑制効果を示さないことも見い出されており、<sup>62</sup> 亜鉛前投与が示す BBN 膀胱発がん抑制効果は亜鉛によって誘導合成されたメタロチオネインによることが明らかにされている。その他にも鉛による腎腫瘍の発生<sup>63</sup>)及びシスプラチンによる肝腫瘍の発生<sup>64</sup>)が、いずれもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスで増強されることが報告されている。

筆者らは、遺伝子損傷に関しても検討しており、マイトマイシン C、<sup>65</sup> X 線<sup>66</sup>)及び Benzo [a] pyrene<sup>67</sup>) を処理したメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて多染性赤血球並びに網状赤血球の小核誘発がいずれも著しく増強されることを見出ししている。さらに、X 線<sup>66</sup>)や Benzo [a] pyrene<sup>67</sup>) による酸化 DNA 損傷に対してもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスで感受性が高いことを報告している。

このように、メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスでは、化学物質、金属あるいは放射線による発がん性が著しく増強され、メタロチオネインが発がん抑制因子として、生体内で重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

### 6. 脳神経疾患

神経変性疾患の 1 つである家族性筋萎縮性側索硬

化症 familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS)の一部が, Cu/Zn SOD (SOD-1) の変異で発症することが知られており, ヒト変異 SOD-1 トランスジェニックマウス (SOD-1 Tg マウス) では筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルとして広く利用されている.<sup>68)</sup> 筆者らは, この SOD-1 Tg マウスにメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを掛け合わせたところ, メタロチオネイン -I/II ノックアウト/SOD-1 Tg マウスが, SOD-1 Tg マウスに比べて ALS 様症状の発症が有意に早くなることを明らかにしている.<sup>69,70)</sup> また, パーキンソン病モデルに汎用される 6-hydroxydopamine による神経毒性,<sup>71)</sup> 脳虚血による脳硬塞及び脳冷凍処理による脳の障害がいずれもメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスで増強されることが報告されている.

さらに, 脳疾患に対してはメタロチオネイン -III ノックアウトマウスを用いた検討も行われている. カイニン酸による痙攣発作及び海馬の CA3 領野での神経障害に対してメタロチオネイン -III ノックアウトマウスは高い感受性を示すことが報告されている.<sup>6)</sup> また, メタロチオネイン -III ノックアウトマウスと SOD-1 Tg マウスとの掛け合せマウスでも, ALS 症状の進行が促進されることが見い出されている.

このように, 種々の脳疾患におけるメタロチオネインの関与についても明らかにされつつあり, 今後の研究が期待される.

## 7. 生体内防御因子としてのメタロチオネインの寄与

以上のように, メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを利用することによって, 有害金属, 酸化的ストレス, 発がん及び脳疾患に対する生体内防御因子としてのメタロチオネインの重要性, 並びに有害金属の動態へのメタロチオネインの関与が明らかにされた. ただし, 生体内には幾重もの複雑な防御システムが備わっていることから, 生体内防御システムの中でのメタロチオネインの位置付けや寄与度を明確にする必要がある.

その 1 つの例として, 各金属の致死毒性 (LD<sub>50</sub>) に対するメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスの感受性が検討されている. 各金属でメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスの感受性を野生型マウスと比較すると, カドミウムは約 7 倍, 亜鉛は

2.4 倍, 銅, ヒ素及び水銀は 1.3—1.4 倍であった.<sup>72)</sup> このことは, メタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスの感受性が金属によってかなり違うことを示唆している.

筆者らは, 無機水銀とシスプラチンの腎毒性に対するメタロチオネインとグルタチオンの防御因子としての寄与について, グルタチオン合成阻害剤であるブチオニンスルフォキシミン (BSO) を投与してグルタチオンを低下させたマウスとメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスを用いて検討した. その結果, 無機水銀の腎毒性に対しては, グルタチオンを低下させたマウスではメタロチオネイン -I/II ノックアウトマウスに比べて, 約 1/20 の投与量で腎毒性が認められた. 一方, シスプラチンに対しては両マウスともに同じ投与量で腎毒性が認められた.<sup>73)</sup> したがって, 無機水銀に対しては, グルタチオンの方がメタロチオネインに比べて防御因子としての寄与は大きく, シスプラチンに対するグルタチオンとメタロチオネインの防御因子としての寄与は同程度であることが明らかとなった. また, 紫外線 (UV-B) の皮膚障害に対する防御効果については, メタロチオネインの方がグルタチオンより大きいことが報告されている.

以上のように, メタロチオネインとグルタチオンを比較した場合でも, 防御因子としての寄与は有害因子毎に異なることが判明したことから, 今後, 有害因子の毒性に対する防御因子としてのメタロチオネインの生体内での位置付けや寄与度を明確にしていく必要があると思われる.

## 8. おわりに

一般に, ヒトの腎臓中メタロチオネイン濃度は加齢に伴って増加していることが知られているが, 一部のヒトに腎臓中メタロチオネイン濃度が極めて低いことが確認されている (Fig. 1).<sup>74)</sup> したがって, 低メタロチオネインレベルのヒトは, 金属毒性, 酸化的ストレス及び化学発がんに対して一般集団に比べて感受性が高い集団 (ハイリスク集団) として考慮する必要があるかもしれない. また, 低メタロチオネインレベルのヒトの存在は, メタロチオネインの遺伝子多型が存在する可能性を示唆している. ごく最近, 健常の日本人を対象として, ヒトメタロチオネインの分子種の 1 つであるメタロチオネイン -IIA 遺伝子のプロモーター領域の転写開始直後に

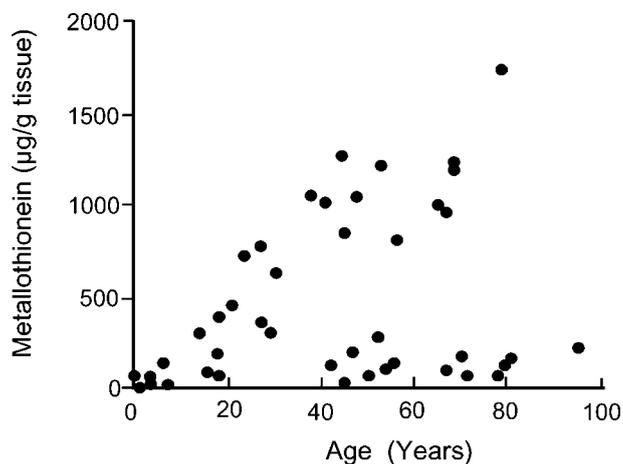


Fig. 1. Relationship between Age and Renal Metallothionein Content in Japanese<sup>74)</sup>

アデニン (A) からグアニン (G) への一塩基置換のあることが見い出され、しかも、この変異型プロモーターは野生型に比べて金属による転写活性化効率が低いことが報告されている。<sup>75)</sup> このように、ヒトにおけるメタロチオネインの遺伝子多型の存在が明らかにされつつあり、今後、さらにメタロチオネインの遺伝子多型に関する研究が進展することを期待したい。

一方、若年期のメタロチオネインレベルは比較的低いため、有害因子に対する感受性が高い可能性が考えられる。したがって、メタロチオネイン誘導剤等を用いて生体内でメタロチオネイン濃度を高く維持することで、発がんを含めた有害因子の毒性や酸化ストレスに起因した疾患などに対して予防効果が期待される。

## REFERENCES

- Palmiter R. D., Sandgren E. P., Koeller D. M., Brinster R. L., *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5266–5275 (1993).
- Erickson J. C., Masters B. A., Kelly E. J., Brinster R. L., Palmiter R. D., *Neurochem. Int.*, **27**, 35–41 (1995).
- Kang Y. J., Chen Y., Yu A., Voss-McCowan M., Epstein P. N., *J. Clin. Invest.*, **100**, 1501–1506 (1997).
- Michalska A. E., Choo K. H. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 8088–8092 (1993).
- Masters B. A., Kelly E. J., Quaipe C. J., Brinster R. L., Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 584–588 (1994).
- Erickson J. C., Hollopeter G., Thomas S. A., Froelick G. J., Palmiter R. D., *J. Neurosci.*, **17**, 1271–1281 (1997).
- Liu J., Liu Y., Habeebu S. S., Klaassen C. D., *Toxicol. Sci.*, **46**, 197–203 (1998).
- Liu Y., Liu J., Habeebu S. M., Waalkes M. P., Klaassen C. D., *Toxicol. Sci.*, **57**, 167–176 (2000).
- Liu J., Liu Y., Michalska A. E., Choo K. H. A., Klaassen C. D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 1216–1223 (1996).
- Habeebu S. S., Liu J., Liu Y., Klaassen C. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 223–232 (2000).
- Habeebu S. S., Liu J., Liu Y., Klaassen C. D., *Toxicol. Sci.*, **56**, 211–219 (2000).
- Liu J., Liu Y., Habeebu S. S., Klaassen C. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **159**, 98–108 (1999).
- Kurita H., Honda A., Satoh M., Nagase H., Abstracts of papers, the 126th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Sendai, March 2006, No. 3, p. 159.
- Lazo J. S., Kondo Y., Dellapiazza D., Michalska A. E., Choo K. H. A., Pitt B. R., *J. Biol. Chem.*, **270**, 5506–5510 (1995).
- Kondo Y., Yanagiya T., Himeno S., Yamabe Y., Schwartz D., Akimoto M., Lazo J. S., Imura N., *Life Sci.*, **64**, 145–150 (1999).
- Zheng H., Liu J., Liu Y., Klaassen C. D., *Toxicol. Lett.*, **87**, 139–145 (1996).
- Satoh M., Nishimura N., Kanayama Y., Naganuma A., Suzuki T., Tohyama C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 1529–1533 (1997).
- Yoshida M., Satoh M., Shimada A., Yasutake A., Sumi Y., Tohyama C., *Life Sci.*, **64**, 1861–1867 (1999).
- Yoshida M., Watanabe C., Satoh M., Yasutake A., Sawada M., Ohtsuka Y., Akama Y., Tohyama C., *Toxicol. Sci.*, **80**, 69–73 (2004).
- Yoshida M., Watanabe C., Kishimoto M., Yasutake A., Satoh M., Sawada M., Akama Y., *Toxicol. Lett.*, **161**, 210–218 (2006).
- Yoshida M., Watanabe C., Horie K., Satoh M., Sawada M., Shimada A., *Toxicol. Lett.*, **155**, 361–368 (2005).

- 22) Kelly E. J., Quaife C. J., Froelick G. J., Palmiter R. D., *J. Nutr.*, **126**, 1782–1790 (1996).
- 23) Liu J., Liu Y., Goyer R. A., Achanzar W., Waalkes M. P., *Toxicol. Sci.*, **55**, 460–467 (2000).
- 24) Guang J., Sone H., Nishimura N., Satoh M., Tohyama C., *Int. J. Oncol.*, **25**, 325–333 (2004).
- 25) Tohyama C., Satoh M., Kodama N., Nishimura H., Choo A., Michalska A., Kanayama Y., Naganuma A., *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **1**, 213–216 (1996).
- 26) Liu J., Liu Y., Michalska A. E., Choo K. H., Klaassen C. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **136**, 260–268 (1996).
- 27) Kimura T., Itoh N., Min K.-S., Fujita I., Muto N., Tanaka K., *Toxicol. Lett.*, **99**, 85–90 (1998).
- 28) Liu Y., Liu J., Klaassen C. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **175**, 253–259 (2001).
- 29) Lau J. C., Joseph M. G., Cherian M. G., *Toxicology*, **127**, 167–178 (1998).
- 30) Brako E. E., Wilson A. K., Jonah M. M., Blum C. A., Cerny E. A., Williams K. L., Bhattacharyya M. H., *Toxicol. Sci.*, **71**, 154–163 (2003).
- 31) Honda A., Satoh M., Hasegawa T., Seko Y., Tohyama C., Nagase H., *Biomed. Res. Trace Elem.*, **14**, 155 (2003).
- 32) Yoshida M., Satoh M., Yasutake A., Shimada A., Sumi Y., Tohyama C., *Toxicology*, **139**, 129–136 (1999).
- 33) Yoshida M., Satoh M., Yasutake A., Yamamoto E., Shimada A., Tohyama C., *Toxicology*, **175**, 215–222 (2002).
- 34) Coyle P., Philcox J. C., Rofe A. M., *Biochem. J.*, **309**, 25–31 (1995).
- 35) Philcox J. C., Coyle P., Michalska A., Choo K. H. A., Rofe A. M., *Biochem. J.*, **308**, 543–546 (1995).
- 36) Coyle P., Philcox J. C., Rofe A. M., *J. Nutr.*, **129**, 372–379 (1999).
- 37) Sato M., Apostolova M. D., Hamaya M., Yamaki J., Choo K. H. A., Michalska A. E., Kodama N., Tohyama C., *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **1**, 221–225 (1996).
- 38) Zhang B., Satoh M., Tohyama C., *J. Health Sci.*, **45**, 15–19 (1999).
- 39) Takano H., Satoh M., Shimada A., Sagai M., Yoshikawa T., Tohyama C., *Lab. Invest.*, **80**, 371–377 (2000).
- 40) Satoh M., Aoki Y., Tohyama C., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **40**, 358–362 (1997).
- 41) Satoh M., Tohyama C., “Metallothionen IV” ed. by Klaassen C. D., Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 1999, pp. 541–546.
- 42) Rofe A. M., Barry E. F., Shelton T. L., Philcox J. C., Coyle P., *Toxicology*, **125**, 131–140 (1998).
- 43) Liu J., Liu Y., Hartley D., Klaassen C. D., Shehin-Johnson S. E., Lucas A., Cohen S. D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 580–586 (1999).
- 44) Liu J., Liu Y., Habeebu S. S. M., Klaassen C. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **149**, 24–31 (1998).
- 45) Hanada K., Sawamura D., Hashimoto I., Kida K., Naganuma A., *J. Invest. Dermatol.*, **110**, 259–262 (1998).
- 46) Hanada K., Sawamura D., Tamai K., Baba T., Hashimoto I., Muramatsu T., Miura N., Naganuma A., *J. Invest. Dermatol.*, **111**, 582–585 (1998).
- 47) Liu Y., Hartley D. P., Liu J., *Toxicol. Lett.*, **95**, 77–85 (1998).
- 48) Itoh N., Kimura T., Nakanishi H., Muto N., Kobayashi M., Kitagawa I., Tanaka K., *Toxicol. Lett.*, **93**, 135–140 (1997).
- 49) Kimura T., Fujita I., Itoh N., Muto N., Nakanishi T., Takahashi K., Azuma J., Tanaka K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 299–302 (2000).
- 50) Apostolova M. D., Choo K. H. A., Michalska A. E., Tohyama C., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **11**, 1–7 (1997).
- 51) Sato M., Suzuki S., Abstracts of papers, the 126th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Sendai, March 2006, No. 1, p. 250.
- 52) Ye B., Maret W., Vallee B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 2317–2322 (2001).
- 53) Kondoh M., Inoue Y., Atagi S., Futakawa N., Higashimoto M., Sato M., *Life Sci.*, **69**, 2137–2146 (2001).
- 54) Sato M., Kondoh M., *Tohoku J. Exp. Med.*, **196**, 9–22 (2002).
- 55) Cai L., Satoh M., Tohyama C., Cherian M.

- G., *Toxicology*, **132**, 85–98 (1999).
- 56) Min K.-S., *Biomed. Res. Trace Elem.*, **11**, 150–160 (2000).
- 57) Zhang B., Satoh M., Nishimura N., Suzuki J. S., Sone H., Aoki Y., Tohyama C., *Cancer Res.*, **58**, 4044–4046 (1998).
- 58) Suzuki J. S., Nishimura N., Zhang B., Nakatsuru Y., Kobayashi S., Satoh M., Tohyama C., *Carcinogenesis*, **24**, 1123–1132 (2003).
- 59) Satoh M., Murata M., Nishimura N., Suzuki J. S., Tohyama C., *Biomed. Res. Trace Elem.*, **12**, 343–344 (2001).
- 60) Shibuya K., Nishimura N., Suzuki J. S., Tohyama C., Satoh M., Abstracts of papers, the 125th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, March 2005, No. 1, p. 91.
- 61) Suzuki J. S., Nishimura N., Nakatsuru Y., Satoh M., Tohyama C., Abstracts of papers, the 4th Annual Meeting of the Metallothionein, Gifu, November 2003, p. 108.
- 62) Kondo Y., Himeno S., Endo W., Mita M., Suzuki Y., Nemoto K., Akimoto M., Lazo J. S., Imura N., *Carcinogenesis*, **20**, 1625–1627 (1999).
- 63) Waalkes M. P., Liu J., Goyer R. A., Diwan B. A., *Cancer Res.*, **64**, 7766–7772 (2004).
- 64) Waalkes M. P., Liu J., Kasprzak K. S., Diwan B. A., *Int. J. Cancer*, **119**, 28–32 (2006).
- 65) Kito H., Nagase H., Sato T., Imai N., Satoh M., Tohyama C., Abstracts of papers, the 23rd Symposium on Toxicology and Environmental Health, Tokyo, October 1997, p. 58.
- 66) Shibuya K., Satoh M., Tohyama C., *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, Supplement, 273 (2001).
- 67) Takaishi M., Kurita H., Suzuki J. S., Tohyama C., Satoh M., Nagase H., *J. Toxicol. Sci.*, **30**, Supplement, S110 (2005).
- 68) Gurney M. E., Pu H., Chiu A. Y., Dal Canto M. C., Polchow C. Y., Alexander D. D., Caliendo J., Hentati A., Kwon Y. W., Deng H. X., Chen W., Zhai P., Suft R. L., Siddique T., *Science*, **264**, 1772–1775 (1994).
- 69) Nagano S., Satoh M., Sumi H., Fujimura H., Tohyama C., Yanagihara T., Sakoda S., *Eur. J. Neurosci.*, **13**, 1363–1370 (2001).
- 70) Fukada K., Nagano S., Satoh M., Tohyama C., Nakanishi T., Ahimizu A., Yanahihara T., Sakoda S., *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 2032–2036 (2001).
- 71) Asanuma M., Miyazaki I., Higashi Y., Tanaka K., Haque M. E., Fujita N., Ogawa N., *Neurosci. Lett.*, **327**, 61–65 (2002).
- 72) Park J. D., Liu Y., Klaassen C. D., *Toxicology*, **163**, 93–100 (2001).
- 73) Satoh M., Shimada A., Zhang B., Tohyama C., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1729–1734 (2000).
- 74) Yoshida M., Ohta H., Yamauchi Y., Seki Y., Sagi M., Yamazaki K., Sumi Y., *Biol. Trace Elem. Res.*, **63**, 167–175 (1998).
- 75) Kita K., Miura N., Yoshida M., Yamazaki K., Ohkubo T., Imai Y., Naganuma A., *Hum. Genet.*, **120**, 553–560 (2006).