

血管構成細胞におけるシロスタゾールによるメタロチオネイン誘導

藤原泰之,^a 北川貴大,^a 新開泰弘,^b 鍛冶利幸,^{b,c} 佐藤雅彦*,^a

Cilostazol Induces Metallothionein Expression in Vascular Cells

Yasuyuki FUJIWARA,^a Takahiro KITAGAWA,^a Yasuhiro SHINKAI,^b
Toshiyuki KAJI,^{b,c} and Masahiko SATOH*,^a^aLaboratory of Pharmaceutical Health Sciences, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University,
1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan, ^bOrganization for Frontier
Research in Preventive Pharmaceutical Sciences, and ^cDepartment of Environmental
Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan

(Received May 29, 2009; Accepted July 30, 2009; Published online August 4, 2009)

Metallothionein (MT) is a cysteine-rich low molecular weight protein and thought to function in the detoxification of heavy metals and reactive oxygen species. We examined the induction of MT synthesis by cilostazol, an antiplatelet drug, in several vascular component cells to find a new pharmacological effect of cilostazol in vascular system. In human coronary artery endothelial cells, cilostazol significantly increased *MT-IX* and *MT-IIA* mRNA levels after the treatment for 6 h and endogenous MT-I/II protein levels after the treatment for 24 and 48 h. In addition, cadmium cytotoxicity was prevented by cilostazol in this endothelial cells. Moreover, cilostazol increased *MT-IX* and *MT-IIA* mRNA levels in human coronary artery smooth muscle cells, human brain microvascular endothelial cells, human brain microvascular pericytes and human colon carcinoma Caco-2 cells after the treatment for 6 h. Interestingly, cilostazol also increased *MT-III* mRNA level in brain microvascular endothelial cells more effectively than in other vascular cells. The present results suggest that cilostazol can protect the vascular system from toxic substances such as heavy metals *via* MT induction in vascular cells.

Key words—cilostazol; metallothionein; endothelial cell; cadmium; atherosclerosis

序 論

メタロチオネイン (MT) は、システインを多く含む分子量約 6500 の低分子量金属結合タンパク質であり、カドミウムや水銀などの重金属を始め様々な薬物やストレスなどによってその合成が誘導される。^{1,2)} ヒトやマウスにおいて、MT には 4 種のアイソフォームが存在することが知られており、主要な MT アイソフォームである MT-I 及び MT-II は各臓器に広く分布するのに対し、MT-III は脳組織、MT-IV は舌や食道に高く発現していることが確認されている。さらにヒトでは MT-I にサブアイソフォームが存在し、機能的遺伝子として *MT-IA*, *MT-IB*, *MT-IE*, *MT-IF*, *MT-IG*, *MT-IH* 及び *MT-IX* の

7 種が報告されている。³⁾ また、MT-II には偽遺伝子である *MT-IIB* が存在するため、それと区別するために機能的遺伝子は *MT-IIA* と名付けられている。MT は重金属毒性に対して軽減作用を有しており、MT を誘導した動物や培養細胞がカドミウムや無機水銀などの有害金属に対して抵抗性を示すことが知られている。⁴⁾ さらに MT は、重金属の蓄積、必須金属である亜鉛や銅の代謝調節及びこれらの金属のほかのタンパク質への供給、フリーラジカル消去などに重要な生理的役割を果たしている。⁴⁻⁸⁾ また、MT ノックアウトマウスを用いた研究によって神経変性疾患を始めとする様々な疾患防御に MT が深く関与することが報告されている。^{9,10)}

一方、シロスタゾールは血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を併せ持つ抗血小板薬であり、フォスホジエステラーゼ 3 を阻害することにより血小板凝集抑制作用を示す。¹¹⁾ 血管内皮細胞に対して、シロ

^a愛知学院大学薬学部衛生薬学講座, ^b北陸大学学術フロンティア研究組織, ^c同薬学部環境健康学教室

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

スタゾールが活性酸素種の産生を減少させることによりリポポリサッカライド (LPS) 誘導性のアポトーシスを抑制することや一酸化窒素の産生を誘導することが報告されている。^{12,13)} また、シロスタゾールは血管平滑筋細胞に対して増殖阻害作用を示すことで、経皮的冠動脈形成術後の血管内膜肥厚の形成を抑制し、再狭窄の予防に有効であることが示されている。^{14,15)} すなわち、シロスタゾールは、血管内皮細胞に対する保護作用や血管平滑筋細胞に対する増殖抑制作用を通じて動脈硬化病変の進展抑制に有用であると考えられている。さらに、Wakida らは、シロスタゾールが脳虚血障害を軽減させること、並びにその作用機序の一部にシロスタゾールによる脳組織での MT-I 及び MT-II の誘導が関与することを報告している。¹⁶⁾ また、シロスタゾールが *in vivo* において肝臓の MT 合成を誘導することや *in vitro* において神経芽細胞種 IMR32 及び脳毛細血管内皮細胞の MT 合成を誘導することも報告されている。¹⁷⁾ これらの報告からシロスタゾールは様々な組織・細胞に対して MT を誘導する可能性が考えられる。

動脈硬化病変の発症・進展において血管組織における酸化ストレスや炎症反応が重要であることが示唆されている。MT は酸化ストレスや炎症反応に対して保護的役割を有することから、血管組織における MT は動脈硬化病変の発症・進展に防衛的に寄与できると考えられる。そこで、各種培養血管構成細胞を用い、シロスタゾールによる MT 合成誘導能を検討するとともに、有害金属であるカドミウムの細胞傷害性に対するシロスタゾールの効果についても検討した。

実験方法

1. 細胞 ヒト冠動脈血管内皮細胞 (human coronary artery endothelial cells; HCAEC), ヒト冠動脈血管平滑筋細胞 (human coronary artery smooth muscle cells; HCASMC), ヒト脳毛細血管内皮細胞 (human brain microvascular endothelial cells; HBMEC), ヒト脳毛細血管周皮細胞 (human brain microvascular pericyte cells; HBP) 及びヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞は、DS ファーマバイオメディカル (大阪) より購入した。

2. 試薬 HuMedia-EG2 培地及び HuMedia-

SG2 培地は、クラボウ (大阪) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は、日水製薬 (東京) より購入した。牛胎仔血清 (FBS) は、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。シロスタゾール {6-[4-(1-cyclohexy-1*H*-tetrazol-5-yl) butoxy]-3,4-dihydro- 2(1*H*)-quinolone} は、大塚製薬 (徳島) より供与して頂いた。抗 MT 抗体 (Clone: E9) 及び抗 β -アクチン抗体は、Dako (Denmark) 及び Sigma (St. Louis, MO, USA) よりそれぞれ購入した。抗ウサギ IgG 抗体及び抗マウス IgG 抗体は、GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) より購入した。FastPure RNA Kit, PrimeScript RT reagent Kit 及び SYBR PrimeScript RT-PCR Kit はタカラバイオ (滋賀) より購入した。そのほかの試薬類は、市販特級品を用いた。

3. 細胞培養とシロスタゾール処理 HCAEC を 24 又は 6 穴培養プレートに播種し、HuMedia-EG2 培地で 37°C, 5% CO₂ の条件下、コンフルエントまで培養した。次に、培地を新鮮な HuMedia-EG2 培地に交換後、ジメチルスルホキシドに溶解したシロスタゾールを添加し、一定時間培養した。HBMEC も HCAEC と同様に HuMedia-EG2 培地を用いて培養した。また、HCASMC 及び HBP は HuMedia-SG2 培地を用い、Caco-2 細胞は 10% FBS 含有 DMEM を用いて培養した。

4. MT mRNA 量の測定 シロスタゾール処理後、培養上清を除去し、リン酸緩衝液 [PBS(-)] で細胞層を 2 回洗浄した後、FastPure RNA Kit を用いてトータル RNA を抽出した。PrimeScript RT reagent Kit を用いて逆転写反応を行い、ついで SYBR PrimeScript RT-PCR Kit を用いてリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (リアルタイム RT-PCR) を行った。MT-IX, MT-IIA, MT-III 及びグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) の各特異的プライマーは、Perfect Real Time サポートシステム (タカラバイオ; 滋賀) より最適化されたものを購入して用いた。各 MT 遺伝子の発現量は、GAPDH に対する相対的な発現量として算出した。

5. MT-I/II タンパク質の測定 シロスタゾール処理後、培養上清を除去し、PBS (-) で細胞層を 2 回洗浄した。細胞層にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 緩衝液 [50 mM Tris- 塩酸 (pH 6.8), 10%

グリセロール, 2% SDS] を添加して細胞を回収した後, 95°C で 15 分間加熱した. 試料に SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) ローディングバッファー (1.67%グリセロール, 5% 2-mercaptoethanol, 50 mM ジチオスレイトール, 10 mM エチレンジアミン四酢酸, 0.005%プロモフェノールブルー) を加え 95°C で 5 分間加熱した. 次に, ヨードアセトアミドを終濃度が 0.1 M になるように加え, 遮光下で 30 分間反応させた. 1.5 M Tris- 塩酸 (pH 8.8) で中和した後, Laemmli の方法¹⁸⁾に準じて試料を SDS-PAGE (15%アクリルアミド) により分離した. 電気泳動したゲル中のタンパク質はパワードプロット・ミニ (アトー, 東京) を用いて, ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写を行った. PVDF 膜を 2.5%グルタルアルデヒド水溶液に 30 分間浸した後, 蒸留水で 3 回, Tween®/Tris-buffered salt solution (TTBS) [20 mM Tris- 塩酸 (pH7.5), 150 mM 塩化ナトリウム, 0.1% Tween20] で 1 回洗浄した. その後, PVDF 膜を 5%スキムミルク含有 TTBS に浸して 30 分間ブロッキングし, TTBS により 3 回洗浄した後, MT-I 及び MT-II タンパク質を認識する抗 MT 抗体 (100 倍希釈) を反応させた. 次に, PVDF 膜を TTBS で洗浄し, Horseradish Peroxidase 標識二次抗体 (5000 倍希釈) と Enhanced chemiluminescence ウェスタンブロットング検出試薬を用いて化学発光させ, MT-I/II タンパク質のバンドを検出した. 次に, 画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて 3 回の実験のタンパク量を解析し, MT-I/II タンパク質の発現量 (β - アクチンタンパク質を内部標準として使用) をグラフ化した.

6. 細胞毒性評価 コンフルエントの HCAEC をカドミウム (100 μ M) の存在下, 又は非存在下, シロスタゾール (10, 30 又は 100 μ M) で 24 時間処理した. 処理後, 培地を回収し, 培地中に逸脱した乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を非特異的な細胞傷害性の指標として CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いて測定した. 細胞層はギムザ染色し, 形態学的に観察した.

7. 統計処理 データは平均値 \pm 標準偏差で表した. 統計学的有意差検定は, 分散分析 (ANOVA) と Bonferroni 補正法による t -検定を用い $p < 0.05$

を統計学的に有意のある差とした.

結 果

1. HCAEC におけるシロスタゾールによる MT 合成誘導 HCAEC をシロスタゾール (10, 30 及び 100 μ M) で 12 時間処理した後, 細胞内の *MT-IX*, *MT-IIA* 及び *MT-III* mRNA 量を測定した (Fig. 1). その結果, *MT-IX* 及び *MT-III* mRNA 量は 100 μ M のシロスタゾール処理により, *MT-IIA* mRNA 量は 30 μ M 以上のシロスタゾール処理によりそれぞれ有意に増加した [Fig. 1(A)]. また, 100 μ M のシロスタゾール処理による MT mRNA 量の経時変化について検討したところ, *MT-IX* 及び *MT-IIA* mRNA 量はコントロールに比べ 6 時間処理において最も高い増加率を示し処理時間の延長とともに減少したが, *MT-III* mRNA 量は 12 時間処理以降で有意な増加が認められた [Fig. 1(B)]. さらに, 100 μ M のシロスタゾールを 24 あるいは 48 時間処理することによって MT-I/II タンパク質量の有意な増加が認められた (Fig. 2).

2. HCAEC におけるカドミウムの細胞毒性に対するシロスタゾールの効果 Figure 3 に示すように, 100 μ M のカドミウム単独処理によって内皮細胞の退行性変化と細胞層に内皮細胞の脱落した空隙が認められたが, それらの傷害の程度はシロスタゾールが共存することで軽減することが形態学的に観察された. また, カドミウム単独処理による LDH 活性の増加も 100 μ M のシロスタゾールが共存することによって有意に減少した. なお, 100 μ M までのシロスタゾール単独処理による非特異的な細胞傷害性は認められなかった (data not shown).

3. シロスタゾール処理による HBMEC, HCASMC, HBP 及び Caco-2 細胞中 MT mRNA 量 HCAEC 以外の血管構成細胞におけるシロスタゾール 6 時間処理後の *MT-IX*, *MT-IIA* 及び *MT-III* mRNA 量を Fig. 4 に示す. HBMEC において, シロスタゾールは *MT-IX*, *MT-IIA* 及び *MT-III* mRNA 量をいずれも有意に増加させた [Fig. 4(A)]. 特に, *MT-IIA* と *MT-III* の mRNA 量の有意な増加は 1 μ M 以上のシロスタゾール処理により認められ, HBMEC では, HCAEC に比べてより低濃度のシロスタゾールによって MT mRNA 量が増加した. HCASMC では, *MT-IX* と *MT-IIA* の mRNA 量がそれぞれ 100

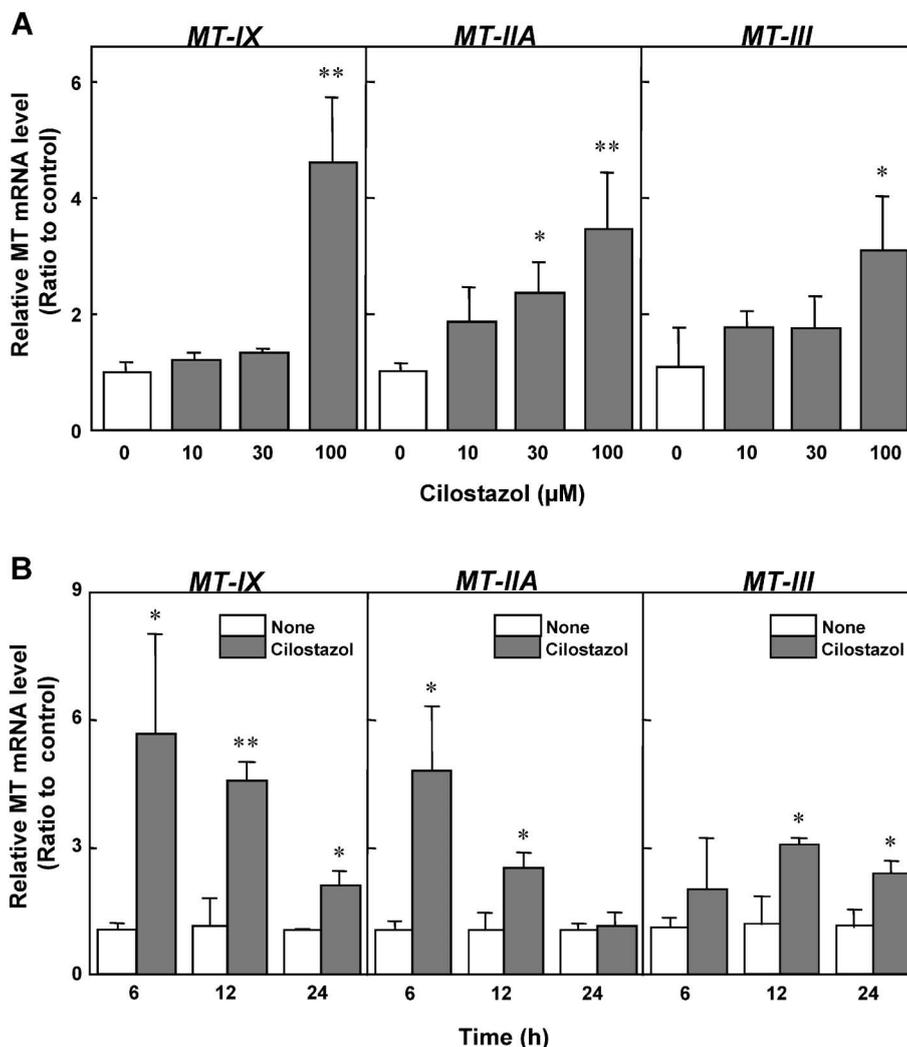


Fig. 1. *MT-IX*, *MT-IIA* and *MT-III* mRNA Levels in HCAEC Treated with Cilostazol

(A), confluent cultures of HCAEC were incubated at 37°C for 12 h in the presence of cilostazol (10, 30 or 100 μM). (B), confluent cultures of HCAEC were incubated for 6, 12 or 24 h in the presence of cilostazol (100 μM). Values are means ± S.D. for three samples. *, **Significant difference from the corresponding control (* p <0.05, ** p <0.01).

μM と 10 μM 以上のシロスタゾールによって有意に増加したが、*MT-III* mRNA 量は 100 μM までのシロスタゾール処理による有意な変化は認められなかった [Fig. 4(B)]. また、Fig. 4(C)に示すように、脳毛細血管を取り巻くように存在している HBP では、*MT-IX* mRNA 量は 100 μM のシロスタゾール処理で、*MT-IIA* mRNA 量は 1 μM 以上のシロスタゾール処理で有意な増加が認められた。*MT-III* mRNA 量は 100 μM のシロスタゾール処理で有意に増加したが、その程度はわずかであった。さらに、Caco-2 細胞では、血管構成細胞の結果とは異なり *MT-III* mRNA は検出されなかったが、*MT-IX* 及び *MT-IIA* mRNA は 100 μM のシロスタゾール処理により有意に増加した [Fig. 4(D)].

考 察

ヒトの場合、*MT-IA*, *MT-IB*, *MT-IE*, *MT-IF*, *MT-IG*, *MT-IH* 及び *MT-IX* の 7 種の MT-I サブアイソフォームが機能的遺伝子であるとされるが、Miura と Koizumi は HeLa 細胞での MT アイソフォーム遺伝子の発現を詳細に検討し、HeLa 細胞では、内因性の *MT-IX* 遺伝子がほかのサブアイソフォームに比べ非常に高く発現していることを報告している.³⁾ そこでわれわれは、MT-I サブアイソフォームの中で *MT-IX* 遺伝子を選択し、*MT-IIA* 及び *MT-III* mRNA とともに遺伝子発現解析を行った。本研究の結果により、シロスタゾールはヒト冠動脈及びヒト脳毛細血管由来の各種血管構成細胞

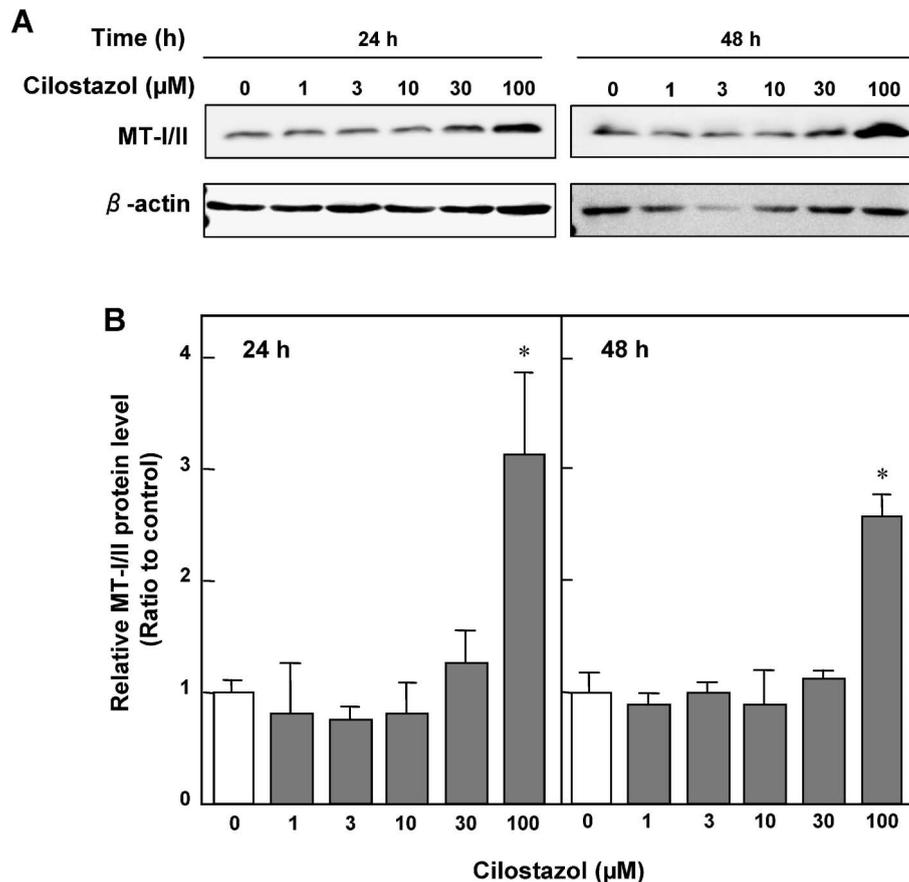


Fig. 2. MT-I/II Protein Level in HCAEC Treated with Cilostazol

Confluent cultures of HCAEC were incubated at 37°C for 24 and 48 h in the presence of cilostazol (1, 3, 10, 30 or 100 μM). (A), representative western blots of MT-I/II and β -actin. (B), the relative values of MT-I/II protein expression. Values are means \pm S.D. from three independent experiments. *Significant difference from the corresponding control ($p < 0.01$).

(HCAEC, HBMEC, HCASC MC 及び HBP) 内の *MT-IX* 及び *MT-IIA* mRNA 量をとともに増加させることが明らかとなった (Table 1). HCAEC 以外の細胞種については、タンパク質レベルでの確認は行っていないが、シロスタゾールは非選択的に血管構成細胞における MT-I/II タンパク質の合成を誘導することが推察される。また、脳毛細血管由来の HBMEC 及び HBP では、冠動脈由来の HCAEC 及び HCASC MC と比較して、より低濃度 (1 μM 以上) のシロスタゾール処理による *MT-IIA* mRNA 量の増加が認められたことから (Figs. 1 and 4), シロスタゾールの MT-I/II 合成誘導能は脳毛細血管組織においてより強く発現される可能性が考えられる。Suzuki らは、抗 MT 抗体を用いたフローサイトメトリー法により、HBMEC では 1 μM のシロスタゾール 12 時間処理で MT-I/II タンパク質量が約 2 倍に増加することを報告しており、¹⁷⁾ 本研究の結果は、彼らの報告を強く支持するものである。一方、

消化管上皮のモデル細胞として用いられている Caco-2 細胞においてもシロスタゾールによる *MT-IX* 及び *MT-IIA* mRNA 量の増加が認められたことから [Fig. 4(D)], シロスタゾールは脳¹⁶⁾や肝臓¹⁷⁾並びに今回示した血管組織だけでなく、消化管においても MT-I/II を誘導するかもしれない。

MT-III は 1989 年に神経細胞成長抑制因子として単離されたタンパク質であり、¹⁹⁾ 主として脳に高く発現していることが知られている。²⁰⁾ 最近、脳以外の組織でも MT-III が発現していることが報告されているが、²¹⁾ 血管構成細胞での MT-III 発現に関する報告はない。今回の検討により、発現レベルは高くないが各種の血管構成細胞が *MT-III* mRNA を発現していることが見い出された。しかも、HCAEC と HBMEC において、その発現量がシロスタゾール処理によって増加することが明らかとなった。シロスタゾールによる *MT-III* の発現誘導は、少なくとも今回検討した細胞種の中では内皮細胞に選択的

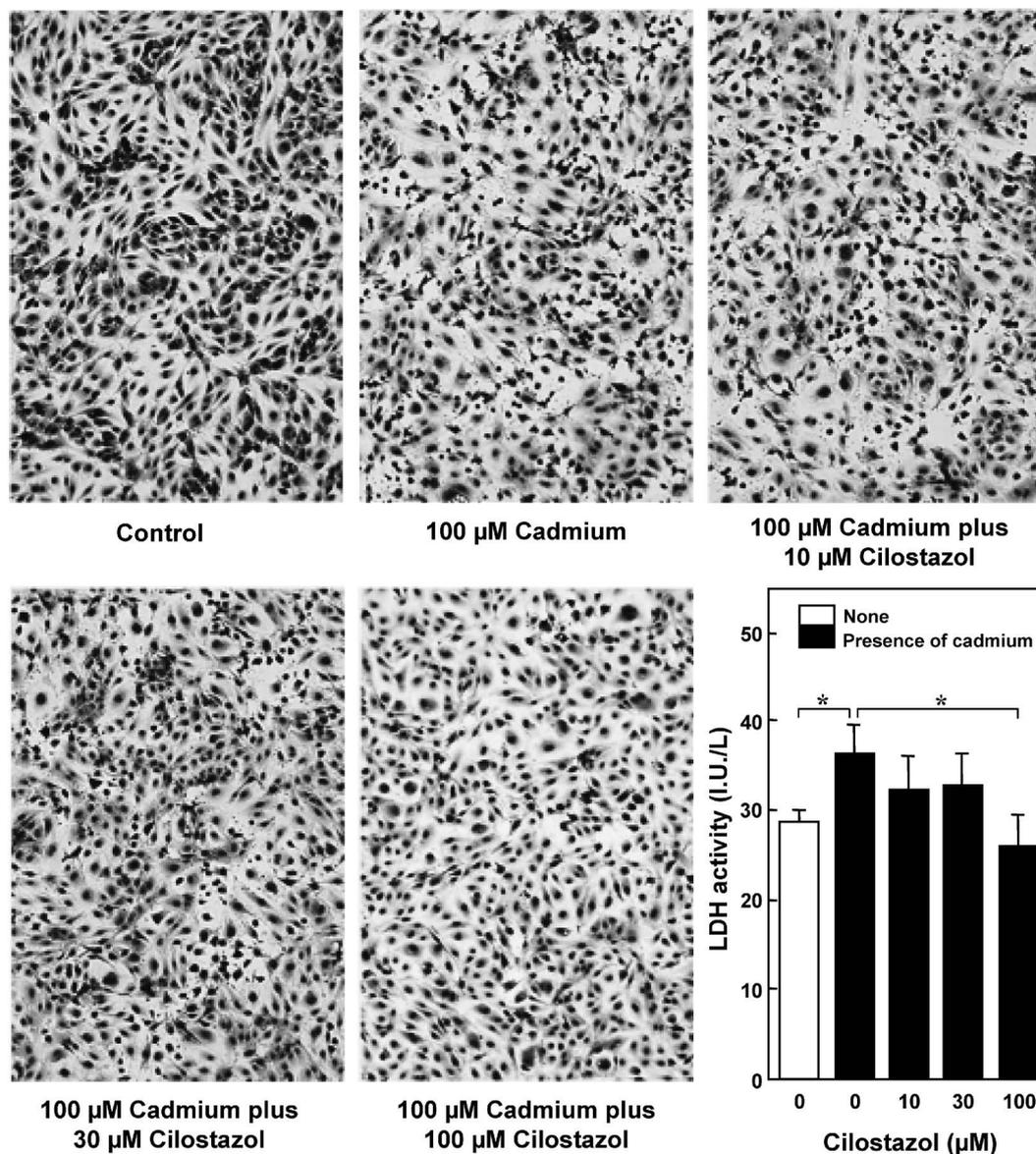


Fig. 3. Effect of Cilostazol on Cadmium Cytotoxicity in HCAEC

Confluent cultures of HCAEC were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (100 μM) combined with or without cilostazol (10, 30 or 100 μM). Cell damage was assessed by morphological observation of the cell layers (original magnification ×40) and measuring LDH activity in the conditioned medium. For LDH activity, values are means ± S.D. for four samples. *Significant difference from “100 μM cadmium alone” ($p < 0.05$).

に認められたが、この発現誘導が内皮細胞に特異的な反応であるかについては今後さらに細胞種を増やして検討する必要がある。また、Table 1 に示すように、脳毛細血管由来の HBMEC は他の細胞種に比べ *MT-III* mRNA 量のシロスタゾールによる増加率が最も高く、Fig. 4(A) に示すように低濃度 (1 μM 以上) から誘導されており、この *MT-III* の発現は虚血再灌流後のシロスタゾールによる脳組織保護作用^{16,22)} を考える上でも興味深い。また、マウス脳微小血管内皮細胞株 bEND.3 において、*MT-III* が低酸素誘導因子 1α 依存的に血管内皮細胞増殖因

子の発現を誘導することが報告されており、²³⁾ *MT-III* が虚血障害後の脳組織の保護に寄与する可能性が示されている。したがって、シロスタゾール処理による HBMEC 及び HBP での *MT-III* 誘導も VEGF の発現誘導を介して脳組織の保護に関与する可能性が考えられる。

近年、遺伝子工学的手法を用いて *MT* のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスが作製され、*MT* 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。例えば、*MT-I* 及び *MT-II* の遺伝子が欠損した *MT-I/*

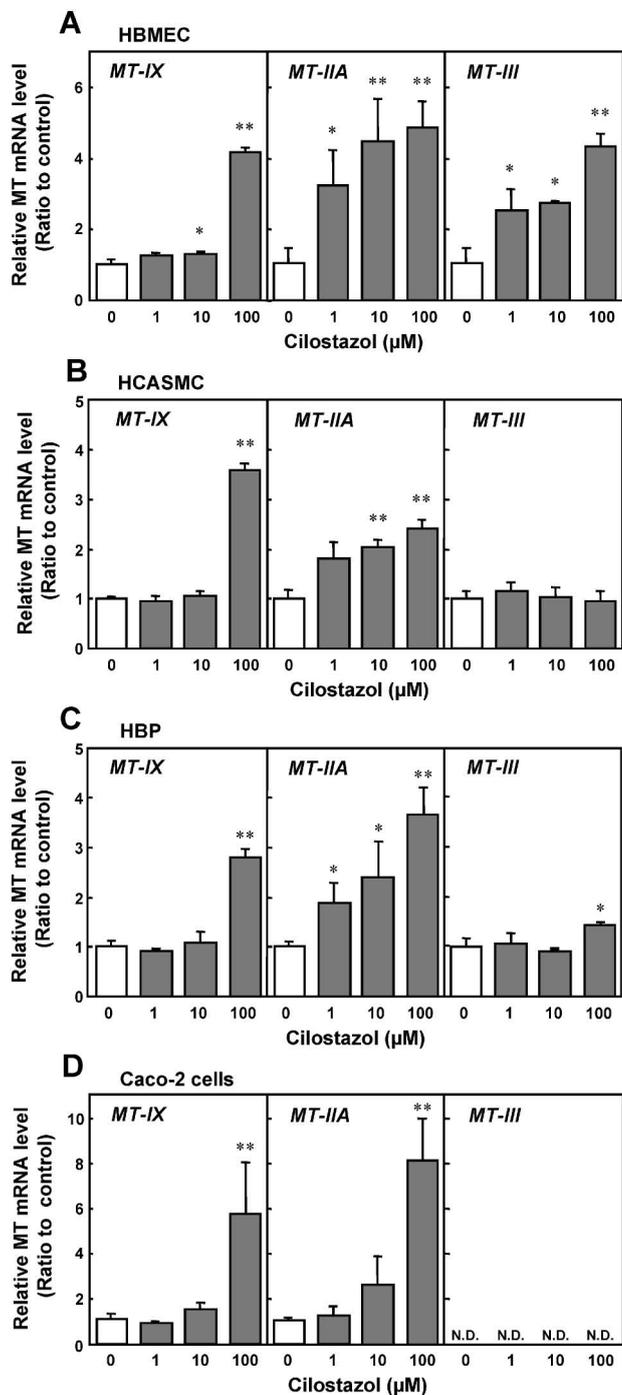


Fig. 4. *MT-IX*, *MT-IIA* and *MT-III* mRNA Levels in HBMEC, HCASMC, HBP and Caco-2 Cells Treated with Cilostazol

Confluent cultures of HBMEC (A), HCASMC (B), HBP (C) and Caco-2 cells (D) were incubated at 37°C for 6 h in the presence of cilostazol (1, 10 or 100 μM). Values are means ± S.D. for three samples. *, ** Significant difference from the corresponding control (*p < 0.05, **p < 0.01). N.D.: not detected.

Table 1. Comparison of Relative MT mRNA Levels in HCAEC, HBMEC, HCASMC, HBP and Caco-2 Cells after Exposure to 100 μM Cilostazol for 6 h

	Relative MT mRNA Level (Ratio to Control)		
	<i>MT-IX</i>	<i>MT-IIA</i>	<i>MT-III</i>
HCAEC	5.56 ± 2.36	4.74 ± 1.46	1.97 ± 1.23
HBMEC	4.18 ± 0.12	4.87 ± 0.74	4.33 ± 0.35
HCASMC	3.57 ± 0.15	2.43 ± 0.17	0.96 ± 0.19
HBP	2.79 ± 0.18	3.66 ± 0.55	1.44 ± 0.04
Caco-2 cells	5.73 ± 2.29	8.08 ± 1.94	N.D.

Confluent cultures of HCAEC, HBMEC, HCASMC, HBP and Caco-2 cells were incubated at 37°C for 6 h in the presence of cilostazol (100 μM). Values are means ± S.D. for three samples. These results were obtained from Figs. 1 and 4. N.D.: not detected.

くの病的状態に関与しており、動脈硬化病変の発症・進展においても酸化低比重リポタンパク質、活性酸素及びフリーラジカルなどの関与が示されている。また、これらの酸化ストレスと同様に炎症反応も動脈硬化病変の発症に重要であると考えられている。環境汚染重金属であるカドミウムも動脈硬化症や高血圧症を始めとする血管病変の危険因子の1つとされ、血管内皮細胞に対して非特異的な細胞傷害を引き起こす。²⁵⁾ 本研究において、MTタンパク質を誘導できる濃度のシロスタゾールを処理することによってHCAECにおけるカドミウムの細胞毒性が軽減されることが見い出された (Fig. 3)。したがって、シロスタゾールは血管内皮細胞や血管平滑筋細胞並びに周皮細胞のMT量を増加させることによってカドミウム毒性に対して血管保護作用を示し、動脈硬化などの血管病変の進展防御に寄与する可能性が示唆された。また、MTはフリーラジカル消去作用を有する⁷⁾ことから、カドミウムだけでなく酸化ストレスによる血管障害に対してもシロスタゾールがMT誘導を介して防御するかもしれない。さらに、血管内皮細胞に対して、シロスタゾールがLPSによる活性酸素種の産生を減少させるが、¹²⁾ その減少にMT合成誘導が関与する可能性も推察される。

本研究では、各種血管構成細胞においてシロスタゾールがMT合成誘導能を示すことを明らかにした。さらに、HCAEC細胞において、シロスタゾールがカドミウムの細胞毒性を軽減すること、並びにMT合成誘導がその軽減効果に寄与することが示唆された。最近、アストロサイトが産生したMTが

II ノックアウトマウスは、有害金属、酸化ストレス及び炎症反応などに対して高感受性であることが報告されている。²⁴⁾ 酸化ストレスは生体における多

神経細胞に移行することが報告されていることから、²⁶⁾ 今後、アストロサイトにおけるシロスタゾールによる MT 誘導も興味の持たれるところである。

謝辞 本研究の一部は、平成 18-20 年度文部科学省科学研究費若手研究(B)(研究代表者：藤原泰之)並びに平成 17-21 年度文部科学省学術フロンティア推進事業(北陸大学薬学研究科)によって行われた。

REFERENCES

- 1) Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M., *Life Sci.*, **59**, 627-647 (2002).
- 2) Mikes A. T., Hawksworth G. M., Beattie J. H., Rodilla V., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 35-70 (2000).
- 3) Miura N., Koizumi S., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 665-673 (2007).
- 4) Kagi J. H. R., "Metallothionein, Vol. III, Biological Roles and Medical Implications," eds. by Suzuki K. T., Imura N., Kimura M., Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, pp. 29-55.
- 5) Cherian M. G., Chan H. M., "Metallothionein, Vol. III, Biological Roles and Medical Implications," eds. by Suzuki K. T., Imura N., Kimura M., Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, pp. 87-109.
- 6) Webb M., "The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium," ed. by Webb M., Elsevier, Amsterdam, 1979, pp. 196-266.
- 7) Sato M., Bremner I., *Free Radic. Biol. Med.*, **14**, 325-337 (1993).
- 8) Cai L., Satoh M., Tohyama C., Cherian M. G., *Toxicology*, **132**, 85-98 (1999).
- 9) Nagano S., Satoh M., Sumi H., Fujimura H., Tohyama C., Yanagihara T., Sakoda S., *Eur. J. Neurosci.*, **13**, 1363-1370 (2001).
- 10) Fukuda K., Nagano S., Satoh M., Tohyama C., Nakanishi T., Ahimizu A., Yanagihara T., Sakoda S., *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 2032-2036 (2001).
- 11) Kanbayashi J., Liu Y., Sun B., Shakur, Y., Yoshitake, M., Czerwiec F., *Curr. Pharm. Des.*, **9**, 2289-2302 (2003).
- 12) Kim K. Y., Shin H. K., Choi J. M., Hong K. W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 709-715 (2002).
- 13) Hashimoto A., Miyakoda G., Hirose Y., Mori T., *Atherosclerosis*, **189**, 350-357 (2006).
- 14) Souness J. E., Hassall G. A., Parrott D. P., *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 857-866 (1992).
- 15) Ishizaka N., Taguchi J., Kimura Y., Ikari Y., Aizawa T., Togo M., Miki K., Kurokawa K., Ohno M., *Atherosclerosis*, **142**, 41-46 (1999).
- 16) Wakida K., Morimoto N., Shimazawa M., Hozumi I., Nagase H., Inuzuka T., Hara H., *Brain Res.*, **1116**, 187-193 (2006).
- 17) Suzuki S., Masui Y., Ohnuki M., Miyakado G., Mori T., Nakajima K., Sato M., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 791-794 (2007).
- 18) Laemmli U. K., *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 19) Uchida Y., Takio K., Titani K., Tomonaga M., *Neuron*, **7**, 337-347 (1991).
- 20) Palmiter R. D., Findley S. D., Whitmore T. E., Durnam D. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6333-6337 (1992).
- 21) Hozumi I., Suzuki J. S., Kanazawa H., Hara A., Saio M., Inuzuka T., Miyairi S., Naganuma A., Tohyama C., *Neurosci. Lett.*, **438**, 54-58 (2008).
- 22) Lee J. H., Park S. Y., Lee W. S., Hong K. W., *Neurol. Res.*, **27**, 483-492 (2005).
- 23) Kim H. G., Hwang Y. P., Jeong H. G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 666-671 (2008).
- 24) Satoh M., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 709-717 (2007).
- 25) Kaji T., *Yakugaku Zasshi*, **124**, 112-120 (2004).
- 26) Chung R. S., Penkowa M., Dittmann J., King C. E., Bartlett C., Asmussen J. W., Hidalgo J., Carrasco J., Leung Y. K., Walker A. K., Fung S. J., Dunlop S. A., Fitzgerald M., Beazley L. D., Chuah M. I., Vickers J. C., West A. K., *J. Biol. Chem.*, **283**, 15349-15358 (2008).