環境有害因子に対するメタロチオネインの毒性学的意義： メタロチオネイン-I/II 欠損マウスモデル研究による検証と提言*

佐 藤 雅 彦

岐阜薬科大学 衛生学教室

Toxicological Significance of Metallothionein on Environmental Harmful Factors: Verification and Suggestions from a Metallothionein-I/II Null Mouse Model Study

Masahiko SATOH

Department of Hygiene, Gifu Pharmaceutical University

Abstract In many research groups including our laboratory, metallothionein (MT)-I/II null mice have been used to clarify the biological function and physiological role of MT. Recent studies with MT-I/II null mice concerning the role of MT in the toxicity and distribution of metal, oxidative stress and chemical carcinogenesis were reviewed. Some reports, including our findings, showed that MT-I/II null mice have an increased sensitivity to harmful metals such as cadmium, mercury, zinc and arsenic. Moreover, it was clarified using MT-I/II null mice that MT plays a major role in the retention of cadmium, mercury and zinc in target tissues. MT-I/II null mice were found to be much more sensitive than wild-type mice to the toxicity caused by free radical-inducing factors, which include paraquat, acetaminophen, ethanol, X-ray, ultraviolet B, carbon tetrachloride, cisplatin, doxorubicin, cerulein and streptozotocin. In addition, MT-I/II null mice were highly susceptible to skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and bladder carcinogenesis caused by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. These results suggest that MT is an important protective factor against metal toxicity, oxidative stress and chemical carcinogenesis.

Key words: Metallothionein (メタロチオネイン), metals (金属), oxidative stress (酸化ストレス), chemical carcinogenesis (化学発がん), gene knock-out mice (遺伝子欠損マウス)

はじめに

メタロチオネイン (metallothionein, MT) は、1957年に Margoshes と Vallee によってウマの腎皮質からSH基に富むカドミウム結合蛋白質として単離され (1), 表1に示すような種々の特徴を有し、特に金属に対する高親和性、フリーラジカル消去作用、アルキル化剤との結合などの性質を併せ持っている (2-8)。また、メタロチオネインは、ヒトやマウスおよびラットなどにおいて4種の亜型

の存在が確認されており、これらの亜型はいずれも構成アミノ酸 (メタロチオネイン-I:61個, メタロチオネイン-II:61個, メタロチオネイン-III:68個, メタロチオネイン-IV:62個) のうち20個をシステインが占め、しかもS-S結合を持たない特徴を有する (表1) (2-8)。

メタロチオネインの生理機能については、表2に示すように、主要な亜型であるメタロチオネインのI型とII型は、重金属の毒性軽減、重金属の蓄積、必須金属である亜鉛や銅の代謝調節、フリーラジカル消去、細胞の増殖・分化、制癌剤の副作用軽減、制癌剤耐性および化学発がんの防御などに関与することが知られており (2-8)、衛生学・毒性学領域において生体防御にかかわる重要な蛋白質であると考えられている。しかしながら、上記に示すようなメタロチオネインの役割については、否定的な論文も散見され不明確な点が数多く残されている。しかも、これまでの研究のほとんどは、メタロチオネインが比較的容易に誘導合成しやすいという性質を利

受付 2004 年 4 月 26 日, 受理 2004 年 5 月 19 日

* 第 73 回日本衛生学会総会 (2003 年, 大分) において授賞した奨励賞に関わる研究をとりまとめた。

Reprint requests to: Masahiko SATOH

Department of Hygienics, Gifu Pharmaceutical University

5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu, 502-8585, Japan

FAX: +81(58)237-5979

E-mail: masahiko@gifu-pu.ac.jp

表1 メタロチオネインの特徴

- ・低分子量 (約7,000) の金属結合蛋白質である
- ・哺乳類で4種の亜型が存在する
 - MT-I: アミノ酸 61 個
 - MT-II: アミノ酸 61 個
 - MT-III: アミノ酸 68 個
 - MT-IV: アミノ酸 62 個
- ・システイン残基が多く (20 個), 芳香族アミノ酸を含まない
- ・多くの生物種で存在が確認されている (哺乳類, 両生類, 爬虫類, 鳥類, 魚類, 無脊椎動物, 植物, 真核生物, 原核生物など)
- ・熱や酸に安定である
- ・様々な要因・刺激によってその合成が誘導される
- ・金属に対する親和性が高い
- ・フリーラジカル消去作用を有する
- ・アルキル化剤と反応しやすい

用してメタロチオネイン誘導剤を用いた検討であったため, メタロチオネイン誘導剤それ自身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。

近年, 遺伝子工学的手法を用いて, メタロチオネイン過剰発現マウス (9-11) やメタロチオネイン欠損マウス (12-14) などのメタロチオネイン遺伝子改変マウスが作成され (表3), これまでの問題点の解決や新たな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, 国内外の多くの研究グループに広く利用されはじめている。我々も, メタロチオネイン -I/II 欠損マウスを用いて, 金属および酸化的ストレスによる毒性や化学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おり, 本稿では, これまでの我々の研究成果並びにそれらに関連する国内外の最近の知見を紹介したい。

有害金属の毒性および動態に及ぼす
メタロチオネインの関与

1. カドミウム

メタロチオネイン遺伝子改変マウスにおけるカドミウム毒性の研究では, メタロチオネイン -I/II 欠損マウスを用いた研究が数多く報告されている (表4)。それらの結果をまとめると, カドミウム単回腹腔内投与による急性肝毒性 (15) やカドミウムの長期皮下投与による慢性の

表2 メタロチオネインの生理作用

- メタロチオネイン -I/II
 - ・重金属の毒性軽減
 - ・重金属の蓄積
 - ・必須微量元素 (亜鉛や銅) の代謝調節
 - ・抗酸化作用
 - ・細胞の増殖・分化
 - ・制癌剤の副作用軽減
 - ・制癌剤耐性
 - ・化学発がんの防御
 - ・癌転移の促進
- メタロチオネイン -III
 - ・神経突起の成長抑制
 - ・アルツハイマー病との関連性
 - ・抗酸化作用
- メタロチオネイン -IV
 - ・ほとんど不明

腎毒性 (16), 肝毒性 (17), 骨毒性 (18), 血液毒性 (19) および免疫毒性 (19) 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 欠損マウスの方が高いことが示されている。また, カドミウムの急性肝毒性が亜鉛の前投与によって野生型マウスでは軽減されるが, メタロチオネイン -I/II 欠損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 (15)。これらの結果は, 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。

カドミウムの慢性腎毒性はカドミウムの安全性を評価するうえでも主要な毒性であり, 上記以外にもカドミウムの長期経口曝露の研究が進められている。300 ppm のカドミウムを含む飲料水あるいは 100 ppm のカドミウムを含む食餌をメタロチオネイン -I/II 欠損マウスに6か月間与えると, 尿中のグルコースおよび γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) の排泄量や血中尿素窒素量並びに病理組織学的形態変化を指標とした腎毒性が認められたが, 野生型マウスではいずれの投与群においてもこれらを指標とした腎毒性は認められなかった (20)。この時の腎臓中カドミウム濃度は, 野生型マウスでは 50 $\mu\text{g/g}$ 組織であったのに対して, メタロチオネイン -I/II 欠損マウスでは 5-10 $\mu\text{g/g}$ 組織程度であった。しかしながら, その一方で, 50 ppm のカドミウムを含む食餌を4か月間

表3 メタロチオネイン (MT) 遺伝子改変マウス

マウス	系統	MT 発現	作製年	文献
MT-I 過剰発現マウス	C57BL/6 & SJL	肝臓で16倍増加	1993	9
MT-I/II 欠損マウス	C57BL/6 & OLA129	—	1993	12
MT-I/II 欠損マウス	129/Sv	—	1994	13
MT-III 過剰発現マウス	C57BL/6 & SJL	脳で3.4倍増加	1995	10
MT-III 欠損マウス	129/Sv	—	1997	14
MT-IIa 心臓過剰発現マウス	FVB	心臓でのみ10-130倍増加	1997	11

表 4 カドミウム毒性に対するメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの感受性

投与量	投与経路	投与期間	毒性	影響	文献
25 $\mu\text{mol/kg}$	腹腔内	1 回	肝毒性	増強	15
12.5-800 $\mu\text{g Cd/kg}$	皮下	10 週間	腎毒性	増強	16
12.5-800 $\mu\text{g Cd/kg}$	皮下	10 週間	肝毒性	増強	17
12.5-800 $\mu\text{g Cd/kg}$	皮下	10 週間	骨毒性	増強	18
12.5-800 $\mu\text{g Cd/kg}$	皮下	10 週間	血液毒性	増強	19
12.5-800 $\mu\text{g Cd/kg}$	皮下	10 週間	免疫毒性	増強	19
30-300 ppm	経口 (飲水)	6 ヶ月間	腎毒性	増強	20
100 ppm	経口 (食餌)	6 ヶ月間	腎毒性	増強	20
50 ppm	経口 (食餌)	4 ヶ月間	腎毒性	変化なし	21

曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、腎臓中カドミウム濃度が 10 $\mu\text{g/g}$ 組織であったにもかかわらず、腎毒性は観察されなかったとの報告もある (21)。このように、一部、矛盾した報告があるものの、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスにおけるカドミウムの慢性腎毒性は腎臓中カドミウム濃度が 10 $\mu\text{g/g}$ 組織程度でも発症することが確認された。なお、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスを利用した食餌からのカドミウム曝露による慢性腎毒性の研究は、相反する結果が示されており、今後更に再検討する必要がある。また、メタロチオネイン-I 過剰発現マウスを用いたカドミウム毒性の検討も報告されており、カドミウムの単回皮下投与による急性の致死毒性および肝毒性に対するメタロチオネイン-I 過剰発現マウスの感受性が野生型マウスに比べて著しく低いことが見いだされている (22)。

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。メタロチオネイン遺伝子を導入して細胞内メタロチオネイン濃度を上昇させた細胞は、カドミウムに対する感受性が低いことが明らかにされている (23)。さらに、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスの初代培養系の線維芽細胞 (24) および肝細胞 (25) や不死化線維芽細胞 (26) においても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、メタロチオネインは、実験動物だけでなく培養細胞系においても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。

カドミウムの体内動態に及ぼすメタロチオネインの影響もメタロチオネイン-I/II 欠損マウスを用いて、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に、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は関与することが見いだされている (27, 28)。さらに、カドミウムを連続長期曝露 (経口あるいは皮下投与) したメタロチオネイン-I/II 欠損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 (16, 20, 21)。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 mg/kg) 経口投与した際にはメタロチオネインの有無は関係しないが、比較的低

投与量 (0.1 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 欠損マウスで増加することが報告されている (29)。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 (30)、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、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 欠損マウスにカドミウムを静脈内投与して、24 時間後の胎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見いだされている (31)。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およ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 欠損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 (32)。以上のようにメタロチオネイン-I/II 欠損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る。

2. 水銀

筆者らはイオン型無機水銀皮下投与による急性腎毒性や金属水銀蒸気曝露による急性肺毒性および慢性神経行動毒性に関する研究を進めている。まず、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスに塩化第二水銀 (20 $\mu\text{mol/kg}$) を単回皮下投与して急性腎毒性を調べたところ、塩化第二水銀を投与したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスは野生型マウスに比べて血清中の尿素窒素およびクレアチニン量が有意に増加した (33)。また、野生型マウスでは塩化第二水銀投与による腎臓の病理組織学的形態変化はほとんど認められなかったが、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは近位尿細管の変性・壊死や尿細管腔の拡大が観察された (33)。

6.6-7.5 mg/m³ の金属水銀蒸気を 1 日 4 時間、3 日間曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの肺では、顕著なうっ血や肺胞の拡張不全 (無気肺) が認められたが、野生型マウスにおける肺への影響は軽微であった (34)。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も検討を加えた。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスに 0.06 mg/m³ の水銀蒸気を 1 日 8 時間、23 週間曝露して、その直後にオープンフィールドテ

スト並びに受動回避学習テストを行った。その結果、水銀蒸気曝露されたメタロチオネイン -I/II 欠損マウスおよび野生型マウスともに、探索行動の亢進や学習能力の低下が認められ、両マウスを比較すると、メタロチオネイン -I/II 欠損マウスは野生型マウスに比べて水銀蒸気曝露による神経行動毒性に対して高い感受性を示した (35)。

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急性腎毒性や金属水銀蒸気曝露による急性肺毒性および慢性神経行動毒性に対して防御作用を示すことが明らかとなった。

水銀の体内動態に及ぼすメタロチオネインの影響についてもメタロチオネイン -I/II 欠損マウスを用いた検討を行っている。メタロチオネインは、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および腎臓への水銀の取り込みに影響を与えないが、これらの臓器での水銀の蓄積・保持に深く関与することが明らかとなっている (33, 36)。さらに、妊娠 16 日目のメタロチオネイン -I/II 欠損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いだしている (37)。

3. その他の金属類

亜鉛の投与による脾臓障害に対しても、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 欠損マウスでは感受性が高いことが報告されている (38)。一方、亜鉛投与による肝臓および脾臓中での亜鉛の蓄積 (38, 39) やエンドトキシン投与による肝臓中での亜鉛の蓄積 (40)、さらには亜鉛の経口投与による腸管からの亜鉛の吸収 (41) 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 欠損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 欠損 *hepatocytes* を用いた検討により示されている (39)。

無機ヒ素化合物である亜ヒ酸の投与による肝毒性に対してメタロチオネイン -I/II 欠損マウスが高感受性である

ことが報告されている (42)。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 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて DNA 鎖切断 (コメットアッセイ) および酸化 DNA 損傷 (8-OHdG) が著しく増加することを見だし、メタロチオネインがジメチルアルシン酸による遺伝子損傷の防御に重要な役割を果たしていることを明らかにしている (43)。

酸化的ストレスに対する メタロチオネインの防御的役割

酸化的ストレスに対するメタロチオネインの役割を評価するため、メタロチオネイン -I/II を欠損したマウスや細胞を用いた検討が行われている。なお、これらのマウスや細胞内において、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およびグルタチオン (GSH) などの抗酸化因子に変化は認められていない。*in vitro* の実験系において、メタロチオネイン -I/II 欠損マウス由来の細胞では *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) およ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 (24, 25)。

メタロチオネイン -I/II 欠損マウスを用いた *in vivo* の実験系でも種々のフリーラジカル誘導因子の毒性に及ぼすメタロチオネインの役割が検討されている (表 5)。パラコートを投与したメタロチオネイン -I/II 欠損マウスでは、肝および腎毒性に対する感受性が増大することが見いだされている (44)。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影響を検討したところ、メタロチオネイン -I/II 欠損マウスでは病理組織学的形態変化および脂質過酸化を指標にしたパラコートの肺毒性が野生型マウスに比べて増強することを確認している。さらに、筆者らは、アセトアミノフェンによる肝毒性 (45)、エタノールによる胃および十二指腸の粘膜病変 (46)、シスプラチンによる腎毒性 (47) 並びに X 線による骨髄障害 (48) に対してもメタロチオネイン -I/II 欠損

表 5 酸化的ストレスに対するメタロチオネイン (MT) 遺伝子改変マウスの感受性

マウス	フリーラジカル誘導因子	毒性	影響	文献
MT-I/II 欠損マウス	パラコート	肝・腎毒性	増強	44
MT-I/II 欠損マウス	アセトアミノフェン	肝毒性	増強	45, 49, 50
MT-I/II 欠損マウス	エタノール	胃・十二指腸潰瘍	増強	46
MT-I/II 欠損マウス	シスプラチン	腎毒性	増強	47, 51
MT-I/II 欠損マウス	アドリアマイシン	心毒性	増強	56
MT-I/II 欠損マウス	放射線	骨髄毒性	増強	48
MT-I/II 欠損マウス	紫外線	皮膚毒性	増強	52, 53
MT-I/II 欠損マウス	四塩化炭素	肝毒性	増強	54
MT-I/II 欠損マウス	セルレイン	脾臓毒性	増強	55
MT-I/II 欠損マウス	ストレプトゾトシン	肝毒性	増強	57
MT-IIa 心臓過剰発現マウス	アドリアマイシン	心毒性	減弱	11
MT-IIa 心臓過剰発現マウス	虚血再還流	心毒性	減弱	59

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いだしている。また、*in vivo* 変異原性試験の1つである小核試験を用いたメタロチオネイン-I/II欠損マウスでの放射線による染色体異常の検討においても、X線を全身照射したメタロチオネイン-I/II欠損マウスは野生型マウスに比べて多染色性赤血球および網状赤血球の小核誘発が著しく増強されることを確認している。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およ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得られている(49-51)。上記フリーラジカル誘導因子の他に、紫外線による皮膚障害(52, 53)、四塩化炭素による肝毒性(54)、セルレインによる脾毒性(55)、アドリアマイシンの心毒性(56)およびストレプトゾトシンによる肝臓中脂質過酸化の促進(57)がメタロチオネイン-I/II欠損マウスで増強することが見いだされている。このように、メタロチオネイン-I/II欠損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急性毒性の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にされている。

金属化合物前投与によるフリーラジカル誘導因子の毒性軽減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およ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欠損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、腎臓や骨髄中の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およびX線による骨髄障害が共に軽減されたが、メタロチオネイン-I/II欠損マウスでは、亜鉛を前投与してもこれらの組織中メタロチオネインは検出限界以下であり、野生型マウスのような軽減効果は認められなかった(47)。従って、亜鉛の前投与が示すシスプラチンの腎毒性およ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中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およびメタロチオネイン-I/II欠損マウス共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(54, 57, 58)。このように、メタロチオネイン-I/II欠損マウスは、メタロチオネイン誘導剤前投与によるフリーラジカル誘導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。

Kangらは、心臓の α ミオシン遺伝子のフラグメントで転写調節を受けるようにメタロチオネイン-*IIA* geneを導入し、心臓でのみ10～130倍にメタロチオネインを過剰発現したトランスジェニックマウスを作製した(11)。この心臓中メタロチオネインを過剰発現したマウスでは、アドリアマイシン(11)や虚血再還流(59)による心臓障害が野生型マウスに比べて減弱することが見いだされている(表5)。また、このトランスジェニックマウス由来の心筋細胞を用いた培養系においても、アドリアマイシン(60)や過酸化水素(61)による細胞毒性がメタロチオネインの過剰発現によって軽減されることが確認されている。

化学発がん抑制因子としての
メタロチオネインの役割

メタロチオネイン-I/II欠損マウスを利用した化学発がんにおけるメタロチオネインの役割に関する研究がいくつかの研究グループから報告されている(表6)。筆者らは、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)による発がんに対するメタロチオネイン-I/II欠損マウスの感受性を検討した。その結果、メタロチオネイン-I/II欠損マウスでは、皮膚へのDMBA単独塗布で誘発される皮膚腫瘍(パピローマ)の発生が野生型マウスに比べて著しく増強されることが認められた(62)。さらに、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)により誘発される皮膚腫瘍の発生も、発生率や発生時期およびマウス1匹あたりの腫瘍数の点においてメタロチオネイン-I/II欠損マウスで増強されることが見いだされた(63)。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A¹⁸²からTへの点変異が認められたことから、メタロチオネインが示すDMBA/TPA二段階皮膚発がんの抑制作用には*c-Ha-ras* gene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、DMBA単独経口投与による多臓器での腫瘍発生に対するメタロチオネインの影響を検討したところ、メタロチオネイン-I/II欠損マウスは野生型マウスに比べて、DMBA経口投与による胃、肺および肝臓での発がん性に対して高い感

表6 メタロチオネイン-I/II欠損マウスにおける発がんおよび癌転移への影響

発がん物質・癌細胞	投与経路	発がん・転移臓器	影響	文献
DMBA	皮膚への塗布	皮膚	発がん性の増強	62
DMBA	経口投与	胃, 肺, 肝臓	発がん性の増強	63
DMBA/TPA	皮膚への投与	皮膚	発がん性の増強	64
BBN	飲水投与	膀胱	発がん性の増強	65
BBN	飲水投与	膀胱	腫瘍の悪性化頻度の減弱	65
B16-BL6メラノーマ	静脈内投与	肺	肺への転移の減弱	66

受性を示すことが明らかとなった (64)。

Kondoらは、N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)により誘発される膀胱腫瘍の発生 (マウス1匹あたりの腫瘍数を指標) が、メタロチオネイン-I/II欠損マウスで増強されることを報告している (65)。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欠損マウスではこのような抑制効果を示さないことも報告しており、亜鉛の投与による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 (65)。しかしながら、その一方で、BBNによって発生した膀胱腫瘍の悪性度は、メタロチオネイン-I/II欠損マウスよりむしろ野生型マウスに高いことが示されている (65)。従って、BBNによる膀胱発がんにおいて、メタロチオネインは腫瘍の誘発に対して抑制作用を示すが、その後の腫瘍の悪性化に対してはむしろ促進的に作用する可能性が示唆されている。

また、筆者らは、肺に転移することが知られているB16-BL6メラノーマ細胞を用いた実験的転移モデルにおいて、メタロチオネイン-I/II欠損マウスではB16-BL6メラノーマ細胞の肺への転移が野生型マウスに比べて減弱されることを見いだした (66)。この時、カドミウム、亜鉛あるいはビスマス前投与した野生型マウスではB16-BL6メラノーマ細胞の肺への転移が増強されるが、メタロチオネイン-I/II欠損マウスではこのような増強効果を示さないことから、これらの金属化合物の投与による肺へのがん転移増強効果は、肺で誘導合成されたメタロチオネインによることが確認された (66)。このように、メタロチオネインは、がん転移に対して促進作用を示すことが明らかとなった。

以上のように、メタロチオネイン-I/II欠損マウスでは、DMBAで誘発される皮膚、胃、肺および肝臓での腫瘍の発生やBBNで誘発される膀胱での腫瘍の発生が著しく増強され、メタロチオネインが化学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た。しかしながら、その一方で、発がん因子によって誘発された腫瘍の悪性化やがん細胞の転移に対しては、メタロチオネインがむしろ促進的に作用することが示され、宿主に悪影響を及ぼすことが示唆された。

そ の 他

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) 様の症状を呈することが報告されている (67)。筆者らは、このSOD-1 Tg マウスにメタロチオネイン-I/II欠損マウスを掛け合わせたところ、メタロチオネイン-I/II欠損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 (68, 69)。さらに、メタロチオネイン-III欠損マウスとSOD-1 Tg マウスとの掛け合わせマウスでも、ALS症状の進展が促進されることが報告されており (70)、メタロチオネインがALSの発症抑制に関与することが示唆されている。また、メタロチオネイン-I/II欠損マウスを用いた検討により、パーキンソン病モデル作製に汎用される6-hydroxydopamineのドパミン神経毒性発現に対してメタロチオネインが保護的に作用することも報告されている (71)。このように、神経変性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る。

お わ り に

以上のように、メタロチオネイン-I/II欠損マウスを利用することによって、有害金属、酸化的ストレスおよび化学発がん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となった。ただし、生体内には、メタロチオネイン以外にも金属解毒因子、抗酸化因子および抗発がん因子が存在し、幾重もの複雑な防御システムが備わっている。従って、今後、金属毒性、酸化的ストレスおよび化学発がんに対する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を明確にする必要がある。

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 (72)。従って、低メタロチオネインレベルのヒトは、金属毒性、酸化的ストレスおよ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。しかも、メタロチオネインは、金属毒性、酸化的ストレスおよび化学発がんに対する感受性を決定する生体内因子の1つであることから、ヒトにおけるメタロチオネインの遺伝子多型の存在の有無を明らかにすることは、メタロチオネインの生体内での役割を研究するうえでたいへん重要なことであり、今後の主要な研究課題である。最近、Naganumaは、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アデニン (A) からグアニン (G) への一塩基置換のあることを見だし、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を報告している (73)。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、メタロチオネイン誘導剤等の服用によって、生

体内でメタロチオネイン濃度を高く維持することができれば、金属毒性、酸化ストレスおよび化学発がんに対する予防効果が期待できる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご協力を賜りました遠山千春先生（国立環境研究所）並びに共同研究の諸先生方に深甚なる謝意を表します。また、研究上でのご指導、ご助言を頂いた井村伸正先生（北里大学）、永沼 章先生（東北大学）、鈴木継美先生（東京大学）並びに清水英佑先生（東京慈恵会医科大学）に心から深謝いたします。

文 献

- (1) Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 1957; 79: 1813-1814.
- (2) Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 267-294.
- (3) Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 35-70.
- (4) Lazo JS, Pitt BR. Metallothioneins and cell death by anticancer drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 635-653.
- (5) Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad Biol Med* 1993; 14: 325-337.
- (6) Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian MG. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 1999; 132: 85-98.
- (7) Satoh M, Tohyama C. Role of metallothionein in mutagenesis and carcinogenesis. *Biomed Res Trace Elements* 2000; 11: 138-144.
- (8) Hozumi I, Inuzuka T, Tsuji S. Brain injury and growth inhibitory factor (GIF). *Neurochem Res* 1998; 23: 319-328.
- (9) Palmiter RD, Sandgren EP, Koeller DM, Brinster RL. Distal regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 5266-5275.
- (10) Erickson JC, Masters BA, Kelly EJ, Brinster RL, Palmiter RD. Expression of human metallothionein III in transgenic mice. *Neurochem Int* 1995; 27: 35-41.
- (11) Kang YJ, Chen Y, Yu A, Voss-McCowan M, Epstein PN. Overexpression of metallothionein in the heart of transgenic mice suppresses doxorubicin cardiotoxicity. *J Clin Invest* 1997; 100: 1501-1506.
- (12) Michalska AE, Choo KHA. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 8088-8092.
- (13) Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 584-588.
- (14) Erickson JC, Hollopeter G, Thomas SA, Froelick GJ, Palmiter RD. Disruption of the metallothionein-III gene in mice: Analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures. *J Neuroscience* 1997; 17: 1271-1281.
- (15) Liu J, Liu Y, Michalska AE, Choo KHA, Klaassen CD. Metallothionein plays less of a protective role in cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity than in cadmium chloride-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276: 1216-1223.
- (16) Liu J, Liu Y, Habeebu SS, Klaassen CD. Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl₂-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicol Sci* 1998; 46: 197-203.
- (17) Habeebu SS, Liu J, Liu Y, Klaassen CD. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 55: 223-232.
- (18) Habeebu SS, Liu J, Liu Y, Klaassen CD. Metallothionein-null mice are more susceptible than wild-type mice to chronic CdCl₂-induced bone injury. *Toxicol Sci* 2000; 56: 211-219.
- (19) Liu J, Liu Y, Habeebu SS, Klaassen CD. Metallothionein-null mice are highly susceptible to the hematotoxic and immunotoxic effects of chronic CdCl₂ exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 159: 98-108.
- (20) Liu Y, Liu J, Habeebu SM, Waalkes MP, Klaassen CD. Metallothionein-I/II null mice are sensitive to chronic oral cadmium-induced nephrotoxicity. *Toxicol Sci* 2000; 57: 167-176.
- (21) Himeno S, Yamazaki Y, Imura N. Accumulation and toxicity of orally ingested cadmium in metallothionein null mice. *J Health Sci* 2000; 46: 149-152.
- (22) Liu Y, Liu J, Iszard MB, Andrews GK, Palmiter RD, Klaassen CD. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 135: 222-228.
- (23) Kelley SL, Basu A, Teicher BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 1988; 241: 1813-1815.
- (24) Lazo JS, Kondo Y, Dellapiazza D, Michalska AE, Choo KHA, Pitt BR. Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J Biol Chem* 1995; 270: 5506-5510.
- (25) Zheng H, Liu J, Liu Y, Klaassen CD. Hepatocytes from metallothionein-I and II knock-out mice are sensitive to cadmium- and tert-butylhydroperoxide-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett* 1996; 87: 139-145.
- (26) Kondo Y, Yanagiya T, Himeno S, Yamabe Y, Schwartz D, Akimoto M, Lazo JS, Imura N. Simian Virus 40-transformed metallothionein null cells showed increased sensitivity to cadmium but not to zinc, copper, mercury or nickel. *Life Sci* 1999; 64: 145-150.

- (27) Tohyama C, Satoh M, Kodama N, Nishimura H, Choo A, Michalska A, Kanayama Y, Naganuma A. Reduced retention of cadmium in the liver of metallothionein-null mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 1996; 1: 213-216.
- (28) Liu J, Liu Y, Michalska AE, Choo KH, Klaassen CD. Distribution and retention of cadmium in metallothionein I and II null mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 136: 260-268.
- (29) Kimura T, Itoh N, Min K-S, Fujita I, Muto N, Tanaka K. Tissue accumulation of cadmium following oral administration to metallothionein-null mice. *Toxicol Lett* 1998; 99: 85-90.
- (30) Liu Y, Liu J, Klaassen CD. Metallothionein-null and wild-type mice show similar cadmium absorption and tissue distribution following oral cadmium administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175: 253-259.
- (31) Lau JC, Joseph MG, Cherian MG. Role of placental metallothionein in maternal to fetal transfer of cadmium in genetically altered mice. *Toxicology* 1998; 127: 167-178.
- (32) Brako EE, Wilson AK, Jonah MM, Blum CA, Cerny EA, Williams KL, Bhattacharyya MH. Cadmium oaths during gestation and lactation in control versus metallothionein 1,2-knockout mice. *Toxicol Sci* 2003; 71: 154-163.
- (33) Satoh M, Nishimura N, Kanayama Y, Naganuma A, Suzuki T, Tohyama C. Enhanced renal toxicity by inorganic mercury in metallothionein-null mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 1529-1533.
- (34) Yoshida M, Satoh M, Shimada A, Yasutake A, Sumi Y, Tohyama C. Pulmonary toxicity caused by acute exposure to mercury vapor is enhanced in metallothionein-null mice. *Life Sci* 1999; 64: 1861-1867.
- (35) Yoshida M, Watanabe C, Satoh M, Yasutake A, Sawada M, Ohtsuka Y, Akama Y, Tohyama C. Susceptibility of metallothionein-null mice to the behavioural alterations caused by exposure to mercury vapour at human-relevant concentration. *Toxicol Sci* 2004 in press.
- (36) Yoshida M, Satoh M, Yasutake A, Shimada A, Sumi Y, Tohyama C. Distribution and retention of mercury in metallothionein-null mice after exposure to mercury vapor. *Toxicology* 1999; 139: 129-136.
- (37) Yoshida M, Satoh M, Yasutake A, Yamamoto E, Shimada A, Tohyama C. Maternal-to-fetus transfer of mercury in metallothionein-null pregnant mice after exposure to mercury vapor. *Toxicology* 2002; 175: 215-222.
- (38) Kelly EJ, Quaife CJ, Froelick GJ, Palmiter RD. Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J Nutr* 1996; 126: 1782-1790.
- (39) Coyle P, Philcox JC, Rofe AM. Hepatic zinc in metallothionein-null mice following zinc challenge: in vivo and in vitro studies. *Biochem J* 1995; 309: 25-31.
- (40) Philcox JC, Coyle P, Michalska A, Choo KHA, Rofe AM. Endotoxin-induced inflammation does not cause hepatic zinc accumulation in mice lacking metallothionein gene expression. *Biochem J* 1995; 308: 543-546.
- (41) Coyle P, Philcox JC, Rofe AM. Metallothionein-null mice absorb less Zn from an egg-white diet, but a similar amount from solutions, although with altered intertissue Zn distribution. *J Nutr* 1999;
- (42) Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes MP. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 2000; 55: 460-467.
- (43) Guang J, Sone H, Nishimura N, Satoh M, Tohyama C. Metallothionein (I/II) suppresses genotoxicity caused by dimethylarsinic acid. *Int J Oncol* 2004; in press.
- (44) Sato M, Apostolova MD, Hamaya M, Yamaki J, Choo KHA, Michalska AE, Kodama N, Tohyama C. Susceptibility of metallothionein-null mice to paraquat. *Environ Toxicol Pharmacol* 1996; 1: 221-225.
- (45) Zhang B, Satoh M, Tohyama C. A protective role for metallothionein in acetaminophen-caused liver toxicity via oxidative stress. *J health Sci* 1999; 45: 15-19.
- (46) Takano H, Satoh M, Shimada A, Sagai M, Yoshikawa T, Tohyama C. Cytoprotection by metallothionein against gastroduodenal mucosal injury caused by ethanol in mice. *Lab Invest* 200; 80: 371-377.
- (47) Satoh M, Aoki Y, Tohyama C. Protective role of metallothionein in renal toxicity of cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40: 358-362.
- (48) Satoh M, Tohyama C. Susceptibility to metals and radical-inducing chemicals of metallothionein-null mice. In: Klaassen CD ed. *Metallothionein IV*. Switzerland: Birkhauser Verlag Basel, 1999: 541-546.
- (49) Rofe AM, Barry EF, Shelton TL, Philcox JC, Coyle P. Paracetamol hepatotoxicity in metallothionein-null mice. *Toxicology* 1998; 125: 131-140.
- (50) Liu J, Liu Y, Hartley D, Klaassen CD, Shehin-Johnson SE, Lucas A, Cohen SD, Metallothionein-I/II knockout mice are sensitive to acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 580-586.
- (51) Liu J, Liu Y, Habeebu SSM, Klaassen CD. Metallothionein (MT)-null mice are sensitive to cisplatin-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 149: 24-31.
- (52) Hanada K, Sawamura D, Hashimoto I, Kida K, Naganuma A. Epidermal proliferation of the skin in metallothionein-null mice. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 259-262.
- (53) Hanada K, Sawamura D, Tamai K, Baba T, Hashimoto I, Muramatsu T, Miura N, Naganuma A. Novel function of metallothionein in photoprotection: metallothionein-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet B injury in the skin. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 582-585.
- (54) Liu Y, Hartley DP, Liu J. Protection against carbon tetrachloride hepatotoxicity by oleanolic acid is not mediated through metallothionein. *Toxicol Lett* 1998; 95: 77-85.
- (55) Fu K, Tomita T, Sarras MP Jr, De Lisle RC, Andrews GK. Metallothionein protects against cerulein-induced acute pancreatitis: analysis using transgenic mice. *Pancreas* 1998; 17: 238-246.
- (56) Kimura T, Fujita I, Itoh N, Muto N, Nakanishi T, Takahashi K, Azuma J, Tanaka K. Metallothionein acts as a cytoprotectant against doxorubicin toxicity. *J Pharmacol Exp Ther*

- 2000; 292: 299-302.
- (57) Apostolova MD, Choo KHA, Michalska AE, Tohyama C. Analysis of the possible protective role of metallothionein in streptozotocin-induced diabetes using metallothionein-null mice. *J Trace Elements Med Biol* 1997; 11: 1-7.
- (58) Itoh N, Kimura T, Nakanishi H, Muto N, Kobayashi M, Kitagawa I, Tanaka K. Metallothionein-independent hepatoprotection by zinc and sakuraso-saponin. *Toxicol Lett* 1997; 93: 135-140.
- (59) Kang YJ, Li G, Saari JK. Metallothionein inhibits ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Am J Physiol* 1999; 276: H993-H997.
- (60) Wang G, Kang YJ. Inhibition of doxorubicin toxicity in cultured neonatal mouse cardiomyocytes with elevated metallothionein levels. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 938-944.
- (61) Wang G, Schuschke DA, Kang YJ. Metallothionein-overexpressing neonatal mouse cardiomyocytes are resistant to H₂O₂ toxicity. *Am J Physiol* 1999; 276: H167-H175.
- (62) Zhang B, Satoh M, Nishimura N, Suzuki JS, Sone H, Aoki Y, Tohyama C. Metallothionein deficiency promotes mouse skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res* 1998; 58: 4044-4046.
- (63) Suzuki JS, Nishimura N, Zhang B, Nakatsuru Y, Kobayashi S, Satoh M, Tohyama C. Metallothionein deficiency enhances skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in metallothionein-null mice. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1123-1132.
- (64) Satoh M, Murata M, Nishimura N, Suzuki JS, Tohyama C. Enhanced chemical carcinogenesis in the stomach of metallothionein-null mice. *Biomed Res Trace Elements* 2001; 12: 343-344.
- (65) Kondo Y, Himeno S, Endo W, Mita M, Suzuki Y, Nemoto K, Akimoto M, Lazo JS, Imura N. Metallothionein modulates the carcinogenicity of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in mice. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1625-1627.
- (66) Kito H, Nagase H, Funasaka T, Satoh M, Tohyama C. Enhancement effect of metallothionein on tumor metastasis in MT knock out mice. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89 Supplement: P-472.
- (67) Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique T. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 264: 1772-1775.
- (68) Nagano S, Satoh M, Sumi H, Fujimura H, Tohyama C, Yanagihara T, Sakoda S. Reduction of metallothioneins promotes disease expression of familial amyotrophic lateral sclerosis in a dose dependent manner. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1363-1370.
- (69) Fukada K, Nagano S, Satoh M, Tohyama C, Nakanishi T, Ahimizu A, Yanahihara T, Sakoda S. Stabilization of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by co-expressed wild SOD1 protein accelerates the disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 2032-2036.
- (70) Puttaparthi K, Gitomer WL, Krishnan U, Son M, Rajendran B, Elliott JL. Disease progression in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis is dependent on both neuronal and non-neuronal zinc binding proteins. *J Neurosci* 2002; 22: 8790-8796.
- (71) Asanuma M, Miyazaki I, Higashi Y, Tanaka K, Haque ME, Fujita N, Ogawa N. Aggravation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic lesions in metallothionein-I and -II knock-out mouse brain. *Neurosci Lett* 2002; 327: 61-65.
- (72) Yoshida M, Ohta H, Yamauchi Y, Seki Y, Sagi M, Yamazaki K, Sumi Y. Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese. *Biol Trace Elem Res* 1998; 63: 167-175.
- (73) Naganuma A. A single nucleotide polymorphism in metallothionein IIA gene in normal. *Jpn J Hyg* 2004; 59(2): 130.