

血管傷害後の新生内膜肥厚における **I κ BNS** の役割

に い だ と み は る
新居田 登三治

(循環器病学専攻)

防衛医科大学校

平成25年度

目次

第1章 緒言	- 1 -
第2章 血管傷害後の新生内膜肥厚における I κ BNS の役割	- 3 -
第1節 背景	
第2節 対象と方法	
第3節 結果	
第4節 考察	
第3章 血管平滑筋における IL-6 の役割と抗 IL-6 受容体抗体による新生内膜肥厚 の抑制効果	- 15 -
第1節 背景	
第2節 対象と方法	
第3節 結果	
第4節 考察	
第4章 包括的考察	- 22 -
謝辞	- 26 -
引用文献	- 27 -
図表	- 33 -

第 1 章 緒言

Nuclear factor- κ B (NF- κ B)は、動脈硬化病変を構成する種々の細胞 (例えば内皮細胞、平滑筋細胞およびマクロファージ)において発現しているサイトカインおよび細胞接着分子などの炎症性メディエーターの調節に重要な役割を果たしている。NF- κ B の活性化は、インターロイキン 6 (interleukin-6: IL-6)、腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α)および単球走化性タンパク質-1 (monocyte chemotactic protein-1: MCP-1)などの多くの炎症性メディエーターの産生を亢進し、動脈硬化の進行を助長している^{1, 2)}。また、NF- κ B の活性化は血管壁の平滑筋細胞の増殖を引き起こし、血管傷害後の新生内膜肥厚に中心的な役割を果たしている³⁾。新生内膜肥厚は血管形成術後再狭窄の主因と考えられており⁴⁾、その機序の解明は血管形成術後の再狭窄予防に重要な示唆を与えるものと考えられる。

NF- κ B の活性化は様々な機構で制御されている。図 1 に NF- κ B の制御機構を示す。未刺激の状態では、NF- κ B (p50/p65 ヘテロダイマー)は、その抑制分子である I κ B- α と結合し、細胞質内で非活性型として存在する。しかしリポポリサッカライド (LPS)などの炎症トリガーが Toll-like receptor (TLR)に認識されると、I κ B- α の分解が誘導され活性型 NF- κ B に変化する。活性型 NF- κ B は、核内に移行し各種炎症性メディエーターのプロモーター領域に結合し、その転写を開始する。I κ BNS は別名 I κ B- δ や Nfkbid (nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, delta)として知られ、NF- κ B 依存性の IL-6 産生を抑制している。I κ BNS は、p50/p50 ホモダイマーと複合体

を形成することにより、活性型 NF- κ B の IL-6 プロモーターへの結合を阻害し、マウスのマクロファージにおける LPS 刺激後の IL-6 産生を特異的に抑制している⁵⁾。さらに IkBNS は、IL-6 以外にも TLR 関連遺伝子であるインターロイキン 18 (IL-18)やインターロイキン 12 p40 (IL-12p40)の発現を抑制していることが知られている⁶⁾。

臨床的には、IL-6 は末梢動脈疾患の進行を示すバイオマーカーであり^{7, 8)}、冠動脈疾患や心臓突然死の強力な予測因子である^{9, 10)}。これらの報告から、IL-6 は動脈閉塞性疾患の鍵となるメディエーターであると考えられる。IkBNS は、マクロファージの NF- κ B 活性を制御し、IL-6 産生を抑制することが解明されているが、血管傷害後の新生内膜肥厚に対する IkBNS の役割は検討されていない。従って、本研究では、IkBNS 欠損マウスの血管傷害モデルを作成し、NF- κ B 活性化による IL-6 産生を介した新生内膜肥厚について検討することを目的とした。

第2章 血管傷害後の新生内膜肥厚における IkBNS の役割

第1節 背景

免疫系は自然免疫系と獲得免疫系に分けられるが、自然免疫系の異物認識には TLR が深く関与している。TLR を介したシグナル伝達では NF- κ B が中心的な役割を担っているが、近年 NF- κ B の活性化を制御する新規分子として IkBNS が同定された。IkBNS は核内で、p50/p50 ホモダイマーと複合体を形成することにより、活性化 NF- κ B のプロモーターへの結合を阻害し、マウスのマクロファージにおける LPS 刺激後の IL-6 産生を抑制している¹¹⁾。IkBNS 欠損マウスでは、dextran sodium sulfate 投与後に炎症性腸疾患を発症することが報告されているが⁶⁾、炎症の関わる心血管疾患モデルにおける検討はまだ行われていない。IL-6 は末梢動脈疾患の進行を示すバイオマーカーであり^{7, 8)}、冠動脈疾患や心臓突然死の強力な予測因子である^{9, 10)}。本章の目的は、カフによる血管傷害モデルを用いて、IkBNS 欠損が新生内膜肥厚に与える影響およびそのメカニズムを解明することにある。

第2節 対象と方法

対象

8～12 週齢のオスの IkBNS 欠損マウス (IkBNS^{-/-}, C57BL/6 由来)と野生型マウス (IkBNS^{+/+}, C57BL/6)を用いた。IkBNS 欠損マウスは大阪大学、竹田潔教授から雌雄ペア

を譲渡していただき、防衛医科大学校動物実験施設にて、通常飼料を使用して繁殖させた。本研究は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て(承認番号 10026)、動物実験規則に基づき実施した。

方法

血圧測定

マウスの血圧は、MK-2000 (Muromachi Kikai)を用いて、無麻酔下で非観血的に尾動脈の収縮期血圧を測定した。

大腿動脈カフ傷害モデル

麻酔はペントバルビタール (用量: 50 mg/kg)を腹腔内投与した。マウスの右大腿動脈を神経や静脈などの周囲組織から剥離し、ポリエチレン製のカフ (長さ 2 mm、内径 0.56 mm、Becton Dickinson)を動脈がカフ内を走行するように留置した。またカフ傷害後の LPS による局所刺激については、LPS 1 mg/mL を含有する Pluronic F-127 ゲル (Wako Pure Chemical Industries)を、大腿動脈とカフの間に注入した。LPS は *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich)を使用した。

組織標本作製

カフ傷害 2 週間後、ペントバルビタール麻酔下で、左心室より生理食塩水、4%パラホルムアルデヒドの順で灌流し大腿動脈を採取した。大腿動脈は 10%ホルマリンで 48 時間固定し、パラフィン包埋後に 5 μm の厚さで横断切片を作成した。切片は 1 個体より 200 μm 毎の等間隔で 10 標本作製し、新生内膜の定量評価に使用した。すべての標本でエラスチカワンギーソン染色を行い、内膜および中膜の面積を NIH Image J 1.42 (National Institutes of Health, public domain software)で計測した。内膜および中膜の面積の結果は、個体ごとに 10 切片の平均値を使用した。

免疫組織染色

免疫組織染色の一次抗体として以下のものを使用した。平滑筋細胞は抗 α -smooth muscle cell actin (α -SMA)抗体 (N1584, DAKO)、細胞増殖については proliferating cell nuclear antigen (PCNA)抗体 (N1529, DAKO)、活性化 NF- κ B については抗リン酸化 NF- κ B p65 (pNF- κ B)抗体 (#3037, Cell Signaling Technology)を使用した。マクロファージ、好中球、T 細胞などの炎症性細胞については、それぞれ抗 MAC-3 抗体 (550292, BD Pharmingen)、抗 Ly-6G 抗体 (551459, BD Pharmingen)、抗 CD3 抗体 (N1580, DAKO)を用いた。TLR4 発現については、抗 TLR4 抗体 (ab-47093, Abcam) を使用した。サイトカインの発現については、抗 IL-6 抗体 (sc-1265, Santa Cruz Biotechnology)

と抗 IL-18 抗体 (210-401-323, Rockland Immunochemicals)にて評価した。二次抗体はそれぞれの一次抗体に特異的な動物種の抗体を用い、発色はジアミノベンジジンを基質としてアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法にて行った。

蛍光免疫染色

大腿動脈を 4%パラホルムアルデヒドにて一晩固定した後、OCT コンパウンド (Sakura Finetek 4583)に包埋し、10 μ m の厚さで薄切した。IkBNS の発現は、一次抗体として抗 IkB- δ 抗体 (sc-135483, Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体として抗ヤギ IgG-FITC 抗体 (sc-2024, Santa Cruz Biotechnology)を使用した。核染色は DAPI を含む UltraCruz™ Mounting Medium (sc-24941, Santa Cruz Biotechnology)にて行った。

リアルタイム PCR

非傷害およびカフ傷害後 3 日、7 日および 14 日目の大腿動脈において、各群 2~4 本ずつまとめて 1 サンプルとし RNA 抽出を行った。サンプルをトライゾール (Sigma-Aldrich)にて溶解し、遠心分離後の上清からイソプロピルアルコール、クロロホルムおよび 70%エタノールを用いて RNA を精製した。精製 RNA から High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて cDNA を合成し、リアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR に使用したプライマー配列は表 1 に示した。

mRNA の発現レベルについては $\Delta\Delta$ CT 法にて解析した。

血中 IL-6 およびコレステロール濃度の測定

カフ傷害による血中 IL-6 およびコレステロール値の変化を検討するため、カフ傷害後 2 週間目に採血を行った。食餌の影響を避けるために、血液サンプルは 7 時間の絶食時間をおいて採取した。血中サイトカイン濃度は BioRad 社の Bioplex キットを用いて測定し、総コレステロール、高密度リポタンパク質 (HDL)コレステロールおよび中性脂肪の評価は酵素法を用いて行った。

統計処理

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示している。2 群間の比較は Student's-t 検定で行った。カフ傷害後の mRNA の経時的変化については、Two-way ANOVA を使用した。 $P=0.05$ を有意水準とした。

第 3 節 結果

カフ傷害前後における体重および血圧の変化

カフ傷害前の体重と血圧については、IkbNS 欠損マウスと野生型マウスにおいて同等であった [体重: 22.2 ± 0.4 g ($n = 6$) vs. 22.4 ± 0.4 g ($n = 6$); $P = \text{NS}$, 収縮期血圧: 94 ± 4

vs. 95 ± 2 mmHg; $P = \text{NS}$]. これらの指標はカフ傷害 2 週間後においても変化を認めなかった [体重: 23.8 ± 0.4 g ($n = 6$) vs. 24.2 ± 0.5 g ($n = 6$); $P = \text{NS}$, 収縮期血圧: 98 ± 3 vs. 102 ± 4 mmHg; $P = \text{NS}$]. 以上の結果より、IkBNS はカフ傷害の前後において、体重と血圧に影響を与えないことが示された。

カフ傷害後の新生内膜肥厚

血管傷害における IkBNS の働きを解明するために、IkBNS 欠損マウスと野生型マウスにおけるカフ傷害後の血管の変化について検討した。IkBNS 欠損マウスは野生型マウスと比較して、内膜面積が 1.9 倍 [$8,066 \pm 1,141 \mu\text{m}^2$ ($n = 10$) vs. $4,267 \pm 1,095 \mu\text{m}^2$ ($n = 10$); $P = 0.027$], 内膜/中膜面積比が 2.0 倍増加した (0.72 ± 0.13 vs. 0.36 ± 0.09 ; $P = 0.032$) (図 2)。一方、中膜の面積については両群間に差を認めなかった ($12,103 \pm 529$ vs. $11,528 \pm 350 \mu\text{m}^2$; $P = \text{NS}$) (図省略)。この結果から、IkBNS 欠損がカフ傷害後の新生内膜肥厚を促進することが示された。

カフ傷害後の新生内膜における組織学的変化を検討するために、抗 α -SMA 抗体、抗 PCNA 抗体および抗 pNF- κ B 抗体を用いて免疫組織染色を行った。図 3A にカフ傷害 7 日目の大腿動脈の連続切片を示している。IkBNS 欠損マウスおよび野生型マウスともに、新生内膜は α -SMA 陽性細胞で占められており、平滑筋細胞が主に新生内膜肥厚を構成していることが示された。さらに IkBNS 欠損マウスの新生内膜では、野生型マウスよ

りも PCNA 陽性細胞と pNF- κ B 陽性細胞の増加が認められた。そこで新生内膜における PCNA 陽性細胞と pNF- κ B 陽性細胞の比率を定量的に評価したところ、IkBNS 欠損マウスは野生型マウスと比較して、PCNA 陽性細胞はカフ傷害 14 日目に 5.4 倍 [$17.3 \pm 4.7\%$ ($n = 7$) vs. $3.2 \pm 1.9\%$ ($n = 7$); $P = 0.024$] (図 3B)、pNF- κ B 陽性細胞は 7 日目に 5.1 倍 [$7.1 \pm 1.1\%$ ($n = 4$) vs. $1.4 \pm 0.8\%$ ($n = 4$); $P = 0.008$] (図 3C)の増加が認められ、NF- κ B の活性化が平滑筋細胞の増殖を引き起こし、新生内膜肥厚を促進していることが示された。

カフ傷害後のマクロファージ浸潤と TLR4 発現

カフ傷害後の炎症細胞浸潤を評価するために、マクロファージ、好中球、T 細胞の免疫組織染色を行った。カフ傷害 7 日目の外膜では、マクロファージ浸潤 (MAC-3 陽性細胞)が認められたが (図 4A)、好中球 (Ly-6G 陽性細胞)や T 細胞 (CD3 陽性細胞)は確認できなかった。マクロファージ浸潤の程度を定量評価するために、MAC-3 陽性細胞数を計測したが、外膜のマクロファージ数には有意差を認めなかった [35.5 ± 6.5 ($n = 4$) vs. 39.5 ± 6.9 ($n = 4$); $P = \text{NS}$] (図 4B)。以上の結果より、IkBNS 欠損は外膜のマクロファージ浸潤の程度には影響を与えていないことが示された。

そこで傷害血管における炎症シグナルの変化を検討するために、TLR4 の発現について検討した。カフ傷害 7 日目の免疫組織染色において、TLR4 が IkBNS 欠損マウスの新

生内膜で強く発現していることが示された (図 4C)。またリアルタイム PCR において、IkBNS 欠損マウスの傷害血管は、野生型マウスのものと比べて TLR4 の mRNA 発現が 2.5 倍 ($P = 0.001$) 増加しており (図 4D)、IkBNS 欠損が血管傷害後の TLR4 発現を促進していることが示された。TLR4 シグナルを増強させるため、Pluronic F-127 ゲルを用いて LPS 局所投与を行った。LPS 局所刺激は IkBNS 欠損マウスの新生内膜肥厚をさらに促進したが、野生型マウスでは変化が見られなかった (図 4E, F)。さらに LPS 局所投与を行った IkBNS 欠損マウスの新生内膜では、野生型マウスよりも pNF- κ B 陽性細胞の比率が有意に増加していた [$32.1 \pm 5.4\%$ ($n = 5$) vs. $15.6 \pm 3.4\%$ ($n = 5$); $P = 0.032$] (図省略)。これらの結果より、IkBNS 欠損マウスの傷害血管では、増強された TLR4 シグナルが NF- κ B を活性化し、新生内膜形成を促進していることが示された。

カフ傷害後の IL-6 および IkBNS の経時的変化

カフ傷害後の IL-6 および IkBNS の経時的変化を確認するために、免疫組織染色とリアルタイム PCR を用いて、それぞれのタンパク発現および mRNA 発現について検討した。IL-6 のタンパク発現については、カフ傷害 7 日目と 14 日目において、野生型マウスと比較して IkBNS 欠損マウスの新生内膜および中膜に強い発現が認められた (図 5A)。また IL-6 の mRNA 発現については、カフ傷害後 3 日目から 14 日目まで、野生型マウスと比較して IkBNS 欠損マウスの方が有意に高値であった (Two-way ANOVA にて $P =$

0.044)。特にカフ傷害 3 日目では、IkBNS 欠損マウスの傷害血管における IL-6 mRNA 発現レベルは、野生型マウスのものと比較して 1.8 倍高く ($P = 0.002$)、IkBNS 欠損マウスではカフ傷害後に IL-6 のタンパクおよび mRNA 発現が亢進していることが示された (図 5B)。IkBNS のタンパク発現については、野生型マウスにおいて、カフ傷害後 7 日目では外膜に、14 日目では中膜に発現が認められた (図 5C)。IkBNS の mRNA 発現については、野生型マウスにおいてカフ傷害後 3 から 14 日目まで発現が認められた (図 5D)。一方、IkBNS 欠損マウスでは、IkBNS の発現は認められなかった。また TLR4 関連遺伝子である IL-18 の発現についても免疫組織染色で評価した。IkBNS 欠損マウスではカフ傷害 7 日目の内膜において IL-18 タンパク発現が認められ (図 6)、IkBNS 欠損マウスでは IL-6 以外にも IL-18 の発現が亢進している可能性が示唆された。以上より IkBNS はカフ傷害後の動脈で誘導され、IL-6 や IL-18 といった TLR4 関連遺伝子の発現を制御し、新生内膜肥厚の抑制に働いている可能性が示唆された。

カフ傷害後の血中 IL-6 濃度とコレステロール値

IkBNS 欠損が血中 IL-6 濃度とコレステロール値に与える影響を検討するために、カフ傷害 2 週間後の血液サンプルを解析した (表 2)。血中 IL-6 濃度は、野生型マウスと比較して IkBNS 欠損マウスにおいて有意に高かった [10.2 ± 2.8 pg/mL ($n = 6$) vs. 2.6 ± 0.6 pg/mL ($n = 6$); $P = 0.043$]。総コレステロールと HDL コレステロールについては、

IkBNS 欠損マウスの方が有意に低かったが (総コレステロール: 81 ± 4 mg/dL vs. 94 ± 1 mg/dL; $P = 0.031$, HDL コレステロール: 58 ± 4 vs. 76 ± 2 mg/dL; $P = 0.004$)、中性脂肪については両群間で差がなかった (22 ± 3 vs. 20 ± 1 mg/dL; $P = \text{NS}$)。

第 4 節 考察

本章では IkBNS 欠損がカフ傷害後の大腿動脈に及ぼす影響を詳細に検討した。IkBNS 欠損マウスはカフ傷害後に、NF- κ B 活性化および平滑筋細胞の増殖を引き起こし、新生内膜肥厚を促進していることが示された。IkBNS 欠損マウスでは、新生内膜における TLR4 発現の亢進が認められ、さらに LPS 刺激にて内膜肥厚が増加し、NF- κ B 活性も亢進した。また IkBNS 欠損マウスでは、傷害血管において TLR4 関連メディエーターである IL-6 および IL-18 の発現増加が認められ、TLR4/NF- κ B シグナル伝達系が新生内膜形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。これまでの報告によると、IkBNS 欠損マクロファージでは LPS 刺激後の IL-6 および IL-18 産生が亢進することが知られている⁶⁾。したがって IkBNS 欠損マウスでは、マクロファージ浸潤数に差がなくても、カフ刺激に対するマクロファージのサイトカイン産生能が亢進し、新生内膜肥厚を促進した可能性が考えられる。しかし今回の組織学的検討では、平滑筋細胞を主体とする新生内膜部位において、TLR4/NF- κ B シグナル活性化と IL-6 および IL-18 産生の亢進が認められ、IkBNS がマクロファージだけでなく血管平滑筋細胞においても重要な

役割を果たしている可能性が示唆された。

IL-6 は C 反応性タンパク (C-reactive protein: CRP) やフィブリノーゲンなどの急性期タンパクを誘導する炎症性メディエーターである¹²⁾。血中の IL-6 濃度は末梢動脈疾患患者の足関節・上腕血圧指数 (ankle/brachial index: ABI) と強い相関関係がある^{7,8)}。さらに IL-6 は冠動脈ステント留置後の再狭窄と関係しており¹³⁾、心血管死の強い予測因子である^{9, 10)}。本研究ではカフ傷害 2 週間後の血中 IL-6 濃度は野生型マウスよりも IκBNS 欠損マウスにおいて有意に高かった。これらのマウスにおける肝臓の IL-6 mRNA 発現レベルには特に差がなかったため [1.0 ± 0.1 (n = 6) vs. 1.0 ± 0.1 (n = 6); $P = \text{NS}$]、血中 IL-6 産生はカフ傷害部で起きている可能性が高いと考えられた。

血中コレステロールについては、カフ傷害後に IκBNS 欠損マウスにおいて HDL コレステロールの低下を認めた。過去の報告では、野生型マウスにおいてリコンビナント IL-6 投与が高脂肪食による動脈硬化を促進することが知られている¹⁴⁾。また高齢者では高い血中 IL-6 値と低 HDL コレステロール血症に相関があることが認められている¹⁵⁾。これらの報告をふまえると、IκBNS 欠損マウスでは血管傷害後の血中 IL-6 増加が、低 HDL コレステロール血症を誘発している可能性が示唆された。

本章では、カフ傷害モデルを用いて、IκBNS 欠損が NF-κB 活性化および TLR4 関連メディエーター (IL-6 および IL-18) の発現を増加させ、平滑筋細胞の増殖を引き起こし、新生内膜肥厚を促進することが示された。特に IL-6 は動脈閉塞性疾患における重要な

炎症性メディエーターである。そこで次の研究課題として、**IkBNS** 欠損マウスの血管傷害後の新生内膜肥厚における **IL-6** の直接的な役割を、**in vitro** および **in vivo** の試験で証明することが必要と考えた。

第3章 血管平滑筋における IL-6 の役割と抗 IL-6 受容体抗体による新生内膜肥厚の抑制効果

第1節 背景

第2章では、カフ傷害モデルを用いて、I κ BNS 欠損が NF- κ B 活性化および TLR4 関連メディエーター (IL-6 および IL-18) の発現を増加させ、平滑筋細胞の増殖を引き起こすことにより、新生内膜肥厚を促進することを示した。特に IL-6 は心血管疾患における重要な炎症性メディエーターであり、IL-6 が血管平滑筋細胞に与える影響を *in vitro* で直接的に証明することが必要と考えた。また、IL-6 シグナル阻害による新生内膜抑制効果が、実際に *in vivo* で認められるのかの確認も必要と考えた。そこで、IL-6 シグナル伝達を阻害するため、抗マウス IL-6 受容体抗体 (MR16-1) を使用した。MR16-1 の効果は、マウスの関節炎モデルで実証されており^{16, 17)}、抗ヒト IL-6 受容体抗体 (トシリズマブ) の有効性と安全性は、関節リウマチ患者における臨床試験で確認されている¹⁸⁾。本章の研究目的は、I κ BNS 欠損マウスにおいて、IL-6 が血管平滑筋細胞に与える影響を検証し、さらに MR16-1 を用いた IL-6 シグナル阻害による新生内膜肥厚の抑制効果を検討することである。

第2節 対象と方法

対象

第2章と同様に、8～12週齢のオスの **IkBNS** 欠損マウスと野生型マウスを使用した。

方法

血管平滑筋細胞培養

血管平滑筋細胞は、小林らの方法¹⁹⁾に基づき **IkBNS** 欠損マウスと野生型マウスの大動脈から分離・培養した。具体的に述べると、8～12週齢のマウスの胸部大動脈を周囲組織から剥離し、II型コラゲナーゼ溶液 (2 mg/mL、無血清 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 11885-084, GIBCO)に溶解)を用いて、37℃で 45 分間インキュベーションしたのち、20%胎児ウシ血清 (fetal bovine serum (FBS, 10082-147, GIBCO))を含む DMEM にて血管内腔を灌流して内皮細胞を除去した。その後、大動脈を約 3 x 3 mm 大のシート状にし、10 日間 10%FBS-DMEM にて培養した。大動脈切片より遊走・増殖してきた血管平滑筋細胞を実験に使用した。

細胞増殖能および遊走能解析

細胞増殖能については BrdU 取り込み試験にて評価した。血管平滑筋細胞を 4 ウェルのコラーゲンコートスライドガラス (354557, BD Biosciences)上で、10%FBS-DMEM を用いて培養した。細胞は試験 12 時間前より無血清培地にて飢餓状態にした。細胞増殖能は血小板由来増殖因子 BB [platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB, 20 ng/mL,

14-8003-62, Bay Bioscience)]またはリコンビナント IL-6 (20 ng/mL, 554582, BD Pharmingen)存在下で 24 時間培養後、BrdU In-Situ Detection Kit (55080, BD Pharmingen)を用いて行った。培養の最終 2 時間で 10 μ mol/mL の BrdU(550891, BD Pharmingen)を添加し、細胞に取り込ませた。

細胞遊走能についてはスクラッチ創傷治癒解析にて検討した。血管平滑筋細胞を 60 mm コラーゲンコート培養皿 (11-020-004, IWAKI)上で培養し、試験 12 時間前より 2 mmol/L のヒドロキシウレアを含有する無血清培地にて飢餓状態にした。ヒドロキシウレアは細胞増殖の影響を除外するために使用した。飽和状態になった血管平滑筋細胞に 200 μ L ピペットチップ先端にて直線を引き、傷害線を作成した。リコンビナント IL-6 (20 ng/mL)刺激前と 12 時間後の傷害面積を計測し、遊走能を評価した。

MR16-1

MR16-1 は大阪大学大学院、岸本忠三名誉教授の承諾を得て中外製薬研究所より譲渡された。コントロール IgG は Jackson ImmunoResearch (012-000-003)より購入した。細胞遊走能試験では、IL-6 刺激 1 時間前に血管平滑筋細胞に 100 μ g/mL の MR16-1 を添加した。カフ傷害モデルでは、週 3 回、10 mg/kg の MR16-1 を腹腔内投与した。

免疫組織染色

MR16-1 の効果を証明するために、IL-6 の下流に存在する転写因子である signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)のリン酸化を免疫組織染色で検討した。リン酸化 STAT3 (pSTAT3)の検出には抗 pSTAT3 (Tyr705)抗体 (#9145, Cell Signaling technology)を使用した。その他、血圧測定および組織学的評価法については第2章と同様に行った。

統計処理

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。2 群間の比較は Student's-t 検定で行った。 $P=0.05$ を有意水準とした。

第3節 結果

細胞増殖能および細胞遊走能試験

IL-6 が血管平滑筋細胞の増殖能に与える影響を検討するために BrdU 取り込み試験を行った。PDGF-BB (20 ng/mL)は、IkbNS の有無にかかわらず細胞増殖を誘導し、両群間に有意差を認めなかった [$10.0 \pm 3.6\%$ ($n = 4$) vs. $8.8 \pm 2.8\%$ ($n = 4$); $P = \text{NS}$]。一方、リコンビナント IL-6 (20 ng/mL)刺激では両群ともに BrdU 取り込みが認められず、IL-6 は血管平滑筋細胞の増殖に影響していないことが示された (図 7)。

次に細胞遊走能を評価するため、スクラッチ創傷治癒解析を行った。IL-6 刺激は野生型マウス由来の血管平滑筋細胞において細胞遊走を誘導し、さらに I κ BNS 欠損マウス由来の血管平滑筋細胞では、より強い遊走能亢進が認められた [傷害面積: $151 \pm 14 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (n = 4) vs. $227 \pm 23 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (n = 4); $P = 0.031$] (図 8A, B)。さらに MR16-1 (100 $\mu\text{g/mL}$)にて IL-6 の効果を阻害したところ、両群で血管平滑筋細胞の遊走が完全に抑制された (図 8C, D)。以上の結果から、IL-6 は血管平滑筋細胞の遊走を引き起こし、さらに I κ BNS 欠損が IL-6 に対する血管平滑筋細胞の遊走能を亢進していることが示された。

I κ BNS 欠損マウスにおけるカフ傷害後の MR16-1 による新生内膜肥厚の抑制

IL-6 が新生内膜形成に及ぼす影響を抑制するために、I κ BNS 欠損マウスのカフ傷害後に 10 $\mu\text{g/kg}$ の MR16-1 またはコントロール IgG を腹腔内投与した。カフ傷害 2 週間後において、体重や血圧は MR16-1 による影響は認められなかったが [体重: $26.1 \pm 0.9 \text{ g}$ (MR16-1, n = 7) vs. $24.7 \pm 0.3 \text{ g}$ (コントロール IgG, n = 7), 収縮期血圧: 95 ± 3 vs. $99 \pm 3 \text{ mmHg}$]、MR16-1 はコントロール IgG と比較して、カフ傷害後の新生内膜肥厚を有意に減少させた [$1,625 \pm 417 \mu\text{m}^2$ (n = 7) vs. $5,379 \pm 1,345 \mu\text{m}^2$ (n = 7); $P = 0.021$] (図 9A, B)。免疫組織染色およびリアルタイム PCR にて IL-6 発現レベルについて評価したが、MR16-1 による IL-6 の減少は認められなかった (図 9C, D)。そこで、MR16-1 による IL-6

シグナルの抑制効果を確認するため、その下流にある転写因子の活性を評価する必要があると考えた。STAT3 は IL-6 シグナル伝達における代表的な転写因子であり、STAT3 活性化は血管傷害後の新生内膜肥厚と関連があることが示されている²⁰⁾。本研究では、MR16-1 は、カフ傷害 7 日後の新生内膜における pSTAT3 陽性細胞の比率を有意に低下させており、MR16-1 が IL-6 シグナル伝達を抑制していることが示された [$31.9 \pm 4.6\%$ ($n = 6$) vs. $64.1 \pm 4.9\%$ ($n = 6$); $P = 0.001$](図 9E, F)。以上の結果より、I κ BNS 欠損マウスにおけるカフ傷害後の新生内膜肥厚は、IL-6 産生増加により引き起こされていることが示された。

第 4 節 考察

マウスの血管平滑筋細胞を用いた *in vitro* の試験では、IL-6 は細胞遊走能に関与していることが判明した。さらに I κ BNS 欠損マウスの血管平滑筋細胞の遊走能は、野生型マウスの血管平滑筋細胞よりも有意に亢進していた。また MR16-1 を用いると、平滑筋細胞の遊走が両群ともに抑制された。これらの結果より、I κ BNS 欠損マウスの血管平滑筋細胞は、IL-6 そのものに対して細胞遊走能が亢進していることが示された。血管傷害はインターロイキン¹²¹⁾や PDGF²²⁾などの炎症性メディエーターを増加させ、これらのメディエーターは血管平滑筋細胞において IL-6 産生を誘導することが知られている²³⁾。したがって、I κ BNS 欠損マウスにおけるカフ傷害後の新生内膜肥厚の機序として、傷害

血管における IL-6 発現の増加と血管平滑筋細胞の遊走能の亢進が直接的に関与していることが示された。

MR16-1 を用いた *in vivo* の試験では、I κ BNS 欠損マウスにおけるカフ傷害後の新生内膜肥厚を 70%減少させた。IL-6 そのものの発現は抑制されていなかったため、IL-6 シグナル伝達の阻害効果を確認するために pSTAT3 の免疫組織染色を行った。過去の報告では、ラットの血管傷害モデルにおいて、IL-6 が STAT3 のリン酸化を誘導し、新生内膜肥厚を促進することが示されている²⁰⁾。MR16-1 はカフ傷害後の内膜における pSTAT3 陽性細胞の比率を有意に減少させ、新生内膜肥厚も抑制した。これらの結果より、IL-6 が I κ BNS 欠損マウスにおける新生内膜形成において中心的な役割を果たしていることが証明された。

第4章 包括的考察

本研究で明らかとなったことは以下の4点である。(1) **IkBNS** 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、カフ傷害後に **TLR4** 発現、**NF- κ B** 活性化および平滑筋細胞増殖が亢進し新生内膜肥厚を促進する。(2) **IkBNS** 欠損マウスの傷害血管では、野生型マウスよりも 1.8 倍、**IL-6 mRNA** の発現が増加する。(3) **IkBNS** 欠損マウスから得られた血管平滑筋細胞は、野生型マウスの血管平滑筋細胞よりも **IL-6** 刺激に対する細胞遊走能が亢進しており、その効果は **MR16-1** (**IL-6** 受容体に対する抗体)で阻害される。(4) **IkBNS** 欠損マウスにおける新生内膜肥厚は、**MR16-1** で抑制される。以上の結果より、**IkBNS** は血管傷害後の **IL-6** 産生を制御することにより、血管の炎症と新生内膜肥厚を抑制することが示された。

IkBNS 欠損マウスの傷害血管における組織学的検討では、内膜における **NF- κ B** 活性化および平滑筋細胞増殖が認められた。この結果は、持続的な **NF- κ B** 活性化が血管平滑筋細胞の増殖を引き起こすという過去の報告に合致する²⁴⁾。**Breuss** らの報告ではウサギの腸骨動脈において **NF- κ B** の活性化を亢進させると、血管形成術後の再狭窄が増悪することを示唆している²⁵⁾。さらに他の研究グループからは、ウサギやヒトにおいて **NF- κ B** デコイ (おとり型核酸医薬)が冠動脈ステント留置術後の再狭窄を抑制したという報告がある^{26, 27)}。これらの報告から、**NF- κ B** は血管形成術後の新生内膜形成において重要な役割を担っていると考えられる。また **NF- κ B** の活性化は動脈硬化の進展に

も関与しており²⁸⁾、動脈硬化部位の内皮細胞、平滑筋細胞およびマクロファージにおいて活性化した **NF- κ B** の発現が確認されている¹⁾。内膜における平滑筋細胞の増殖は、動脈硬化進行の一つの機序として考えられており²⁹⁾、**IkBNS** 欠損マウスにおける新生内膜肥厚の原因を詳細に検討することは、動脈硬化の進展や血管形成術後の再狭窄における新しい機序の解明に役立つものと思われる。

活性化した **NF- κ B** は、**IL-6**、**TNF- α** および **MCP-1** などの炎症性サイトカインやケモカインを誘導する^{30, 31)}。**Wang** らは、ラットの血管傷害モデルにおいて、**IL-6/STAT3** シグナルが新生内膜肥厚を引き起こすことを証明している²⁰⁾。さらに鈴木らはブタ冠動脈の血管傷害モデルにおいて、シロリムス (免疫抑制剤) 溶出性ステントが新生内膜肥厚および **IL-6** 産生を抑制することを示している³²⁾。これらの報告より、**IL-6** は血管傷害後の新生内膜形成において重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、**IkBNS** 欠損マウスの傷害血管における **IL-6 mRNA** 発現が、野生型マウスよりも有意に増加していた。さらに *in vitro* の試験では、**IL-6** 刺激に対する **IkBNS** 欠損マウスの血管平滑筋細胞の遊走能は、野生型マウスの血管平滑筋細胞よりも有意に亢進していることが明らかとなった。このように、**IkBNS** 欠損マウスでは、傷害血管における **IL-6** 産生増加が、直接的に血管平滑筋細胞の遊走能を亢進させていることが示された。一方、24時間の **IL-6** 刺激では血管平滑筋細胞における **BrdU** 取り込みは認められなかった。これは、24時間以内 (短期間) の **IL-6** 刺激では血管平滑筋細胞の増殖を起こさずに、遊走

能を亢進させるという過去の報告²⁰⁾に合致する。しかし、本研究では、カフ傷害 14 日目の **IkBNS** 欠損マウスの新生内膜部位において、**PCNA** 陽性細胞の増加が認められ、平滑筋細胞の増殖が起きていることが確認された。池田らの報告によると、72 時間（長期間）の **IL-6** 刺激を行うと、血管平滑筋細胞は内因性の **PDGF** 産生を介して、間接的に細胞増殖を引き起こすことが証明されている³³⁾。したがって、**IkBNS** 欠損マウスでは、傷害血管における長期間にわたる **IL-6** 産生増加が、間接的に平滑筋細胞の増殖を引き起こし、新生内膜肥厚の一因となった可能性が考えられる。以上より、**IkBNS** 欠損マウスにおけるカフ傷害後の新生内膜形成には、**IL-6** の血管平滑筋細胞に対する直接的な遊走能亢進作用、さらに間接的な増殖能亢進作用、この両者が関与しているものと思われる。

カフ傷害後の **IkBNS** 欠損マウスにおける大腿動脈では **TLR4** 発現の亢進を認めた。さらに **LPS** 局所投与が **IkBNS** 欠損マウスの新生内膜肥厚と **NF- κ B** 活性化を有意に増加させた。**TLR4** シグナル伝達系が活性型 **NF- κ B** の核内移行を促進し³⁴⁾、**LPS** 刺激後の **IkBNS** 欠損マクロファージにおいて **IL-6** 以外にも **IL-18** の産生を増加させることが知られている⁶⁾。本研究でもカフ傷害 7 日目の免疫組織染色では、**IkBNS** 欠損マウスの新生内膜に **IL-18** の発現が認められた。過去の報告では、**NF- κ B** 活性化を通じて **IL-18** が血管傷害後の新生内膜肥厚を促進することが示されている³⁵⁾。これらの結果より **TLR4/NF- κ B** シグナル伝達系が **IkBNS** 欠損マウスの新生内膜肥厚において重要な役割

を担っていることが示された。

本研究では、カフ傷害で誘導される TLR4 関連遺伝子のうち、IL-6 のシグナル伝達を特異的に阻害するために MR16-1 を使用した。MR16-1 は、I κ BNS 欠損マウスにおけるカフ傷害後の新生内膜肥厚を 70%減少させた。過去の報告でも、ラットの血管傷害モデルにおいて、IL-6 が STAT3 のリン酸化を誘導し、新生内膜肥厚を促進することが示されており²⁰⁾、IL-6 は血管傷害後の新生内膜形成において重要な役割を果たしていると考えられる。抗 IL-6 受容体抗体の効果は、マウスの関節炎モデル^{16, 17)}や、関節リウマチ患者の臨床試験¹⁸⁾において有効性が確認されているが、血管傷害における有効性を示したのは本研究が最初である。本研究の結果より、IL-6 の産生亢進が I κ BNS 欠損マウスにおける新生内膜形成の主因であり、IL-6 の抑制が血管傷害後の再狭窄予防に有効な治療法である可能性が見出された。

NF- κ B とその制御因子である I κ B 分子は免疫反応の制御に重要な役割を果たしている。今回は、I κ BNS 欠損マウスにおけるカフ傷害後の新生内膜形成における IL-6 の役割を詳細に検討した。I κ BNS はカフ傷害モデルにおいて、TLR4 発現、NF- κ B の活性化および IL-6 産生を抑制することにより、血管傷害後の新生内膜肥厚を抑制していた。以上の結果より、I κ BNS は内因性の NF- κ B 抑制因子として働き、血管形成術などの動脈の炎症によって引き起こされる新生内膜肥厚の進行を抑制している可能性が示された。

謝辞

本論文作成の全般にわたり御指導を賜りました防衛医科大学校 循環器内科学 足立 健 教授、磯田 菊生 講師、大鈴 文孝 名誉教授、心臓血管外科学 前原 正明 教授、分子生体制御学 四ノ宮 成祥 教授、さらに本研究に関わるマウスおよび抗体の提供を快諾していただきました大阪大学 竹田 潔 教授および大阪大学大学院 岸本 忠三 名誉教授に謹んで御礼申し上げます。

統計解析について御指導いただきました防衛医学研究センター情報システム部門 芦田 廣 教授、脇坂 仁 講師、また病理標本作製に御尽力を賜りました防衛医科大学校 共同利用研究施設 原澤 たつ代さん、および研究活動を支えて下さった防衛医科大学校 内科学講座 浜 御幸さんに深謝申し上げます。

引用文献

1. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, *et al.* Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. J Clin Invest. 1996;97:1715-22.
2. Monaco C, Andreaskos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, *et al.* Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:5634-9.
3. Landry DB, Couper LL, Bryant SR, Lindner V. Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. Am J Pathol. 1997;151:1085-95.
4. Kearney M, Pieczek A, Haley L, Losordo DW, Andres V, Schainfeld R, *et al.* Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. Circulation. 1997;95:1998-2002.
5. Yamamoto M, Takeda K. Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses. J Infect Chemother. 2008;14:265-9.
6. Kuwata H, Matsumoto M, Atarashi K, Morishita H, Hirotani T, Koga R, *et al.*

- IkappaBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity*. 2006;24:41-51.
7. Murabito JM, Keyes MJ, Guo CY, Keaney JF, Jr., Vasan RS, D'Agostino RB, Sr., *et al.* Cross-sectional relations of multiple inflammatory biomarkers to peripheral arterial disease: The Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis*. 2009;203:509-14.
 8. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation*. 2005;112:976-83.
 9. Luc G, Bard JM, Juhan-Vague I, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, *et al.* C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease: the PRIME Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1255-61.
 10. Empana JP, Jouven X, Canoui-Poitrine F, Luc G, Tafflet M, Haas B, *et al.* C-reactive protein, interleukin 6, fibrinogen and risk of sudden death in European middle-aged men: the PRIME study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:2047-52.
 11. Takeda K. [Toll-like receptor]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*.

2005;28:309-17.

12. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*. 2008;54:24-38.
13. Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, Mizuno O, Fukazawa H, Kurosaki K, *et al*. Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis. *Heart*. 2000;84:83-7.
14. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2364-7.
15. Zuliani G, Volpato S, Ble A, Bandinelli S, Corsi AM, Lauretani F, *et al*. High interleukin-6 plasma levels are associated with low HDL-C levels in community-dwelling older adults: the InChianti study. *Atherosclerosis*. 2007;192:384-90.
16. Takagi N, Mihara M, Moriya Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, *et al*. Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41:2117-21.
17. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, Inoue A, Mihara M, Ohsugi Y, *et al*. Crucial role of the interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Rheum*.

2008;58:754-63.

18. Jones G, Ding C. Tocilizumab: a review of its safety and efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2010;3:81-9.
19. Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12:138-42.
20. Wang D, Liu Z, Li Q, Karpurapu M, Kundumani-Sridharan V, Cao H, *et al*. An essential role for gp130 in neointima formation following arterial injury. *Circ Res*. 2007;100:807-16.
21. Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, *et al*. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res*. 2002;91:77-82.
22. Bowen-Pope DF, Malpass TW, Foster DM, Ross R. Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance. *Blood*. 1984;64:458-69.
23. Loppnow H, Libby P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J Clin Invest*. 1990;85:731-8.
24. Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE. Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth

muscle cells. J Clin Invest. 1995;96:2521-7.

25. Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H, Kadl A, Baumgartl G, Steurer S, *et al.*
Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. Circulation. 2002;105:633-8.
26. Ohtani K, Egashira K, Nakano K, Zhao G, Funakoshi K, Ihara Y, *et al.*
Stent-based local delivery of nuclear factor-kappaB decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. Circulation. 2006;114:2773-9.
27. Egashira K, Suzuki J, Ito H, Aoki M, Isobe M, Morishita R. Long-term follow up of initial clinical cases with NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide transfection at the site of coronary stenting. J Gene Med. 2008;10:805-9.
28. Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. J Am Coll Cardiol. 2001;38:307-14.
29. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999;340:115-26.
30. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest. 2001;107:7-11.
31. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? J Clin Invest. 2001;107:255-64.

32. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, *et al.* Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation*. 2001;104:1188-93.
33. Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y, *et al.* Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol*. 1991;260:H1713-7.
34. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
35. Maffia P, Grassia G, Di Meglio P, Carnuccio R, Berrino L, Garside P, *et al.* Neutralization of interleukin-18 inhibits neointimal formation in a rat model of vascular injury. *Circulation*. 2006;114:430-7.

図表

表 1 リアルタイム PCR プライマー配列

プライマー配列	
TLR4	5'-ACCTGGCTGGTTTACACGTC-3' and 5'-CTGCCAGAGACATTGCAGAA-3'
IL-6	5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3' and 5'-CACGATTTCCTCCAGAGAACATGTG-3'
GAPDH	5'-AAGCCCATCACCATCTTCCA-3' and 5'-GGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'
IkBNS	Mm00549082_m1*, Applied Biosystems

表 2 カフ傷害 2 週間後の血中 IL-6 濃度とコレステロール値

	IkBNS^{+/+} (n = 6)	IkBNS^{-/-} (n = 6)	P
IL-6 (pg/mL)	2.6 ± 0.6	10.2 ± 2.8	0.043*
総コレステロール (mg/dL)	94 ± 1	81 ± 4	0.031*
HDL コレステロール (mg/dL)	76 ± 2	58 ± 4	0.004**
中性脂肪 (mg/dL)	20 ± 1	22 ± 3	0.615

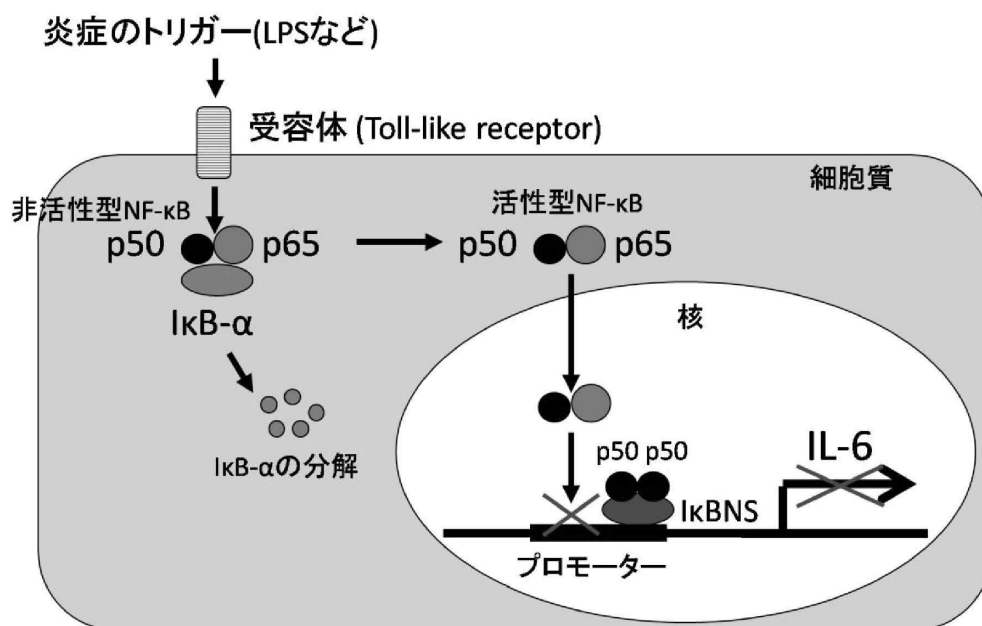


図1 NF-κB の制御機構

NF-κB (p50/p65 ヘテロダイマー)は、IκB-α と結合し細胞質内で非活性型として存在する。炎症トリガーが TLR に結合すると、IκB-α の分解が誘導され活性型 NF-κB に変化する。活性型 NF-κB は、核内に移行し各種炎症性メディエーターのプロモーター領域に結合し、その転写を開始する。IκBNS は、p50/p50 ホモダイマーと複合体を形成することにより、活性型 NF-κB の IL-6 プロモーターへの結合を阻害し、IL-6 産生を特異的に抑制している。

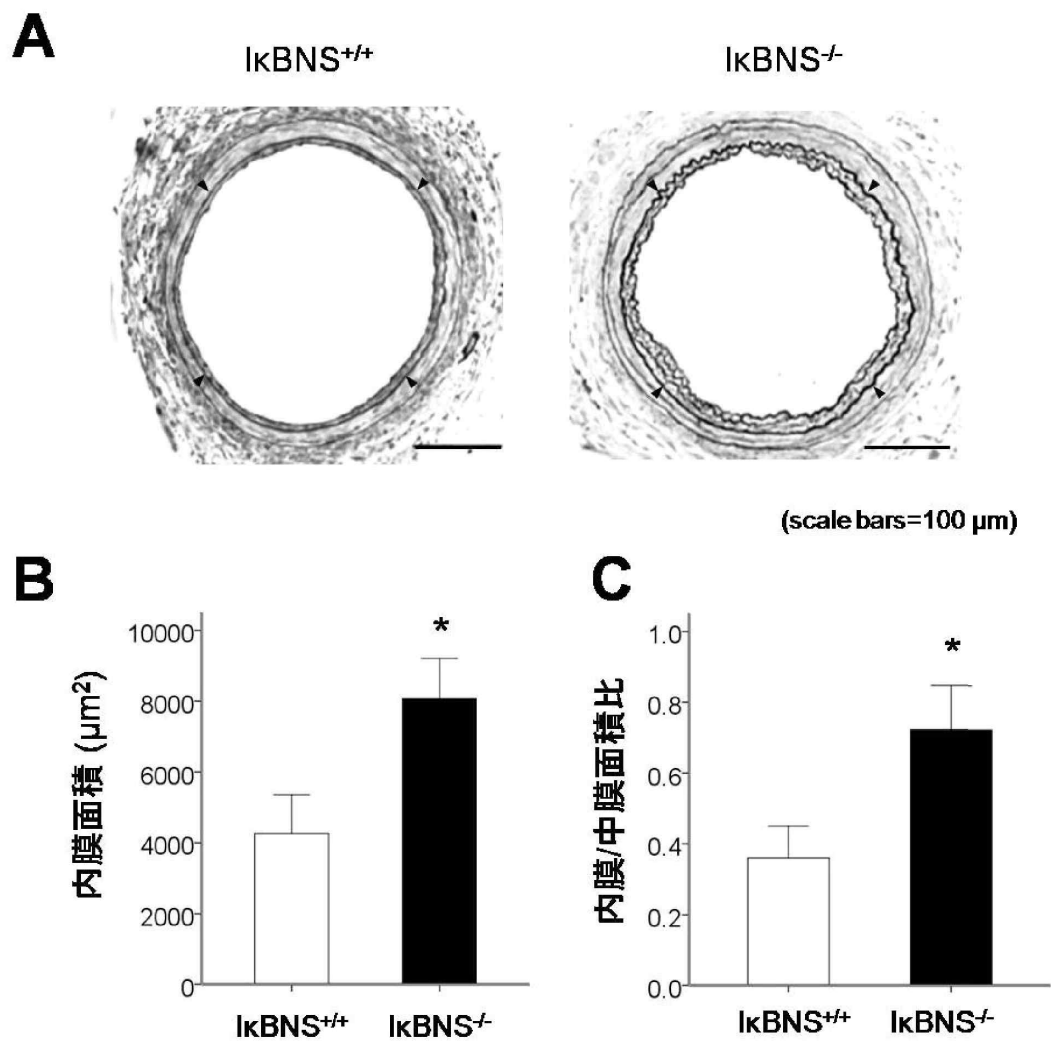


図 2 カフ傷害後の新生内膜肥厚

(A) カフ傷害 2 週間後に、野生型マウスおよび IkBNS 欠損マウスから採取された大腿動脈のエラスチカワンギーソン染色。矢頭は内弾性板の位置を示す。内弾性板の内側が新生内膜である。(B, C) カフ傷害 2 週間後の面積計測結果 (* $P < 0.05$, $n = 10$)。

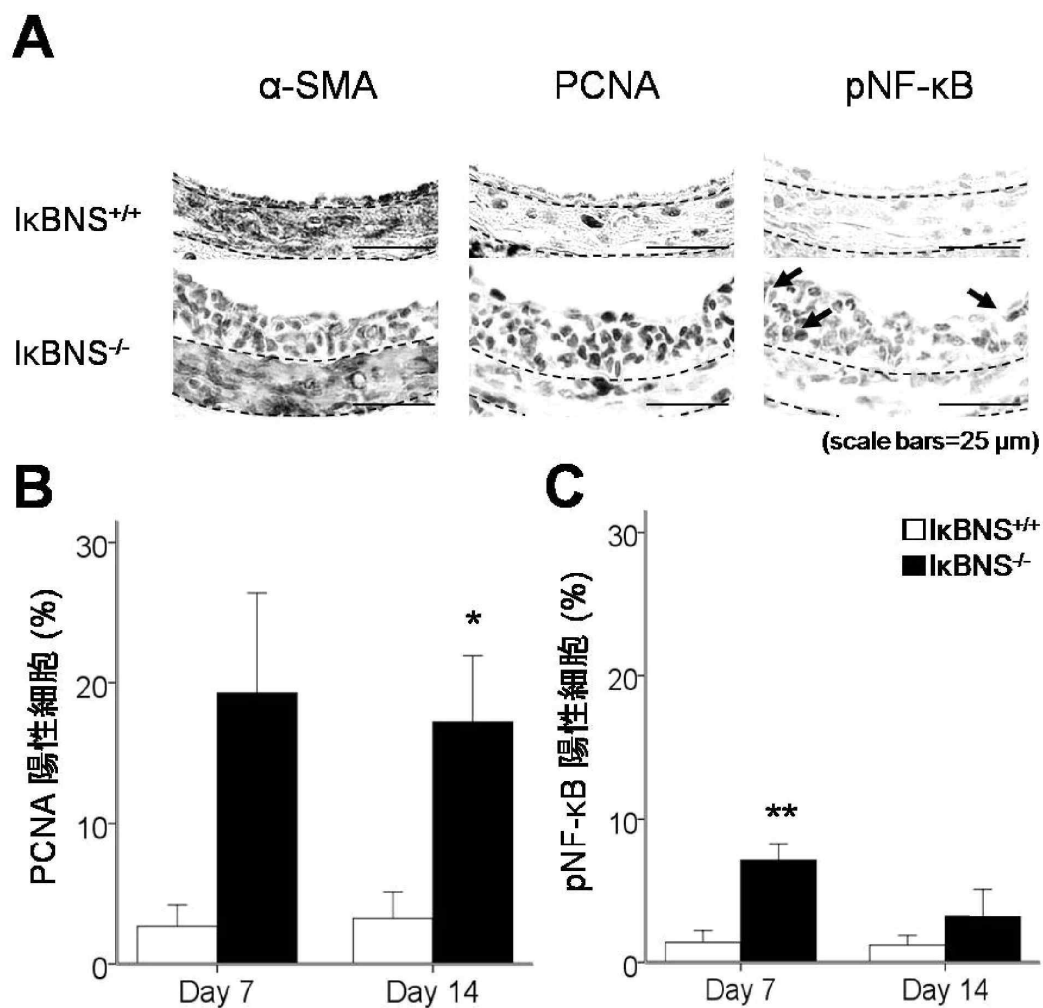


図 3 カフ傷害後の大腿動脈における平滑筋細胞増殖と NF- κ B 活性化

(A) カフ傷害 7 日目の大腿動脈連続切片における α -SMA、PCNA および pNF- κ B の免疫組織染色。矢印は IkBNS 欠損マウスの pNF- κ B 陽性細胞を示す。破線は内弾性板および外弾性板を示す。(B, C) カフ傷害 7 日目と 14 日目の内膜における PCNA 陽性細胞と pNF- κ B 陽性細胞の比率 (* P < 0.05, ** P < 0.01, n = 3-7)。

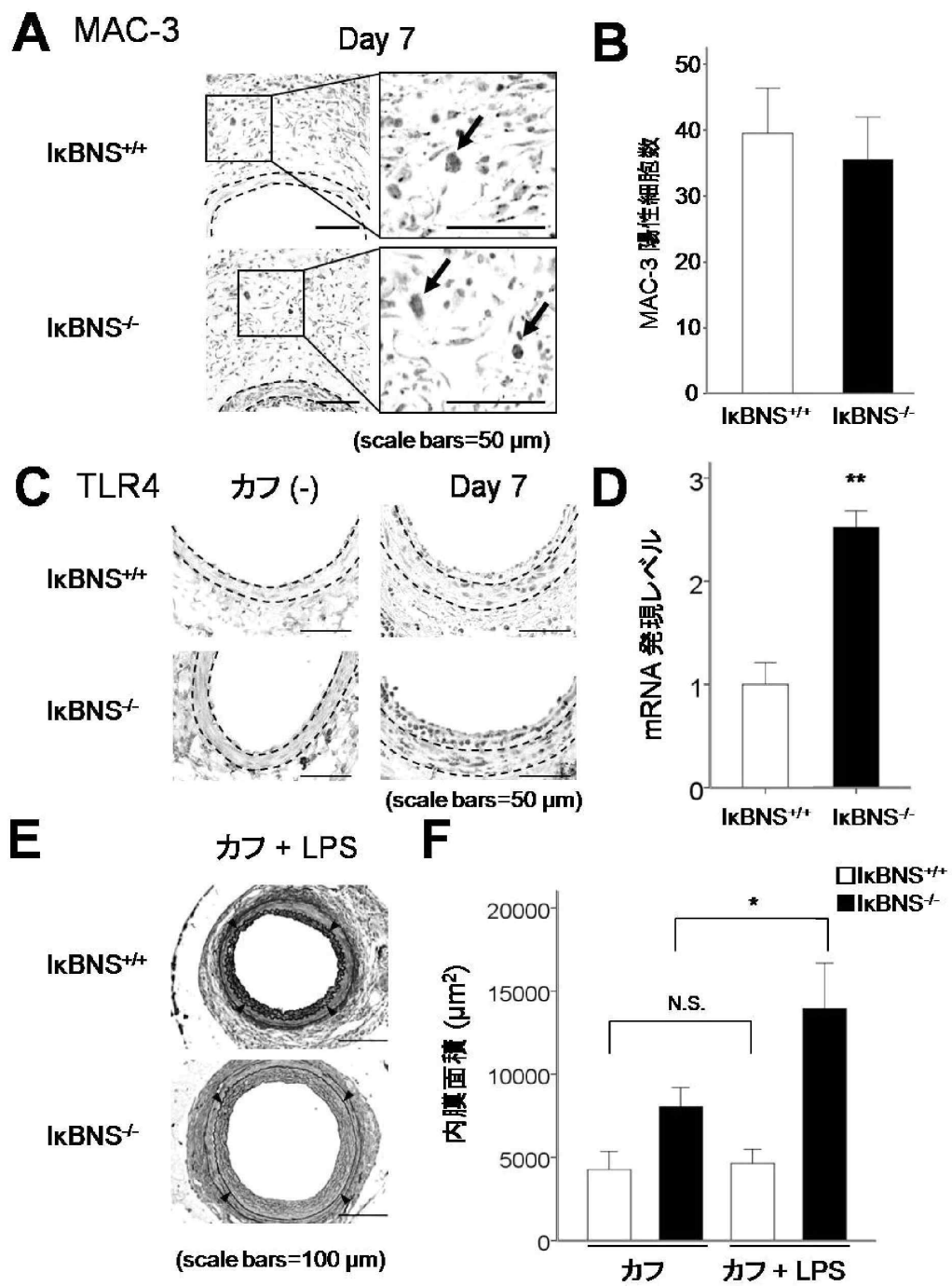


図 4 カフ傷害後のマクロファージ浸潤および TLR4 発現

(A) カフ傷害 7 日目の MAC-3 免疫組織染色。矢印は MAC-3 陽性細胞を示す。(B) カフ傷害 7 日目の MAC-3 陽性細胞数の計測結果 ($n = 4$)。 (C) カフ傷害 7 日目の TLR4 免疫組織染色。破線は内弾性板および外弾性板を示す。(D) リアルタイム PCR によるカフ傷害 3 日後の TLR4 mRNA 発現のリアルタイム PCR 解析結果 ($**P < 0.01, n = 5$)。 (E) LPS 局所刺激後の大腿動脈におけるエラスチカワンギーソン染色。矢頭は内弾性板を示す。(F) LPS 局所刺激後の内膜面積の測定結果 ($*P < 0.05, n = 7$)。カフ傷害単独群の結果は図 2B のデータを使用。

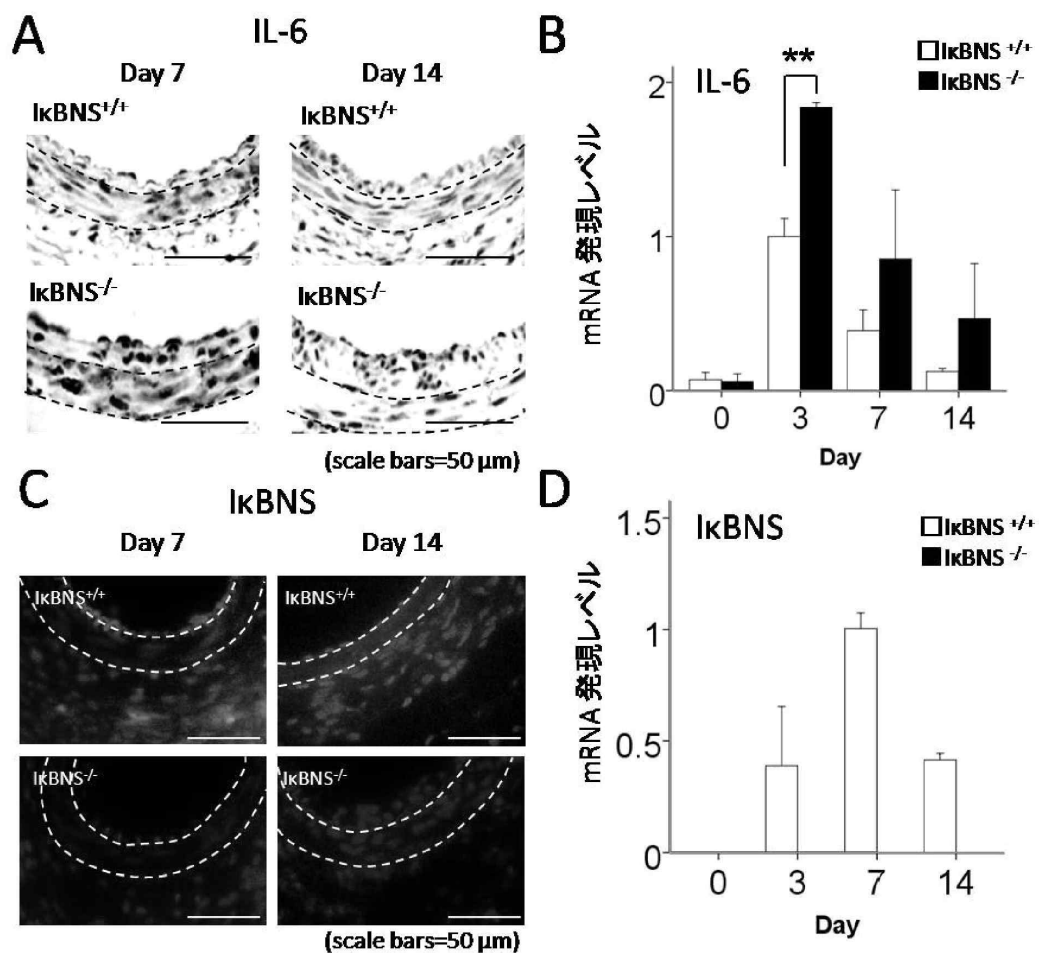


図 5 カフ傷害後の IL-6 および IκBNS 発現の経時的変化

(A) カフ傷害 7 日目と 14 日目における IL-6 の免疫組織染色。破線は内弾性板および外弾性板を示す。(B)カフ傷害後 0、3、7 および 14 日目における IL-6 mRNA 発現のリアルタイム PCR 解析結果 (** $P < 0.01$, $n = 3-5$)。 (C) カフ傷害後 7 日目と 14 日目における IκBNS の蛍光免疫染色。破線は内弾性板および外弾性板を示す。(D) カフ傷害後 0、3、7 および 14 日目における IκBNS mRNA 発現のリアルタイム PCR 解析結果 ($n = 3-5$)。

IL-18

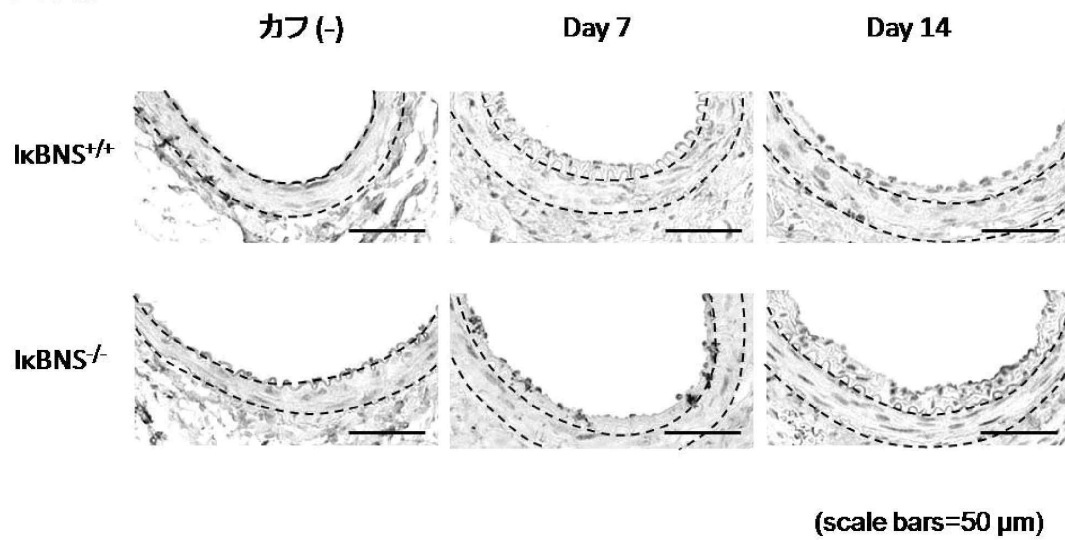


図 6 カフ傷害後の IL-18 発現

カフ傷害前、7 日および 14 日後における IL-18 の免疫組織染色。破線は内弾性板および外弾性板を示す。

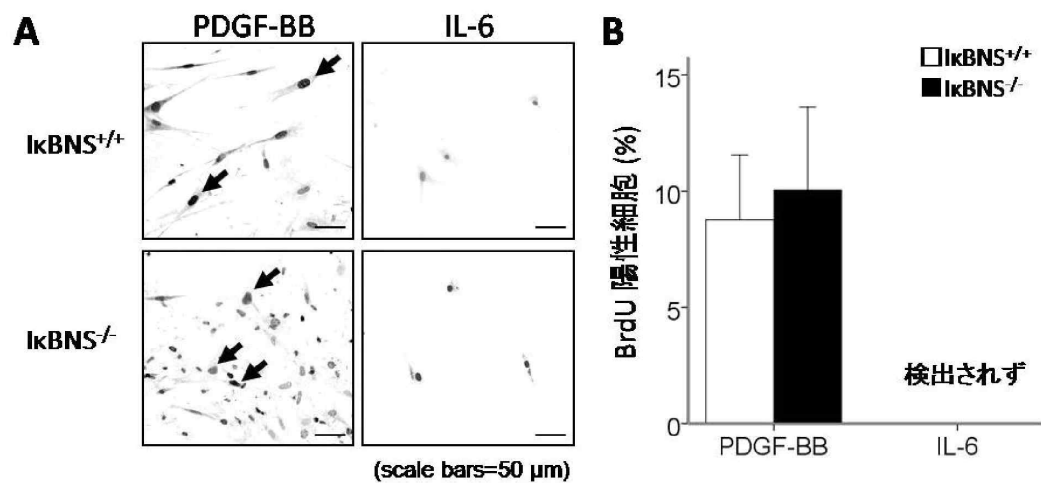


図 7 血管平滑筋細胞における細胞増殖能の評価

(A) PDGF-BB (20 ng/mL)または IL-6 (20 ng/mL)刺激 24 時間後の BrdU 取り込み。矢印は BrdU 陽性細胞を示す。(B) BrdU 陽性細胞比率の計測結果 (n = 4)。IL-6 刺激では BrdU 陽性細胞は検出されなかった。

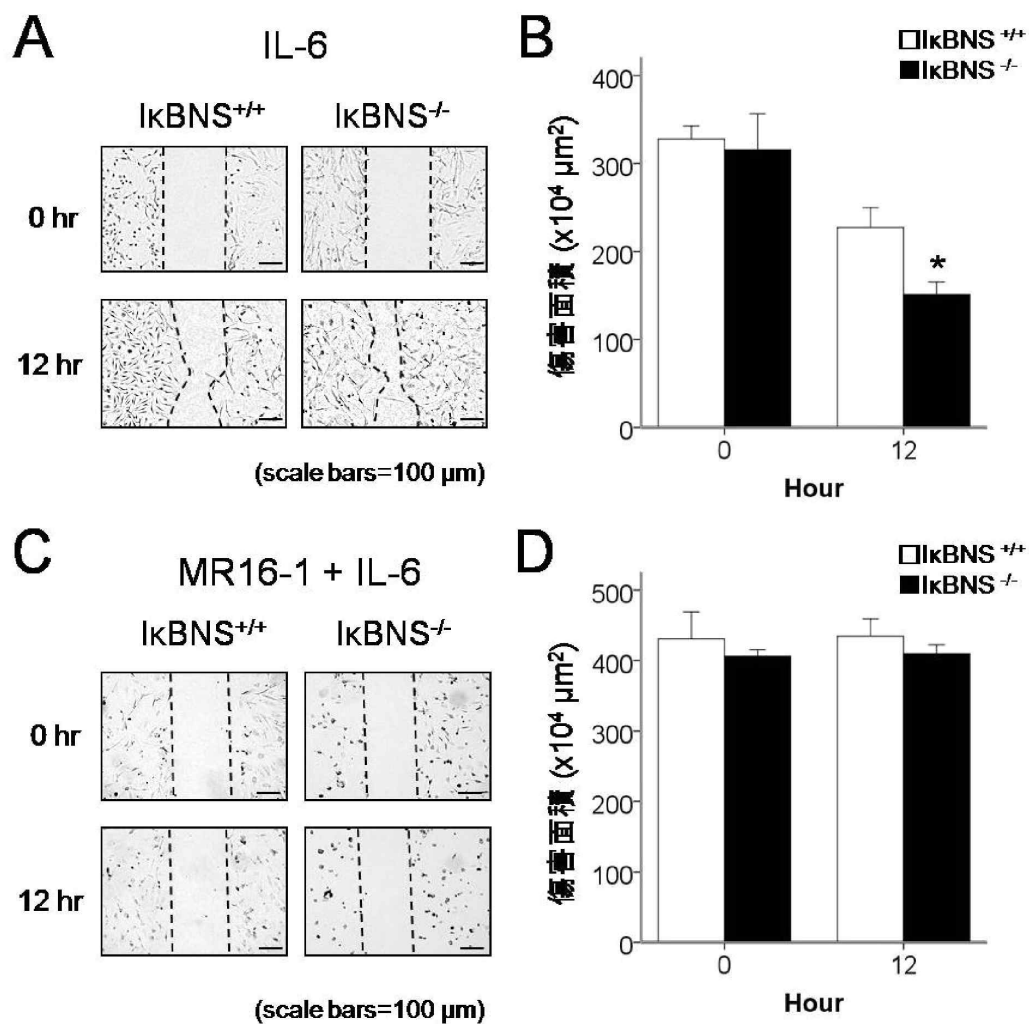


図 8 血管平滑筋細胞における IL-6 刺激後の細胞遊走能の評価と MR16-1 による細胞遊走の抑制

(A) IL-6 (20 ng/mL) 刺激 0 および 12 時間後のスクラッチ創傷治癒解析。(B) IL-6 刺激 0 および 12 時間後の傷害面積の変化 (* $P < 0.05$, $n = 4$)。破線は傷害線の辺縁を示す。(C) 1 時間前より MR16-1 (100 μg/mL) にて前処置後、IL-6 刺激 (20 ng/mL) を行った 0 および 12 時間後のスクラッチ創傷治癒解析。破線は傷害線の辺縁を示す。(D) MR16-1 前処置後、IL-6 刺激 0 および 12 時間後の傷害面積の変化 ($n = 4$)。

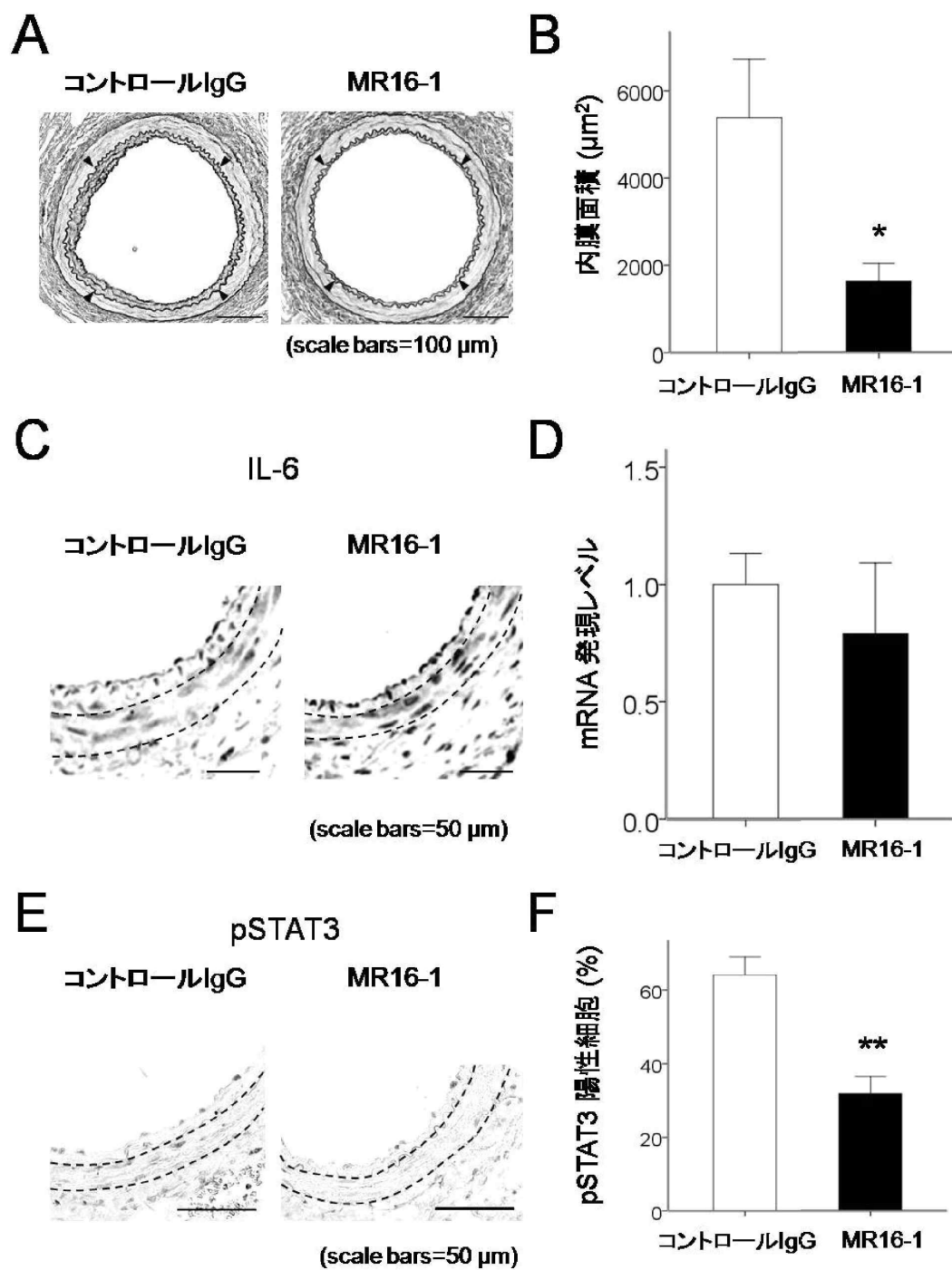


図 9 IkBNS 欠損マウスにおけるカフ傷害後の MR16-1 による新生内膜肥厚の抑制効果

(A) IkbNS 欠損マウスにおけるカフ傷害後、10 mg/kg の MR16-1 またはコントロール IgG を 2 週間、腹腔内投与した大腿動脈のエラスチカワンギーソン染色。矢頭は内弾性板を示す。(B) 内膜面積の計測結果 ($*P < 0.05$, $n = 7$)。 (C) 治療後の傷害血管における IL-6 の免疫組織染色。破線は内弾性板および外弾性板を示す。(D) 治療 3 日目の IL-6 mRNA 発現のリアルタイム PCR 解析結果 ($n = 5-6$)。 (E) 治療後 7 日目の傷害血管における pSTAT3 の免疫組織染色。破線は内弾性版および外弾性板を示す。(F) pSTAT3 陽性細胞比率の計測結果 ($**P < 0.01$, $n = 6$)。