

動脈硬化における炎症の役割—TRAF6の抑制による実験的検討

宮原 拓也^{1,2} 小山 博之^{1,2} 宮田 哲郎² 名川 弘一² 重松 宏³

要 旨：動脈硬化の進展には炎症反応が重要な役割の一つを担うと考えられている。炎症性シグナル伝達系の一つであるCD40シグナル伝達系の仲介蛋白であるTRAF6に着目し、そのdominant negativeをウサギ頸動脈へ導入することで内膜肥厚およびステント内再狭窄が抑制された。その過程には、炎症細胞浸潤、血管平滑筋細胞の増殖、さらにプロテアーゼの活性化などさまざまなメカニズムの関与が示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 627-635)

Key words: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, inflammation, intimal hyperplasia

序 言

近年、動脈硬化性疾患と炎症反応との関係が注目されており¹⁾、本研究ではその炎症性シグナル伝達系の中でCD40シグナル伝達系に着目した。この伝達系は、TNF(tumor necrosis factor)receptor-associated factor (TRAF)という細胞内の仲介蛋白を介してnuclear factor κ B(NF κ B)などの転写因子を活性化するが、この活性化は内膜肥厚の形成や動脈硬化の進展過程に関与すると報告されている²⁾。その仲介蛋白の中でTRAF6は、NF κ Bとextracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2)の共通のtransducerであるだけでなく³⁾、TNF receptor superfamilyとtoll-like receptor/interleukin-1 receptor (TLR/IL-1R) superfamilyの両シグナル伝達系に関与する唯一のTRAF蛋白であり^{4,5)}、その中でTLR4もまた内膜肥厚に関与すると報告されている⁶⁾。これらの知見から、TRAF6を介するシグナル伝達系は動脈硬化性疾患の治療のあらたなターゲットになりうると考えた。本研究の目的は、ウサギの頸動脈を用いたバルーン擦過モデルと肥厚内膜へのステント留置による再障害モデルを作製し、TRAF6を介するシグナル伝達系を抑制することで、内膜肥厚やステント内再狭窄が*in vivo*で抑制されるか否かを検討することである。

¹東京大学大学院医学系研究科血管再生医療講座

²東京大学大学院医学系研究科血管外科

³東京医科大学外科学第2講座

TRAF6 dominant negative導入による 内膜肥厚抑制の検討

1)方法

(1)プラスミド

TRAF6は、本来RING fingerやzinc fingersを含むNH₂末端を介してNF κ Bなどの転写因子を活性化しているが、本研究ではこのNH₂末端を欠損したdeletion mutantをdominant negative(DN)⁷⁾として用いた。TRAF6 DN plasmid(pME-FLAG-T6 Δ RZ5)とその対照群としてTRAF6 DN配列を含まないcontrol plasmid(pME-FLAG)とを用い、両群間の比較・検討を行った。

(2)ウサギ頸動脈擦過モデルとエレクトロポレーションによるプラスミド導入

普通飼料で飼育した日本白色ウサギ(雄、2.5~3.0kg)を用い、麻酔はキシラジンとケタミンの筋肉注射で行い、頸部正中切開にて左頸動脈を露出した。ウサギ頸動脈のバルーン障害は2Fr Fogarty balloon catheterで総頸動脈を擦過することにより行った。血管壁への遺伝子導入はエレクトロポレーション法⁸⁾で行い、electric pulse generator(Elctro Square Porator ECM830, BTX®, Genetronics社製)を用いた。総頸動脈の中極側と内頸および外頸動脈をおのおのクランプし、血管内腔の血液成分をPBS(phosphate-buffered saline)で洗い出したのち、400 μ g/mlの濃度のplasmid DNAを0.5ml程度血管内腔に

2006年1月12日受付 2006年2月21日受理

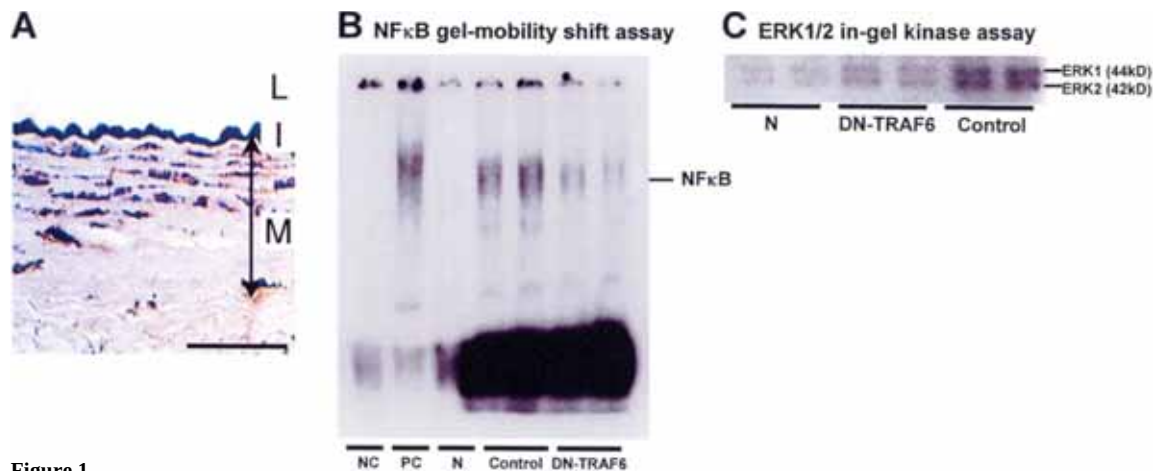


Figure 1

A: Photomicrographs of DN-TRAF6 plasmid-treated vessel stained with anti-FLAG tag antibody.

L: lumen, I: intima, M (bar with arrows): media, Bar = 100 μ m

B: NF κ B activity determined by gel-mobility shift assay. Nuclear extract was incubated with [32 P]ATP end-labeled consensus oligonucleotides.

NC: negative control (nuclease free water without HeLa Nuclear Extract), PC: positive control (nuclease free water with HeLa Nuclear Extract), N: normal carotid artery

C: ERK1/2 activity determined by in-gel kinase assay. Cell lysate from carotid artery was separated on SDS-PAGE gel containing myelin basic protein (MBP) and incubated with [32 P]ATP.

N: normal carotid artery

充填し、20分間incubate後に、電圧30V、負荷時間 20 ms、パルス10回の条件下で電気パルスを加えてプラスミドを導入した。この導入法による発現の推移は、LacZ導入後のルシフェラーゼ活性による評価では導入2日後に発現のピークがあり2週間程度でその活性は消退するとされている⁸⁾。またわれわれが行ったpreliminaryの検討では電圧30V、プラスミド濃度400 μ g/mlで最も良好でかつ再現性のある遺伝子導入効率が得られている。(3)TRAF6 DN導入後のNF κ BおよびERK1/2活性

TRAF6 DN導入の2日後に、プラスミドに組み込まれたFLAG tagに対するモノクローナル抗体で免疫染色を行い、プラスミドの導入を確認した。プラスミド導入 / バルーン障害 6 時間後のNF κ B活性をgel-mobility shift assay法で評価し、また障害 2 時間後のERK1/2活性をin-gel kinase assay法で評価した。

(4)内膜肥厚、血管平滑筋細胞の増殖、マクロファージ浸潤、平滑筋細胞のアポトーシスの検討

内膜肥厚の検討は、プラスミド導入 / バルーン障害 7 日後の内膜肥厚を新生内膜 / 中膜面積比(NI/M ratio)で評価した。そのメカニズムの解明として、血管平滑筋細胞の増殖、炎症細胞の浸潤、さらに平滑筋細胞のアポトーシスなどに関して検討を行った。平滑筋細胞

の増殖はBrdUの取り込み率(BrdU labeling index)で評価したが、中膜細胞増殖は障害 2 日後に評価し、また内膜細胞増殖は障害 7 日後にプラスミドを導入し、その 2 日後に評価した。バルーン障害 2 日後のマクロファージの浸潤はRAM11による免疫染色で評価した。また、障害 2 日後の中膜細胞のアポトーシスの評価は、TUNEL染色およびラジオアイソトープを用いたDNA fragmentation⁹⁾の観察の 2 つの手法で行った。上記両群間の比較・検討には各群 6 匹ずつのウサギを用いて解析した。

2) 結果

(1)血管壁へのプラスミド導入とNF κ BおよびERK1/2活性
エレクトロポレーション法によりTRAF6 DNを含むプラスミドが血管壁へ導入されることが確認された(**Fig. 1A**)。TRAF6 DN導入後のNF κ B活性およびERK1/2活性はともに抑制されており(**Fig. 1B, 1C**)、導入されたTRAF6 DNが*in vivo*でこのシグナル伝達系に作用していることが確認された。

(2)内膜肥厚の抑制

TRAF6 DN群ではコントロール群に比べてバルーン障害 7 日後の内膜 / 中膜面積比が有意に低く、TRAF6

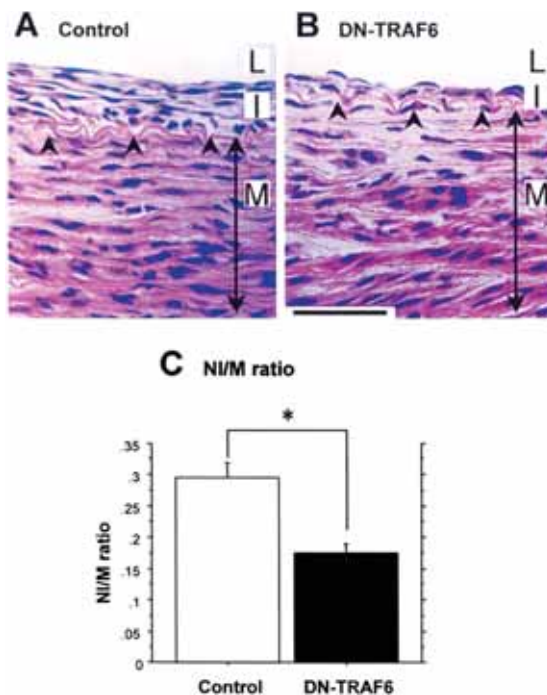


Figure 2 Effect of DN-TRAF6 transfer on neointimal formation after balloon injury. Photomicrographs of control plasmid-treated vessel (A) and DN-TRAF6 plasmid-treated vessel (B) at 7 days after balloon injury. Sections were stained with hematoxylin/eosin. L: lumen, I: intima, M (bar with arrows): media, arrowheads: internal elastic lamina, Bar = 100 μ m. C: neointimal area/medial area ratio (NI/M) of DN-TRAF6 plasmid-treated vessel was significantly reduced. *: $p < 0.01$, values are shown as mean $\pm$ SEM

DNの導入により内膜肥厚の形成が有意に抑制されることが確認された(**Fig. 2**)。

(3)血管平滑筋細胞の増殖, マクロファージ浸潤, 平滑筋細胞のアポトーシス

BrdUの取り込み率による細胞増殖の評価では, TRAF6 DNの導入により内膜および中膜平滑筋細胞の増殖がともに抑制された(**Fig. 3A, 3B**)。RAM11の免疫染色では, TRAF6 DNにより障害2日後の内膜へのマクロファージの浸潤も抑制された(**Fig. 3C**)。一方, TRAF6 DN群ではコントロール群に比べてTUNEL陽性細胞率は増加し, DNA fragmentationの観察ではスメア様のパターンをとり, TRAF6 DNの導入により血管平滑筋細胞のアポトーシスが促進されることが確認された(**Fig. 4**)。

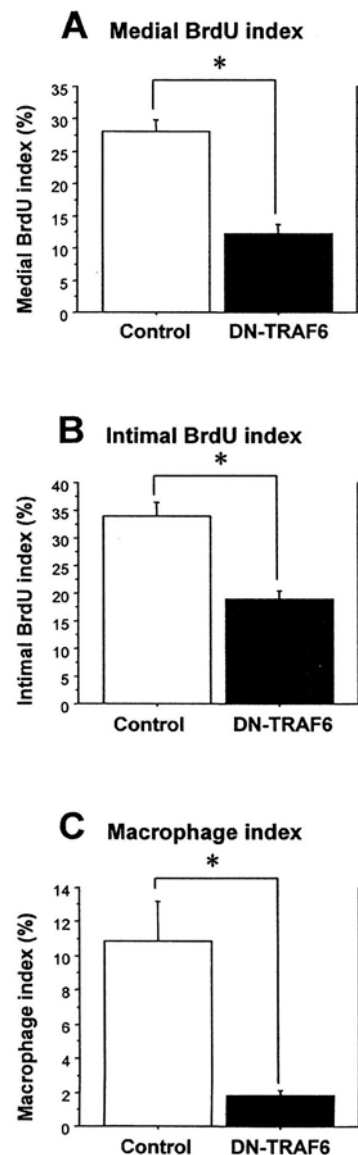


Figure 3 Effect of DN-TRAF6 transfer on medial cell replication (A), intimal cell replication (B), and macrophage infiltration (C). Medial BrdU index (A) and intimal BrdU index (B). The proportion of BrdU positive nuclei to total nuclei. C: Macrophage index (the proportion of RAM11 positive cell number to total medial cell number). Values are shown as mean $\pm$ SEM, *: $p < 0.01$

これらの結果¹⁰⁾を踏まえ, 内膜肥厚に続いてステント内再狭窄に対するTRAF6 DNの影響に関して検討を行った。

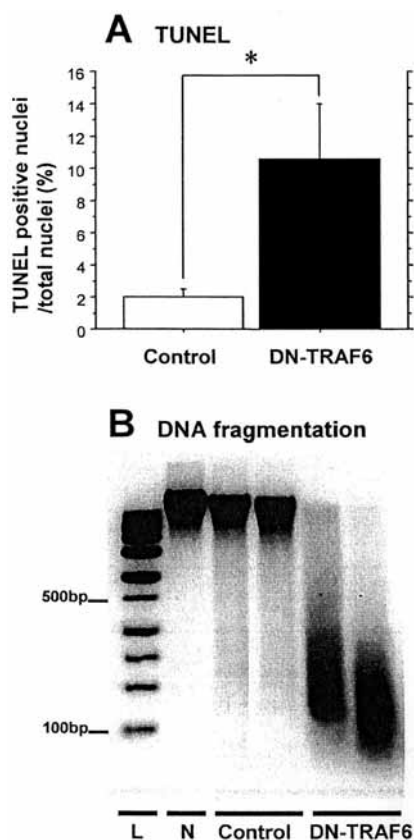


Figure 4
Effect of DN-TRAF6 gene transfer on apoptosis at 2 days after balloon injury.
A: apoptosis was quantified by TUNEL staining as the proportion of TUNEL-positive nuclei to total nuclei. Values are shown as mean $\pm$ SEM, *: $p < 0.01$
B: autoradiographs of DNA gel electrophoretogram. DNA was end-labeled with [32 P]dATP.
L: 100 bp DNA ladder, N: normal carotid artery

TRAF6 dominant negative導入による ステント内再狭窄抑制の検討

1) 方法

(1) ウサギ頸動脈ステント留置モデル

ステント内再狭窄の検討には臨床における動脈硬化性病変へのステント留置に近似したモデルとして、バルーン障害28日後の肥厚内膜へPalma stent (3mm) をPTCA balloon catheterを用いて総頸動脈へ留置した。

(2) ステント内内膜肥厚, 血管平滑筋細胞の増殖, 炎症細胞浸潤, プロテアーゼ活性の検討

ステント留置後の経時変化を観察するために、プ

ラスミド導入 / ステント留置後 3, 7, 14日目に各群各時点6匹ずつのウサギから標本を採取し, ステント内内膜の内膜面積と細胞数を測定した。そのメカニズムの解明として, 血管平滑筋細胞の増殖, 炎症細胞の浸潤, さらにプロテアーゼの活性などに関して検討を行った。前半の実験と同様に, 細胞増殖はBrdUの取り込み率で評価し, マクロファージの浸潤はRAM11の免疫染色で評価した。また, 血管内腔側の炎症細胞の観察は走査型電顕で行った。血管障害後にはさまざまなプロテアーゼが活性化されるが, matrix metalloproteinase (MMP)-9とplasminogen activator (PA) 活性をzymographyで評価した。

2) 結果

(1) ステント内内膜肥厚の抑制

TRAF6 DN群ではステント留置後の内膜面積および内膜細胞数の経時的な増加はコントロール群に比較して有意に抑制された (Fig. 5)。

(2) 血管平滑筋細胞の増殖, 炎症細胞浸潤, プロテアーゼ活性

TRAF6 DNの導入により内膜および中膜平滑筋細胞の増殖は抑制された (Fig. 6)。ステント内内膜へのマクロファージの浸潤はストラット周囲に多く観察され, ステント留置3日後から14日後まで遷延する傾向にあったが, TRAF6 DNによりその浸潤も著明に抑制された (Fig. 7)。また走査型電顕による血管内腔側の観察では, コントロール群では3日後から14日後まで白血球や血小板の内腔側への付着が豊富に観察されたのに対して, TRAF6 DN群ではそれらの付着は抑制されていた (Fig. 8)。さらにコントロール群ではバルーン障害後にはMMP-9とPAのプロテアーゼの活性化がみられるが, TRAF6 DNの導入によりそれらの活性はいずれも抑制された (Fig. 9)。

考 察

本研究では, TRAF6のNH₂末端が欠損したdeletion mutantであるTRAF6 DNを用いてNF κ Bを活性化するシグナル伝達系の抑制を試みたが, *in vivo*の検討でTRAF6 DNによりこの伝達系が抑制されることが確認されており⁷⁾, また実際, 本研究における*in vitro*の検討でもTRAF6 DNによりNF κ BおよびERK1/2活性が抑制されることが確認された。TRAF6 DNの導入により, バ

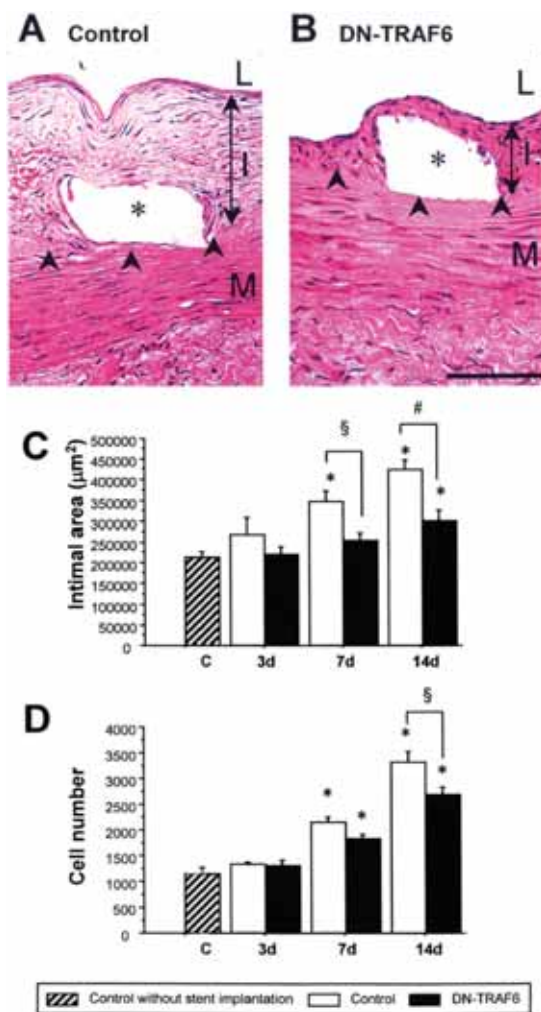


Figure 5 Photomicrographs of control plasmid-treated vessel (A) and DN-TRAF6 plasmid-treated vessel (B) at 14 days after stent implantation. Sections were stained with hematoxylin/eosin. L: lumen, I (bar with arrows): intima, M: media, *: strut hole, arrowheads: internal elastic lamina, Bar = 100 μm. Time course of intimal area (C) and intimal cell number (D). Values are shown as mean ± SEM, *: $p < 0.01$ vs control without stent implantation, #: $p < 0.01$, §: $p < 0.05$ control group vs DN-TRAF6 group, C: control, d: days after stent implantation

ルーン障害後の中膜・内膜平滑筋細胞の増殖, マクロファージの浸潤は抑制され, 一方平滑筋細胞のアポトーシスは促進された。血管平滑筋の細胞増殖が抑制され, アポトーシスが促進されることで, 内膜および中膜の細胞数が相対的に減少し, その結果としてバルーン障害後の内膜肥厚抑制に作用したと考えられ

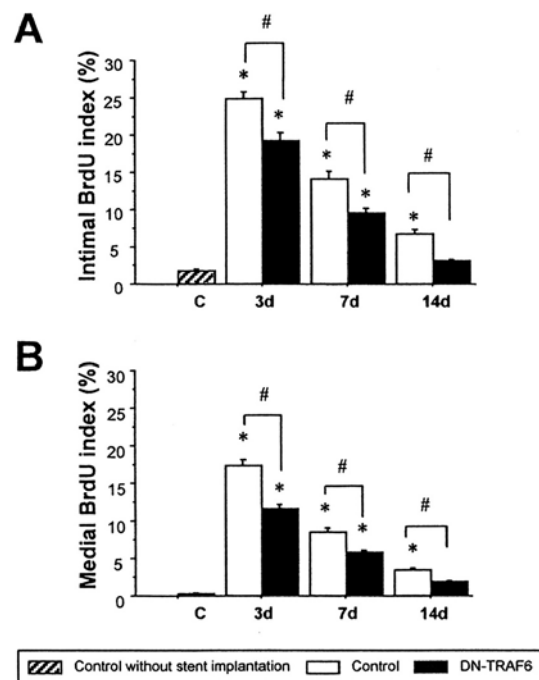


Figure 6 Time course of intimal BrdU index (A) and medial BrdU index (B). Values are shown as mean ± SEM, *: $p < 0.01$ vs control without stent implantation, #: $p < 0.01$ control group vs DN-TRAF6 group, C: control, d: days after stent implantation

る。マクロファージの浸潤が抑制され, かつアポトーシスが促進された理由としては, TRAF6 DNによりNFκB活性が抑制されたことがその最も大きな要因と考えられる。Yoshimuraら¹¹⁾やBreussら¹²⁾の報告でも, NFκB decoyやIκBαによるNFκB活性の選択的阻害により本研究と同様の結果が得られている。

TRAF6 DNの導入により中膜平滑筋細胞の増殖が抑制されたメカニズムには2つの可能性が考えられる。一つはERK1/2活性の抑制で, もう一つはNFκB活性の抑制である。ERK1/2カスケードはCD40シグナル伝達系の下流に存在しており, その活性化により血管障害後の中膜平滑筋細胞増殖が促進される¹³⁾。さらに最近の研究では, NFκB活性もまた中膜平滑筋細胞の増殖に関与すると報告されている¹⁴⁾。前半の研究において最も注目すべき点は, TRAF6 DNの導入により内膜細胞増殖も抑制されたことである。従来報告では, 血管障害後の内膜細胞増殖のメカニズムに関するevidenceはほとんど存在しない。近年, ラパマイシンなどの薬剤

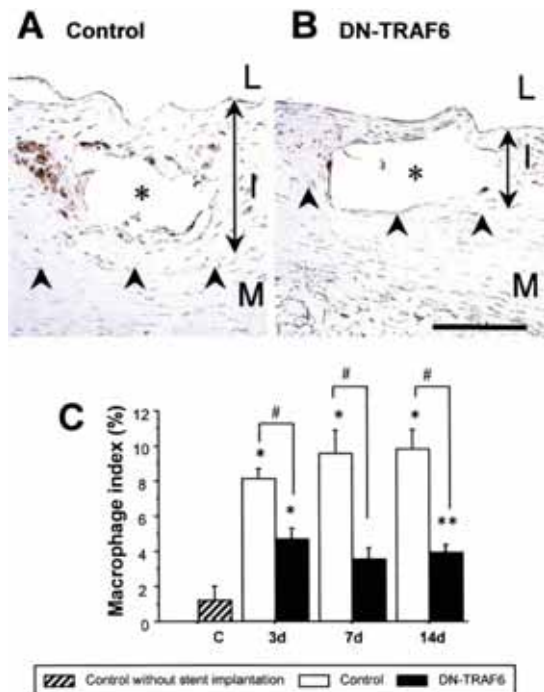


Figure 7 Photomicrographs of (A) control plasmid-treated vessel and (B) DN-TRAF6 plasmid-treated vessel at 7 days after stent implantation.

Sections were stained with RAM11.

L: lumen, I (bar with arrows): intima, M: media, *: strut hole, arrowheads: internal elastic lamina, Bar = 100 μ m

C: Time course of macrophage index in intima.

Values are shown as mean $\pm$ SEM, *: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$ vs control without stent implantation, #: $p < 0.01$ control group vs DN-TRAF6 group, C: control, d: days after stent implantation

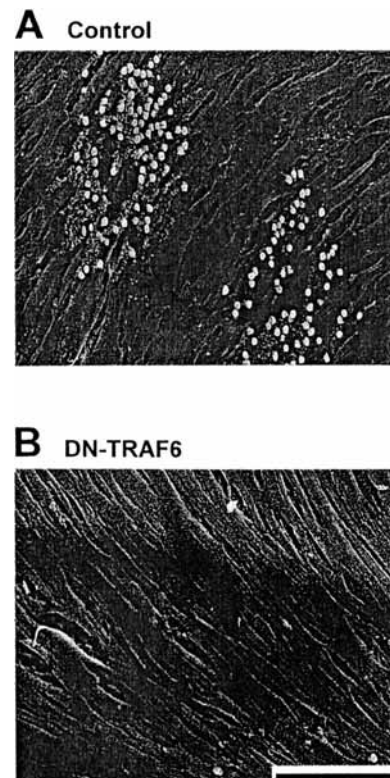


Figure 8 Scanning electron microscopic view of carotid lumen at 3 days after stent implantation in (A) control group and (B) DN-TRAF6 group.

Fewer leukocytes adhered to the luminal surface in the DN-TRAF6 group as compared with the control group. Bar = 100 μ m

溶出性ステントの臨床応用で良好な成績が得られているが¹⁵⁾、このことは内膜細胞増殖においては炎症や免疫反応が重要な役割の一つを担っていることを示唆している。

またTRAF6 DNを導入した血管では、中膜平滑筋細胞のアポトーシスが促進されていることが確認された。この結果は、*in vitro*の実験でNF κ Bが血管平滑筋細胞のアポトーシスの誘導を調節しているとする報告¹⁶⁾や、*in vivo*の実験でNF κ B活性の選択的な抑制により平滑筋細胞のアポトーシスが促進されるとする報告に矛盾しない結果である^{11, 12)}。またKollumらの報告¹⁷⁾において、ステント留置後の肥厚内膜を透過型電顕で観察した検討によると、アポトーシスを起こしている細胞は血管平滑筋細胞が主体であり、それ以外にはマクロファージのアポトーシスもわずかに観察されている。

ステント留置後もステント金属に対する異物反応や組織障害後の修復反応としての炎症や免疫反応が重要な役割を果たしていると考えられる^{18, 19)}。組織学的検討では、バルーン拡張術に比較してステント留置術では慢性的にステント部への単球・マクロファージの浸潤が認められており²⁰⁾、またステント部周囲への炎症細胞浸潤の程度と新生内膜形成は相関すると報告されている^{18, 21)}。

ステント留置後の形態学的な解析から、内膜面積および内膜細胞数はTRAF6 DNを導入した血管で有意に抑制された。さらにBrdUの取り込み率による細胞増殖の評価では、中膜のみならず内膜平滑筋細胞においても細胞増殖が抑制された。実際のステント内再狭窄症例の内膜切除標本を病理学的に検索した報告においても、その肥厚内膜での細胞増殖や細胞周期の活性化が

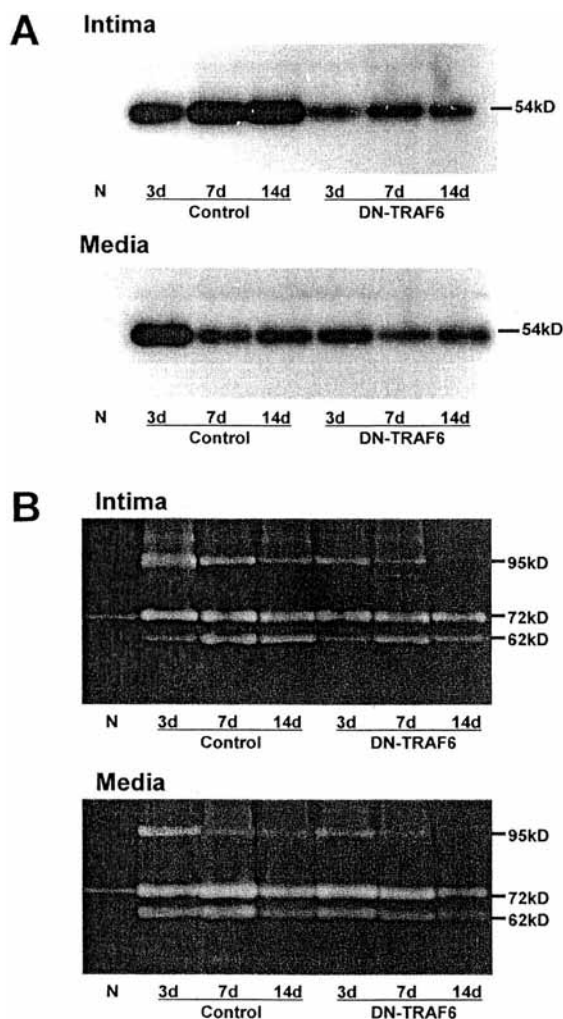


Figure 9

A: PA zymograms developed for 24 hours showing time course of PA activity in intima and media. The 54 kD band represents urokinase PA activity.

B: Gelatin zymograms showing time course of gelatinolytic activity in intima and media. Gelatinolytic activity at 62 and 72 kD represents the active and latent forms of MMP-2, respectively, and 95 kD activity represents MMP-9 activity. N: normal carotid, d: days after stent implantation.

確認されており²²⁾, 内膜細胞増殖はステント内再狭窄において重要な役割を果たしていると考えられる。本研究でステント内内膜肥厚が抑制された最も大きな要因は, TRAF6 DNによりこの内膜平滑筋細胞の増殖が抑制されたことにあると考えられる。

TRAF6 DNを導入することにより, ステント留置後の血管内腔側への白血球の付着やステント内内膜への

マクロファージの浸潤が抑制された。この結果は, ステント留置後の炎症細胞浸潤による炎症反応の重要性を示している。コントロール群では, 白血球の内腔側への付着はステント留置3日後から14日後まで遷延して観察され, これは内膜細胞増殖の活性過程と併行しており, 白血球の付着が内膜平滑筋細胞の増殖に対して重要な役割を果たしている可能性が示唆される。またマクロファージの内膜への浸潤も14日目まで遷延して観察されるが, TRAF6 DNの導入によりその浸潤は抑制された。従来の報告では肥厚内膜内のマクロファージは内膜肥厚を促進するとされている²³⁾。内膜肥厚が形成される過程にはさまざまなプロテアーゼが活性化されており^{24, 25)}, マクロファージ自身がそれらプロテアーゼを分泌していると報告されている²⁶⁾。実際, 本研究においてもTRAF6 DNによりステント留置後のMMP-9とUPAのプロテアーゼ活性はともに抑制されており, それらの知見を裏付ける結果である。

結 語

本研究では, CD40シグナル伝達系の仲介蛋白であるTRAF6に着目し, そのdominant negativeをウサギ頸動脈へ導入することにより, 内膜肥厚ならびにステント内再狭窄に対するその抑制効果が確認された。その過程には, 炎症細胞の浸潤, 血管平滑筋細胞の増殖, プロテアーゼの活性化などのさまざまな要素が関与していることが示唆された。この検討が臨床現場において動脈硬化病変の治療やステント内再狭窄予防に対するあらたな戦略の一つとなることが期待される。

文 献

- 1) Ross R: Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115-126.
- 2) Monaco C, Paleolog E: Nuclear factor κ B: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res*, 2004, **61**: 671-682.
- 3) Kashiwada M, Shirakata Y, Inoue J et al: Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a ras-independent pathway. *J Exp Med*, 1998, **187**: 237-244.
- 4) Cao Z, Xiong J, Takeuchi M et al: TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, 1996, **383**: 443-446.
- 5) Aderem A, Ulevitch RJ: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000, **406**:

- 782–787.
- 6) Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ et al: *In vivo* evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation*, 2002, **106**: 1985–1990.
 - 7) Ishida T, Mizushima S, Azuma S et al: Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 28745–28748.
 - 8) Matsumoto T, Komori K, Shoji T et al: Successful and optimized *in vivo* gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse. *Gene Ther*, 2001, **8**: 1174–1179.
 - 9) Rosl F: A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**: 5243.
 - 10) Miyahara T, Koyama H, Miyata T et al: Inflammatory signaling pathway containing TRAF6 contributes to neointimal formation via diverse mechanisms. *Cardiovasc Res*, 2004, **64**: 154–164.
 - 11) Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K et al: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element ‘decoy’ of nuclear factor- κ B binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther*, 2001, **8**: 1635–1642.
 - 12) Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H et al: Activation of nuclear factor- κ B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. *Circulation*, 2002, **105**: 633–638.
 - 13) Koyama H, Olson NE, Dastvan FF et al: Cell replication in the arterial wall: activation of signaling pathway following *in vivo* injury. *Circ Res*, 1998, **82**: 713–721.
 - 14) Marra DE, Simoncini T, Liao JK: Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21^{Waf1} and p27^{Kip1}. *Circulation*, 2000, **102**: 2124–2130.
 - 15) Sousa JE, Costa MA, Abizaid A et al: Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation*, 2001, **103**: 192–195.
 - 16) Erl W, Hansson GK, de Martin R et al: Nuclear factor- κ B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1999, **84**: 668–677.
 - 17) Kollum M, Kaiser S, Kinscherf R et al: Apoptosis after stent implantation compared with balloon angioplasty in rabbits. Role of macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 2383–2388.
 - 18) Kornowski R, Hong MK, Tio FO et al: In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **31**: 224–230.
 - 19) Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ et al: Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation*, 1999, **99**: 44–52.
 - 20) Inoue S, Koyama H, Miyata T et al: Cell replication induces in-stent lesion growth in rabbit carotid artery with pre-existing intimal hyperplasia. *Atherosclerosis*, 2002, **162**: 345–353.
 - 21) Farb A, Weber DK, Kolodgie FD et al: Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*, 2002, **105**: 2974–2980.
 - 22) Kearney M, Pieczek A, Haley L et al: Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*, 1997, **95**: 1998–2002.
 - 23) Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI et al: Hypercholesterolemia enhances macrophage recruitment and dysfunction of regenerated endothelium after balloon injury of the rabbit iliac artery. *Circulation*, 1991, **84**: 755–767.
 - 24) Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW et al: Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res*, 1994, **75**: 539–545.
 - 25) Clowes AW, Clowes MM, Au YP et al: Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. *Circ Res*, 1990, **67**: 61–67.
 - 26) Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R et al: Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**: 402–406.

Inflammatory Signaling Involving Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 Contributes to Intimal Hyperplasia via Diverse Mechanisms

Takuya Miyahara,^{1,2} Hiroyuki Koyama,^{1,2} Tetsuro Miyata,² Hirokazu Nagawa,² and Hiroshi Shigematsu³

¹Department of Vascular Regeneration, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

²Division of Vascular Surgery, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

³Second Department of Surgery, Tokyo Medical University Hospital, Tokyo, Japan

Key words: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, inflammation, intimal hyperplasia

We examined the role of inflammatory signaling involving tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to intimal lesion formation. A rabbit carotid artery was subjected to balloon injury by Fogarty catheter (balloon injury model) or a preexisting intimal lesion was subjected to implantation of a 3-mm-diameter Palmaz stent (stent implantation model). After a dominant negative (DN) form of TRAF6 (pME-FLAG-T6 Δ RZ5) was transferred by electroporation, its effects were evaluated by comparing the findings in arteries that were treated with control plasmid (pME-FLAG). With an expression of plasmid vector containing the DN-TRAF6 sequence successfully transferred to arterial wall cells, and its inhibitory effect on inflammatory signaling was confirmed by suppressing both activities after injury: nuclear factor- κ B (NF κ B) and extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). Morphometric analyses revealed that DN-TRAF6 significantly inhibited intimal lesion formation after balloon injury or stenting. In the DN-TRAF6-treated vessels cell replication was suppressed in both the intima and media, and apoptosis was enhanced. Moreover, DN-TRAF6 prevented macrophage accumulation, leukocytes adhesion to the luminal surface, and activation of proteases after stent implantation. These findings suggest that TRAF6 plays an important role in cell replication, inflammatory cell infiltration, and protease activity that contribute to intimal lesion development. (J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 627–635)