

# アポリポタンパク E 欠損マウスの動脈硬化に対するインターフェロン $\gamma$ の機能阻害効果

古賀 允久

福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室, 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Effects of postnatal blocking of interferon- $\gamma$  function  
on atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-knockout mice

Mitsuhisa Koga

Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences,  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka 814-0180, Japan

## Abstract

**Background.** A role of interferon- $\gamma$  is suggested in early development of atherosclerosis. However, it remains unknown whether inhibition of interferon- $\gamma$  function will prevent progression of atherosclerotic plaques and stabilize advanced plaques.

**Methods and Results.** Atherosclerotic plaques were induced in ApoE-KO mice by feeding with high-fat diet from 8-weeks old. Interferon- $\gamma$  function was postnatally inhibited by repeated gene transfers of a soluble mutant of interferon- $\gamma$  receptors (sIFN $\gamma$  R), an interferon- $\gamma$  inhibitory protein, into the thigh muscle every 2 weeks. When sIFN $\gamma$ R treatment was initiated from 8-weeks old (pre-atherosclerotic stage), aortic plaque formation was prevented. When sIFN $\gamma$ -R treatment was started from 12-weeks old (atherosclerotic stage), sIFN $\gamma$ R not only prevented plaque progression but also stabilized advanced plaques: sIFN $\gamma$ R decreased the lipid and macrophage accumulations but increased fibrotic area and smooth muscle cells. Moreover, sIFN $\gamma$ R downregulated expressions of pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules, and matrix metalloproteinases but upregulated pro-collagen type I. sIFN $\gamma$ R did not affect serum cholesterol levels.

**Conclusions.** Therapeutic blocking of interferon- $\gamma$  function by sIFN $\gamma$ R treatment would be a new strategy to inhibit plaque progression and to stabilize advanced plaques through the anti-inflammatory effects.

## 緒言

心臓病は、アメリカ、ヨーロッパ、日本などの国では、死亡原因の 50%を占めている。その心臓病の原因となっているのが動脈硬化である。動脈硬化病変の破綻によって、心筋梗塞、脳卒中などを引き起こす(1-3)。動脈硬化の危険因子として、①高脂血症、②高血圧、③加齢、④糖尿病、⑤喫煙、⑥肥満など生活習慣に関係しているものが多い(4)。近年、日本ではライフスタイルの変化により、動脈硬化がより重要な問題になってきている。

動脈は内膜、中膜、外膜からなる三層構造によって形成されており、管腔側には一層に並んだ血管内皮細胞が内膜を覆っている。以前までは、動脈硬化は単に内膜に脂質が蓄積するものと考えられていたが、現在では動脈硬化は炎症による疾患の一つと考えられている(5-7)。

プラーク（粥状動脈硬化巣）は血管内皮細胞が傷害され、活性化することから発生する。傷害された内皮細胞では vascular adhesion molecule-1(VCAM-1)などの接着因子の発現が誘導され(8,9)、その表面に血液中の単球やリンパ球が接着し、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)などの働きによって血管内皮細胞の間隙から血管壁内（内膜）へ侵入してくる(10-12)。侵入した単球は、動脈硬化の主役の一つであるマクロファージへと分化し、さらに脂肪物質を取り込むことで泡沫細胞となり、プラークを大きくし、不安定化させる(13)。

心血管イベントの発生には、プラークの安定性が大きく関与している。安定プラークとは、組織学的にプラーク中の粥状の脂肪や泡沫細胞がコラーゲンや平滑筋細胞の厚い線維性組織で覆われているプラークを称し、心筋梗塞や不安定狭心症を起こしにくい。一方、不安定プラークは、脂質や泡沫細胞が薄い線維性被膜で覆われたプラークを称し、破綻しやすい。プラークが破綻すると、血栓形成により心筋梗塞や脳卒中などの心血管イベントを惹き起こす(14-16)。プラークの不安定化や脆弱化過程にも炎症反応が強く関係しており、マクロファージなどの炎症性細胞に起因することが多い。マクロファージは、T細胞やナチュラルキラー細胞が産生するインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) によって増殖・活性化され、コラーゲンなどの線維成分を分解する matrix metalloproteinases(MMPs)などの分解酵素を産生する(17,18)。さらに、IFN- $\gamma$ は平滑筋細胞増殖の抑制や平滑筋細胞からのコラーゲン産生も抑制するので、プラークの形成だけでなく、プラークの不安定化にも大きく関与している(18-20)。

そこで、本研究では IFN- $\gamma$ を標的とし、動脈硬化病変における IFN- $\gamma$ の役割を生体レベルで解明すること、さらに抗 IFN- $\gamma$ 療法が動脈硬化症に伴う循環器疾患において新しい治療法になりうるかを検討した。すなわち、動脈硬化モデルマウスであるアポリポ蛋白 E 欠損 (ApoE KO) マウスの下肢筋肉内に IFN- $\gamma$ 機能を拮抗阻害する可溶性 IFN- $\gamma$ R を naked DNA 法にて導入し、IFN- $\gamma$ R タンパク質を発現させ (21-25)、血中に分泌された IFN- $\gamma$ R タンパク質により遠隔臓器である大動脈において IFN- $\gamma$ 機能を拮抗阻害させることを企図した。それにより動脈硬化の初期炎症機転及び発生進展の抑制が可能かどうかを検討した。

## sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入法の確立

### ① 血清 sIFN $\gamma$ R タンパク質の経時的変化:

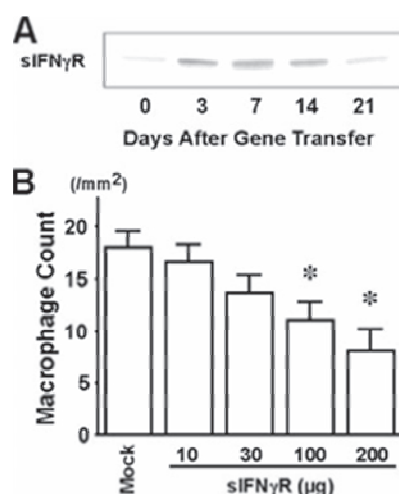
【方法】sIFN $\gamma$ R 遺伝子を導入する3日前に、遺伝子導入効率を上げるため、マウスの大腿骨格筋に 12ug/g 体重のブピバカイン(マーカイン®)を筋注した。同部位に PBS で溶解した sIFN $\gamma$ R 遺伝子組み換え発現プラスミドを筋注導入し、導入した日を day 0 とした。大腿骨格筋に sIFN $\gamma$ R 遺伝子を導入すると、骨格筋内で sIFN $\gamma$ R タンパク質が産生され、血液中に分泌される。そこで、遺伝子導入効率を確認するために、day 0, 3, 7, 14, 21 において、マウス血清をセファロースビーズを用いて免疫沈降反応後、ウェスタンブロットを行った。

【結果】sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入後 sIFN $\gamma$ R タンパク質の血清レベルは3日目をピークに14日目まで持続した。これにより遺伝子導入後、局所で sIFN $\gamma$ R タンパク質が産生され血液中に分泌し、少なくとも14日間は血清レベルが維持されたことが明らかになった(Figure 1A)。

### ② in vivo における sIFN $\gamma$ R タンパク質の抗 IFN- $\gamma$ 作用:

【方法】ブピバカイン筋注部位にエタノール沈殿により精製した sIFN $\gamma$ R 遺伝子を 0, 10, 30, 100, 200 $\mu$ g/40 $\mu$ L PBS の濃度で導入した。さらに、遺伝子導入3日後に除毛したマウスの背中に、炎症細胞の浸潤を誘発させる目的で、リコンビナントマウス IFN- $\gamma$  8000IU を皮内投与した。遺伝子導入4日後に、リコンビナント IFN- $\gamma$  を投与した皮膚組織を取り出し、浸潤したマクロファージの免疫組織学染色を行い、陽性細胞数を計測することにより、リコンビナントマウス IFN- $\gamma$  による炎症細胞浸潤誘発に対する抑制効果を比較した。

【結果】sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入部位とは異なる遠隔組織(皮膚組織)において、炎症細胞の浸潤を抑制した。また皮膚組織において IFN- $\gamma$  によって誘導される炎症細胞数は、用量依存的に減少し、200 $\mu$ g 遺伝子投与群が最も炎症細胞数の減少を示した(Figure 1B)。



**Figure 1. Efficacy of sIFN $\gamma$ R gene transfer into the thigh muscle.**

A, Representative immunoblot showing the temporal changes in serum sIFN $\gamma$ R protein levels after a single sIFN $\gamma$ R gene transfer (200  $\mu$ g) into the thigh muscle of wild-type mice.

B, sIFN $\gamma$ R gene transfer into the thigh muscle dose-dependently inhibited macrophage infiltration induced by recombinant interferon- $\gamma$  injection (8000 IU) in the subdermis of the back. Bar  $1 \times$  SD (n=10). \* $P < 0.05$  vs mock treatment.

## 【考察】

sIFN $\gamma$ R 遺伝子を大腿骨格筋に導入した場合、遺伝子導入後 3 日目をピークに 14 日目まで血中に sIFN $\gamma$ R タンパクが分泌していた(Figure 1A)。血中に分泌された sIFN $\gamma$ R タンパクが、導入部位とは異なる遠隔組織において抗炎症効果を示すことが示唆された。また、200 $\mu$ g の sIFN $\gamma$ R 遺伝子を導入した場合、最も抗炎症効果を示したことから(Figure 1B)、sIFN $\gamma$ R 遺伝子の投与量を 200 $\mu$ g と設定し、以下の実験を行った。

### 動脈硬化モデルマウスにおける sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入による動脈硬化予防効果

動脈硬化モデルマウスである ApoE KO マウスに、8 週齢から高脂肪食を負荷し、8、10 週齢時の 2 回 sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入を行い、12 週齢時に大動脈及び血液を採取した。

#### ① 全身状態:

体重、血圧、血清コレステロール値、血清 CRP 値については sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入による変化は認められなかった。

#### ② 末梢血中マクロファージ:

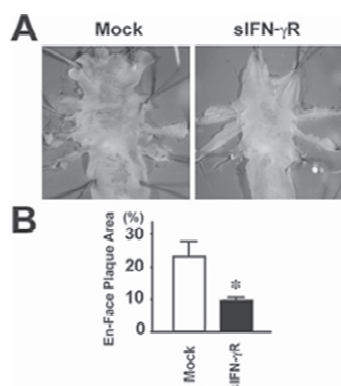
【方法】フローサイトメトリーにより血液中の単球マクロファージ数を求め、末梢血中のリンパ球・単球における sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入の影響を検討した。

【結果】コントロール群と sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入群では末梢血中単球マクロファージ数には、有意な差はみられず、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入は末梢血中の単球マクロファージ数に影響を及ぼさないことが判った。

#### ③ 血管内腔表面のプラーク病変:

【方法】血管内腔(上行大動脈～大動脈弓)表面を開き、オイルレッド-O でプラークの染色を行い、コンピュータ解析によって大動脈弓の血管内腔表面に対するプラークの割合(プラーク面積/大動脈内腔面積)を求め、プラーク形成について検討した。

【結果】大動脈弓の血管内腔表面に対するプラークの割合は、コントロール群では  $19.6 \pm 5.4\%$  であったのに対し、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入群で  $9.6 \pm 1.5\%$  と有意にプラーク面積を減少させた(Figure 2)。sIFN $\gamma$ R 導入により、大動脈弓におけるプラーク病変形成を阻止することが明らかになった。



**Figure 2. Effects of sIFN $\gamma$  treatment on atherosclerotic plaque formation.**

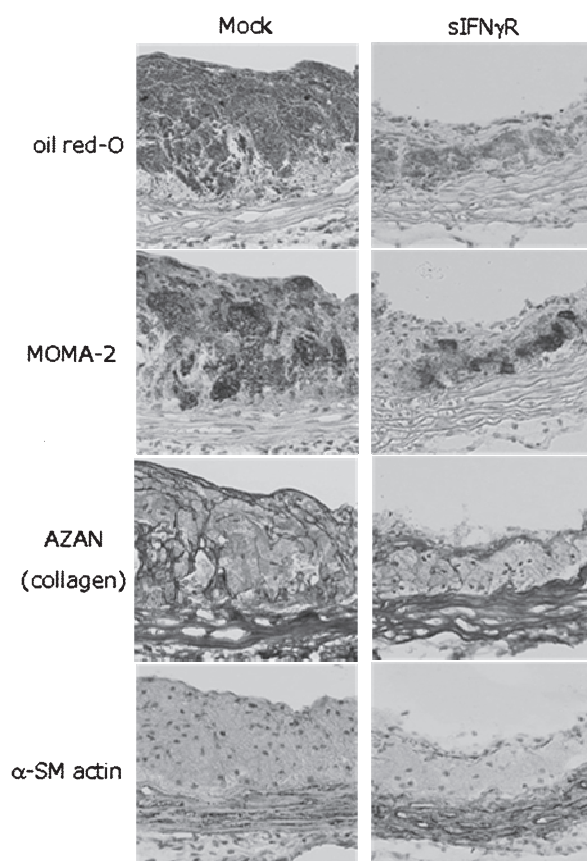
A: Representative photographs showing oil red-O-stained atherosclerotic plaques (red) in the ascending aorta and the aortic arch at 12 weeks of age. B: Pooled data on the effects of sIFN $\gamma$  treatment on the en face plaque area in the ascending aorta and the aortic arch at 12 weeks of age. Bar: 1 $\times$ SD (n=5).

\*p<0.05 vs. mock plasmid treatment.

#### ④ プラーク病変の組織学的検討

【方法】上行大動脈断面において、6μm 厚の連続凍結組織切片を作成し、オイルレッド-O (プラーク、脂肪)、MOMA2 免疫染色 (単球・マクロファージ)、AZAN 染色 (コラーゲン)、α-SMC の免疫染色 (平滑筋細胞のアクチン) を行い、プラークの安定化を評価した。また、IFN-γ、炎症サイトカインである IL (interleukin)-1 β、炎症性ケモカインである MCP (monocyte chemoattractant protein)-1、接着因子である VCAM (vascular cell adhesion molecules)-1 の免疫染色を行いプラークにおけるこれらの発現の評価を行った。

【結果】上行大動脈断面においても sIFNγR 遺伝子導入により、プラーク病変の減少とプラーク中への単球・マクロファージの浸潤抑制が認められた。また、プラークを安定させるコラーゲン、α-smooth muscle actin はコントロール群と比較して明らかに増加し、プラークを安定化させた (Figure 3)。上行大動脈断面組織において、control 群では、IFN-γ、IL-1 β、MCP-1、VCAM-1 がいずれもプラーク中に多く発現していた。sIFNγR 遺伝子導入群では、プラークにおけるこれらの発現は抑制されていた。



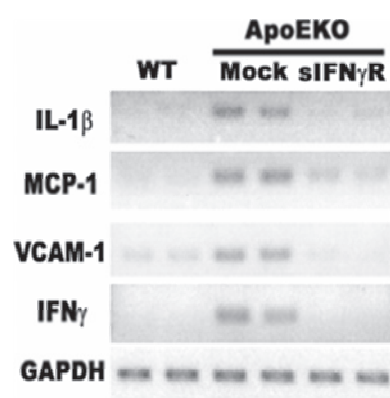
**Figure 3. Effects of sIFNγR treatment on the structural features of the plaques.** Representative microphotographs of the oil red-O (lipid, red)-, MOMA-2 (monocytes/macrophages, red)-, Azan (fibrous tissue, blue)-, and αSMA (smooth muscle cells, red)-stained cross sections of atherosclerotic plaques in the aortic root of sIFNγR- and mock-treated apoEKO mice. Five independent experiments showed similar results.



⑤ 炎症性サイトカイン、接着因子の mRNA 発現:

【方法】トライゾール®を用いて大動脈の total RNA を抽出後、RT-PCR 法により cDNA を合成し、PCR にて IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1、VCAM-1 の発現を比較した。

【結果】wild-type のマウスの大動脈では、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1、VCAM-1 の発現は、ほとんど認められなかった。一方、ApoE KO マウスの control 群では、これらは多く発現していたが、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入によって、大動脈でのこれらの発現は抑制された(Figure 4)。



**Figure 4.** Representative photographs of the electrophoresis of RT-PCR products showing the effects of sIFN $\gamma$ R treatment on the mRNA expressions of interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) at 12 weeks of age. Five independent experiments showed similar results. WT, wild-type mice.

【考察】

本章では、動脈硬化モデルマウス(ApoE KO マウス)における sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入による動脈硬化予防効果について検討を行った。sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入は、上行大動脈のプラーク形成を抑制し、プラーク中への単球マクロファージの浸潤を抑制した。また、プラークを安定させるコラーゲンや平滑筋細胞は増加した。これらの結果から sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入は、単に抗炎症・抗動脈硬化に働くだけでなくプラークを安定化させることが示唆された。また sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入により、大動脈における IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1、VCAM-1 の mRNA の発現が抑制(Figure 4)されたことから、血管内における抗炎症作用効果によって動脈硬化発症・進展及び動脈硬化の不安定化を抑制することが示唆された。

既に形成された動脈硬化病変における sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入の効果

ApoE KO マウスに 8 週齢時から、高脂肪食の負荷を開始し、動脈硬化が形成されている 12、14 週齢時の 2 回 sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入を行った。16 週齢時に組織を採取した。

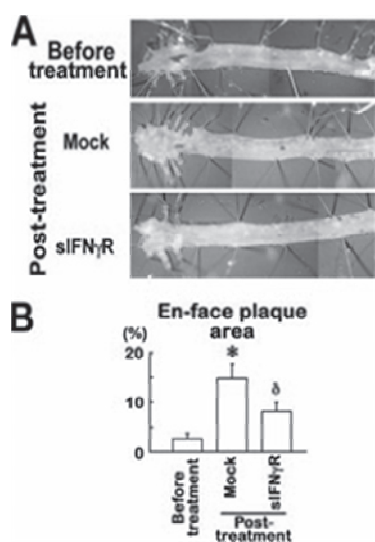
① 全身状態:

体重、血圧、血清コレステロール値、血清 CRP 値については予防実験と同様に sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入による影響は認められなかった。

## ② 血管内腔表面プラーク病変:

【方法】血管内腔表面を開き、オイルレッド-O でプラークの染色を行った。コンピュータ解析により血管内腔表面全体に対するプラークの割合(プラーク面積/大動脈内腔面積)を求めた。

【結果】コントロール群では  $14.8 \pm 2.8\%$ であったのに対し sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入群で  $8.1 \pm 1.8\%$ と有意な差があった(Figure 5 B)。大動脈弓において、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入によるプラークの退縮は認められなかった。しかし、下行大動脈、腹部大動脈においては、control 群では、プラークが多く形成されていたのに対して、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入によって、大動脈プラーク病変形成が明らかに抑制された。(Figure 5 A)。



**Figure 5. Effects of 4-week sIFN $\gamma$ R treatment on the atherosclerotic lesions.**

A. Representative en-face photographs showing the oil red-O-stained atherosclerotic plaques (yellow-red) of the aorta at 16-weeks old. B. Pooled data of the effects of sIFN $\gamma$ R treatment on the en-face plaque area. C. Pooled data of the effects of sIFN $\gamma$ R treatment on the histological plaque stability index. Bar=1xSD (n=10). \*p<0.01 vs. ApoE-KO mice before gene transfer at 12-weeks old (Before treatment).  $\delta$ p<0.01 vs. the mock-treated ApoE KO mice.

## ③ プラーク病変の安定化:

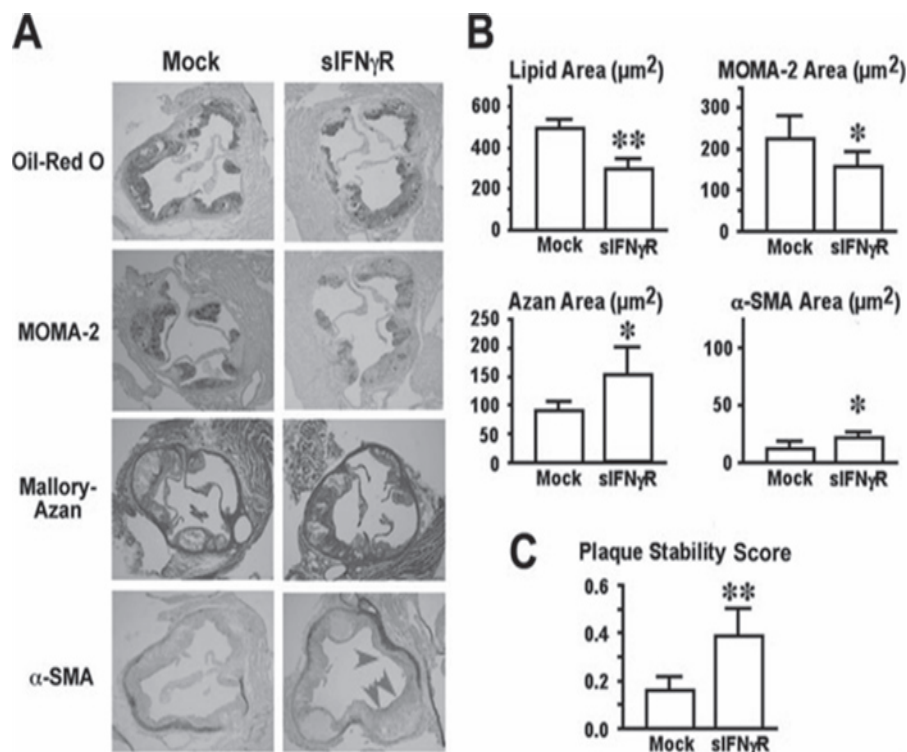
【方法】上行大動脈断面において、予防実験と同様にオイルレッド-O(プラーク)、MOMA2 免疫染色、AZAN 染色、 $\alpha$ -SMC の免疫染色を行い、以下のようにプラークの安定化スコアを求めた。プラーク安定化スコア=(コラーゲン面積と平滑筋細胞のアクチン面積)/(脂肪プラーク面積+単球・マクロファージ面積)。プラーク安定化スコアにより、sIFN $\gamma$ R 遺伝子によるプラーク安定化について検討を行った。

【結果】sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入によって、脂質プラークの蓄積、単球・マクロファージの浸潤を抑制し、コラーゲン、平滑筋細胞のアクチンを増加させた。また、プラーク安定化スコアは、Control 群ではおよそ 0.2 であったのに対し、sIFN $\gamma$ R 導入ではおよそ 0.35 であり、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入は、プラークを安定化した(Figure 6)。

④ 炎症性サイトカイン、接着因子の mRNA 発現:

【方法】予防実験と同様に、大動脈より total RNA をトライゾールで抽出し、cDNA を合成した。炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、IL-6、炎症性ケモカインである MCP-1、接着分子である VCAM-1、マクロファージ活性化因子である MIP-1、細胞外マトリックス分解酵素である MMP-9、-13、Collagen-1 の発現を PCR 法によって検討した。

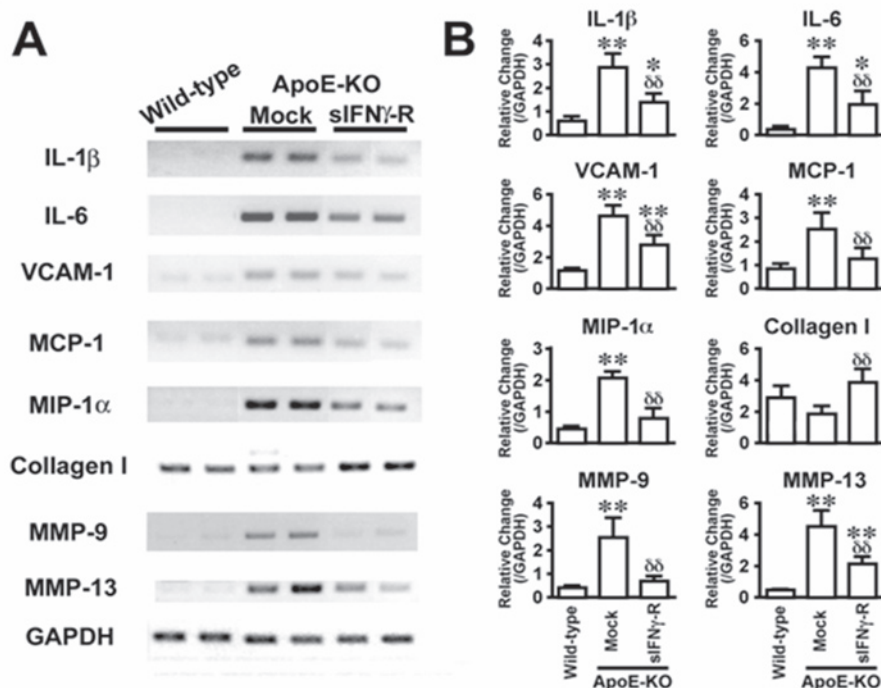
【結果】control 群では、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1、VCAM-1、MIP-1、MMP-9、-13 の発現が多く認められたが、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入群ではこれらの発現が抑制されていた。一方、プラークを安定化させる Collagen-1 の発現は、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入群が control 群よりも多かった。(Figure 7)



**Figure 6. Effects of sIFN $\gamma$ R treatment on the histological aspects.**

A. Representative microphotographs of the oil red-O (lipid)-, MOMA-2 (monocytes/macrophages)-, Azan (fibrous tissue)-, and  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA; SMCs)-stained cross-sections of the plaques in the aortic root at 16-weeks old. Arrowheads indicate thin layer of intimal SMCs (brown in color). B. Pooled data of the effects of sIFN $\gamma$ R treatment on the oil red-O-, MOMA-2-, Azan-, and  $\alpha$ -SMA-stained areas and the cross-sectional plaque area. Bar=1xSD (n=10). \*p<0.05 and \*\*p<0.01 vs. the mock plasmid treatment, respectively.





**Figure 7. Effects of sIFN $\gamma$ -R treatment on mRNA expressions in the aortic wall at 16-weeks old.** A. Representative photographs of electrophoresis of RT-PCR products. B. Pooled data of the effects of sIFN $\gamma$ -R treatment on the mRNA expressions of the target genes. The expression level of the target gene was normalized for the GAPDH level in each sample. Bar=1xSD (n=5). \*p<0.05 and \*\*p<0.01 vs. wild-type mice.  $\delta$ p<0.05 and  $\delta\delta$ p<0.01 vs. the mock-treated ApoE-KO mice.

#### 【考察】

本章では、既に形成された動脈硬化病変における sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入の効果について検討を行った。ApoE KO マウスにおける既に形成されたプラークでは、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入は、形成されたプラークを退縮させないが、新たなプラーク形成を抑制することが明らかとなった (Figure 5)。さらに、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入することによって、プラークをより安定化させることも明らかとなった (Figure 6)。その作用機序としては、大動脈における炎症抑制、単球・リンパ球の接着抑制、細胞外マトリックス分解酵素の産生抑制による不安定化因子の抑制が考えられる。さらに、プラーク安定化因子であるコラーゲン増加も寄与すると考えられる。

## 【総括】

本研究では、動脈硬化に対するインターフェロン $\gamma$ の機能阻害効果を検討するため、アポリポrotein E欠損マウスに sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入を行い、実験した。

IFN $\gamma$ は動脈硬化の発症・進展のみならず、プラークの不安定化にも大きく関与していることが示唆された。さらに、IFN $\gamma$ を標的とした治療法が、動脈硬化の予防だけでなく、進展抑制にも有効である可能性が示唆された。また、sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入は単に抗炎症・抗動脈硬化に働くだけでなく、プラークの安定化にも寄与することが判った。

本研究のプロトコルにおいて、マウス観察期間中は sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入によるマウスの死亡は認められなかった。しかし、大腿骨格筋への sIFN $\gamma$ R 遺伝子導入によって sIFN $\gamma$ R タンパクが血液中に分泌されることから、全身に作用する可能性が考えられる。長期間 IFN $\gamma$ を阻害した場合、免疫系の制御機構が破綻し、感染症や癌を惹き起こす可能性も推測される。また、本研究で用いたプラスミドを naked DNA 法によって遺伝子導入する方法は、一回の投与によって作用が持続するという利点がある一方で、投与してからの血中濃度を調節することは難しい。従って、臨床に応用するためには、リコンビナント sIFN $\gamma$ R のナノ分子開発による局所運搬や sIFN $\gamma$ R がコーティングされたステントを開発するなど、動脈硬化に対して特異的かつ局所的に作用させることが必要だろう。

IFN $\gamma$ はプラーク形成、不安定化に関与しており、本研究で用いた sIFN $\gamma$ R 遺伝子(プラスミド)療法や抗 IFN $\gamma$ 療法は、循環器疾患に対する臨床応用可能な新しい標的となりうると共に、新しい遺伝子治療法としても有力であると考ええる。また、sIFN $\gamma$ R タンパクが血中に分泌されることから、動脈硬化以外の疾患においても応用可能ではないかと考える。

## 【謝辞】

本研究をまとめるにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻、御校閲を賜りました福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 片岡泰文 教授に心より深く感謝の意を表します。

本研究に際し、有益な御指導と御鞭撻を賜りました久留米大学医学部心臓血管内科 今泉勉 主任教授、同甲斐久史 助教授に深甚たる謝意を表します。

本論文を査読していただき、貴重な御意見と御校閲を賜りました福岡大学薬学部 高野行夫 教授、中島学 教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、懇切な御指導と御助言を頂きました、福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室の首藤英樹 助教授、山内淳史 助手、西奥剛 助手、高田英友子 助手に謹んで感謝申し上げます。

本研究において多大な御指導と御助力を頂きました久留米大学循環器病研究所の安川秀雄講師をはじめとする同研究所の皆様方に心より御礼申し上げます。

また薬学疾患管理学教室の皆様方、ならびに支えてくださった皆様方に深く感謝いたします。

## 【参考文献】

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362: 801-809
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241
3. Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004; 5: 189-218
4. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson TA, Reed J, Washington R, Smith SC Jr. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association. *Circulation*. 1998; 12; 97(18):1761-1762
5. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *New Engl J Med*. 1999; 340:115-126
6. Peter Libby, Pail M. Ridker, Attilio Maseri. Inflammatory and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105: 1135-1143
7. Peter Libby. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420: 868-874
8. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003; 170: 191-203
9. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107: 1255-1262
10. Boisvert WA. Modulation of atherosclerosis by chemokines. *Trends Cardiovasc Med*. 2004; 14: 95: 161-165
11. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004; 95: 858-866
12. Boring L, Gosling K, Li H, et al. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998; 394: 894-897
13. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994 Jan;89(1):503-505
14. Fuster V, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherothrombosis: mechanisms and clinical therapeutic approaches. *Vasc Med*. 1998; 3: 231-229
15. Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet*. 1999; 353 Suppl 2: SII5-SII9.
16. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001; 103: 1718-1720

17. Mire-Sluis AR, Thorpe R. Laboratory protocols for the quantitation of cytokines by bioassay using cytokine responsive cell lines. *J Immunol Methods*. 1998 Feb 1;211(1-2):199-210
18. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and function. *J Leukoc Biol*. 2004; 75: 163-189
19. Young YL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2002;88:554-567
20. Harvey EJ, Ramji DP. Interferon- $\gamma$  and atherosclerosis: Pro- or anti-atherogenic? *Cardiovasc Res*. 2005;67:11-20
21. Piccirillo CA, Prud'homme GJ. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by intramuscular gene transfer with cytokine-encoding plasmid vectors. *Hum Gene Ther*. 1999;10:1915-1922
22. Lawson BR, Prud'homme GJ, Chang Y, Gardner HA, Kuan J, Kono DH, Theofilopoulos AN. Treatment of murine lupus with cDNA encoding IFN-gammaR/Fc. *J Clin Invest*. 2000;106:207-215
23. Tahara N, Kai H, Niiyama H, Mori T, Sugi Y, Takayama N, Yasukawa H, Numaguchi Y, Matsui H, Okamura K, Imaizumi T. Repeated gene transfers of naked prostacyclin synthase plasmid into skeletal muscles attenuate monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolong survival in rats. *Hum Gene Ther*. 2004;15:1270-1278
24. Danko I, Fritz JD, Jiao S, Hogan K, Latendresse JS, Wolff JA. Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Ther*. 1994;1:114-121
25. Niiyama H, Kai H, Yamamoto T, Shimada T, Sasaki K, Murohara T, Egashira K, Imaizumi T. Roles of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 in ischemia-induced neovascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:661-666