

Focal Adhesion Kinase Promotes the Progression of Aortic
Aneurysm by Modulating Macrophage Behavior

(大動脈瘤進展におけるマクロファージの機能制御を介した Focal Adhesion Kinase の役割)

氏名 原田 剛佑

所属 山口大学大学院医学系研究科
応用医工学系専攻 器官制御医科学領域
器官病態外科学 (外科学第一)

平成 28 年 12 月

目次

| | |
|----------|-------|
| 1. 要旨 | 3 |
| 2. 研究の背景 | 4 |
| 3. 目的 | 4 |
| 4. 方法 | 4-9 |
| 5. 結果 | 10-26 |
| 6. 考察 | 27-28 |
| 7. 結語 | 28 |
| 8. 謝辞 | 29 |
| 9. 参考文献 | 30-33 |

1. 要旨

【目的】腹部大動脈瘤 (AAA) は慢性炎症と細胞外マトリクスの破壊を特徴とする致死的な血管疾患である。マクロファージを介した AAA の進展における分子機序の多くは明らかにされていない。

【方法・結果】我々は AAA 組織に集積したマクロファージにおいて focal adhesion kinase (FAK) の発現と活性が増強されていることを示した。培養マクロファージを用いた実験では、FAK が tumor necrosis factor- α で誘導されるマトリクス分解酵素とケモカインの分泌を促進していた。さらに、FAK はマクロファージの走化性も促進していた。化学的刺激で誘導した AAA モデルマウスを用いた実験では、FAK 阻害剤を投与するとマクロファージの局所浸潤が抑えられ、AAA の形成と進展が著しく抑制された。

【結論】FAK は慢性的な AAA 進展の根幹となるマクロファージの機能制御に重要な役割を果たしている。この研究での成果により AAA の進展への理解が深まり、FAK が新たな治療標的となると考える。

2. 研究の背景

腹部大動脈瘤 (AAA) は大動脈が限局的に拡張し、破裂に至る頻度が高い疾患であり、死亡率の高い疾患である [1,2]。AAA の治療方法は現在のところ、破裂を予防するための開腹手術または血管内治療に限られる [3]。AAA に対する手術以外の治療、特に薬物治療は現在のところない [4,5]。AAA の特徴はケモカインに誘導される慢性的な炎症細胞浸潤と matrix metalloproteinases (MMPs) などのタンパク質分解酵素による進行性の細胞外マトリクス破壊である [5-10]。特に、AAA の特徴である長期の持続的な炎症を制御する分子機序はほとんど明らかにされていない。

Focal adhesion kinase (FAK) はインテグリンを介するシグナル伝達に重要な役割を担う細胞内チロシンキナーゼである。また、FAK は他の細胞膜表面受容体を介するシグナルにも関与している [11]。特に FAK を含むインテグリンシグナルは細胞の運動能を制御しており、癌やその他の疾患の病態に関与している [12-15]。我々は以前に、血管平滑筋細胞において FAK が機械的刺激に対する炎症反応に関与していることを *in vitro* で示した [16]。この役割の中で、FAK は c-jun N-terminal kinase (JNK) の活性化と monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) と MMP-2 の発現増加に関わっていた。FAK による MMP-2 の発現増加は他の研究でも示唆されている [17]。これらの結果から、FAK が炎症反応を増強し、持続させることにより AAA の進展を促進するという仮説に至った。

3. 目的

本研究の目的は、FAK が AAA 進展の際の長期に持続する炎症を促進するか、また薬物的 FAK 阻害が AAA の形成と進展を抑制し得るかを検証することである。AAA に対する手術以外の新たな治療法として FAK を治療標的とした薬物療法の可能性を探ることである。

4. 方法

マウスモデル

6 週齢、雄の C57BL/6 マウスを千代田開発から購入した。マウスは 5 匹ごとにケージに入れ、12 時間毎の明暗周期で室温、湿度を調整した部屋で飼育した。マウスは実験期間を通して標準的な餌と水を自由に与えた。以前の報告にあるように、0.5 M CaCl_2 を大動脈周囲に塗布することで AAA を誘導した [18,19]。まずペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) を腹腔内投与してマウスに麻酔を行った。次に開腹し、左腎静脈と大動脈分岐部間の腎動脈下大動脈に CaCl_2 を塗布した。マウスはそれぞれの実験で示す時点でペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg、腹腔内投与) を過量投与して犠牲死させた。Phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した 4%パラホルムアルデヒドを生理的な圧力で全身投与して組織を固定した。腹部大動脈をすぐに採取し、形態分析のための写真を撮り、組織学的に分析した。大動脈の写真を用いて大動脈の最大外径を計測

した。全ての実験は、the United States National Institutes of Health の the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に則って行った。これらのプロトコルは山口大学の the Institutional Animal Care and Use committee (No. 31-097) の承認を得た。

薬物投与

予防的介入実験では AAA モデルマウス (n=6) に対して PF573228 (12.5 mg/kg; Selleck Chemicals, USA, S2013) を 5% dimethylsulfoxide (DMSO, Wako, Japan, 046-21981)、5% Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA, P1754)、5% polyethylene glycol 400 (Sigma-Aldrich, P3265)、0.9% NaCl に希釈し、1日2回6週間、腹腔内投与した。比較対照として別群のマウス (n=10) に並行して溶媒のみを投与した。さらに疑似対照として、CaCl₂の代わりにマウス (n=5) に NaCl を塗布した。治療的介入実験では、まず CaCl₂でマウス (n=35) を処置した。処置から3週間おいて PF573228 (n=11) または溶媒のみ (n=13) の投与を開始した。治療前後の比較のために CaCl₂処置から3週間後のマウス (n=11) を分析した。短期間介入実験ではまずマウス (n=14) を CaCl₂で処置した。CaCl₂ 処置3週間後から4日間のみ PF573228 (n=8) または溶媒のみ (n=6) を投与した。

細胞培養実験

6週齢、雄の C57BL/6 マウス (千代田開発) から、以前に報告されたとおりチオグリコレートで誘導したマクロファージを採取した [20,21]。まず、マウスにチオグリコレート培養液 (Sigma-Aldrich, T0632) を 2ml 腹腔内投与した。3日後に 10ml の PBS による腹腔内洗浄で細胞を回収した。細胞は冷却した PBS で2回洗浄し、10% fetal bovine serum (FBS) を含む RPMI-1640 培養液 (DS Pharma Biomedical, Japan, 1260254) に再懸濁し、プラスチックプレートに播種した。24時間後、接着していない細胞を培養液で洗浄することで除去した。マクロファージを24時間、血清飢餓状態にした後、20 μ M PF573228 (Sellek Chemicals, S2013)、70 μ M FAK inhibitor 14 (Santa Cruz Biotechnology, USA, sc203950) または 5 μ M PF562271 (Sellek Chemicals, S2890) で1時間処理し、10 ng/ml の tumor necrosis factor-alpha (TNF)- α (PeproTech, USA, 30001A) で24時間刺激した。いくつかの実験では、マクロファージを 20 μ M SP600125 (Tocris Bioscience, UK, 1496) で処理し、10 ng/ml tumor necrosis factor-alpha (TNF)- α (PeproTech, USA, 30001A) で24時間刺激した。

レンチウイルスの RNA 導入

FAK shRNA のレンチウイルス粒子と対照粒子を Santa Cruz Biotechnology (USA, sc35353V, sc108080) から購入した。マウス腹腔マクロファージにレンチウイルス粒子を用いて 50 MOI、10 μ g/ml のポリブレン (Santa Cruz Biotechnology, sc134220) 存在下で 10% FBS を加えた RPMI-1640 培養液に24時間おいて遺伝子導入した後、ポリブレンを含まない培地に移した。マクロファージはレンチウイルスによる導入の少なくとも5から7日後に実験に用いた。これらの実験は山口大学の the Genetic Modification Safety Committee (No. J15032, J16039) の承認を得た。

細胞生存能実験

生細胞と死細胞の数を計測するために LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay Kit (Molecular Probes, L3224) を用いた。処理されたマクロファージを PBS に溶解した calcein AM (1 μ M) とエチジウムホモ二量体 (2 μ M) で 20 分間、室温で染色した。calcein AM とエチジウムホモ二量体の蛍光強度を fluorescence microplate reader (ARVOsx, PerkinElmer, USA) を用いて測定した。

走化性実験

6 週齢、雄の C57BL/6 マウス (千代田開発) からチオグリコレートで誘導したマクロファージを採取した。また、6 週齢、雄の C57BL/6 マウス (千代田開発) から EasySep™ Mouse Monocyte Isolation Kit (STEMCELL Technologies, Canada, ST19801) を用いて脾臓中の単球を採取した。マウス腹腔マクロファージまたはマウス脾臓単球 (5×10^4 個/well) を無血清 RPMI-1640 培養液 100 μ l に懸濁し、20 μ M PF573228 で処理した。細胞を Transwell apparatus (Corning, USA, 3421) に装着した孔径 5.0 μ m の膜の上に播種した。下のチャンパーに 10 ng/ml のリコンビナントマウス MCP-1 (R&D Systems, USA, 479JE) を含む 600 μ l の RPMI-1640 培養液を満たした。細胞が遊走した後、膜の裏面の細胞核を DAPI (Molecular Probes, USA, D1306) で染色した。染色された細胞を蛍光顕微鏡で観察し、細胞数を計測した。

貪食実験

24 ウェルプレートにマウス腹腔マクロファージ (1.5×10^6 個/well) を播種し、20 μ M PF573228、70 μ M FAK inhibitor 14、または 5 μ M PF562271 で 1 時間処理した。細胞を 0.84 μ m 蛍光粒子 (4.5×10^7 個/well) (Spherotech, USA, FP08522) を含む無血清 RPMI-1640 培養液で 2 時間培養した。滅菌した PBS で 3 回洗浄した後、1 つ以上粒子を取り込んだ細胞を蛍光顕微鏡で観察し、細胞数を計測した。

ヒト大動脈標本

開腹手術を行った腹部大動脈瘤患者 28 人から腹部大動脈壁の組織を採取した。28 人の患者全てから腹部大動脈瘤組織の拡張部位を肉眼的に同定し、その病変部位をヒト腹部大動脈瘤標本として用いた。28 人中 8 人の腹部大動脈瘤患者から、拡張部位から分離した正常径大動脈壁部位を同定し、この部位を対照の非拡張部ヒト標本として用いた。免疫組織学的分析の正常対照群として、関連のない原因で死亡した人の病理解剖からヒト大動脈壁標本を得た。以前の報告にあるように、全ての大動脈組織標本はタンパク質分析、ウェスタンブロット、免疫染色、ex vivo 組織培養に用いた [16,18,22]。患者の臨床情報を Table 1 に示す。ヘルシンキ宣言に則って、全ての患者から組織利用についての説明と同意を得た。これらのヒト標本を含むプロトコルは山口大学病院治験審査委員会 (#H24-26) の承認を得た。

Clinical data of human subjects

| | Non-dilated n=8 | AAA n=28 |
|----------------------|--------------------|----------------|
| Age, mean \pm SD | 73.6 \pm 7.1 | 70.2 \pm 8.8 |
| Male, % | 75.0 | 75.0 |
| Smoking, % | 62.5 | 75.0 |
| Hypertension, % | 62.5 | 60.7 |
| Diabetes mellitus, % | 25.0 | 25.0 |
| Dyslipidemia, % | 25.0 | 32.1 |
| Statins, % | 50.0 | 42.9 |
| ACE-I, % | 0.0 | 14.3 |
| ARB, % | 25.0 | 32.1 |
| NSAIDs, % | 12.5 | 3.6 |

AAA indicates abdominal aortic aneurysm; ACE-I, angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB, angiotensin II type 1 receptor blockers; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Table 1. 患者の臨床情報

ヒト大動脈瘤標本の *ex vivo* 培養

ex vivo 組織培養は以前の報告を参考に行った [18,22]。まず、腹部大動脈瘤壁組織を約 1mm の大きさに細かく切り刻んだ。切り刻んだ組織を 12 ウェルプレートに等分して入れ、無血清 DMEM (Thermo Fisher Scientific, USA, 11885084) で培養した。組織は 20 μ M PF573228 (Selleck Chemicals, S2013) で 1 時間処理し、10 ng/ml TNF- α (PeproTech, 30001A) で 48 時間刺激した。

組織学および免疫組織化学的分析

組織学分析のため、パラフィン包埋切片を hematoxylin/eosin (HE) と Elastica-van Gieson (EVG) 染色で染色した。以前の報告を参考に、免疫染色を行った [18]。組織切片を以下の抗体で標識した。抗 pFAK 抗体 (1:100; rabbit monoclonal; Abcam, UK, ab81298)、抗 F4/80 抗体 (1:50; rat monoclonal; BMA Biomedicals, Switzerland, T-2006)、抗 MMP-9 抗体 (1:50; goat polyclonal; R&D Systems, AF909)、抗 MMP-2 抗体 (1:50; goat

polyclonal; R&D System, AF1488)、抗 MCP-1 抗体 (1:50; goat polyclonal; R&D Systems, AF-479)。抗体標識後の蛋白は VECTASTAIN ABC-AP kit (Vector Laboratories, USA) を用いてアビジン-ビオチン複合法で可視化した。間接免疫蛍光染色は、抗 pFAK 抗体 (1:100; rabbit; Bioworld Technology, USA, BS4617)、抗ヒト CD68 抗体 (1:100; mouse; Dako, Denmark, M0876)、抗ヒト smooth muscle actin 抗体 (1:100; mouse; Dako, M0851) を用い、続く二次抗体として、Alexa Fluor 488 結合抗マウス IgG 抗体 (1:200; Molecular Probes, A11001) と Alexa Fluor 594 結合抗ウサギ IgG 抗体 (1:200; Molecular Probes, A11012) を用いた。モノクローナル抗体の特異性を確認するために非免疫 IgG (R&D Systems, AB105C, 6001A) を陰性対照として用いた。抗体と対応するリコンビナントタンパク、すなわち MMP-9 (R&D Systems, 909MM)、MMP-2 (R&D Systems, 924MP)、MCP-1 (R&D Systems, 479JE) と予め混合する吸収試験を陰性対照として、ポリクローナル抗体の特異性を確認した。アポトーシス細胞死は TUNEL staining kit (Roche, Switzerland, 11684809910) で立証した。アポトーシスとマクロファージの二重蛍光染色は TUNEL staining kit (Roche, 12156792910) と抗 F4/80 抗体 (1:100; rat; BMA Biomedicals, T-2006)、Alexa Fluor 488 結合抗ラット IgG 抗体を用いて行った。それぞれのマウスから少なくとも 3 切片を BZ-X700 microscope system (Keyence, Japan) を用いて確認、撮影した。中膜のエラスチン破壊度は EVG 染色で以前に報告された分類法を用いて評価した[21,23]。大動脈壁内のマクロファージは横断面 1 切片上の F4/80 陽性細胞数を計測した。組織内のそれぞれのタンパク質の染色域は ImageJ (NIH) で定量化し、大動脈全体に対する染色組織の割合で表した。特異的に染色された領域を判定するために、陰性対照の非特異的染色で検出されない値を閾値とした。複数の切片を比較するために、染色と画像分析は均一の条件下で行った。

ウェスタンブロット法

タンパク質の抽出とウェスタンブロットは以前の報告を参考に行った [18]。まず、同量のタンパク質をポリアクリルアミドドデシル硫酸ナトリウムゲルの溝にそれぞれ注入して電気泳動により分離し、ニフツ化ポリビニリデン膜に転写した。リン酸化 FAK (pFAK) (1:1000; Abcam, ab4803)、total FAK (1:1000; Cell Signaling Technology, USA, #3285)、リン酸化 JNK (1:2000; Promega, V7931)、JNK1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, sc-474)、JNK2 (1:1000; Cell Signaling Technology, #4672)、リン酸化 NF- κ B (1:1000; Cell Signaling Technology, #3033)、total NF- κ B (1:1000; Cell Signaling Technology, #8242)、MMP-9 (1:1000; R&D Systems, AF909)、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (1:50000; Millipore, USA, MAB374)、 β -アクチン (1:1000; Cell Signaling Technology, #4970) をそれぞれの抗体で膜から検出した。

ゼラチンザイモグラフィ

ゼラチンザイモグラフィは以前の報告を参考に行った [18,22]。MMP-9 のタンパク量は対応する分子量のバンドを定量化することで決定した。

酵素結合免疫吸着法

培養上清中の MCP-1 の濃度はサンドイッチ法を用いて定量化した。mouse MCP-1 ELISA Kit (R&D Systems, MJE00) と human MCP-1 ELISA Kit (R&D Systems, DCP00) を取扱い説明書に従って使用した。

統計学的分析

全てのデータを平均値 ± 標準偏差で表記した。データの正規性は D'Agostino-Pearson 検定 ($n \geq 8$) または Kolmogorov-Smirnov 検定 ($n < 8$) を用いて検定した。2 群の比較では、F 検定により正規分布と等分散が示されたデータには Student's t 検定を行い、その他のデータにはノンパラメトリック Mann-Whitney U 検定を行った。多群間の比較では、Brown-Forsythe 検定により正規分布と等分散が示されたデータには one-way analysis of variance (ANOVA) 検定と Tukey 検定による事後検定を行い、その他のデータにはノンパラメトリック Kruskal-Wallis 検定と Dunn 検定による事後検定を行った。エラスチン破壊度の変数の統計学的有意性を示すために χ^2 二乗検定を行った。全てのデータは Prism 6.0 (GraphPad Software, USA) で分析した。P 値 < 0.05 を統計学的有意であるとみなした。

5. 結果

FAK の発現と活性が AAA で増強している

FAK が AAA 病変で活性化しているかどうか検証するために開腹 AAA 手術を行った患者から採取したヒト大動脈壁標本中のリン酸化 FAK と total FAK を定量した。FAK は正常径大動脈組織と比較して AAA 組織で著しく増加し、活性化していた (Fig. 1A)。また、ヒトの AAA 瘤壁における FAK の分布を検討し、病理組織学的変化との関連について分析した。活性化型 FAK は主に AAA 瘤壁の中膜外側から外膜にかけて存在し、特に細胞浸潤と組織破壊の強い領域に分布していた (Fig. 1B)。免疫蛍光染色では活性化 FAK は主に外膜の CD68 陽性細胞と共存していたが、中膜の α -smooth muscle actin (α -SMA) 陽性平滑筋細胞とはほとんど共存していなかった (Fig. 1C, D)。

AAA の実験モデルで FAK の活性化を実証するために、腎動脈下大動脈周囲に塩化カルシウム (CaCl_2) を塗布する AAA マウスモデルを作製した [18,19,24,25]。この処置を行うことで、大動脈壁における炎症細胞浸潤と段階的な弾性線維層の破壊が誘導され、処置後 6 週間にわたって持続する。無処置マウスと比較して CaCl_2 処置マウスの大動脈壁では、FAK の発現と活性化がともに増強していた。ヒト AAA 瘤壁の所見と同様に、活性化型 FAK は病変部大動脈の中膜と外膜で観察された (Fig. 2A, B)。

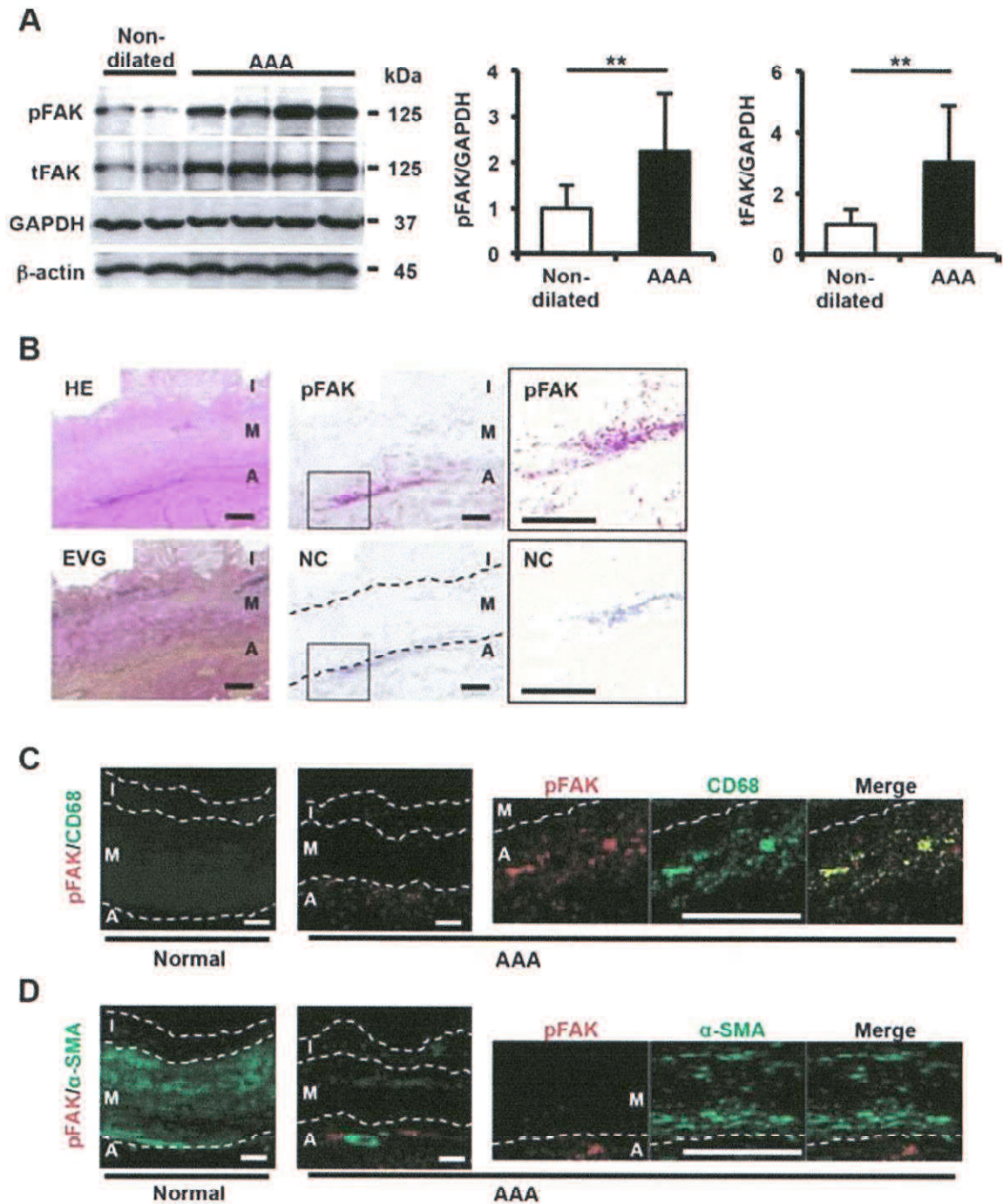


Figure 1. FAK はヒト動脈瘤組織中に存在するマクロファージで活性化している。
 (A) 標本は動脈瘤 (AAA, n=28) と正常径 (n=8) のヒト大動脈壁から採取した。(左) 抽出タンパク質のウェスタンブロットは抗リン酸化 FAK (pFAK) 抗体と抗 total FAK (tFAK) 抗体を用いて行った。GAPDH と β-actin をローディングコントロールとして用いた。(右) バンドを定量化したもの。値は平均値±標準偏差、**P<0.01、Mann-Whitney U 検定で示した。(B) hematoxylin/eosin (HE)、Elastica-van Gieson (EVG)、抗 pFAK 抗体で染色したヒト AAA 瘤壁切片の病理組織学的分析。NC は陰性対照。スケールバーは 200 μm。I は内膜、M は中膜、A は外膜を表す。黒い点線は内弾性板、外弾性板を表す。(C, D) 正常なヒト大動脈壁切片とヒト AAA 瘤壁切片での pFAK (赤)、CD68 (緑)、α-smooth muscle actin (α-SMA、緑) の免疫蛍光染色である。白い点線は層の境界を示す。スケールバーは 200 μm。

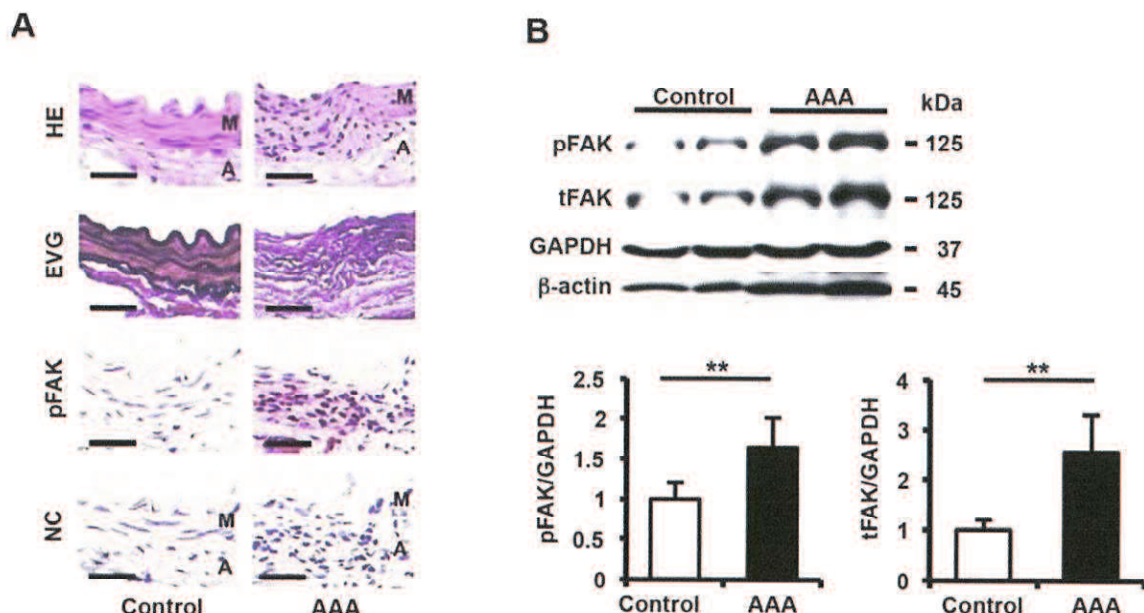


Figure 2. FAK は大動脈瘤マウスモデルで活性化している

雄の C57BL/6 マウスの大動脈周囲に CaCl_2 を塗布することにより大動脈瘤 (AAA) マウスを作製した (n=6)。対照のマウスとして無処置のマウスを用いた (n=5)。(A) hematoxylin/eosin (HE)、Elastica-van Gieson (EVG)、抗リン酸化 FAK (pFAK) 抗体で染色した大動脈の病理組織学的分析。NC は陰性対照。スケールバーは $30 \mu\text{m}$ 。M は中膜、A は外膜を表す。(B) 大動脈標本から組織抽出物を作成した。(上) 抗リン酸化 FAK (pFAK) 抗体と抗 total FAK (tFAK) 抗体を用いて、抽出物をウェスタンブロットで分析した。GAPDH と β -actin をローディングコントロールとして用いた。(下) 定量化分析 (n=5-6)。値は平均値±標準偏差、**P<0.01、pFAK/GAPDH は Mann-Whitney U 検定、tFAK/GAPDH は Student's t 検定を用いた。

FAK は $\text{TNF-}\alpha$ 刺激によるマクロファージの炎症を増強する

AAA 病変中のマクロファージで FAK の発現と活性が増強していることがわかり、FAK が AAA に関連する炎症の過程でマクロファージの機能を制御しているかどうかを検証することにした。まず、チオグリコレートで誘導したマウス腹腔マクロファージを回収し、培養した。次に炎症誘発刺激として tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) の効果を検証した。特に $\text{TNF-}\alpha$ は、AAA 患者の血清中でも大動脈壁組織中でも増加しており [26,27]、AAA 病態に関連があるとされている [28]。 $\text{TNF-}\alpha$ で培養マウスマクロファージを刺激すると、15 分以内に JNK と nuclear factor-kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) の活性化を惹起するが、これらの分子は AAA 病態にとって重要である [18,29]。その後、 $\text{TNF-}\alpha$ の刺激により FAK の発現と活性が有意に増強し、このことが 24 時間後にも持続してみられる JNK や $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性化や MMP-9 や MCP-1 の産生に繋がっている (Fig. 3A)。JNK 阻害剤 SP600125 の投与で $\text{TNF-}\alpha$ により誘発される JNK や $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性化と MMP-9 や MCP-1 の産生が阻害されるが、 $\text{TNF-}\alpha$ で処理したマクロファージ中の FAK の発現と活性の増強には影響しなかった (Fig. 3B-G)。一方、FAK 阻害剤 PF573228 は $\text{TNF-}\alpha$ で誘発される FAK の活性化と発現増加、JNK と $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性化、MMP-9 と MCP-1 の分泌を完全に阻害した。しかし、PF573228 は細胞増殖や細胞死には影響を与えなかった

(Fig. 4A-I)。これらの結果から、FAK シグナルを増強し、引き続いて JNK や NF- κ B を活性化し、MMP-9 や MCP-1 を増加させていく正のフィードバックが存在することが示唆された。さらにこれらの現象は他の 2 種類の FAK 阻害剤 PF562271、FAK inhibitor 14 や、レンチウイルス誘導 shRNA による FAK 阻害によっても確認された (Fig. 5, 6, 7)。

培養マクロファージでの結果をさらに拡充するため、ヒト AAA の *ex vivo* 培養組織に PF573228 を投与した。我々の以前の研究結果と同様に、TNF- α で刺激するとヒト AAA 組織からの MMP-9 分泌が有意に増加した [18,30]。この結果から、ヒト AAA 組織の *ex vivo* 培養条件で TNF- α 刺激後でも生存能力は維持されることが示唆された。興味深いことに、TNF- α 刺激によるヒト AAA 組織からの MMP-9 や MCP-1 の分泌は PF573228 投与により著明に減少した (Fig. 8)。以上の結果から、少なくとも TNF- α 刺激の条件下では FAK が自らの発現と活性を増強し、JNK シグナルを活性化することにより MMP-9 や MCP-1 の分泌を促進していることが示された。

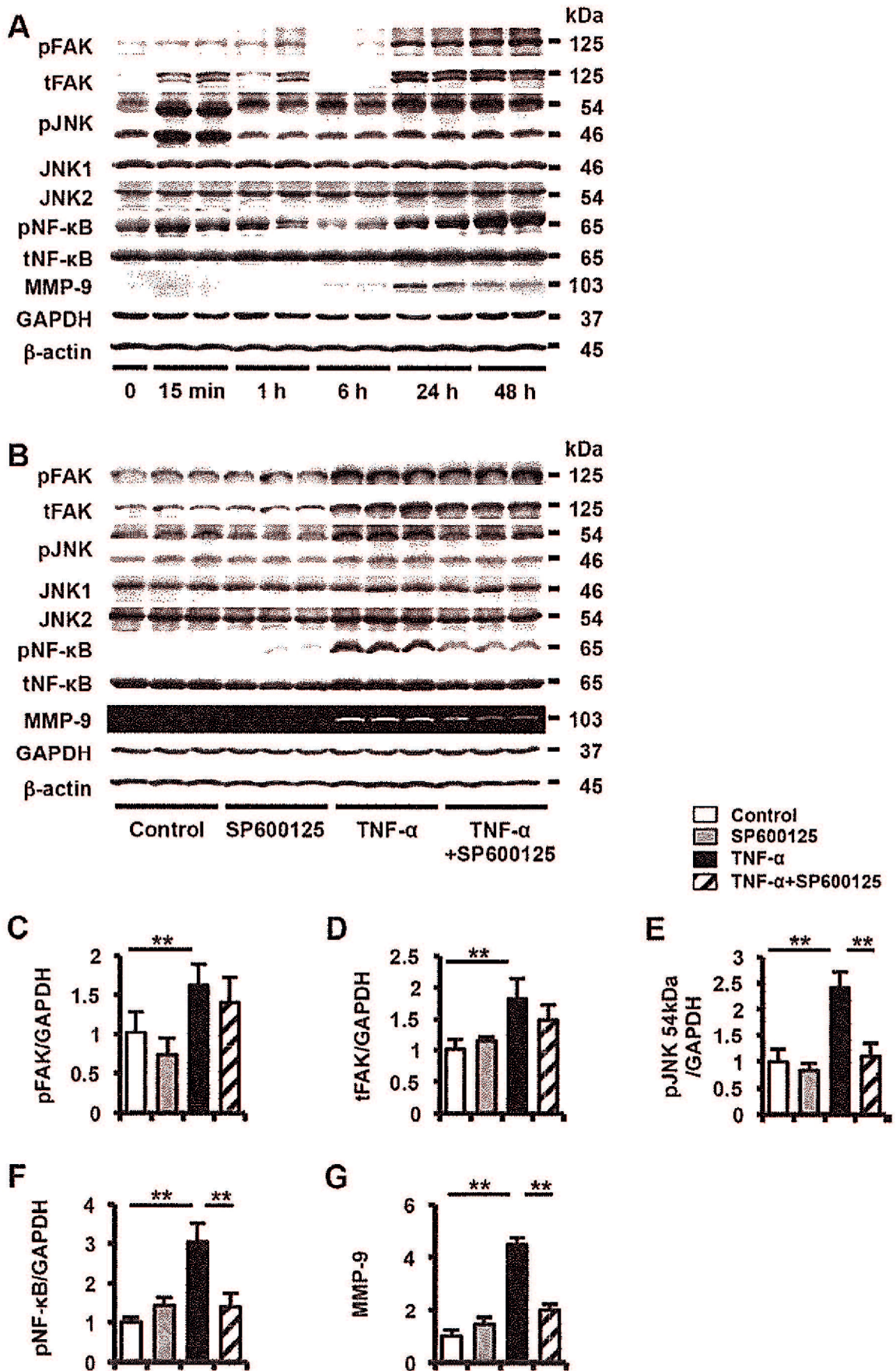


Figure 3. FAK は JNK 活性と無関係にマクロファージの TNF- α 刺激で活性化する

(A) マウス腹腔マクロファージを 15 分、1 時間、6 時間、24 時間、48 時間 TNF- α で刺激した。各タンパク質について細胞抽出物のウェスタンブロット分析を行った。GAPDH

と β -actin をローディングコントロールとして用いた。データは 3 つの独立した実験のうちの代表的なものである。(B) マウス腹腔マクロファージを 20 μ M SP600125 で処理し、TNF- α で 24 時間刺激した (n=6)。各タンパク質について細胞抽出物のウェスタンブロット分析を行った。MMP-9 はゼラチンザイモグラフィーで示した。GAPDH と β -actin をローディングコントロールとして用いた。(C-G) (C) リン酸化 FAK (pFAK)、(D) total FAK (tFAK)、(E) リン酸化 JNK (pJNK) 54 kDa、(F) リン酸化 NF- κ B (pNF- κ B) の定量化を行った (n=6)。培養上清中の (G) MMP-9 のタンパク量をゼラチンザイモグラフィーで定量した (n=6)。値は平均値 \pm 標準偏差、**P<0.01、one-way analysis of variance と Tukey 事後検定で示した。

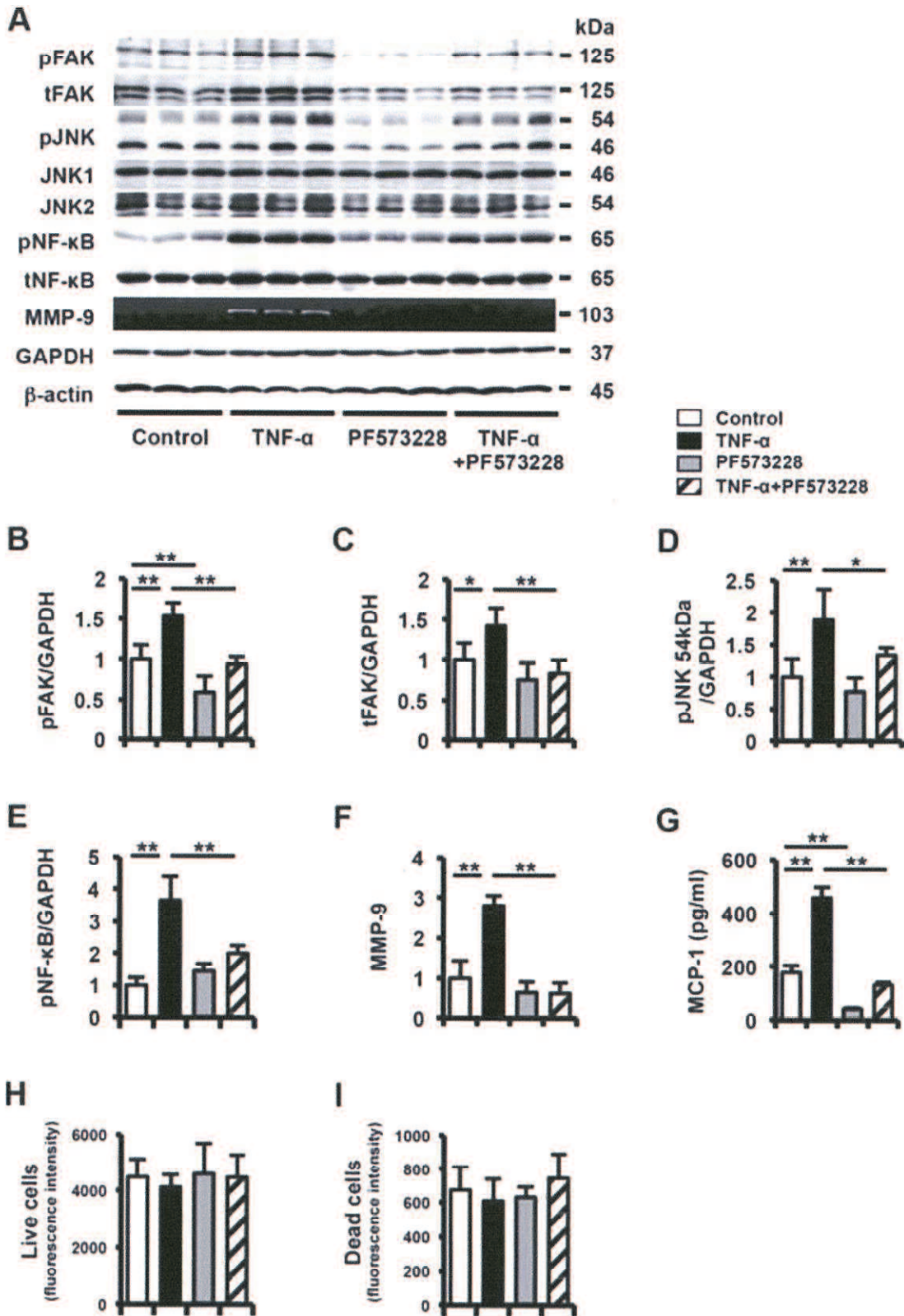


Figure 4. FAK は TNF- α を介するマクロファージの炎症反応を制御している
 マウス腹腔マクロファージを PF573228 (20 μ M) で処理し、TNF- α で 24 時間刺激した (n=6)。(A) 抽出タンパク質のウェスタンブロットは各タンパク質の抗体を用いて行った。MMP-9 はゼラチンザイモグラフィで検出した。GAPDH と β -actin をローディングコントロールとして用いた。(B-I) バンドを定量化したもの。(B) リン酸化 FAK (pFAK)、(C) total FAK (tFAK)、(D) リン酸化 JNK (pJNK) (54kDa)、(E) リン酸化 NF- κ B (pNF- κ

B) (n=6)。培養上清の中の (F) MMP-9 と (G) MCP-1 のタンパク量をそれぞれゼラチンザイモグラフィと ELISA で検出した (n=6)。(H, I) 生細胞および死細胞を LIVE/DEAD viability/cytotoxicity assay で定量化した (n=6)。値は平均値±標準偏差、*P<0.05、**P<0.01、one-way analysis of variance と Tukey 事後検定で示した。

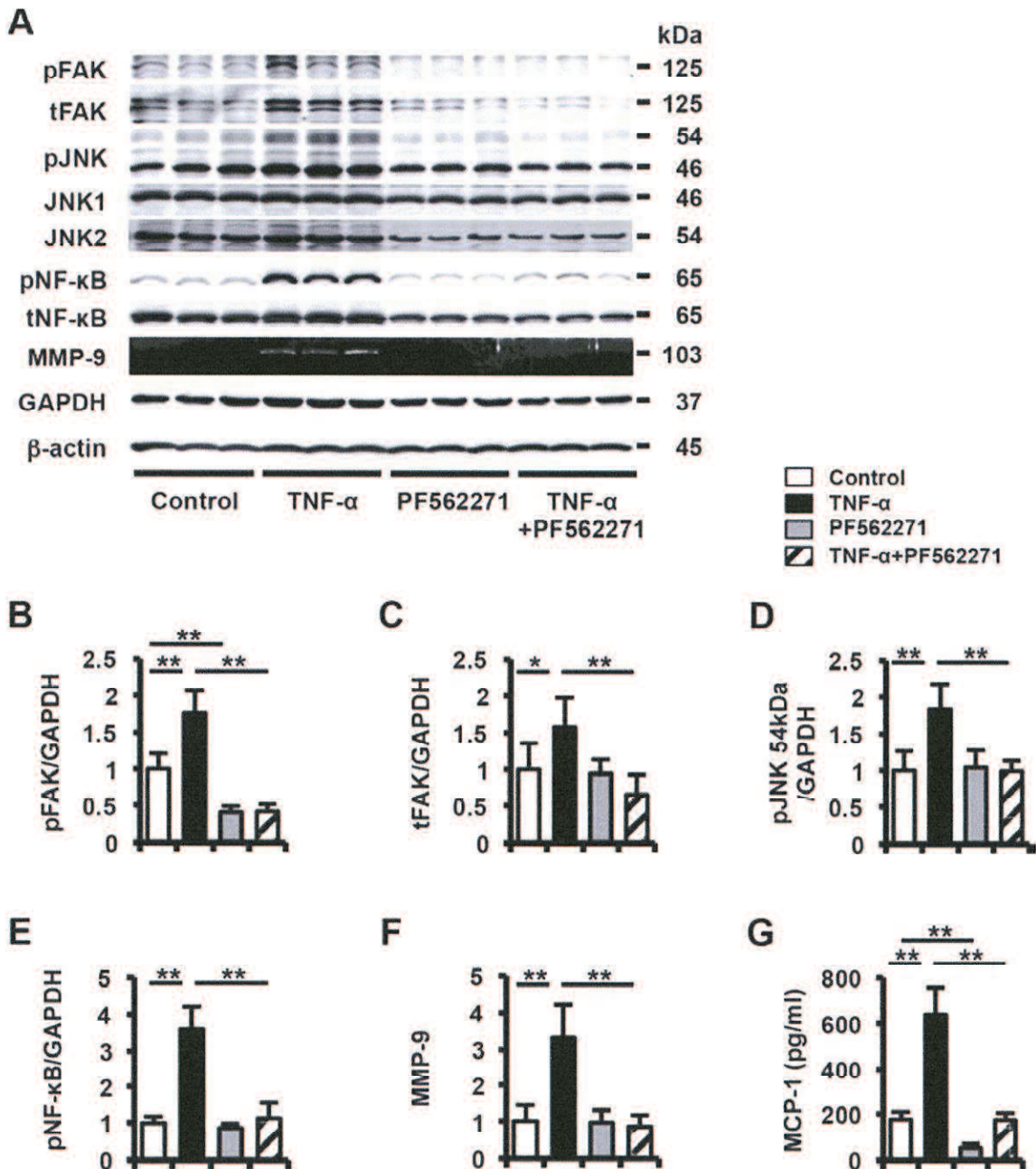


Figure 5. PF562271 は TNF- α を介するマクロファージの炎症反応を抑制する
 マウス腹腔マクロファージを PF562271 (5 μ M) で処理し、TNF- α で 24 時間刺激した (n=6)。(A) 細胞抽出物のウェスタンブロットで各タンパク質を定量した。MMP-9 はゼラチンザイモグラフィで示した。GAPDH と β -actin をローディングコントロールとして用いた。(B-G) (B) リン酸化 FAK (pFAK)、(C) total FAK (tFAK)、(D) リン酸化 JNK (pJNK) 54kDa、(E) リン酸化 NF- κ B (pNF- κ B) の定量分析を行った (n=6)。培養上清中の (F) MMP-9 と (G) MCP-1 のタンパク量をそれぞれゼラチンザイモグラフィと ELISA で検出した (n=6)。値は平均値±標準偏差、*P<0.05、**P<0.01、one-way analysis

of variance と Tukey 事後検定で示した。

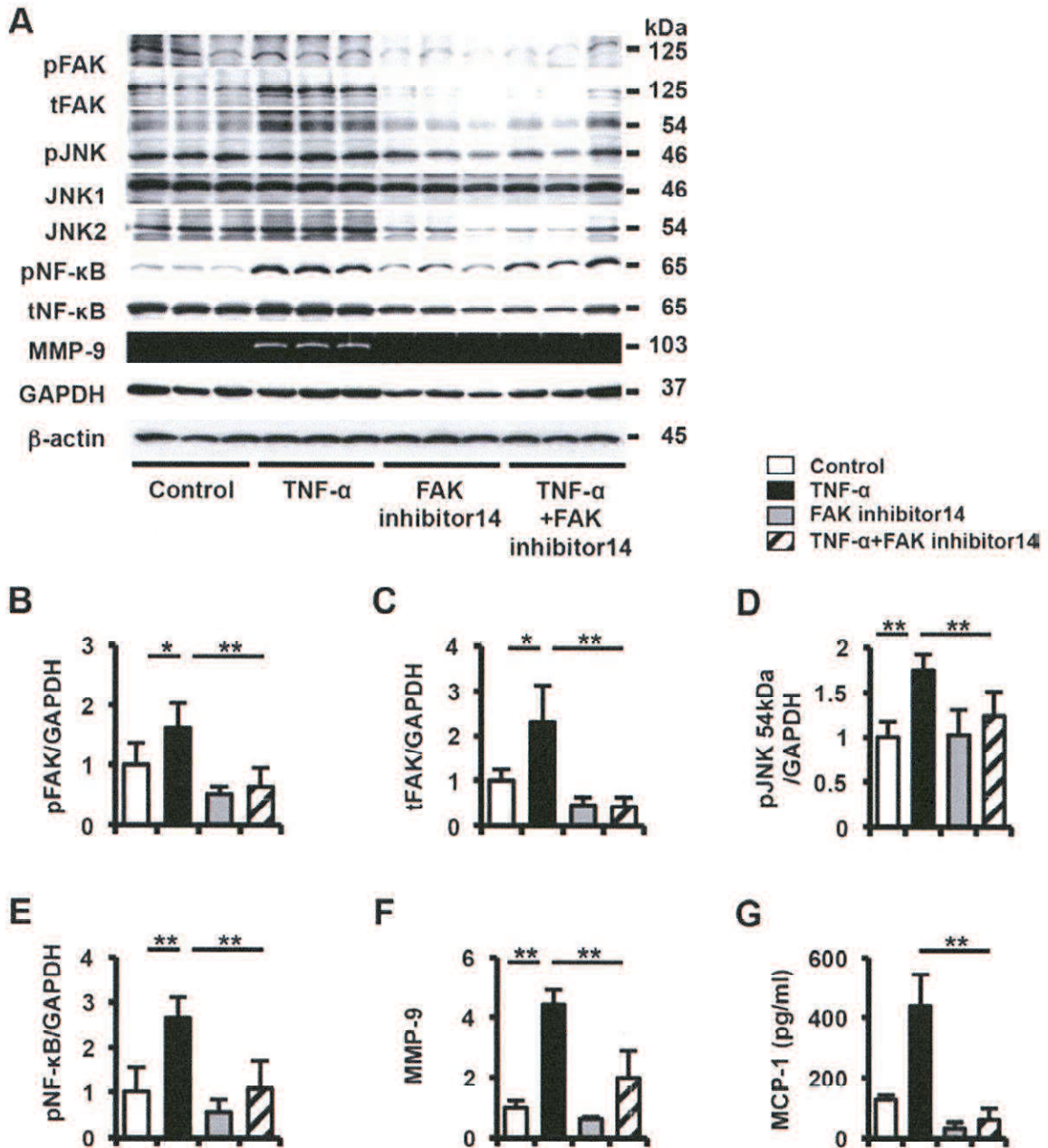


Figure 6. FAK inhibitor 14 は TNF- α を介するマクロファージの炎症反応を抑制する
 マウス腹腔マクロファージを FAK inhibitor 14 (70 μ M) で処理し、TNF- α で 24 時間刺激した (n=6)。(A) 細胞抽出物のウェスタンブロットで各タンパクを定量した。MMP-9 はゼラチンザイモグラフィーで示した。GAPDH と β -actin をローディングコントロールとして用いた。(B-G) (B) リン酸化 FAK (pFAK)、(C) total FAK (tFAK)、(D) リン酸化 JNK (pJNK) 54kDa、(E) リン酸化 NF- κ B (pNF- κ B) の定量分析を行った (n=6)。培養上清中の (F) MMP-9 と (G) MCP-1 のタンパク量をそれぞれゼラチンザイモグラフィーと ELISA で検出した (n=6)。値は平均値 \pm 標準偏差、*P<0.05、**P<0.01、Kruskal-Wallis 検定と Dunn 事後検定で示した。

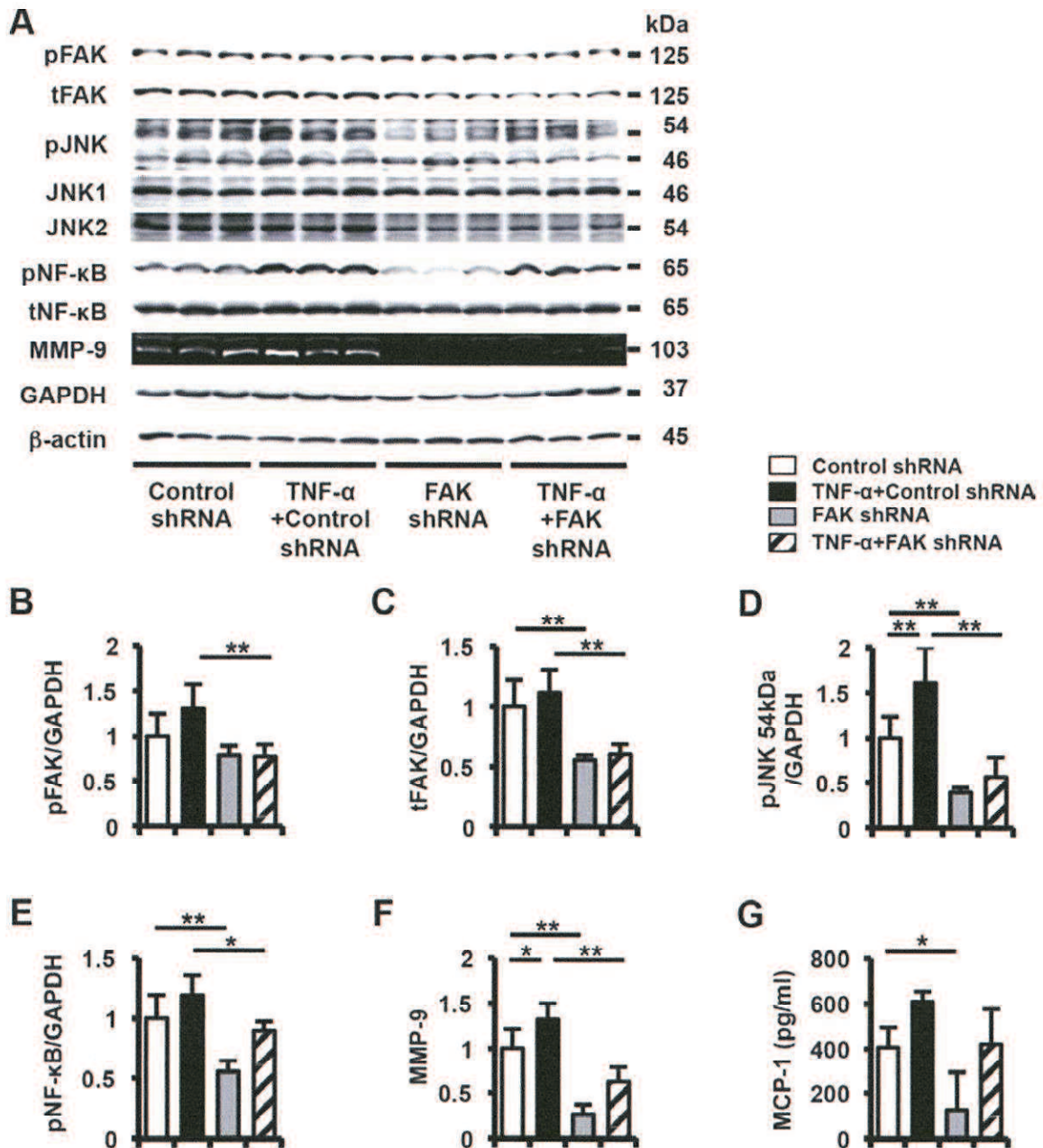


Figure 7. レンチウイルスを介する shRNA による FAK 阻害は TNF- α を介するマクロファージの炎症反応を抑制する

マウス腹腔マクロファージに FAK shRNA と対照のレンチウイルス粒子を導入し、TNF- α で 24 時間刺激した (n=6)。(A) 細胞抽出物のウェスタンブロットで各タンパク質を定量した。MMP-9 はゼラチンザイモグラフィで示した。GAPDH と β -actin をローディングコントロールとして用いた。(B-G) (B) リン酸化 FAK (pFAK)、(C) total FAK (tFAK)、(D) リン酸化 JNK (pJNK) 54kDa、(E) リン酸化 NF- κ B (pNF- κ B) の定量分析を行った (n=6)。培養上清中の (F) MMP-9 と (G) MCP-1 のタンパク量をそれぞれゼラチンザイモグラフィと ELISA で検出した (n=6)。値は平均値 \pm 標準偏差、*P<0.05、**P<0.01、one-way analysis of variance と Tukey 事後検定で示した。

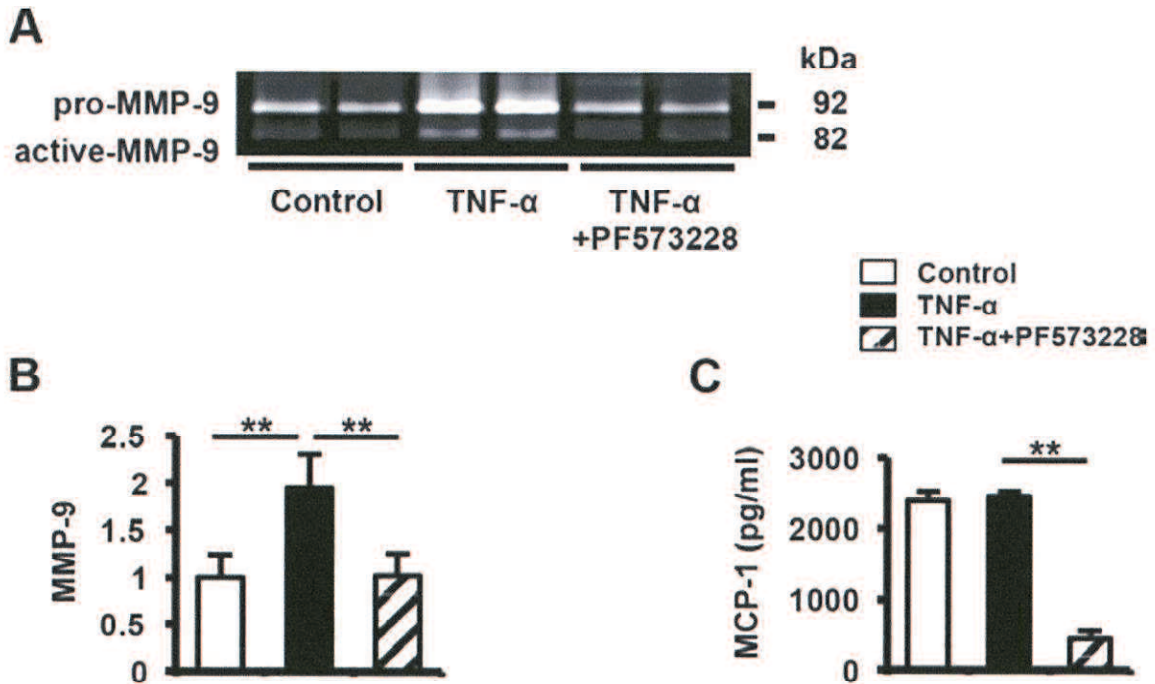


Figure 8. FAK はヒト大動脈瘤組織において TNF- α を介する炎症反応を制御する
ヒト大動脈瘤 (AAA) 組織を小片に刻み、PF573228 (20 μ M) で処理して TNF- α で 48 時間刺激した (n=6)。 (A) MMP-9 活性をゼラチンザイモグラフィーで示した。 (B, C) 培養上清中の (B) MMP-9 と (C) MCP-1 のタンパク量をそれぞれゼラチンザイモグラフィーと ELISA で検出した (n=6)。値は平均値 \pm 標準偏差、**P<0.01、one-way analysis of variance と Tukey 事後検定で示した。

FAK の活性化はマウスの AAA 形成に必要である

次に我々は、CaCl₂ の大動脈周囲への塗布によって AAA を誘発させるマウスモデルを用いて in vivo での AAA 病態に FAK が大きく関与するかどうかを検討した。ヒトの AAA の臨床においては薬物的介入が妥当であるため、この問題を検証するに当たり FAK の薬物的阻害を選択した。CaCl₂ の塗布に続き、PF573228 または溶媒のみを 6 週間投与した。対照群に対し疑似処置として生理食塩水 (NaCl) を塗布した (Fig. 9A)。実験を通して、これらの群間に体重変化の差はなく、どの群にも死亡や創傷治癒遅延はなかった。灌流固定後の大動脈を形態分析すると、疑似処置群に比較して溶媒投与群で大動脈径の有意な拡大を示した (Fig. 9B, C)。拡大した大動脈には、中膜と外膜の炎症細胞浸潤と中膜弾性線維層の破壊がみられ (Fig. 9D)、ヒトの AAA の病理組織学的特徴 [10,31] と一致していた。PF573228 投与により CaCl₂ で誘導される大動脈拡大が完全に抑制され (Fig. 9B, C)、細胞浸潤と弾性線維層の破壊が著しく抑えられた (Fig. 9D, E)。さらに、大動脈壁中の F4/80 陽性細胞数として定量化したマクロファージの集積は PF573228 により有意に減少し、MMP-9 と MMP-2 のタンパク量も定量化した (Fig. 9F-H)。これらの結果から、持続的な FAK 阻害により AAA 形成過程でのマクロファージの炎症反応を抑制することができることが示唆された。従って FAK は CaCl₂ で誘導される AAA の形成に必要であることがわかった。

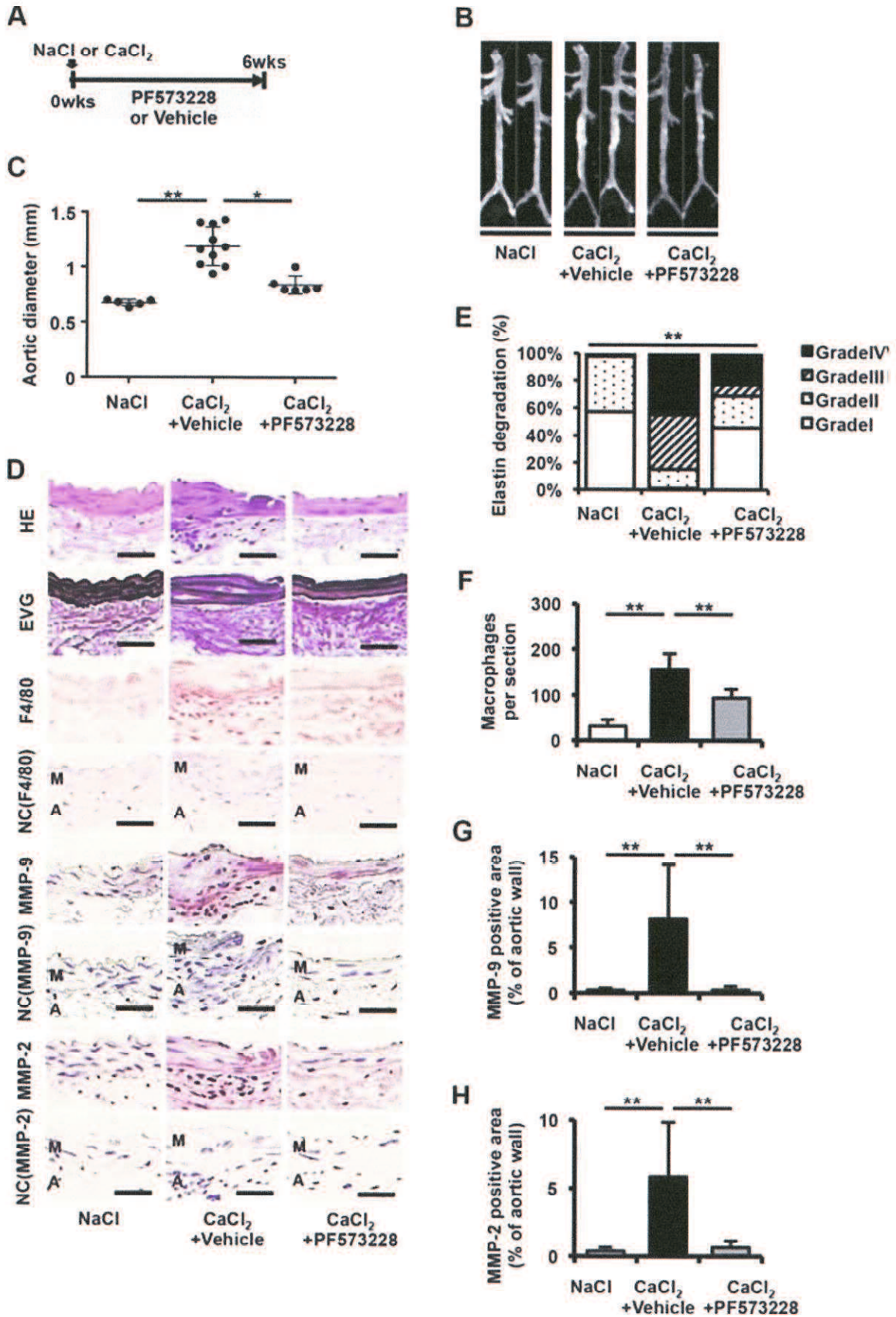


Figure 9. FAK 阻害剤 PF573228 はマウスの大動脈瘤形成を抑制する

(A) 6 週齢、雄の C57BL/6 マウスの大動脈周囲に CaCl₂ を塗布した後、PF573228 (n=6) または溶媒のみ (n=10) を 6 週間投与した。対照のマウスとして CaCl₂ の代わりに NaCl (n=5) を塗布した。(B) NaCl または CaCl₂ 処置後 6 週のマウス大動脈。(C) NaCl または

CaCl₂ 処置後 6 週の腎動脈下大動脈最大径の定量化 (n=5-10)。値は平均値±標準偏差、*P<0.05、**P<0.01、Kruskal-Wallis 検定と Dunn 事後検定で示した。(D) それぞれ処置したマウスの大動脈切片の病理組織学的分析。切片を hematoxylin/eosin (HE)、Elastica-van Gieson (EVG)、抗 F4/80 抗体、抗 MMP-9 抗体、抗 MMP-2 抗体で染色した。NC は陰性対照。スケールバーは 30 μm。M は中膜、A は外膜を表す。(E) 中膜エラスチンの破壊度は以下のように分類した。EVG 染色切片 (各群でマウス 5-10 匹、各マウスで 8 切片) をもとに、破壊なしまたは軽度 (grade I、白)、中等度 (grade II、点状)、高度 (grade III、斜線)、重度 (grade IV、黒) で分類した。**P<0.01、χ² 二乗検定。(F) F4/80 を細胞標識として用いたマクロファージ数の定量化。細胞数は NaCl または CaCl₂ 処置後 6 週の大動脈切片 (n=5-10) で計測した。NaCl または CaCl₂ 処置後 6 週の大動脈切片 (n=5-10) を (G) MMP-9 または (H) MMP-2 で染色し、染色組織の割合を定量化した。値は平均値±標準偏差、*P<0.05、**P<0.01、Kruskal-Wallis 検定と Dunn 事後検定で示した。

FAK の中途阻害は動脈瘤進展を抑制する

我々は次に、FAK が AAA 進展時期のさらなる大動脈拡大を抑えられるかどうかを検討した。つまり、動脈瘤が既に存在している AAA 患者に治療を行っている実臨床と合致させることを考えた。この目的に対して、マウスに CaCl₂ 塗布後 3 週間待ち、その後 3 週間続けて PF573228 を投与した (Fig. 10A)。以前の報告にあるように、CaCl₂ で誘導した AAA マウスモデルはヒト AAA の進展過程で見られる主な特徴をもつ点で特に良いモデルである [16,21,24]。実際に、CaCl₂ で処置したマウス大動脈は 3 週間後に軽度拡大しており、6 週目まで大動脈径の拡大が続く (Fig. 10B, C)。さらに、CaCl₂ 処置 3 週間後の大動脈に炎症細胞浸潤と弾性繊維の破壊がみられ、その病変はその後の 3 週間でさらに増悪した (Fig. 10D)。そこで CaCl₂ 処置 3 週間後から PF573228 を投与すると、CaCl₂ 塗布後 4 週目から 6 週目までの期間の大動脈拡大が抑えられた (Fig. 10A, B)。また、PF573228 を投与すると 4 週目から 6 週目までの期間の大動脈壁のさらなる細胞浸潤、特にマクロファージの集積とエラスチンの破壊が著明に抑えられた (Fig. 10D, E, F)。さらに、PF573228 を投与すると CaCl₂ 処置後 4 週目から 6 週目までの期間の MMP-9 と MCP-1 の増加を阻害した (Fig. 10D, G, I)。一方で MMP-2 の増加は阻害されなかった (Fig. 10D, H)。以上の結果から、FAK を薬物的に阻害すると、大動脈周囲への CaCl₂ 塗布で AAA を誘導したマウスモデルにおいて小径 AAA からの進展を止められることが示された。

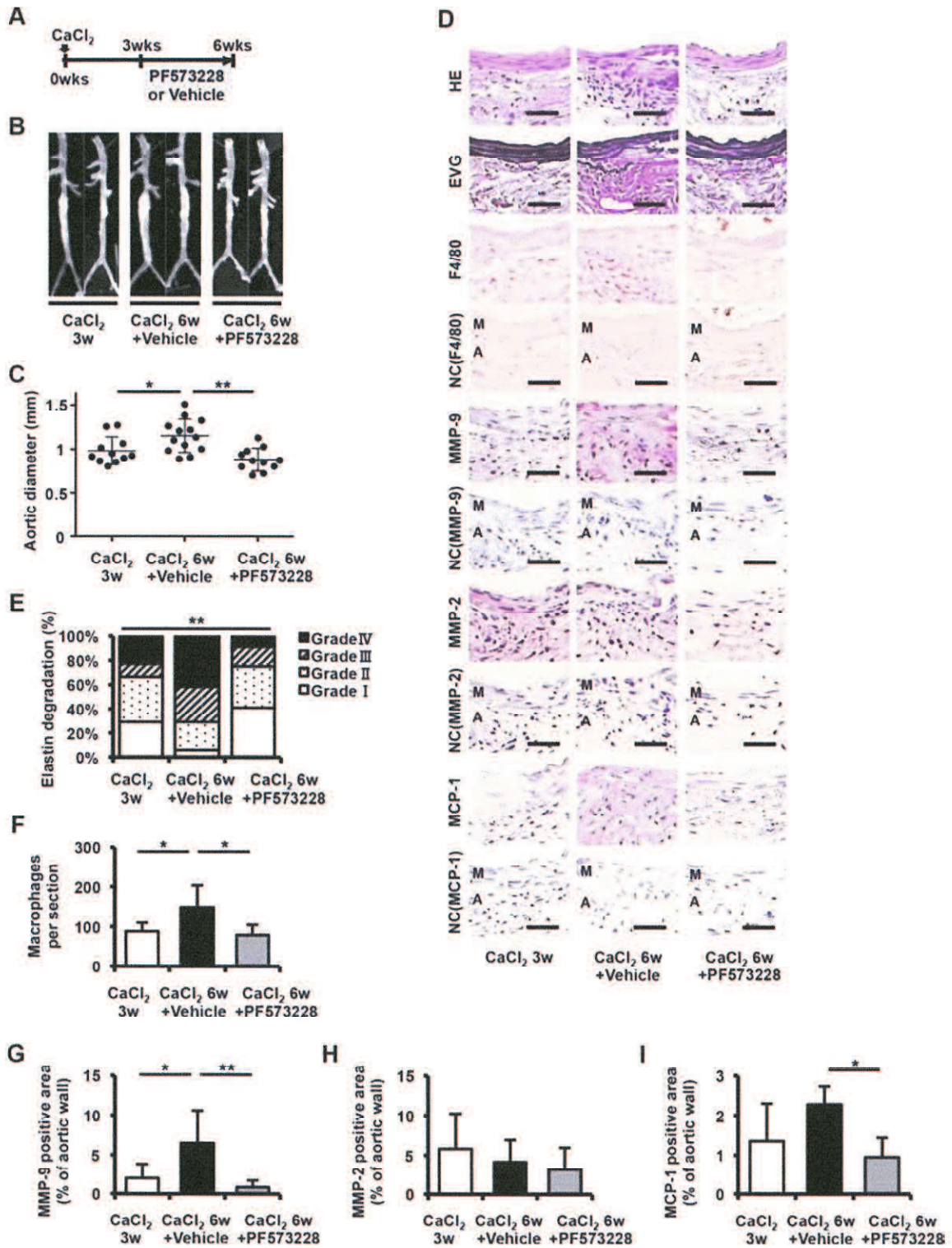


Figure 10. FAK 阻害剤 PF573228 はマウスの動脈瘤進展を抑制する

(A) 6 週齢、雄の C57BL/6 マウスの大動脈周囲に CaCl₂ を塗布した 3 週後に PF573228 (n=11) または溶媒のみ (n=13) を 3 週間投与した。マウス大動脈を CaCl₂ 処置の 6 週後に解析し、治療的介入の有無による AAA の進展を評価した。治療的介入前後の比較のため、CaCl₂ 処置の 3 週後のマウス大動脈を解析した。(B) CaCl₂ 処置の 3 週後または 6 週後のマウス大動脈。(C) CaCl₂ 処置の 3 週後または 6 週後の腎動脈下大動脈最大径を定量化した (n=11-13)。値は平均±標準偏差、*P<0.05、**P<0.01、one-way analysis of variance と Tukey 事後検定で示した。(D) hematoxylin/eosin (HE)、Elastica-van Gieson (EVG)、

抗 F4/80 抗体、抗 MMP-9 抗体、抗 MMP-2 抗体、抗 MCP-1 抗体で染色した大動脈の病理組織学的分析。NC は陰性対照。スケールバーは 30 μ m。M は中膜、A は外膜を表す。(E) 中膜エラスチン破壊度を EVG 染色切片 (各群でマウス 11-13 匹、各マウスで 8 切片) をもとに、破壊なしまたは軽度 (grade I、白)、中等度 (grade II、点状)、高度 (grade III、斜線)、重度 (grade IV、黒) で分類した。** $P < 0.01$ 、 χ 二乗検定。(F) CaCl_2 処置の 3 週間または 6 週間後の大動脈壁中の F4/80 陽性細胞 (マクロファージ) を定量化した ($n=6-7$)。 CaCl_2 処置の 3 週間または 6 週間後の大動脈切片 ($n=6-7$) を (G) MMP-9、(H) MMP-2 または (I) MCP-1 で染色し、染色組織の割合を定量化した。値は平均値 \pm 標準偏差、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、one-way analysis of variance と Tukey 事後検定で示した。

FAK はマクロファージの集積を促進する役割を担う

FAK が促進する AAA 進展の基盤となる現象の機序をより深く理解するために、我々は CaCl_2 処置 3 週間まで待つてマウスに PF573228 投与を開始し、4 日間のみ投与を続けた (Fig. 11A)。興味深いことに、PF573228 を短期間投与すると溶媒投与と比較してアポトーシスに影響を与えることなく (Fig. 11D) 大動脈壁内へのマクロファージの集積が減少した (Fig. 11B, C)。

これらの結果から、FAK は AAA の病態の過程でマクロファージの運動能を制御しているという仮説を立てた。この仮説を立証するにあたり、チオグリコレートで誘導したマウス腹腔から採取したマクロファージの走化性とマウス脾臓単球の走化性を FAK が制御することを検証するために *in vitro* でトランスウェル遊走実験を行った。特に MCP-1 の存在下で膜を通過して遊走する細胞数を定量化した。興味深いことに、PF573228 で処理するとどちらの細胞でも MCP-1 が誘引する走化性が著明に阻害された (Fig. 11E, F)。この結果から、FAK の活性化が MCP-1 に向かうマクロファージや単球の走化性に必要不可欠であることが示された。

また、我々は FAK の阻害でマクロファージの機能が包括的に抑制され、意図しない免疫抑制効果を持つかもしれないという臨床的問題について検討した。特に、蛍光粒子を取り込んだマクロファージの細胞数を定量化することで貪食能の程度を検証した。これにより PF573228 を投与しても一般的な条件下でのマクロファージの貪食能は損なわれないことがわかった。これらの結果は、他の 2 種類の FAK 阻害剤 PF562271、FAK inhibitor 14 を用いた実験でも裏付けられた (Fig. 12)。

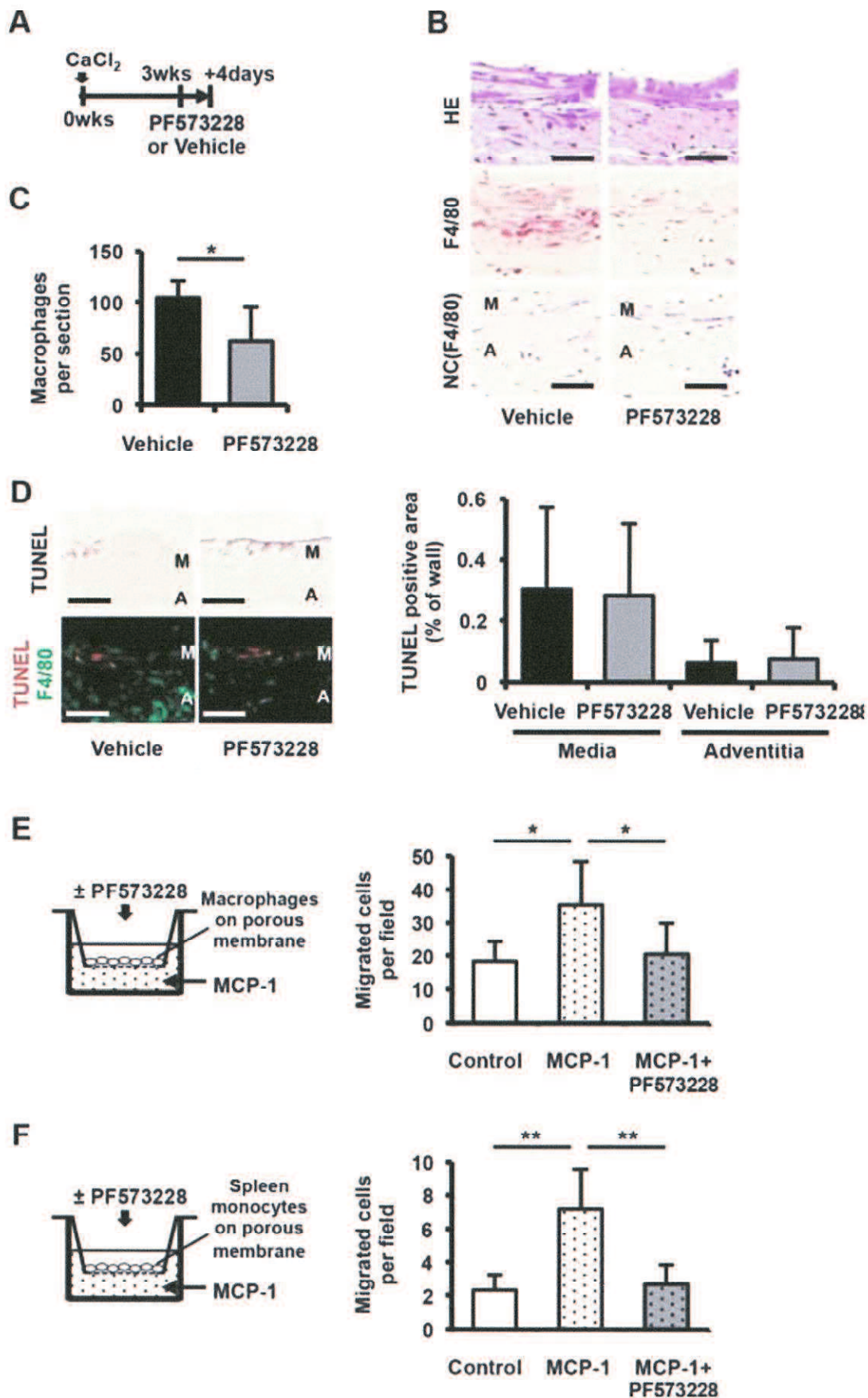


Figure 11. FAK はマウスでのマクロファージの集積と *in vitro* でのマクロファージの遊走を制御している

(A) 雄の C57BL/6 マウスの大動脈周囲に CaCl₂ を塗布した 3 週後に PF573228 (n=8) ま

たは溶媒のみ (n=6) を 4 日間投与した。(B) hematoxylin/eosin (HE) または抗 F4/80 抗体で染色した大動脈の病理組織学的分析。NC は陰性対照。スケールバーは 30 μm 。(C) 処置後の大動脈壁中の F4/80 陽性細胞 (マクロファージ) を定量化した (n=6-8)。値は平均値 \pm 標準偏差、*P<0.05、Student's t 検定で示した。(D) TUNEL 染色および TUNEL (赤) と F4/80 (緑) の免疫蛍光染色により大動脈壁切片上のアポトーシス細胞を検出した。スケールバーは 30 μm 。M は中膜、A は外膜を表す。処置後の染色組織の割合を中膜と外膜で別々に定量化した (n=6-8)。値は平均値 \pm 標準偏差、Mann-Whitney U 検定で示した。(E) マウス腹腔マクロファージと (F) マウス脾臓単球を無血清培養液に懸濁して Transwell 装置の上のチャンバーに 10 ng/ml MCP-1 の存在下で 20 μM PF573228 を加えた。2 時間後、下のチャンバーに遊走した細胞数を定量化した。値は平均値 \pm 標準偏差、*P<0.05、**P<0.01、one-way analysis of variance と Tukey 事後検定で示した。

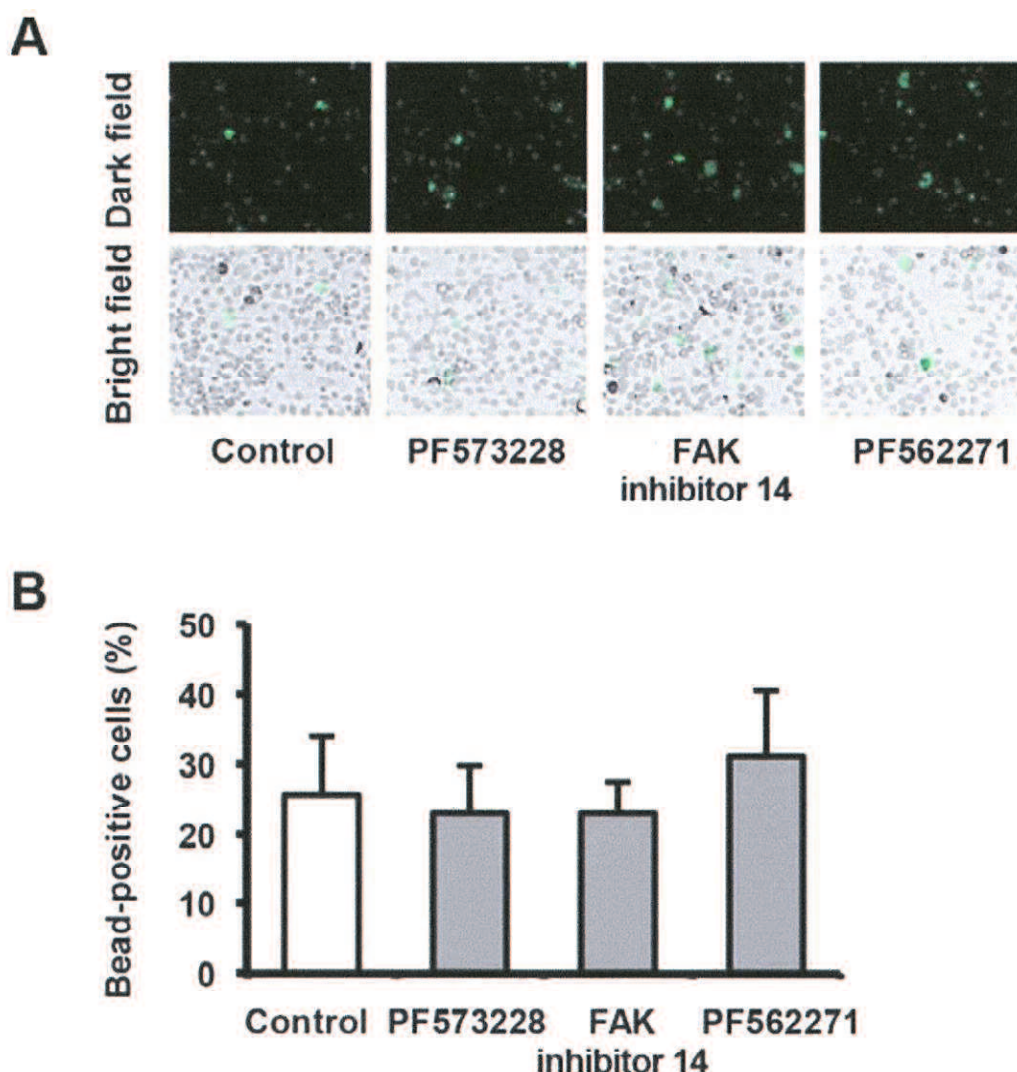


Figure 12. マクロファージの貪食能は FAK 活性とは関連しない

マウス腹腔マクロファージを FAK 阻害剤 (PF573228、FAK inhibitor 14、PF562271) で 1 時間処理し、蛍光粒子を加えて 2 時間培養した (n=9)。(A) 暗視野で粒子を取り込んだマクロファージのみを示し、明視野で全てのマクロファージを示している。(B) 粒子貪食細胞の定量 (n=9)。値は平均値 \pm 標準偏差で示した。各処置群に統計学的な有意差はなかった (Kruskal-Wallis 検定)。

6. 考察

FAK がマクロファージの炎症誘発性機能を制御し、それにより持続する大動脈の炎症と AAA の進展を促進する重要な制御分子であることを本研究で初めて実証した。ヒトの組織標本を用い、AAA 病変部、特にそこに集積したマクロファージで FAK の発現と活性が増強していることを示した。マウスマクロファージを用いた *in vitro* の実験では、FAK が MCP-1 と MMP-9 の分泌を刺激し、MCP-1 に対する走化性を促進的に制御していることを明らかにした。マウスモデルでは、FAK を薬物的に阻害するとマクロファージの集積が抑えられ、AAA の進展を阻害した。これらの結果より、FAK は AAA 患者の薬物治療の新しい標的となることが強く示唆される。

とりわけ、FAK 阻害は効果的に AAA の進展を抑えた。我々は、この現象の基礎にある機序を理解するために、まず実験的に AAA を誘導したマウスの大動脈壁を病理組織学的に検証した。FAK を阻害すると、明らかに大動脈拡大の直接の原因である弾性線維層の破壊が抑えられた。MMP、特に MMP-9 が介在する過剰なエラスチン分解が AAA の形成、進展に重要な要素であり [10,32]、マクロファージが AAA 瘤壁で MMP-9 を分泌する主な細胞であると考えられている [33,34]。この研究で、FAK がマクロファージでの MMP-9 分泌増加に必須であることを明らかにした。したがって、FAK を阻害すると、少なくとも部分的には MMP-9 を抑えることで、弾性線維破壊を減少させたと考えられる。さらに、FAK はマクロファージ集積を増幅させるマクロファージの MCP-1 分泌促進に必須であることを示した。線維性疾患において FAK が線維芽細胞の MCP-1 分泌を刺激しマクロファージを動員することが以前に報告されている [35]。また、MCP-1 は AAA の血管炎症の増幅に重要な役割を担っている [36,37]。つまり、これらの結果から FAK-MCP-1 系がマクロファージ集積の促進に重要な役割を担っており、それが AAA の形成、進展において重要な事象であることが示唆された [38]。

この研究における予期せぬ結果は、FAK の短期間阻害で AAA 瘤壁に集積したマクロファージが急速に減少したことである。これによりマクロファージ集積には FAK-MCP-1 系以外の機序が関与していることが示唆された。一般的に、組織中のマクロファージ数は浸入と退出のバランスを反映している。FAK は以前より細胞の運動能を制御していると考えられてきた [12,13]。実際、走化性シグナルを含む様々な刺激に反応して遊走する細胞の運動能を FAK が制御していると考えられている [39]。本研究で我々は、FAK を阻害するとマクロファージや単球の MCP-1 に対する走化性を減少させることを見出した。この結果から FAK が MCP-1 分泌と MCP-1 に対する走化性を増強することでマクロファージ浸潤の促進に重要な役割を担っていることが示された。このことは、骨髄系細胞特異的 FAK ノックアウトマウスにおいてチオグリコレートで誘導した腹膜炎部位への単球やマクロファージの浸潤が抑えられたという以前の研究結果によって支持される [40]。その明確な機序は完全には明らかになっておらず、FAK がマクロファージの大動脈からの退出にも関連している可能性がある。とはいえ、これらの結果は FAK が炎症部位におけるマクロファージ集積を持続、増幅することに重要な役割を担っていることを暗に示している。

本研究におけるもう一つの予期せぬ結果は FAK の活性と発現が TNF- α で刺激された

マクロファージとヒト AAA 大動脈壁で増強されていたことである。NF- κ B や Nanog を含むいくつかの転写因子が FAK のプロモーター活性を増加させることが報告されている [41-43] が、FAK 発現を増強する機序は、特にマクロファージにおいてはあまりわかっていない。一方、インテグリン受容体を介する細胞接着によって FAK が二量体を形成し、自己リン酸化することはよく知られている [11,12,43]。最近の研究では、受容体チロシンキナーゼ、サイトカイン受容体、細胞内 pH の上昇、機械的刺激などで FAK が活性化されることが明らかにされている [13,16,43]。我々の研究では、炎症部位や AAA 病変で増加している主要なサイトカインである TNF- α が AAA 組織中のマクロファージでの FAK の発現と活性の増強に関与していることが示唆された。

さらに重要なことは、AAA の動物モデルには 2 つの病期がある。ひとつ目はモデルに特異的な初期の形成期であり、ふたつ目はヒトの疾患の特徴に近い、進展期である [18,19,25]。実験の全期間にわたる介入では進展期と初期形成期の効果を分けて評価することはできない。特に本研究では、マウスモデルにおいて病期を限定して FAK を阻害することで、既存の AAA のさらなる進展を効果的に抑えることができることを証明した。さらに、ヒト AAA 組織の *ex vivo* 培養においても FAK 阻害の効果があることを示した。これらのデータは FAK 阻害がヒトの AAA 進展を止めるための重要な効果を持つということを強く裏付けている。

我々は、JNK を阻害するとマウスで形成された AAA が退縮することを以前に報告した [18]。本研究では FAK の阻害でマクロファージの TNF- α 刺激による JNK の活性化を完全に抑制した。対照的に、JNK の阻害は FAK の活性化を抑制しなかった。これらのデータから FAK は AAA 組織中の炎症誘発性のマクロファージの反応を制御するという点では JNK よりも強く影響しており、AAA の治療において FAK 阻害は JNK 阻害より効果的である可能性が示された。

FAK の阻害は AAA の治療戦略としてさらに 2 つの利点がある。一つ目は、本研究において FAK 阻害治療のバイオマーカー候補として MMP-9 と MCP-1 が同定されたことである。実践的な AAA の薬物治療を進めるためには治療効果の指標が必要であるので、このことは利点となる [5,44]。二つ目はいくつかの FAK 阻害剤で抗がん治療の第 1 相、第 2 相臨床試験が進行中である。したがって、AAA 患者に対する FAK 阻害剤の効果、安全性の確認にさらなる研究は必要であるものの、薬物的 FAK 阻害剤が近いうちに臨床において使用可能になることが期待できる。

7. 結語

本研究では、マクロファージの集積を促進し、持続的な炎症を引き起こす AAA の新たな機序を提示した。阻害剤のオフターゲット効果の可能性については検討の余地が残されているものの [45,46]、薬物的に FAK を阻害すると、炎症誘発性のマクロファージの機能を制御することでマウスの AAA 進展を阻止できることが実証された。FAK 阻害治療は、致命的な疾患である AAA の治療において手術以外の治療法となると期待される。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました山口大学大学院器官病態外科学講座（第一外科）濱野公一教授に深謝申し上げます。また、実験のご指導を頂いた山口大学大学院器官病態外科学講座（第一外科）吉村耕一先生に感謝します。

9. 参考文献

- [1] Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *The Lancet* 2005; 365: 1577-1589.
- [2] Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, van Herwaarden JA, Halt PJE, van Keulen JW, Rantner B, Schlösser FJV, Setacci F, Ricco JB. Management of Abdominal Aortic Aneurysms Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2011; 41, Supplement 1, S1-S58.
- [3] Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, Golzarian J, Grnik HL, Halperin JL, Jaff MR, Moneta GL, Olin JW, Stanley JC, White CJ, White JV, Zierler RE. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of patients with peripheral artery disease (Updating the 2005 Guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2011; 124: 2020-2045.
- [4] Golledge J, Norman PE. Current status of medical management for abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 2011; 217: 57-63.
- [5] Yoshimura K, Aoki H. Recent advances in pharmacotherapy development for abdominal aortic aneurysm. *Int J Vasc Med* 2012; 2012: 648167.
- [6] Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg* 2002; 39: 110-230.
- [7] Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2605-2613.
- [8] Aoki H, Yoshimura K, Matsuzaki M. Turning back the clock: regression of abdominal aortic aneurysms via pharmacotherapy. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85: 1077-1088.
- [9] Golledge J. Targeting chemokines in aortic aneurysm: could this be key to a novel therapy for a common problem? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 670-672.
- [10] Tedesco MM, Dalman RL. Arterial Aneurysms. In: Cronenwett JL, Johnston KW, eds. *Vascular Surgery* Philadelphia: Saunders; 2010: 117-130.
- [11] Hanks SK, Ryzhova L, Shin NY, Brabek J. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2003; 8: d982-996.
- [12] Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2005; 6: 56-68.
- [13] Zhao X, Guan JL. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced drug delivery reviews* 2011; 63: 610-615.
- [14] McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nature reviews. Cancer* 2005; 5: 505-515.

- [15] Siesser PM, Hanks SK. The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006; 12: 3233-3237.
- [16] Yamashita O, Yoshimura K, Nagasawa A, Ueda K, Morikage N, Ikeda Y, Hamano K. Periostin links mechanical strain to inflammation in abdominal aortic aneurysm. *PLoS One* 2013; 8: e79753.
- [17] Varadarajulu J, Laser M, Hupp M, Wu R, Hauck CR. Targeting of alpha(v) integrins interferes with fak activation and smooth muscle cell migration and invasion. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005; 331: 404-412.
- [18] Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, Hoshii Y, Tanaka N, Ricci R, Ishihara T, Esato K, Hamano K, Matsuzaki M. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-jun n-terminal kinase. *Nat Med*. 2005;11:1330–1338.
- [19] Aoki H, Ohno S, Furusho A, Nishihara M, Nishida N, Hirakata S, Yoshimura K. Mouse model of abdominal aortic aneurysm induced by cacl2. In: Sata M, ed. *Mouse models of vascular diseases*. Tokyo: Springer Japan; 2016:211–225.
- [20] Ricci R, Sumara G, Sumara I, Rozenberg I, Kurrer M, Akhmedov A, Hersberger M, Eriksson U, Eberli FR, Becher B, Boren J, Chen M, Cybulsky MI, Moore KJ, Freeman MW, Wagner EF, Matter CM, Luscher TF. Requirement of jnk2 for scavenger receptor a-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science (New York, N.Y.)*. 2004;306:1558–1561.
- [21] Ueda K, Yoshimura K, Yamashita O, Harada T, Morikage N, Hamano K. Possible dual role of decorin in abdominal aortic aneurysm. *PLoS One*. 2015;10:e0120689.
- [22] Nagasawa A, Yoshimura K, Suzuki R, Mikamo A, Yamashita O, Ikeda Y, Tsuchida M, Hamano K. Important role of the angiotensin ii pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res*. 2013;183:472–477.
- [23] Hamblin M, Chang L, Zhang H, Yang K, Zhang J, Chen YE. Vascular smooth muscle cell peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion promotes abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2010;52:984–993.
- [24] Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002; 110: 625-632.
- [25] Wang Y, Krishna S, Golledge J. The calcium chloride-induced rodent model of abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 2013; 226: 29-39.
- [26] Hamano K, Li TS, Takahashi M, Kobayashi T, Shirasawa B, Ito H, Zempo N. Enhanced tumor necrosis factor- alpha expression in small sized abdominal aortic aneurysms. *World J Surg* 2003; 27: 476-480.
- [27] Juvonen J, Surcel HM, Satta J, Teppo AM, Bloigu A, Syrjala H, Airaksinen J, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:

- 2843-2847.
- [28] Xiong W, MacTaggart J, Knispel R, Worth J, Persidsky Y, Baxter BT. Blocking TNF-alpha attenuates aneurysm formation in a murine model. *J Immunol* 2009; 183: 2741-2746.
- [29] Miyake T, Aoki M, Masaki H, Kawasaki T, Oishi M, Kataoka K, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Regression of abdominal aortic aneurysms by simultaneous inhibition of nuclear factor kappaB and ets in a rabbit model. *Circ Res* 2007; 101: 1175-1184.
- [30] Yoshimura K, Nagasawa A, Kudo J, Onoda M, Morikage N, Furutani A, Aoki H, Hamano K. Inhibitory effect of statins on inflammation-related pathways in human abdominal aortic aneurysm tissue. *International journal of molecular sciences* 2015; 16: 11213-11228.
- [31] Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Development of pharmacological therapy for abdominal aortic aneurysms based on animal studies. In: Sakalihasan N, ed. *Aortic aneurysms, new insights into an old problem*. Liège: Édition de l'Université de Liège; 2008.
- [32] Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, Ennis TL, Shapino SD, Senior RM, Thompson RW. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000; 105: 1641-1649.
- [33] Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, Tilson MD. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* 1994; 20: 814-820.
- [34] Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Kojima K, Yano M, Yano Y, Nakamura K, Nakamura-Uchiyama F, Matsushima Y, Imamura T, Onitsuka T, Asada Y, Nawa Y, Eto T, Kitamura K. Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression of abdominal aortic aneurysm. *Circ Res* 2008; 102: 1368-1377.
- [35] Wong VW, Rustad KC, Akaishi S, Sorkin M, Glotzbach JP, Januszyk M, Nelson ER, Levi K, Paterno J, Vial IN, Kuang AA, Longaker MT, Gurtner GC. Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling. *Nature medicine* 2012; 18: 148-152.
- [36] Ishibashi M, Egashira K, Zhao Q, Hiasa K, Ohtani K, Ihara Y, Charo IF, Kura S, Tsuzuki T, Takeshita A, Sunagawa K. Bone marrow-derived monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is critical in angiotensin II-induced acceleration of atherosclerosis and aneurysm formation in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: e174-178.
- [37] Onoda M, Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Morikage N, Furutani A, Matsuzaki M, Hamano K. Lysyl oxidase resolves inflammation by reducing monocyte chemoattractant protein-1 in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 2010; 208: 366-369.
- [38] Mallat Z. Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 2509-2519.

- [39] Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science* 2010; 123: 1007-1013.
- [40] Owen KA, Pixley FJ, Thomas KS, Vicente-Manzanares M, Ray BJ, Horwitz AF, Parsons JT, Beggs HE, Stanley ER, Bouton AH. Regulation of lamellipodial persistence, adhesion turnover, and motility in macrophages by focal adhesion kinase. *The Journal of cell biology* 2007; 179: 1275-1287.
- [41] Golubovskaya V, Kaur A, Cance W. Cloning and characterization of the promoter region of human focal adhesion kinase gene: nuclear factor kappa B and p53 binding sites. *Biochimica et biophysica acta* 2004; 1678: 111-125.
- [42] Ho B, Olson G, Figel S, Gelman I, Cance WG, Golubovskaya VM. Nanog increases focal adhesion kinase (FAK) promoter activity and expression and directly binds to FAK protein to be phosphorylated. *J Biol Chem* 2012; 287: 18656-18673.
- [43] Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature reviews. Cancer* 2014; 14: 598-610.
- [44] Golledge J, Powell JT. Medical management of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 34: 267-273.
- [45] Wynn ML, Ventura AC, Sepulchre JA, Garcia HJ, Merajver SD. Kinase inhibitors can produce off-target effects and activate linked pathways by retroactivity. *BMC systems biology*. 2011; 5: 156.
- [46] Weiss WA, Taylor SS, Shokat KM. Recognizing and exploiting differences between mai and small-molecule inhibitors. *Nature chemical biology*. 2007; 3: 739-744.