

表 題 マルファン症候群モデルマウスにおける胸部大動脈瘤拡大の
スタチンによる抑制機序に関する研究

論 文 の 区 分 論文博士

著 者 名 佐藤 哲也

所 属 自治医科大学附属さいたま医療センター 心臓血管外科

令和3年4月7日申請の学位論文

紹 介 教 員 専攻科 心臓血管外科
職名・氏名 教授 山口 敦司

目 次	頁
要約	3
1. 緒論	6
2. 実験方法	11
2-1 実験動物	11
2-2 薬物治療プロトコール	12
2-3 エコー検査	13
2-4 組織学検査	13
2-5 タンパク質アッセイ <i>in vivo</i>	14
2-6 タンパク質アッセイ <i>in vitro</i>	15
2-7 Ras 活性化アッセイ	17
2-8 MMP 活性アッセイ（ザイモグラフィー）	17
2-9 統計分析	19
3. 結果	19
3-1 マルフアンマウスの大動脈径拡大に対するプレニル化阻害剤の効果	19

3-2 MA (Ras Inhibition) による Fbn1C1039G / + マウスの ERK シグナル伝達抑制効果	22
3-3 スタチンと MA による Ras 依存性 ERK シグナル伝達阻害と MMP 活性抑制効果	24
4 考察	30
5 結論	39
謝辞	40
引用文献	41

要約

背景；マルファン症候群の病態を理解するために、マルファン症候群モデルマウスを用いた解析が広く行われている。以前の報告よりマルファン症候群モデルマウスにおいてスタチン投与の有効性が示されたが、その機序は未だ明らかになっていない。スタチンは血中のコレステロールを低下させるだけでなく、Ras を含む膜結合型 G タンパク質シグナル伝達に関与するファルネシル化とゲラニルゲラニル化をブロックすることが報告されている。そこで本研究ではスタチンによる大動脈径拡大の抑制効果におけるこれらのプレニル化経路の役割について検討した。

方法と結果；スタチンに加え、選択的プレニル化阻害薬として、ファルネシル化阻害薬であるマヌマイシン A（以下、MA）とゲラニルゲラニル化阻害薬であるペリリルアルコール（以下、PA）を使用した。*in vivo* 実験として、マルファン症候群のマウスモデルである Fbn1C1039G / +マウスに、4～8 週齢の期間、以下の薬剤を投与した。（1）プラバスタチン（HMG-CoA [3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A] 還元酵素阻害剤）、（2）MA、（3）PA、（4）溶媒。上行大動脈径を経時的に測定し、12 週で安楽死させ、上行大動脈の組織学

的解析及びタンパク質分析を施行した。プラバスタチン群および MA 群は、溶媒群と比較して上行動脈径の拡大を有意に抑制し (Fbn1C1039G / +溶媒群 ; $1.77 \pm 0.05\text{mm}$ 、MA 群 ; $1.55 \pm 0.06\text{ mm}$ 、 $P = 0.01$ 、各 $n = 8$) が、PA 群は大動脈径の拡大を抑制しなかった ($1.81 \pm 0.06\text{ mm}$ 、 $P = 0.46$ 、 $n=8$)。組織学には、溶媒群と比較して、プラバスタチン群と MA 群は有意にエラスチン断裂が減少した (グループあたり $n = 5$)。また、溶媒群と比較して大動脈標本におけるリン酸化 c-Raf とリン酸化 ERK1 / 2 は、MA 群で有意に減少した ($n = 4-5$)。また、タンパク質分析では、MMP (マトリックスメタロプロテイナーゼ) -2 活性はスタチン群で有意に減少した。*in vitro* 実験として、Fbn1C1039G / +大動脈平滑筋細胞培養液中に、(1) MA、(2) PA、(3) 溶媒を添加後 TGF- β を添加し、細胞内のリン酸化 cRaf およびリン酸化 ERK1 / 2 と培養上清の MMP-2 活性を測定した。MA 添加により Ras 依存性 ERK シグナル伝達と上清中の MMP-2 活性は減少した (各 $n = 5$)。

結語 ; プラバスタチンと MA を投与した Fbn1C1039G / +マウスは動脈瘤の拡大が抑制された。この時、Ras 依存性 ERK シグナル伝達も抑制された。血管平滑

筋細胞では MA は Ras シグナル伝達の抑制に伴い、MMP-2 活性を低下させ

た。

1. 緒論

マルファン症候群は、遺伝性の結合組織障害（FBN1 [フィブリリン 1]変異）に起因し、主に心血管系、眼球系、および筋骨格系に障害をきたす。有病率は 5000～10000 人に 1 人で、75%が常染色体優勢遺伝を呈し、残り 25%は新生突然変異とされる [1]。改訂 Ghent 診断基準（2010）が診断に用いられ、FBN1 変異の証明以外に水晶体偏位、大動脈疾患、手首サイン、親指サインなどの身体的徴候が重要である [2]。マルファン症候群の予後を規定するのは大動脈疾患であり、大動脈基部径の拡大とそれに続く大動脈解離および破裂は、依然として主要な死亡原因であるため [3、4]、予防的な大動脈置換手術が推奨される。2020 年改訂の日本の大動脈瘤・大動脈解離診療ガイドラインでは、大動脈基部または上行大動脈径が 50 mm 以上で class I 手術適応であり、最大径 45 mm 以上の瘤で大動脈解離の危険因子（大動脈解離の家族歴・大動脈拡大速度 > 5 mm/半年・重症の大動脈弁閉鎖不全症）を有する場合、また、妊娠予定の女性で最大径 40 mm 以上の瘤を有する場合には、class IIa 手術適応である [5]。手術治療成績は近年向上しており、特に若年者では自己弁温存大動脈基部手術の実施が推奨されている [5]。

マルファン症候群の原因遺伝子である FBN1 は細胞外マトリックスの構成因子であると同時に、潜在型（不活性型）TGF- β （トランスフォーミング増殖因子- β ）の複合体と結合し、シグナル伝達を調整している。FBN1 の変異により、不活性型 TGF- β が減少することで、恒常的な TGF- β の活性化と大動脈中膜の構造変化が発生し、大動脈径の拡大が誘発されと考えられている。Holmらはマルファンマウスモデルに TGF- β 抗体を用いて、いくつかのシグナル伝達系を解析し、noncanonical ERK（extracellular signal-regulated kinase）を介した TGF- β シグナル伝達の増強が大動脈径拡大に関連していることを報告した [6]。マルファン症候群と類似する身体骨格病変と大動脈病変を特徴とする Loyes-Dietz 症候群は基本的に TGFBR1/TGFBR2 遺伝子変異によるものとされており、そのほか、マルファン症候群に類縁した表現型が TGFB2, TGFB3, SMAD3 遺伝子変異によっても生じることが示されており、TGF- β シグナル伝達の異常が大動脈瘤、大動脈解離の発症に関連していることが示唆されている [7]。

マルファン症候群の薬物療法に関する臨床試験の結果によると β 遮断薬およびアンジオテンシン受容体遮断薬（ロサルタン、イルベサルタン）の有用性

が報告されており [8、9、10]、2020 年改訂版大動脈瘤・大動脈解離の診療ガイドラインでも、大動脈径拡大の予防を目的とした β 遮断薬およびアンジオテンシン受容体遮断薬の投与は推奨クラス I となっている [5]。これらの薬剤における動脈瘤発生抑制の詳細な分子生物学機序はまだ十分に解明されていないが、マルファン症候群マウスモデルにおけるアンジオテンシン II 受容体欠損が大動脈径拡大をもたらすこと、ロサルタンにより選択的にアンジオテンシン I 受容体を阻害すると TGF- β を介した ERK シグナルパスウェイの活性化が抑制され、その結果アンジオテンシン II 受容体が活性化され、大動脈瘤拡大が抑制されると報告された [11]。一方、 β 遮断薬の分子生物学的機序はわかっていないが、臨床研究においてアンジオテンシン II 受容体拮抗薬に β 遮断薬を追加した方がアンジオテンシン II 受容体拮抗薬単剤より大動脈瘤形成速度が低下した報告がある [12、13]。

これらの薬剤以外に、血清コレステロールを低下する作用を有する HMG-CoA (3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A) 還元酵素阻害剤 (スタチン) が、マルファン症候群モデルマウスの大動脈径の拡大を抑制するとの報告が近年なされた [14]。スタチンは、ヒト大動脈二尖弁症例における上行大動

脈の拡大を抑制させることが報告されているが、その分子機構は解明されていない [15、16]。また、スタチンにはヒトにおける腹部大動脈瘤の進展、破裂の抑制効果も報告されている [17]。本作用はスタチンによる抗炎症作用によるものとされているが、胸部大動脈瘤においては、大動脈壁への炎症細胞浸潤の役割は小さいため、抗炎症作用以外の作用機序が推測される。マルファン症候群では必ずしも高血圧や脂質代謝異常を合併せず、マルファン症候群のような遺伝性動脈瘤は、腹部大動脈瘤のような動脈硬化性動脈瘤の病態とは一致しない点が多い。スタチンは、メバロン酸をコレステロールに変換する経路の律速段階である酵素 HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより、コレステロール産生を抑制する。血中コレステロール濃度の低下作用とは独立に、炎症や MMP 活性も低下させ、多面的な生物学的特性を有する [16、18-20]。さらに、HMG-CoA 還元酵素阻害は、コレステロール合成経路の中間産物であるファルネシルピロリン酸 (farnesyl pyrophosphate; 以下、FPP) やゲラニルゲラニルピロリン酸 (geranyl-geranyl pyrophosphate; 以下、GGPP) などのイソプレノイドの産生を抑制し、低分子量 GTP 結合タンパク質 (small G-protein) である Ras、Rac、Rho の活性化に関与している。これらの活性化にはファルネシル化

とゲラニルゲラニル化などのプレニル化が必要であり、FPP や GGPP はその修飾物質である（図 1） [21、22] 。活性化した GTP 結合タンパク質は、GTP と GDP の結合サイクルに必要な GTPase であり、細胞膜周辺に局在することにより細胞の維持、運動性、分泌、増殖などのさまざまなシグナルパスウェイの惹起に不可欠な構成要素とされる。Ras 関連タンパク質は通常ファルネシル化されるが、一部の Ras（K-Ras）や Rho タンパク質はゲラニルゲラニル化される [22] 。

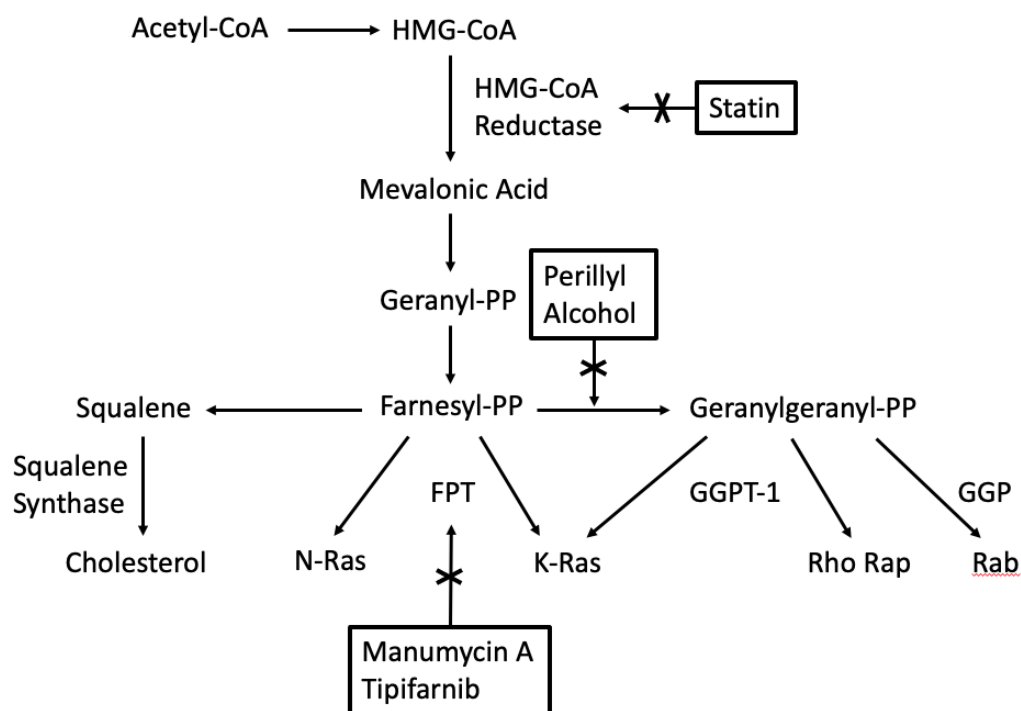


図 1 : HMG-CoA (3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A) からのコレステロール経路およびプレニル化経路の概略図。各阻害剤による経路内の遮断部位を示す。 FPT、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ ; GGPT、ゲラニルゲラニルプロテイントランスフェラーゼ

本研究の目的は、マルファン症候群モデルマウスにおけるスタチンの大動脈拡大抑制の機序を、*in vivo* および *in vitro* 実験により分子細胞レベルで明らかにすることにある。マルファン症候群マウスモデルの動脈瘤予防に対する HMG-CoA 還元酵素阻害と選択的イソプレノイド遮断の有効性を比較し、プレニル化経路の関与の体系的な解析を目指した。また、TGF- β 添加（または処理）後の大動脈平滑筋細胞における低分子量 G タンパク質シグナル伝達と MMP-2 分泌との関係性を検証した。

2. 実験方法

2-1 実験動物

Fbn1C1039G/+マウスは、ジョンズホプキンス大学医学部のハリーC.ディーツ博士より寄贈された動物を使用した。Fbn1C1039G/+マウスはフィブリリン1のミスセンス変異を導入したモデルで、TGF- β シグナルの下流の細胞内シグナル伝達系と動脈瘤発生の関係性など、これまで多くの病態生理の解明に寄与してきた。遺伝的背景を揃えた対照マウス（WT；野生種）として、同腹仔

の C57BL/6J マウス (H-2^{b/b}) を使用した。本実験では、4 週齢のマウス (雄・雌同数) を使用した。大動脈血管平滑筋細胞 (smooth muscle cell; SMC) は、4 週齢の Fbn1C1039G/+および C57BL/6JWT 同腹仔対照マウスから作成した。*in vitro* 実験は、1 グループにつき、4-5 個体からの SMC 採取を行った。SMC の採取は、切除された上行大動脈から内膜と外膜を切除し、残った中膜を可能な限り細かく組織片とし Collagenase type I、Elastase type I、Soybean Trypsin Inhibitor で 16 時間程度インキュベートした。その後、平滑筋細胞用の培養液とともに培養皿に接着させ、継代したものを Passage 4-5 を実験に使用した。

動物実験のプロトコールは、スタンフォード大学実験動物管理委員会によって承認された。プロトコールは、米国国立衛生研究所および米国農務省の研究における動物の世話と使用に関するガイドラインに従った。

2-2 薬物治療プロトコール

Fbn1C1039G/+マウスに対して、4-8 週齢までの 4 週間、以下の薬剤投与を実施した。Fbn1C1039G/+マウス (4 週齢) に対して (1) プラバスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害剤、100 mg/kg/日 PO、溶媒は水)、(2) マヌマイ

シン A (MA; FPT 阻害剤、2.5 mg / kg 隔日 IP、溶媒はエタノール) 、 (3) ペ
リリルアルコール (PA; GGPT1 および-2 阻害剤、5.0 mg / kg 隔日 IP ; エタノ
ール、溶媒はエタノール) 、 (4) コントロール群 (溶媒対象 ; エタノール
0.25ml / kg 隔日 IP) 、 のいずれかを投与した。これらの実験動物は 12 週齢で安
楽死させた (各グループ n = 8) 。尚、プラバスタチン・MA・PA の投与量
は、当研究グループのマウス異所性心移植後の慢性拒絶実験モデルで使用する
投与量で設定した [23] 。

2-3 エコー検査

経胸壁エコー検査は、4 週齢 (ベースライン) ・ 6 ・ 8 ・ 10 ・ 12 週齢で施行し
た。尚、対象動物の割付について盲検化された 2 名の研究者がエコー検査を担
当した。エコー検査は、実験動物に 2% 吸入イソフルランをノーズコーンを介
して投与し、吸入麻酔による鎮静下で施行した。Vevo-2100 エコーシステム
(FUJIFILM Visualsonics) を使用し、傍胸骨長軸像で上行大動脈径が最大となる
部分で各研究者が 3 回ずつ計測し、合計 6 回の測定値の平均値を、大動脈径と
して採用した。

2-4 組織学検査

12 週齢で安楽死させた実験動物から上行大動脈を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。大動脈は tissue-Tek OCT compound histomount (Sakura) に包埋し、サンプルを 4 μ m の断面でスライスし、accustain ElastinVerhoeff VanGieson キット (Sigma Aldrich) で染色した。大動脈は、DM4000B 顕微鏡 (Leica Microsystems) を使用して 40 倍の倍率で画像化した。組織学検査の定量化は、盲検化された病理医が大動脈 1 スライスにおいて全周を観察し、弾性線維 1 薄層あたりのエラスチンの平均断裂数を測定した。さらに各動物からの 3 つの連続したセクションを分析し、個々の動物で平均値を計算し解析に用いた。

2-5 タンパク質アッセイ *in vivo*

組織または細胞からのタンパク質は、放射性免疫沈降アッセイ溶解緩衝液を使用して抽出し、タンパク質濃度は、ビシンコニン酸アッセイによって決定した。タンパク質のリン酸化と発現は Wes システム (Protein Simple) によって

分析した。サンプルは、SimpleWestern サンプルバッファー (Protein Simple; *in vivo* 実験では濃度 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、*in vitro* 実験では 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) と混合することで、還元・変性させた。すべての一次抗体は、Cell Signaling Technology から購入し、下記抗体と濃度で実験を行なった；リン酸化 ERK1 / 2 (pERK1 / 2) (1:50)、ERK 1/2 (1:50)、リン酸化 c-Raf (pRaf1) (1 : 150)、c-Raf1 (1 : 150)、vinculin (1 : 150)。二次抗体と化学発光基質は、少量の 25 ウェルアッセイプレートの指定されたウェルに分注し、すべてのアッセイステップは WES により自動的に実行された。デンストメトリーによる定量化は、標的タンパク質 (pRaf1 および pERK1 / 2) の面積を使用して実行し、ローディングコントロールとして vinculin で補正した。結果は、WT コントロールと比較した変化倍率として示した。本実験には次のグループを用いた。(1) 野生型 (WT ; n = 4)、(2) Fbn1C1039G / +マウスコントロール投与群 (Fbn1 ; n = 5)、(3) Fbn1C1039G / +マウス MA 投与群 (Fbn1 MA ; n = 5)、(4) Fbn1C1039G / +マウス PA 投与群 (Fbn1 PA ; n = 4)。尚、スタチンの下流経路の薬理効果を検証するため、本実験ではスタチン投与群は含めなかった。

2-6 タンパク質アッセイ *in vitro*

前述の通り、血管平滑筋細胞 (smooth muscle cell; SMC) は、4 週齢の Fbn1C1039G / + および C57BL / 6JWT 同腹仔対照マウスの上行大動脈から作成した。*in vivo* と同様 Wes システム (Protein Simple) を使用し、タンパク質定量を自動的に行った。一次抗体の濃度は同様に行った。SMC は SMC 培地 (SmGM-2 Bullet Kit; Lonza) で培養し、実験前に SMC (2.0×10^5 細胞/ mL) growth factor を除去した培地を使用し 24 時間飢餓状態にした。Fbn1C1039G / + SMC を組換え TGF- β または溶媒コントロールとインキュベートし、ERK 活性化率 (pERK/totalERK) を測定した。次に、プレニル化阻害剤が Ras 依存性 ERK 活性化を低下させるかどうかを判断するために、プレニル化阻害剤投与後に TGF- β 刺激を行った。Fbn1C1039G / + SMC における Raf1 および ERK1 / 2 の活性化率を測定した。さらに再現性を確かめるため、MA と類似した FPT 阻害効果を示す tipfarnib を使用した。SMC は、(1) MA (100 nmol / L)、(2) PA (800 μ mol / L)、(3) tipifarnib (5 μ mol / L)、または (4) 溶媒で 45 分間のインキュベート後、マウス組換え TGF- β (5 ng / mL) で 10 分間インキュベートした。さらに MA、PA の TGF- β の ERK 惹起抑制効果を検証するため、既

知の ERK 刺激薬であるイソプロテレノール (0.1 $\mu\text{mol/L}$) を 45 分間追加でインキュベートした。

2-7 Ras 活性化アッセイ

前述の通り、SMC は、4 週齢の Fbn1C1039G / +および C57BL / 6JWT 同腹仔対照マウスの上行大動脈から作成した。尚、下記 *in vitro* 実験に際して、1 グループにつき、4–5 個体からの SMC 採取を行った。実験前に SMC (2.0×10^5 細胞/ mL) を growth factor を除去した培地を使用して 48 時間飢餓状態にした。Ras 活性は、G-Lisa Ras activation assay 生化学キット (Cytoskeleton) で測定した。SMC タンパク質は、細胞溶解バッファーを使用して抽出後、液体窒素で凍結し-80°Cで保存した。SMC は、(1) MA (100 nmol/L)、(2) PA (800 $\mu\text{mol/L}$)、(3) tipifarnib (5 $\mu\text{mol/L}$)、または(4) 溶媒と 45 分間のインキュベート後、マウス組換え TGF- β (5 ng/mL) と 10 分間インキュベートした。

2-8 MMP 活性アッセイ (ザイモグラフィ)

in vitro では Fbn1C1039G / + SMC (2.0×10^5 細胞/ mL) を後述の薬物処理後、SMC 培養上清を収集し、Amicon Ultra-4 遠心フィルター (Ultracel-30K; Millipore Sigma) を使用して濃縮した。MMP ザイモグラフィーアッセイは、Gelatin-Zymography kit (Cosmo Bio) を使用し実施した。濃縮された上清 (10 μ L) を各ウェルに入れ、製造元の指示に従って MMP-2 活性を測定した。実験前に growth factor を除去した培地を使用して 48 時間飢餓状態にした。SMC は、(1) vehicle、(2) MA (100 nmol / L)、(3) PA (800 μ mol/ L) と 45 分間インキュベートした後、マウス組換え TGF- β (5 ng / mL) と 48 時間インキュベートした。さらに ERK シグナル経路が MMP-2 合成に関与することを検証するため、既知の ERK 刺激薬としてイソプロテレノール (0.1 μ mol/L) と 48 時間インキュベートした。実験には、グループごとに 5 つのサンプルを使用した。

in vivo では Fbn1C1039G / +マウスを、4-8 週齢の期間 (1) プラバスタチンまたは (2) 溶媒のいずれかを投与した。動物は 12 週齢で安楽死させた (各グループ $n = 5$)。上行大動脈を採取し、タンパク質を収集し、前述のように、MMP ザイモグラフィーアッセイは Gelatin-Zymography Kit (Cosmo Bio) を使用

し実施した。タンパク質サンプル (6 µg) を各ウェルに入れ、MMP-2 活性を測定した。MMP-2 活性レベルは MMP-2 マーカーの濃さ定量比較し、同腹仔 WT 対照マウスとの倍率差として表した。

2-9 統計分析

統計分析は、SPSS 19.0 (IBM Corp) を用いて実施した。治療群間で大動脈径の拡大パターンを比較する場合、線形混合効果モデルを使用した。2 群間比較には Mann-Whitney 検定、3 群間以上の比較では Kruskal-Wallis 検定を使用し、治療群間における 2 群間の差の検定に関しては、Dann-Bonferroni 検定を用いて行い、非正規分布データとして中央値および 4 分位範囲として表したデータを比較した。P < 0.05 を有意差有りとした。

3. 結果

3-1 マルフアンマウスの大動脈径拡大に対するプレニル化阻害剤の効果

Fbn1C1039G/+および C57BL/6J WT 同腹仔対照マウスの上行大動脈径を、4、6、8、10、および 12 週齢で経胸壁エコー検査を使用して測定した（図 2A；各グループ n = 8）。12 週間までに、Fbn1C1039G/+ マウスの大動脈径は 1.77 ± 0.05 mm に達したが、WT 同腹仔対照では 1.39 ± 0.03 mm であった（ $P < 0.01$ ）。プラバスタチン投与群では、Fbn1C1039G/+マウスの動脈瘤の拡大は有意に減少した（ 1.56 ± 0.03 mm、 $P < 0.01$ ）。マルファン動脈瘤のスタチンによる拡大抑制作用における特定のイソプレノイドの役割をより明確にするために、選択的プレニル化遮断を使用した。MA（FPT 阻害）群は、溶媒群と比較して、Fbn1C1039G/+ マウスにおける動脈瘤拡大を有意に減少させた（ 1.55 ± 0.06 mm、 $P = 0.01$ ）。対照的に、PA（GGPT1 および-2 阻害）群は動脈瘤拡大を有意に変化させなかった（ 1.81 ± 0.06 mm、 $P = 0.46$ ）。ElastinVerhoeff VanGieson 染色による組織学的所見（図 2B および 2C；各グループ n = 5）としては、12 週齢 WT 同腹仔対照の動脈瘤壁と比較して、Fbn1C1039G/+マウスの動脈瘤壁ではエラスチン断裂の増加を認めた（WT、1 薄層あたり 0.4 ± 0.2 断裂；Fbn1C1039G/+、1 薄層あたり 4.2 ± 0.6 断裂、 $P = 0.02$ ）。プラバスタチンと MA は、動脈瘤の拡大の低下と相関して、Fbn1C1039G/+マウスの大動脈壁

におけるエラスチン断裂を有意に抑制した（それぞれ、 2.2 ± 0.5 断裂/薄層、 $P = 0.01$ ；および 2.3 ± 0.4 断裂/薄層、 $P = 0.01$ ）。対照的に、PA 処理した Fbn1C1039G/+マウスではエラスチン断裂に違いは認めなかった（1 薄層あたり 3.3 ± 0.6 断裂）。

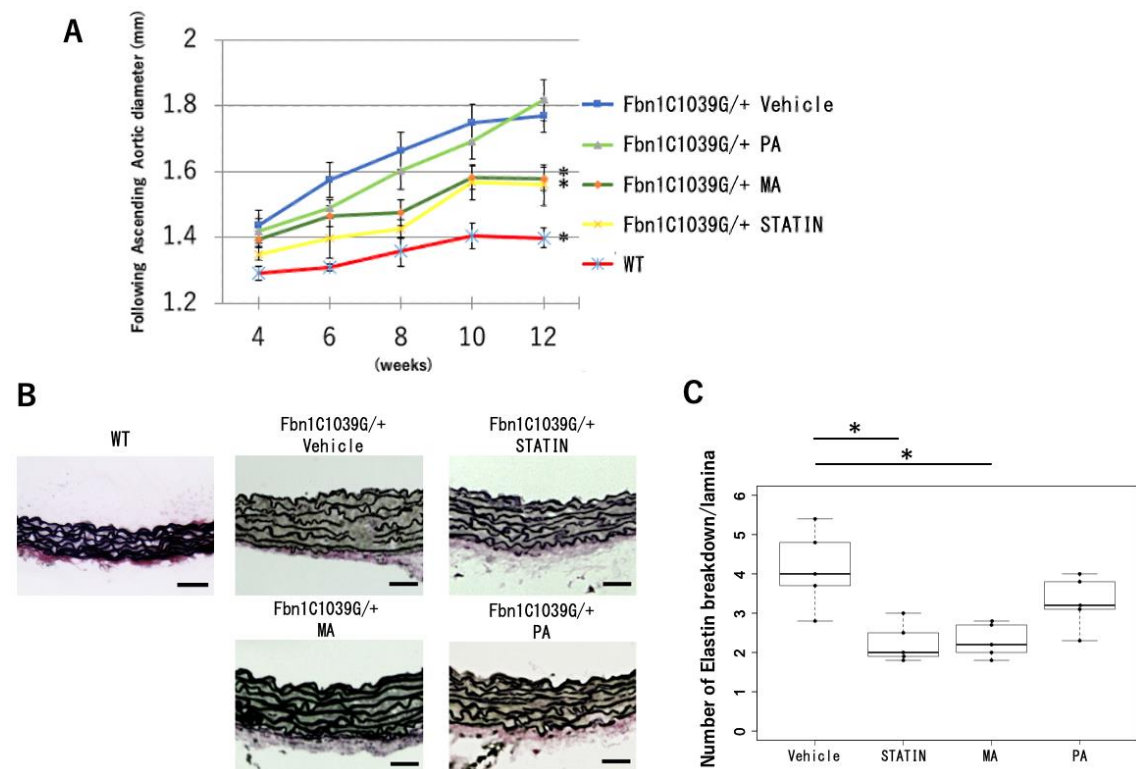


図 2：スタチンまたはプレニル化阻害剤で治療した Fbn1C1039G/+マウスにおける大動脈径の拡大およびエラスチン断裂を示す。A、経胸壁心エコー検査を使用して、WT（野生型）、溶媒（vehicle）およびプラバスタチン（STATIN）、マヌマイシン A（MA）、ペリリルアルコール（PA）を投与された Fbn1C1039G/+マウスの上行大動脈径（mm）（各グループ $n = 8$ ）の時系列データを示す。B、各群のエラスチン薄層破壊を評価した。12 週齢での WT および、vehicle、STATIN、MA、または PA を投与された Fbn1C1039G/+マウスの上行大動脈壁の代表的なエラスチン組織学的染色（Elastin Verhoeff Van

Gieson) を示す。スケールバーは 50 μ m を示す。 C、12 週齢での vehicle、STATIN、MA、または PA を投与された Fbn1C1039G / +マウスの上行大動脈壁 (360°) における 1 薄層あたりのエラスチン平均断裂数を示す。結果は中央値および 4 分位範囲として表した。 *P \leq 0.05、A ; 線形混合効果モデル、C ; Kruskal-Wallis 検定を使用。

3-2 MA (Ras Inhibition) による Fbn1C1039G / + マウスの ERK シグナル伝

達の抑制効果

TGF- β 依存性 ERK シグナル伝達が Fbn1C1039G / +マウスの動脈瘤拡大に重要な役割を果たすことが報告されている [6]。MA は ERK 活性化因子である Ras 活性を低下させるため、MA や PA などのプレニル化阻害剤は ERK シグナル伝達を妨げることにより大動脈径の拡大が抑制されると仮定した。上行大動脈中の Ras シグナル伝達の下流にあるタンパク質 pRaf1 および pERK1 / 2 を Wes で測定した (図 3 ; WT、n = 4; Fbn1C1039G / +溶媒対照、n = 5 ; Fbn1C1039G / +MA、n = 5; Fbn1C1039G / + PA、n = 4)。 WT 同腹仔対照群と比較し Fbn1C1039G / +マウス溶媒対称群で pRaf1 と pERK1 / 2 の両方が有意に上昇していた (pRaf1 : 8.8 \pm 0.8、P = 0.01; pERK1 / 2 : 3.5 \pm 0.2、P = 0.01)。大動脈径拡大の抑制に対応して、pRaf1 および pERK1 / 2 は、Fbn1 C1039G / +溶媒対照

群と比較して MA 投与群 Fbn1C1039G / +マウスで有意に低下した（pRaf1 : MA、 4.1 ± 0.9 ; 溶媒対照、 8.8 ± 0.8 、 $P = 0.02$; pERK1 / 2 : MA、 2.3 ± 0.1 ; 溶媒対照、 3.5 ± 0.2 、 $P < 0.01$ ）。一方、PA 投与群は、Fbn1C1039G / + マウス溶媒対照群と比較し、pRaf1 または pERK1 / 2 の減少は認めなかった（Fbn1 PA : pRaf1 : 6.6 ± 0.8 、 $P = 0.4$; pERK1 / 2 : 2.9 ± 0.1 、 $P = 0.5$ ）。

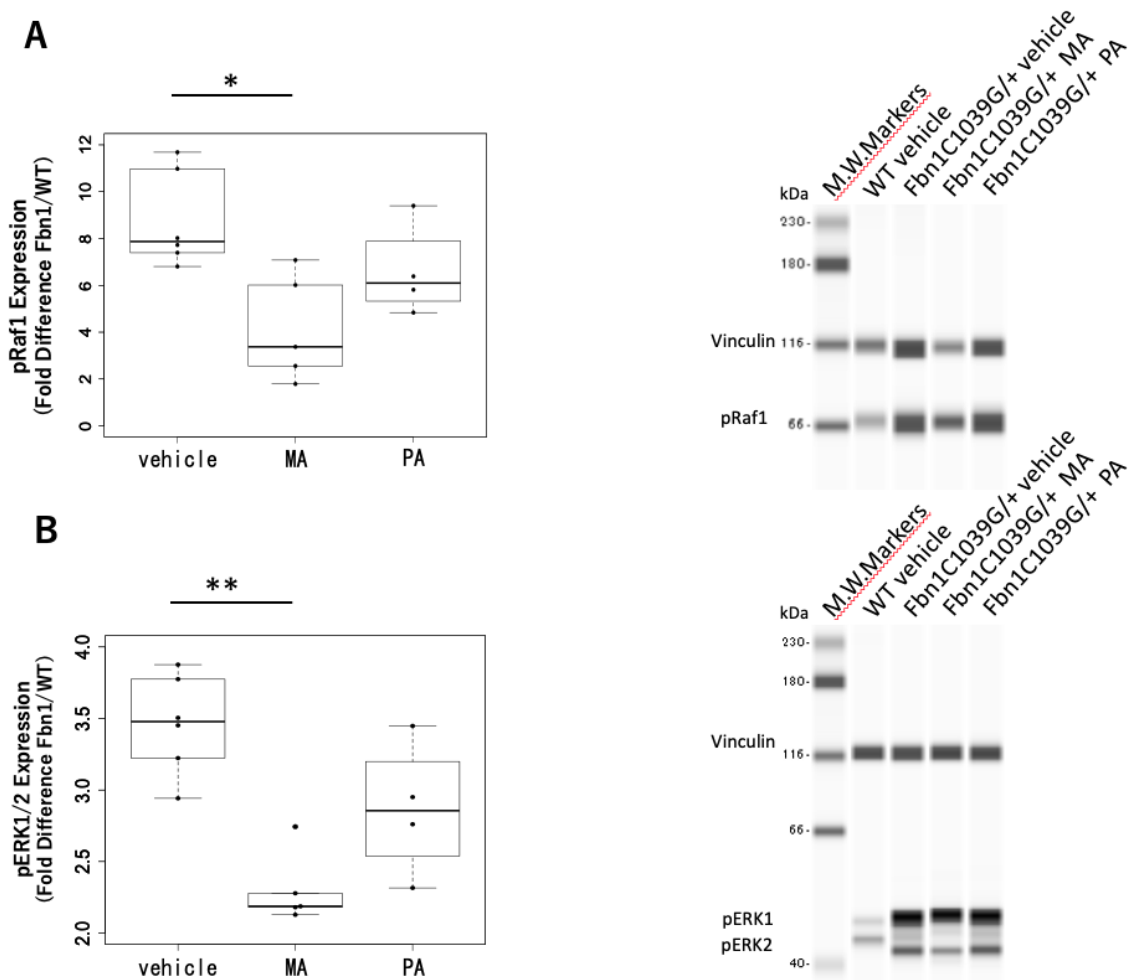


図 3 : プレニル化阻害剤で治療した Fbn1C1039G / +マルフアンマウスにおける ERK (extracellular signal-regulated kinase) シグナル伝達のタンパク質分析を示す。A、溶媒対照 (n = 5)、マヌマイシン A (MA; n = 5)、またはペリリル

アルコール (PA; n = 4) を投与された Fbn1C1039G / + マルフアンマウスを 12 週齢で安楽死させ、上行大動脈標本におけるリン酸化 c-Raf (pRaf1) のタンパク質分析を行った。同腹仔野生型 (WT) 対照マウス (n = 4) と比較した倍率差として表示した。B、上記と同様にリン酸化 ERK1 / 2 (pERK1 / 2) のタンパク質分析を行った。結果は中央値および 4 分位範囲として表した。*P ≤ 0.05。 **P ≤ 0.01。Kruskal-Wallis 検定を使用。

3-3 Fbn1C1039G / + マウスの上行大動脈由来血管平滑筋細胞における MA の

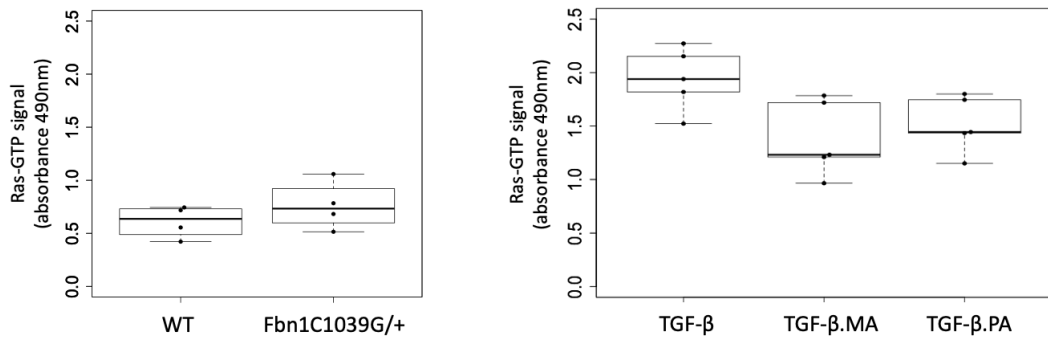
Ras 依存性 ERK シグナル伝達阻害と MMP 活性化抑制効果

マルファンマウス動脈瘤拡大に対するスタチンの保護効果と TGF-β 依存性 ERK シグナル伝達の関連性を解明するために、Fbn1C1039G / + マウスの上行大動脈に由来する血管平滑筋 (SMC) を使用して *in vitro* 実験を実施した。WT および未処理の Fbn1C1039G / + SMC の Ras、Raf、および ERK1 / 2 の活性化率に差は認めなかった (図 4A–C、左)。次に WT または Fbn1C1039G / + SMC を組換え TGF-β とインキュベートし、ERK 活性化を測定した。予備実験結果では、WT / + SMC と Fbn1C1039G / + SMC の TGF-β の反応性が異なり、Fbn1C1039G / + SMC では、TGF-β 投与早期 (10 分後) に pERK が増加する傾向を認めた (各グループ n = 4、図表なし)。次に、プレニル化阻害剤の Ras 依存性 ERK 活性化抑制能を評価するために、MA および PA インキュベート後に

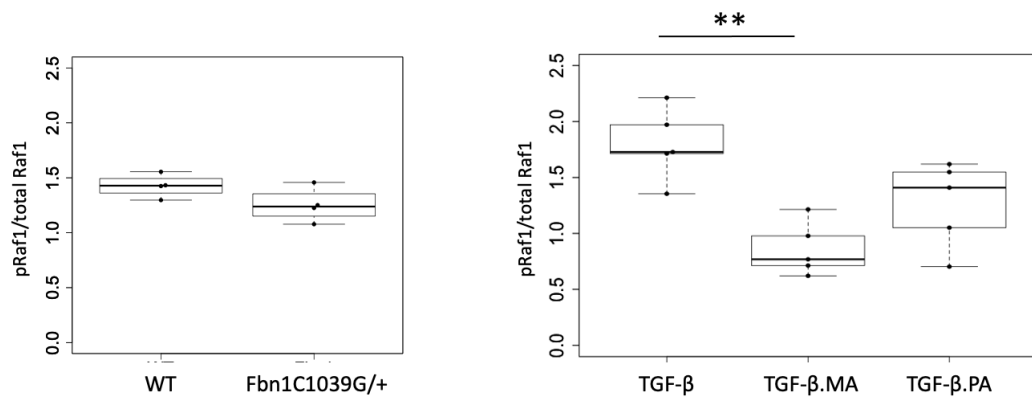
TGF- β とインキュベートした Fbn1C1039G/+ SMC における Ras、pRaf1、および pERK1/2 活性化率を測定した (図 4A-C、右 ; 各グループ n = 5) 。結果、MA 群で Ras、pRaf1、および pERK1/2 活性化の低下を認めた (Ras : TGF- β 、 1.94 ± 0.29 ; TGF- β MA、 1.38 ± 0.35 、 $P = 0.04$; pRaf1 : TGF- β 、 1.79 ± 0.32 ; TGF- β MA、 0.86 ± 0.23 、 $P = 0.01$; pERK1/2 : TGF- β 、 0.96 ± 0.11 ; TGF- β MA、 0.36 ± 0.08 、 $P = 0.003$) が、PA 群では認めなかった (Ras : TGF- β 、 1.94 ± 0.29 ; TGF- β PA、 1.51 ± 0.26 、 $P = 0.14$; pRaf1 : TGF- β 、 1.79 ± 0.32 ; TGF- β PA、 1.26 ± 0.38 、 $P = 0.27$; pERK1/2 : TGF- β 、 0.96 ± 0.11 ; TGF- β PA、 0.58 ± 0.18 、 $P = 0.12$) 。さらに、Fbn1C1039G/+ SMC を MA に類似する競合ファルネシルトランスフェラーゼ Ras 阻害剤である tipifarnib とインキュベートすると、MA と同様に Raf および pERK1/2 の活性化率の低下を認めた (図 4D ; 各グループ n = 4 ; pRaf1 : TGF- β 、 1.75 ± 0.16 ; TGF- β tipifarnib、 0.67 ± 0.13 、 $P = 0.03$; pERK1/2 : TGF- β 、 0.96 ± 0.11 ; TGF- β tipifarnib、 0.58 ± 0.07 、 $P = 0.03$) 。最後に、MA および PA インキュベート後に TGF- β インキュベートした Fbn1C1039G/+ SMC の pERK1/2 活性化は、既知の ERK 刺激因子であるイソプロテレノール (ISO) とのインキュベーションにより両群で増加を認めた (図 4D ; pERK1/

2 : TGF- β MA、 0.41 ± 0.04 ; TGF- β MA ISO、 0.80 ± 0.02 、 $P = 0.01$; TGF- β PA、
 0.59 ± 0.09 ; TGF- β PA ISO、 1.18 ± 0.06 、 $P = 0.01$ 、各グループ $n = 5$) 。

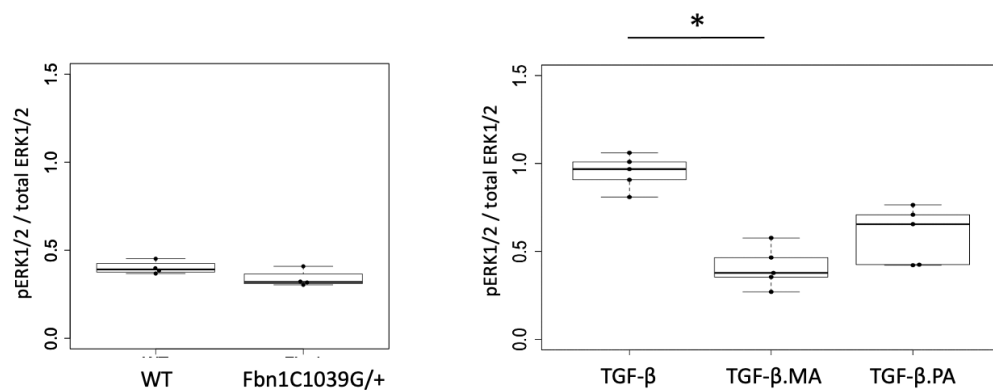
A



B



C



D

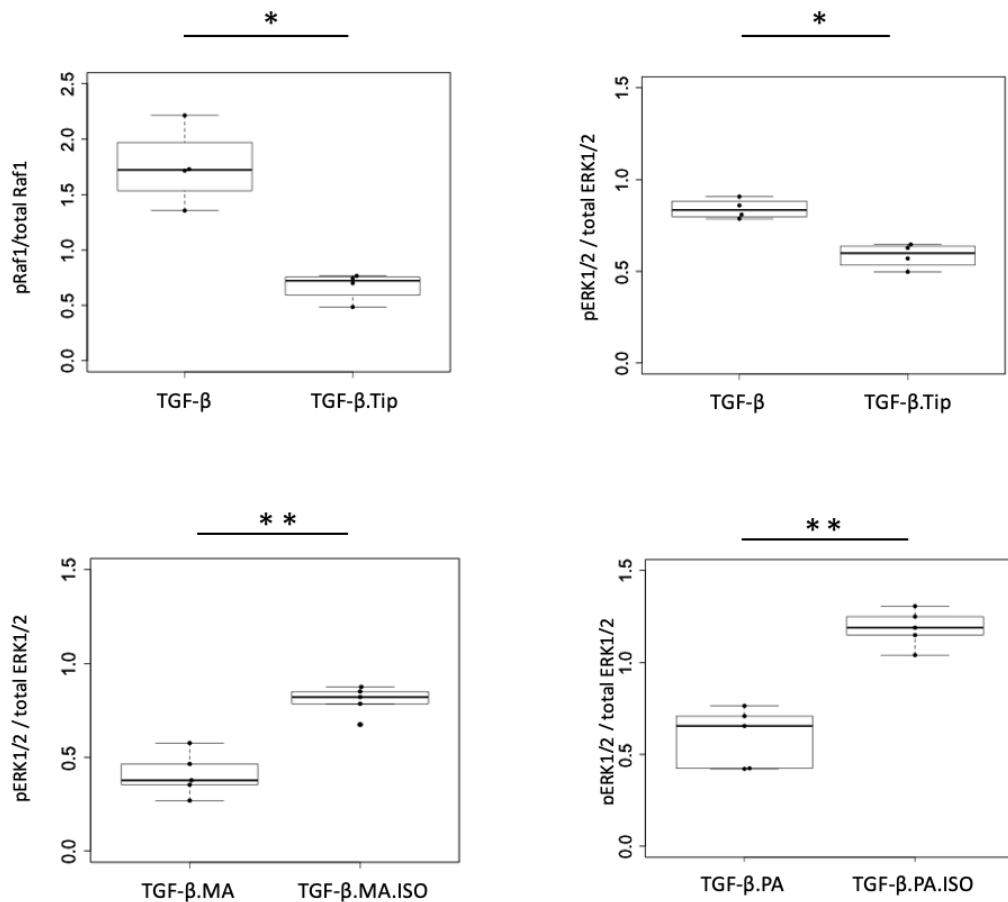


図4：Fbn1C1039G/+上行大動脈由来血管平滑筋細胞（SMC）における Ras-Raf-ERK シグナル伝達のタンパク質分析。

A、（左）；WT（野生型）の SMC および Fbn1C1039G/+SMC、（右） TGF-β（transforming growth factor β）単独とインキュベート、マヌマイシン A（MA）投与後に TGF-β とインキュベート、またはペリリルアルコール（PA）投与後に TGF-β とインキュベートした Fbn1C1039G/+ SMC における Ras 活性を示す（各グループ n=5）。 B および C、同様のグループにおけるリン酸化 c-Raf（pRaf1）またはリン酸化 ERK1/2（pERK1/2）の Wes によるタンパク質分析。総 c-Raf または総 ERK1/2 と比較した倍率差（活性化率）として表した（各グループ n=5）。 D（上段）、TGF-β 単独または tipifarnib（Tip：FPT 阻害）投与後 TGF-β とインキュベートした Fbn1C1039G/+ SMC における pRaf1 および pERK1/2 の Wes タンパク質分析（各グループあたり n=5）。 D（下段）、MA（左）もしくは PA（右）投与後に TGF-β を投与し、さらにイソプロ

テレノール (ISO) とインキュベートした Fbn1C1039G / + SMC における pERK1 / 2 の Wes によるタンパク質分析。総 c-Raf または pERK1 / 2 と比較した倍率差 (活性化率) として表した (各グループ n = 5) 。すべての結果は中央値および 4 分位範囲として表した。 *P ≤ 0.05。Mann-Whitney 検定もしくは Kruskal-Wallis 検定を使用した。

MMP による細胞外マトリックスのタンパク質分解は大動脈径拡大に関与すると報告されている [20] 。組織切片において明らかなエラスチン断裂が増加したのは、タンパク質分解活性の上昇の関与が想定される。そこで Fbn1C1039G / + SMC によって分泌された上清中の MMP-2 活性を、ゼラチンザイモグラフィーによって測定した (図 5 ; 各グループ n = 5) 。 MMP-2 活性は、溶媒投与の SMC と比較し TGF-β 投与後に有意に増加した (TGF-β : 2.41 ± 1.1 倍の増加、P = 0.01) 。この MMP-2 活性の増強は、MA 投与により有意に減少した (TGF-β : 2.41 ± 1.1; MA : 0.97±0.41、P = 0.03) 。最後に、MA 投与後の SMC をイソプロテレノール (ISO) とインキュベートすると、MMP-2 活性が再度上昇した (MA : 0.97 ± 0.41; MA ISO : 2.48 ± 1.36、P = 0.04) 。

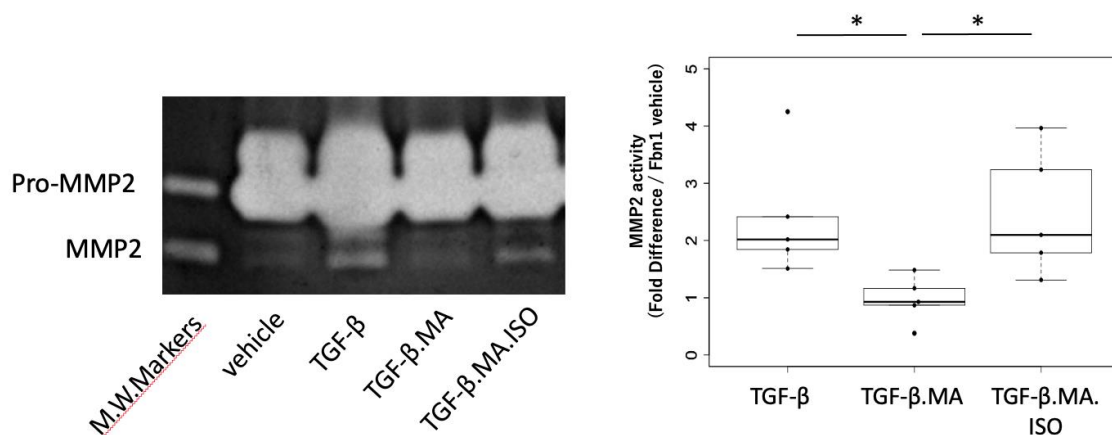


図 5 : Fbn1C1039G / +上行大動脈由来の血管平滑筋細胞 (SMC) から分泌された MMP-2 (matrix metalloproteinase2) 活性レベルを示す。TGF- β (transforming growth factor b) のみ、TGF- β とマヌマイシン (MA)、または TGF- β と MA とイソプロテレノール (ISO) を投与した Fbn1C1039G / + SMC の MMP ザイモグラフィ結果を示す (各グループ n = 5) 。 Fbn1C1039G / +SMC と薬剤投与後の SMC の MMP 活性を比較した倍率差として示した。結果は中央値および 4 分位範囲として表した。 * $P \leq 0.05$ 。Kruskal-Wallis 検定を使用。

Ras 阻害による MMP-2 活性の低下が *in vitro* で確認されたため、動物モデルに戻り、プラバスタチンまたは溶媒のいずれかを投与した Fbn1C1039G / +マウスの上行大動脈の MMP 活性レベルを測定した。 *in vitro* の結果を裏付けるように、MMP-2 活性は、溶媒群と比較してプラバスタチン投与群で有意に減少した (図 6; 溶媒対照 : 4.91 ± 0.81 、プラバスタチン : 2.32 ± 0.13 ; $P = 0.01$ 、各グループ n = 5) 。

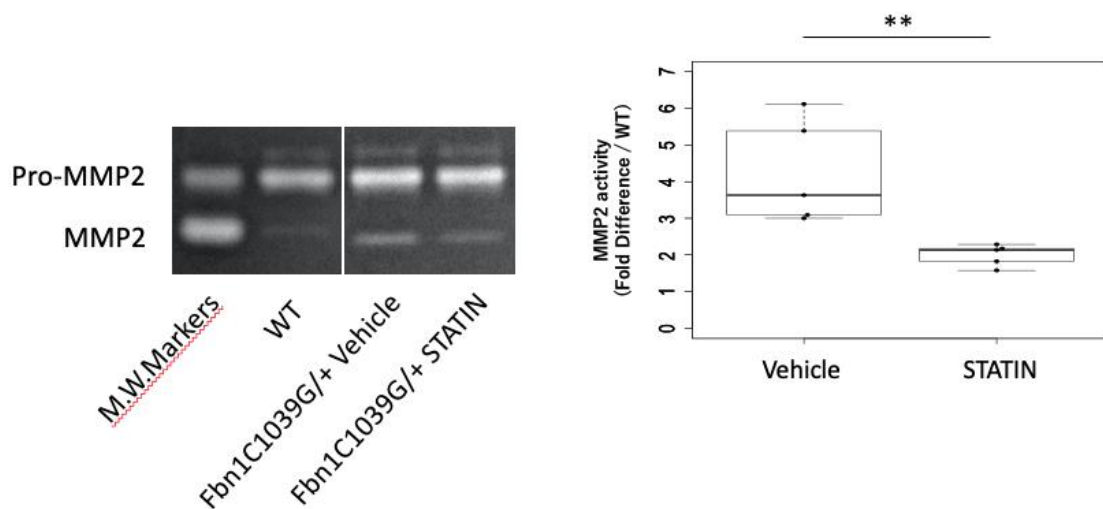


図 6 : *in vivo* でのスタチン治療後の Fbn1C1039G / +マウスの上行大動脈における MMP-2 (マトリックスメタロプロテイナーゼ) 活性レベルを示す。同腹仔野生型 (WT)、溶媒 (vehicle) を投与した Fbn1C1039G / +マウス、またはプラバスタチン (STATIN) を投与した Fbn1C1039G / +マウスの上行大動脈における MMP-2 ザイモグラフィー (各グループ $n = 5$) 結果を示す。WT に対する倍率差として表される MMP 活性を示した。結果は中央値および 4 分位範囲として表した。 ** $P \leq 0.01$ 。Mann-Whitney 検定を使用。

4. 考察

大動脈組織の恒常性維持には種々の分子細胞機構が関与している。血管平滑筋細胞のアポトーシス、エラスチン産生による中膜組織の安定性の欠如、細胞外マトリックスの過剰な分解、リモデリング不全などいずれかの分子機構に異常を生じることで、マルファン症候群では大動脈径の拡大に至ると考えられて

いる[24-27]。マルファン症候群における大動脈径拡大の発症機序の解明は、動脈瘤の拡大を抑制する創薬の可能性を秘める。スタチン（HMG-CoA 還元酵素阻害剤）は、抗炎症、抗酸化、抗増殖などの複数の生物学的特性を有するコレステロール非依存性の保護効果を持つ脂質低下薬である [16、18-20]。また、スタチンには水溶性と脂溶性があり、脂溶性は細胞透過性がよく、各臓器への移行性が良い反面、副作用も強い [28]。本研究ではマルファン症候群マウスにスタチンを投与した過去文献に基づき、水溶性のプラバスタチンを使用した [14]。本研究では、HMG-CoA 還元酵素阻害剤と選択的イソプレノイド阻害剤を利用して、マルファンのマウスモデルにおける動脈瘤拡大に対するスタチンによる抑制効果の背後にあるプレニル化経路、メカニズムを体系的に分析した（図 1 および 7）。以下の点が明らかになった：（1）スタチンは主に Ras プレニル化の阻害を介して動脈瘤拡大を抑制する、（2）Ras プレニル化の減少は下流の ERK シグナル伝達を減少させる、（3）スタチンを介した Ras シグナル伝達の減衰は ERK 依存性の MMP 活性化減弱させる。

また MA や Tip はファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ (FTase) 阻害薬であり、ファルネシル Ras (F-Ras) の形成を阻害し、ERK 活性化を減少させる (図中⑤)。一方 PA はゲラニルゲラニルタンパク質トランスフェラーゼ (GGTase I) 阻害薬であり、ゲラニルゲラニル Ras (GG-Ras) を減少させる (図中⑥) が、本研究では ERK 活性化の抑制は軽微であった。結果、スタチンはマトリックスメトプロテイナーゼ II の生成を減少させ、エラスチン分解を抑制し、それには Ras のファルネシル化が重要と考えられた。

HMG-CoA、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A ; G-PP、ゲラニルピロリン酸 ; ファルネシルピロリン酸、F-PP ; ゲラニルゲラニルピロリン酸、GG-PP ; ファルネシル Ras、F-Ras ; ゲラニルゲラニル Ras、GG-Ras ; MA、マヌマイシン A ; Tip、ティピファルニブ ; PA、ペリリルアルコール ; pERK、リン酸化 ERK ; p-c-Raf、リン酸化 c-Raf ; statin、プラバスタチン

ヒトのマルフアン 症候群と類似する病理所見を呈するマルフアン症候群モデルマウス Fbn1C1039G/+が、確立したマルフアン 症候群の動物実験モデルとして使用されつつある。本モデルにおける Fbn1 変異は、主に非標準的な ERK 経路を介して作用する TGF- β シグナル伝達の増強をもたらす [2]。しかしながら、過剰な ERK シグナル伝達がどのように大動脈拡大を促進するかは、ほとんど解明されていない。本研究では、ERK を介した大動脈径拡大経路に着目し、Ras 依存性の ERK 活性化が MMP 活性化を増加させることを見出した。スタチンは、血清コレステロールを低下させるだけでなく、多面性の一つである抗炎症作用を有し、腹部大動脈瘤の拡大を遅らせることが報告されている [29, 30]。ヒトの腹部大動脈瘤では炎症細胞が MMP を放出することで動

脈壁の脆弱性をもたらすが、スタチンは MMP 産生を抑制することで大動脈の拡大を抑制すると報告された [31, 32]。このことは、スタチンが SMC から直接生成される MMP やエラスターゼ類似物質の産生を減少させ、大動脈径拡大を抑制する可能性を示唆している。しかしながら、マルファン症候群や大動脈弁 2 尖弁に伴う大動脈瘤壁中の炎症細胞浸潤は、非遺伝性大動脈瘤に比べ軽度であり、炎症細胞浸潤と異なる病態が関与している可能性がある [33]。

本研究では、Fbn1C1039G / +マウスモデルにおける TGF- β を介した大動脈径拡大のメカニズムの解明を目的として、プレニル化阻害剤を使用した実験を施行した。今回の *in vivo* 実験ではスタチンと MA は Fbn1C1039G / +上行大動脈における動脈瘤拡大の抑制し、MMP 活性を減少させた。この機序に一致して *in vitro* 実験は、スタチンがファルネシル Ras の活性化を減少させることにより、TGF- β 依存性 ERK シグナルの伝達を低下させることによって、ERK 誘導性 MMP 活性がダウンレギュレートする可能性を示した。しかし、*in vitro* および *in vivo* の両方で MMP 活性レベルの減少は限定的であった。この現象に関しては、以下 3 点が考えられる原因として挙げられる。(1) スタチンの投与量または期間が最適ではない、(2) スタチンは MMP 活性を部分的にしか阻害し

ない、(3) MMP 活性アッセイには限界がある。今後、スタチンの動脈瘤抑制に関しては、多角的な研究アプローチで検証する必要があり、スタチンの投与開始時期の設定変更や、MMP-2 を特異的に検出・定量化できる解析実験の実施を検討している。Ras タンパク質は、ファルネシルトランスフェラーゼによるファルネシル化を受けて細胞質から細胞膜に移行し、転写因子を活性化する低分子量 GTPase である [34, 35]。プレニル化経路を分析すると、MA は最も効果的なファルネシルトランスフェラーゼ (N-Ras、K-Ras) 遮断薬で [34]、大動脈径拡大の抑制効果を認める。対照的に主にゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ 1 を阻害する PA は、GTPase Rap および Rab、および一部の Ras (K-Ras) に作用する [36] が、大動脈径拡大の抑制にはほとんど効果がなかった。本研究では、個々の GTPase を定量化していないため、各薬剤による抑制効果は不明である。今後、GTPase 定量化実験も行い、薬剤の治療効果も解析する予定である。本マウスモデルを使用しスタチンによる大動脈瘤拡大抑制効果を示した McLoughlin らの報告では、組織学的に粗面小胞体の減少を認められたため、スタチンによるタンパク質産生抑制効果が薬理作用機序の 1 つとして報告されている [14]。Luan らは、*in vitro* 実験を行ない、スタチンが未知

の後転写因子の修飾作用によって、血管 SMC からの MMP-1、-2、-3、および-9 産生・分泌を抑制する可能性を示した [18]。この報告は、マルファンマウスにスタチンを投与し、上行大動脈中の MMP-2 が減少した今回の研究結果 (図 5) に一致する。尚、本研究では、血管 SMC からの MMP 分泌にスタチンが及ぼす影響を中心に解析を行なったが、スタチンには血管 SMC の増殖抑制効果があることも報告されている [37]。さらにスタチンは血管 SMC の収縮型 (分化型) から合成型 (脱分化型) への phenotype change を抑制するとの報告もある [38]。一般に大動脈壁における血管 SMC は収縮型の形質を有し、血管壁が何らかの原因で傷がつくと合成型に phenotype change し、血管修復に関わる一方、動脈硬化の原因の一つとなる [39]。今後、本実験モデルを使用した研究で、血管 SMC のホメオスタシスにスタチンが及ぼす pleiotropic effects に関しても検証する予定である。

Ras タンパク質の阻害による疾患治療は、他の疾患領域、特に腫瘍、RAS 病 (RASopathy ; 神経線維腫症 1 型、ヌーナン症候群、Noonan with multiple lentigines [NSML]、Cardio-facio-cutaneous (CFC) 、Costello and Legius syndromes) 、および神経障害性疾患などの分野で研究が進められている [40-

43]。Ras シグナル伝達の遮断には、その物理的構造、複数のフィードバックループ、シグナル伝達の冗長性などの課題がある。また、Ras シグナル経路はほとんどの正常細胞機能にとって不可欠であるが、スタチン療法は有害な全身的影響（免疫および細胞増殖）なしに、マルファン症候群の TGF- β を介した Ras / ERK 活性化の低下を介した生体侵襲性の少ない治療となる可能性がある [8、14、44]。しかし、このメカニズムがヒトにおいて再現性があるかどうかは、十分に検証されていない。さらに、TGF- β は複数のシグナル伝達経路を刺激するため、どの経路が大動脈疾患を引き起こすのかは不明である。大動脈基部の予防的外科的置換のみがマルファン症候群患者の平均余命を延長するが、動脈瘤の拡大を遅らせたり、手術を遅らせたりするためには、 β 遮断薬、アンジオテンシン受容体遮断薬およびスタチンなど、TGF- β シグナル伝達経路内のさまざまな場所を遮断する薬剤も使用する必要がある。スタチンがマルファン症候群の自然予後を改善するかどうかについては、今後は動物実験以外にも大規模な臨床試験による検証が必要である。

本研究の **limitation** としては以下の点が挙げられる。まず、第一に、本実験では当該実験動物における血清脂質濃度や血圧測定を実施していないため、ス

タチンの脂質代謝や体血圧に及ぼす影響が評価できていない。当該動物実験モデルで、これらの評価項目も今後解析する予定である。第二に、現在マルファン症候群における大動脈径拡大の標準的な予防薬物として推奨されている β 遮断薬およびアンジオテンシン受容体遮断薬の効果を、本研究では検証していない。今後、当該動物実験モデルを使用して、 β 遮断薬およびアンジオテンシン受容体遮断薬とスタチンの治療効果の比較・これらの薬剤の作用機序の解明を行うとともに、薬剤の効果が相加的か検証する予定である。第三に、スタチンの多面的作用として、HMG-CoAの下流であるFPPやGGPPを供給するnon-sterol pathwayに対するイソプレノイド産生抑制効果に加え、lipid raftのコレステロール組成を規定し、細胞膜貫通型受容体の機能を修飾する作用（sterol pathwayに及ぼす作用）も報告されている[45]。本研究では、sterol pathwayに関する解析実験を行なっていないため、今後、本実験モデルを使用した研究で検証する予定である。第四に、マウスの大動脈瘤の実験モデルにおいて、MAの効果を検証した報告はあるものの[46]、PAの効果を検証した報告はなかった。このため、本実験におけるPAを含めた薬剤の投与量に関しては、過当グループが報告したマウス心移植モデル実験での投与量を採用した

[23]。今回、大動脈拡大抑制効果を認めなかった PA に関しては、至適投与量以下の投与量であった可能性がある。故に、本研究結果は、スタチンが及ぼすマルファンマウスの大動脈径拡大抑制効果において、ゲラニルゲラニル化修飾の役割を否定するものではないと考えられる。第五に、*in vivo* 実験において pERK のみを使用し total ERK を使用していないため、各個体間の total ERK の差が、結果に影響を与えた可能性がある。本実験では活性化された ERK (pERK) に重要性をおき、WT との倍率差で比較した。

5. 結論

本研究では、マルファン症候群マウスモデルを用いて、スタチンの大動脈径拡大の抑制効果を示した。スタチンは血管平滑筋細胞の RAS の中でも、特に K-Ras、N-Ras を抑制し ERK 経路をダウンレギュレートさせる。この結果、エラスターゼ作用のある MMP-2 の分泌を低下させ、動脈壁内のエラスチンの断裂を抑制し、大動脈径の拡大を抑制する可能性が示唆された。

謝辞

本研究において、研究計画の発案と実験のご指導を賜りました Stanford 大学

胸部心臓外科専攻教授 Michael P Fischbein 先生に深謝いたします。

引用文献

1. Murdoch JL, Walker BA, Halpern BL, Kuzma JW, McKusick VA. Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome. *N Engl J Med*. 1972;286:804–808.
2. Judge DP, Dietz HC. Marfan’s syndrome. *Lancet*. 2005;366:1965–1976.
3. Dietz H, Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. Marfan syndrome. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021.
4. Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, Callewaert BL, Backer JD, Devereux RB, Hilhorst-Hofstee Y, Jondeau G, Faivre L, Milewicz DM, Pyeritz RE, Sponseller PD, Wordsworth P, Paepe AMD. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* 2010; 47: 476-485.
5. 日本循環器学会/日本心臓血管外科学会/日本胸部外科学会/日本血管外科学会合同ガイドライン 大動脈瘤・大動脈解離診療ガイドライン（2020年改訂版） https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2020/07/JCS2020_Ogino.pdf.
6. Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, Bedja D, Chen Y, van ERP C, Lindsay ME, Kim D, Schoenhoff F, Cohn RD, Loeys BL, Thomas CJ, Patnaik S, Marugan JJ, Judge

- DP, Dietz HC. Noncanonical TGF-beta signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science*. 2011;332:358–361.
7. Eric M. Isselbacher, Christian Lacks Lino Cardenas, PharmD, Mark E. Lindsay. Hereditary Influence in Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *Circulation*. 2016;133:2516-2528.
8. Lacro RV, Dietz HC, Sleeper LA, Yetman AT, Bradley TJ, Colan SD, Pearson GD, Selamet Tierney ES, Levine JC, Atz AM, Benson DW, Braverman AC, Chen S, De Backer J, Gelb BD, Grossfeld PD, Klein GL, Lai WW, Liou A, Loeys BL, Markham LW, Olson AK, Paridon SM, Pemberton VL, Pierpont ME, Pyeritz RE, Radojewski E, Roman MJ, Sharkey AM, Stylianou MP, Wechsler SB, Young LT, Mahony L. Atenolol versus losartan in children and young adults with Marfan's syndrome. *N Engl J Med*. 2014;371:2061–2071.
9. Shores J, Berger KR, Murphy EA, Pyeritz RE. Progression of aortic dilatation and the benefit of long-term b-adrenergic blockade in Marfan's syndrome. *N Engl J Med*. 1994;330:1335–1341.

10. Michael Mullen, Xu Yu Jin, Anne Child, A Graham Stuart, Matthew Dodd, Jose Antonio, Aragon-Martin, David Gaze, Anatoli Kiotsekoglou, Li Yuan, Jiangting Hu, Claire Foley, Laura Van Dyck, Rosemary Knight, Tim Clayton, Lorna Swan, John D R Thomson, Guliz Erdem, David Crossman, Marcus Flather. Irbesartan in Marfan syndrome(AIMS):a double-blind, placebo-controlled randomized trial. *Lancet*. 2019;394:2263-2270.
11. Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM, Aziz H, Schoenhoff F, Bedja D, YiChun C, Alexandra N, Daniel PJ, Dietz HC. Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science*. 2011;332:361–365.
12. Kang YN, Chi SC, Wu MH, Chiu HH. The effects of losartan versus beta-blockers on cardiovascular protection in marfan syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J.Formos.Med.Assoc*. 2020;119:182-190.
13. Hsin-Hui chu, Hei-Hwan Wu, Jou-Kou Wang, Chun-Wei Lu, Shuenn-Nan Chiu, Chun-An Chen, Ming-Tai Lin, Fu-Chang Hu. Losartan Added to β -Blockade

- Therapy for Aortic Root Dilation in Marfan Syndrome: A Randomized, Open-Label Pilot Study. *Mayo Clin.Proc.* 2013;88:271-276.
14. McLoughlin D, McGuinness J, Byrne J, Terzo E, Huuskonen V, McAllister H, Black A, Kearney S, Kay E, Hill AD, Dietz HC, Redmond JM. Pravastatin reduces Marfan aortic dilation. *Circulation.* 2011;124:S168–173.
15. Goel SS, Tuzcu EM, Agarwal S, Aksoy O, Krishnaswamy A, Griffin BP, Svensson LG, Kapadia SR. Comparison of ascending aortic size in patients with severe bicuspid aortic valve stenosis treated with versus without a statin drug. *Am J Cardiol.* 2011;108:1458–1462.
16. Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ. Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2001;49:281–287.
17. Salata K, Syed M, Hussain MA, de Mestral C, Greco E, Mamdani M, Tu JV, Forbes TL, Bhatt DL, Verma S, Al-Omran M. Statins reduce abdominal aortic aneurysm growth, rupture, and perioperative mortality: A systematic review and meta-Analysis. *J Am Heart Assoc.* 2018;7:e008657. doi: 10.1161/JAHA.118.008657.

18. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:769–775.
19. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1712–1719.
20. Porreca E, Di Febbo C, Baccante G, Di Nisio M, Cuccurullo F. Increased transforming growth factor-beta (1) circulating levels and production in human monocytes after 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase inhibition with pravastatin. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1752–1757.
21. Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;13:39–51.
22. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343:425–430.
23. Stein W, Schrepfer S, Itoh S, Kimura N, Velotta J, Palmer O, Bartos J, Wang X, Robbins RC, Fischbein MP. Prevention of transplant coronary artery disease by prenylation inhibitors. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30:761-9.

24. Merk DR, Chin JT, Dake BA, Maegdefessel L, Miller MO, Kimura N, Tsao PS, Iosef C, Berry GJ, Mohr FW, Spin JM, Alvira CM, Robbins RC, Fischbein MP. miR-29b participates in early aneurysm development in Marfan syndrome. *Circ Res.* 2012;110:312–324.
25. Okamura H, Emrich F, Trojan J, Chiu P, Dalal AR, Arakawa M, Sato T, Penov K, Koyano T, Pedroza A, Connolly AJ, Rabinovitch M, Alvira C, Fischbein MP. Long-term miR-29b suppression reduces aneurysm formation in a Marfan mouse model. *Physiol Rep.* 2017;5:e13257.
26. Emrich FC, Okamura H, Dalal AR, Penov K, Merk DR, Raaz U, Hennigs JK, Chin JT, Miller MO, Pedroza AJ, Craig JK, Koyano TK, Blankenberg FG, Connolly AJ, Mohr FW, Alvira CM, Rabinovitch M, Fischbein MP. Enhanced caspase activity contributes to aortic wall remodeling and early aneurysm development in a murine model of Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:146–154.
27. Dietz HC, Cutting CR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM, Stetten G, Meyers

- DA, Francomano CA. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991;352:337-339.
28. Sakamoto T, Kojima S, Ogawa H, Shimomura H, Kimura K, Ogata Y, Sakaino N, Kitagawa A, MUSASHI-AMI Investigators. Usefulness of hydrophilic vs lipophilic statins after acute myocardial infarction: subanalysis of MUSASHI-AMI. *Circ J*. 2007;71:1348-1353.
29. Schouten O, van Laanen JHH, Boersma E, Vidakovic R, Feringa HHH, Dunkelgrün M, Bax JJ, Koning J, van Urk H, Poldermans D. Statins are associated with a reduced infrarenal abdominal aortic aneurysm growth. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;32:21–26.
30. Shiraya S, Miyake T, Aoki M, Yoshikazu F, Ohgi S, Nishimura M, Ogihara T, Morishita R. Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis*. 2009;202:34–40.
31. Kajimoto K, Miyauchi K, Kasai T, Shimada K, Kojima Y, Shimada A, Niinami H, Amano A, Daida H. Short-term 20-mg atorvastatin therapy reduces key

inflammatory factors including c-Jun N-terminal kinase and dendritic cells and matrix metalloproteinase expression in human abdominal aortic aneurysmal wall. *Atherosclerosis*. 2009;206:505–511.

32. Nagashima H, Aoka Y, Sakomura Y, Sakuta A, Aomi S, Ishizuka N, Hagiwara N, Kawana M, Kasanuki H. A 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses production of matrix metallo- proteinase-9 in human abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg*. 2002;36:158–163.
33. Grewal N, Adriana C. Pathogenesis of aortic wall complications in Marfan syndrome. *Cardiovasc Pathol*. 2018;33:62-69.
34. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*. 2017;170:17–33.
35. Welsch ME, Kaplan A, Chambers JM, Stokes ME, Bos PH, Zask A, Zhang Y, Sanchez-Martin M, Badgley MA, Huang CS, Tran TH, Akkiraju H, Brown LM, Nandakumar R, Cremers S, Yang WS, Tong L, Olive KP, Ferrando A, Stockwell BR. Multivalent small-molecule pan-RAS inhibitors. *Cell*. 2017;168:878– 889.e29.

36. Ren Z, Elson CE, Gould MN. Inhibition of type I and type II geranylgeranyl-protein transferases by the monoterpene perillyl alcohol in NIH3T3 cells. *Biochem Pharmacol.* 1997;54:113–120.
37. Jaschke B, Michaelis C, Milz S, Vogeser M, Mund T, Hengst L, Kastrati A, Schömig A, Wessely R. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res.* 2005;68:483-92.
38. Kiyon J, Kusch A, Tkachuk S, Krämer J, Haller H, Dietz R, Smith G, Dumler I. Rosuvastatin regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in vascular remodeling: role for the urokinase receptor. *Atherosclerosis.* 2007;195:254-261.
39. Grootaert MOJ, Bennett MR. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis time for a reassessment. *Cardiovasc Res.* 2021. Epub ahead of print.
40. Baines AT, Xu D, Der CJ. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem.* 2011;3:1787–1808.

41. Tajiri H, Uruno T, Shirai T, Takaya D, Matsunaga S, Setoyama D, Watanabe M, Kukimoto-Niino M, Oisaki K, Ushijima M, Sanematsu F, Honma T, Terada T, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Cote JF, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y. Targeting Ras-driven cancer cell survival and invasion through selective inhibition of DOCK1. *Cell Rep.* 2017;19:969–980.
42. Wang Y, Kim E, Wang X, Novitch BG, Yoshikawa K, Chang LS, Zhu Y. ERK inhibition rescues defects in fate specification of Nf1-deficient neural progenitors and brain abnormalities. *Cell.* 2012;150:816–830.
43. Willey JZ, Elkind MS. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in the treatment of central nervous system diseases. *Arch Neurol.* 2010;67:1062–1067.
44. Attenhofer Jost CH, Greutmann M, Connolly HM, Weber R, Rohrbach M, Oxenius A, Kretschmar O, Luscher TF, Matyas G. Medical treatment of aortic aneurysms in Marfan syndrome and other heritable conditions. *Curr Cardiol Rev.* 2014;10:161–171.

45. Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol.* 2009;185:381-385.
46. Sugita M, Sugita H, Kaneki M. Farnesyltransferase inhibitor, manumycin a, prevents atherosclerosis development and reduces oxidative stress in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1390-1395.