

表 題 マルファン症候群モデルオスマウスの胸部大動脈瘤形成におけるアンドロゲンの TGF- $\beta$  誘導性 Erk/Smad シグナルへの影響

論文の区分 論文博士

著 者 名 田島 泰

所 属 自治医大付属さいたま医療センター 総合医学 2

2021年 8月 13日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療学系専攻 外科系総合医学  
職名・氏名 教授 山口 敦司

目次	頁
要約	3
1. 緒論	5
2. 実験方法	
2-1 実験動物	8
2-2 マウスへの薬物治療	8
2-3 大動脈径および体重の測定	9
2-4 組織学的分析	9
2-5 WES 自動タンパク質アッセイ	10
2-6 ウェスタンブロッティング分析	11
2-7 組織 RNA 抽出と定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)	12
2-8 ホルモンによる平滑筋細胞治療、in vitro	12
2-9 MMP 活性アッセイ (ザイモグラフィ)	13
2-10 免疫細胞染色	14
2-11 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	14
2-12 統計分析	15
3. 結果	
3-1 <i>Fbn1</i> <sup>C1039G/+</sup> マウスの大動脈瘤成長と elastin break の性差	16
3-2 <i>Fbn1</i> <sup>C1039G/+</sup> オスの上行/大動脈基部大動脈瘤における p-Erk1/2 および	

p-Smad2 シグナルの増加、および MMP 活性レベルの上昇	19
3-3 <i>Fbn1</i> <sup>C1039G/+</sup> オスの大動脈由来 SMC において、アンドロゲンによる	
TGF-β 誘導性 p-Erk1/2 および p-Smad2 シグナル伝達の増強	24
3-4 アンドロゲン受容体遮断薬による <i>Fbn1</i> <sup>C1039G/+</sup> オスの大動脈瘤の成長	
と Erk1/2 および Smad2 活性化の抑制	29
4. 考察	32
5. 結論	39
引用文献	40

## 要約

### 背景

マルファン症候群の男性患者は、女性と比較して大血管イベント発生のリスクが高く、大動脈基部拡大の進行が早いことが報告されている。しかしながら、マルファン症候群の男性患者における大動脈瘤形成過程に、男性ホルモン（アンドロゲン）が及ぼす影響は十分に解明されていない。我々は TGF- $\beta$ （トランスフォーミング成長因子ベータ）が誘導する細胞外シグナル調節キナーゼ（Erk）/Smad シグナル伝達をアンドロゲンが増強し、大動脈瘤拡大の進行を促進させると仮定した。

### 方法

マルファン症候群モデルマウス (*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>) およびその wild type control (WT) の体重および大動脈径を 6、8、12、および 16 週齢で測定し、大動脈瘤形成過程の性差を調査した。また、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスを、6 から 16 週齢まで (1) Flutamide（フルタミド, アンドロゲン受容体遮断薬）または (2) 溶媒コントロール (vehicle control) で治療し、16 週齢で上行/大動脈基部および下行大動脈検体を採取した。その後、各大動脈組織検体における p-Erk1/2、p-Smad2、および matrix metalloproteinase (MMP) 活性を測定した。さらに、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部由来の平滑筋細胞を作成し、内因性アンドロゲンである Dihydrotestosterone (DHT)、Flutamide、または TGF- $\beta$ 1 で治療し、Erk/Smad シグナル伝達の活性化および MMP-2 活性を測定した。

### 結果

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスは *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メスと比較して、上行大動脈および大動脈基部の成長が有意に早く、大動脈径もより増加していた。さらに 16 週齢のオスの上行/大動脈基部検体では、メスよりも p-Erk1/2、p-Smad2 および active MMP-2 の発現が有意に高かった。上行/大動脈基部検体から作成した平滑筋細胞を使用した *in vitro* 実験では、DHT 治療は TGF-β1 に誘導された Erk/Smad シグナル伝達および MMP-2 活性を増強させたが、この増強作用は Flutamide 治療によって抑制された。最後に、6 から 16 週齢まで Flutamide 治療を行った *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスでは、vehicle control 群と比較して、上行大動脈および大動脈基部の瘤径が有意に減少していた。これに関連して、Flutamide 治療群の上行/大動脈基部検体において p-Erk1/2、p-Smad2、および active MMP-2 の発現の減少を認めた。

## 結論

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスでは、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メスと比較して、上行大動脈/大動脈基部で p-Erk1/2 および p-Smad2 シグナルの増強を認め、大動脈径の拡大も確認された。また、上行/大動脈基部由来の平滑筋細胞を使用した研究では、DHT が TGF-β 誘導性の Erk/Smad シグナル伝達を増強させる可能性が示された。さらに *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスへの Flutamide 治療は上行/大動脈基部の p-Erk1 / 2 および p-Smad2 の発現を減少させ、大動脈瘤の拡大を抑制することが確認された。アンドロゲンは、直接的あるいは間接的に TGF-β 誘導性の Erk/Smad シグナル伝達を介して、マルファン症候群の大動脈瘤拡大に影響を与えるため、アンドロゲン受容体遮断薬（フルタミド、スピロラクトンなど）の投与によって、男性のマルファン症候群症例の大動脈拡大が抑制される可能性が示唆された。

## 1. 緒論

マルファン症候群（MFS）は、遺伝性結合組織障害（フィブリリン 1 遺伝子変異）であり、発生頻度は 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)。一般的に心血管系、眼球系、および筋骨格系に影響を及ぼし、特に大動脈基部の動脈瘤拡大それに続く大動脈解離および破裂は主要な死亡原因となるため(2, 3)、予防的な大動脈置換手術が推奨される。本邦の 2020 年改訂の大動脈瘤・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などの大動脈解離の危険因子を有する場合、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(4)。

MFS の原因遺伝子であるフィブリリン 1 は細胞外マトリックス（ECM）の構成因子であり、大動脈壁の中膜における弾性線維はフィブリリン 1 を含むマイクロフィブリルにエラスチンタンパク質が沈着し、各エラスチンが架橋されている。このため、フィブリリンに障害を発生すると、弾性線維の伸縮性に機能異常が生じる。さらにフィブリリン 1 は不活性型トランスフォーミング成長因子-ベータ（TGF- $\beta$ ）の複合体（LTBP）と結合し、シグナル伝達を調整しており、MFS ではフィブリリン 1 の変異により、LTBP が不安定化することによって恒常的に活性型 TGF- $\beta$ が増加する(5)。これを受けて、TGF- $\beta$ シグナルの下流の MMP 活性が増強し、結果として大動脈中膜の構造変化による大動脈組織の脆弱性が出現し、大動脈瘤形成や大動脈解離の発症が誘発されると考えられている。特に TGF- $\beta$  誘導性の細胞

外シグナル調節キナーゼ (Erk) /Smad シグナル伝達は、成人の MFS の大動脈瘤形成過程において重要な役割を果たすと報告されている(6-8)。また、ACTA2、MYH11 などの遺伝子変異による家族性大動脈解離では、主に大動脈の血管平滑筋細胞の機能不全や平滑筋細胞のアポトーシスなどが病態に関係している(9)。大動脈病変が中心であり、症候性の全身性結合織病変は合併しない。一方、MFS では、マルファン症候群では TGF- $\beta$  シグナルの増強が病態の中心と考えられており、大動脈だけでなく全身の結合織に及ぶ症候性変化が特徴的である。TGF- $\beta$  シグナルの影響は平滑筋細胞の増殖、分化、形質転換、アポトーシスに影響を与え(10)、さらに TGF- $\beta$  シグナルの下流の MMP などのタンパク質分解酵素が ECM を劣化させることが病態の主体となる(11)。このため、MFS における大動脈瘤形成は、ACTA2、MYH11 などの遺伝子変異による家族性大動脈解離の発症とは病態が異なると考えられている。

疫学的に MFS は男性と女性に等しく分布しているが、MFS の男性は妊娠していない女性と比較して大血管イベント（大動脈解離または大動脈根置換の必要性）のリスクが高いことが報告されている(12-14)。さらに、MFS の男性の大動脈基部径やその成長率は女性のそれよりも高い(14, 15)。MFS 動脈瘤の性差に関するメカニズムはまだ明らかにされていないが、アンドロゲンやエストロゲンなどの性ホルモンが大動脈壁の ECM のリモデリングなどに関係している可能性が示唆される。

MFS のマウスモデルは、大動脈瘤形成の過程を研究するための強力な科学的ツールであるが、動物実験モデルを使用して性差が MFS の大動脈瘤形成に及ぼす影響を科学的に調査

した研究は少ない。Renard らの研究では、オスの MFS モデルマウス (*Fbn1*<sup>GT-8/+</sup>) はメスよりも大動脈基部径が拡大しており、妊娠経験のあるメスは未経産のメスと比較し大動脈基部径の拡大が明らかになった(16)。また、Renard らは、17 $\beta$ -estradiol が平滑筋細胞からフィブリリン 1 の分泌を促進させることで女性 MFS 症例における大動脈拡大が抑制される可能性を示した(16)。Jimenez-Altayo らは、当研究グループと同じ MFS モデルマウス (*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>) を使用して、オスではメスと比較してフェニレフリン誘発性の上行大動脈収縮が増強し、大動脈壁 ECM の構造破壊が進行することを報告した(17)。

腹部大動脈瘤の動物実験モデルでは、アンドロゲンまたアンドロゲン受容体が TGF- $\beta$  シグナル、MMP-2, -9 を増強し、腹部大動脈瘤を拡大・増悪させることが報告された(18, 19)。さらに、健常人の腹部大動脈組織と比較して、腹部大動脈瘤壁でアンドロゲン受容体の発現が増強することも報告されている(20)。これらの報告は、アンドロゲン及びアンドロゲン受容体が、MFS の大動脈瘤形成を促進させる可能性を示唆するが、MFS モデルマウスの大動脈瘤形成過程において、アンドロゲンが果たす役割は報告されていない。本研究では、MFS モデルマウス (*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>) を使用して、大動脈病変の細胞シグナル伝達および大動脈瘤形成にアンドロゲン及ぼす影響が調査することを目的とした。さらに、ECM リモデリングに関するアンドロゲンの影響に関して、大動脈部位別（下行大動脈、上行/大動脈基部）にその特異性を調査するとともに、アンドロゲン、TGF- $\beta$  シグナル伝達、および MMP 活性の相互作用に関して、in vivo および in vitro の疾患モデルシステムそれぞれで検討した。性差という観点から MFS の大動脈瘤発生に関する病態解明を行い、新規の治療法の開発への



礎を拓くことを目的として、本研究を遂行した。

## 2. 方法

### 2-1. 実験動物

すべての動物実験に関するプロトコールは、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管理と使用に関するガイドラインを遵守して作成し、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。すべての動物実験は、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入したオスとメスの *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウス (Fbn1) と同腹仔野生型コントロールマウス (WT) を使用して行った。マウスは、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>コロニー内でのみ交配され、Jackson Laboratory から提供されたデータに基づくと、実験用マウスは少なくとも 10 世代の戻し交配を行った。マウスは特定病原体除去飼育場で飼育し、通常の餌を与え管理した。特に *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスの性差を解明するために、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>と WT それぞれの性差を比較した。

### 2-2. マウスへの薬物治療

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスを、(1) Flutamide (アンドロゲン受容体阻害薬) (1 日おきに 50 mg/kg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) または (2) 溶媒コントロール (vehicle control) のいずれかを 6~16 週齢まで皮下注射し(20, 21)、16 週齢で安楽死させた (flutamide-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>

オス ; n=14、 vehicle control-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=14、 flutamide-treated WT オス ; n=7、 vehicle control-treated WT オス ; n=8)。治療中は大動脈径をエコーで測定し経過観察した。

### 2-3. 大動脈径および体重の測定

MFS モデルマウスの成体と成人の大動脈瘤径に関する性差は報告されているが(14-17)、生殖期前の MFS における大動脈瘤径の性差は明らかではない(22)。今回、我々は、生殖期以後の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスの大動脈径の性差を調査した(23)。経胸壁心エコー検査は、6、8、12、および16週齢で行い、Vevo-2100 (Visual Sonics, Toronto Canada) を使用して parasternal long-axis view で腕頭動脈分岐部から 1 mm 近位の上行大動脈とバルサルバ洞レベルで大動脈径を計測した。計測は 2 人の盲検研究者が 3 回測定し、その平均値を検査値として使用した。経胸壁心エコー検査の前に、各時点で体重を測定した。検査中はノーゾコーンを介して 2%吸入イソフルランで麻酔した (WT オス ; n=12, WT メス ; n=12, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n= 9, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メス ; n=11, flutamide-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=9, vehicle control-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=9, flutamide-treated WT オス ; n=7, vehicle control-treated WT オス ; n=8)。

### 2-4. 組織学的解析

無作為に選択された 16 週齢マウスの上行/大動脈基部検体を採取し、4% パラホルムアルデヒドで固定し、Tissue-Tek OCT Compound HistoMount (Sakura, Torrance, CA) に埋没した。サンプルは 5 μm の断面にスライスし、Accustain ElastinVerhoeff's Van Gieson kit (Sigma

Aldrich) で染色した。上行大動脈の最も拡大した部位から 50  $\mu\text{m}$  の間隔で 3 つの大動脈断面を解析し、Leica DM4000B 顕微鏡を使用して、倍率 40 倍で画像化した。2 人の盲検研究者が大動脈断面の elastin break 数を測定し、弾性板あたりの平均値を計測し、解析した。

(WT オス ; n=7, WT メス ; n=5, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> オス ; n=5, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> メス ; n=5, flutamide-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> オス ; n=5, vehicle control-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> オス ; n=5)。

## 2-5. WES 自動タンパク質アッセイ (Automated western blots)

組織または細胞からのタンパク質を、前述のように Radio-Immunoprecipitation Assay 可溶化バッファー (Thermo Scientific, Rockford, IL) を使用し、抽出した(24)。タンパク質濃度は、Bicinchoninic acid assay (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL) によって測定した。タンパク質の発現およびそのリン酸化は、WES (ProteinSimple, San Jose, CA) によって定量化し、評価した。サンプルをサンプルバッファー (最終サンプルタンパク質濃度 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) と混合し、還元し、変性させた。抗体濃度は p-Erk1/2 (1:150)、Erk1/2 (1:150)、および vinculin (1:150) を使用した。すべての抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA) から購入した。二次抗体と化学発光基質を、25 well assay plate の指定された well に分注し、WES automated system によってすべてのアッセイ ステップを自動的に実行した。デンシトメトリーによる定量化は、標的タンパク質のバンド面積を測定し、ローディング コントロールとして vinculin を使用した。実験には、グループあたり 8~12 匹のマウスを使用した (WT オス ; n=10, WT メス ; n=10, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> オス ; n=11, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> メス ; n=12, flutamide-treated

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=8, vehicle control-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> オス ; n= 8)。

## 2-6. ウェスタンブロッティング分析

タンパク質濃度は、上記のように Bicinchoninic acid assay によって評価した。サンプルを 2.5% 2-メルカプトエタノールを含む Laemmli's sample buffer で 95°C で 5 分間変性させた。タンパク質量と等量の変性サンプルを 4%~15%のポリアクリルアミドゲルにロードした。タンパク質を SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写した。5%w/v BSA (ウシ血清アルブミン) でブロッッキングした後、ニトロセルロース膜を p-Smad2 (1:500) (Cell Signaling Technology)、Smad2 (1:1000) (Cell Signaling Technology)、Gapdh (1:1000) (Cell Signaling Technology) または Androgen receptor (1:500) (ab133273, Abcam, Cambridge, UK) などの一次抗体にインキュベートした。タンパク質バンドは、secondary IgG HRP conjugates (1:3000) (Cell Signaling Technology) と ECL (EMD Millipore Corporation, Burlington, MA) を用いて視覚化した。バンド強度は、ImageJ ソフトウェア (National Institute of Health, Bethesda, MD) で測定し、ローディングコントロールとして Gapdh を使用した。実験には、グループあたり 6~9 匹のマウスを使用した (WT オス ; n=6, WT メス ; n=6, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=6, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メス ; n=6, flutamide-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=9, vehicle control-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=9)。

## 2-7. 組織 RNA 抽出と定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)

組織 RNA は、miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して抽出し、Nanodrop (Agilent, Foster City, CA) で定量化した。iScript Select cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を使用して、RNA を cDNA に変換した。cDNA は TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を使用し、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) で TGF- $\beta$ 1 (*Tgfb1*) (Mm01178820\_m1) および androgen receptor (*Ar*) (Mm00442688\_m1) などの標的遺伝子を増幅させた。また、標的遺伝子発現レベルは、リボソームハウスキーピング遺伝子 (18S) で補正した。*Fbn1* や WT の各サンプルの周期閾値 (Ct 値) は internal control (comparative Ct [ $\Delta$ Ct]) を基準にし、性別が一致した WT のレベルに対する倍数差 ( $2^{-\Delta\Delta$ Ct) に変換し評価した。実験には、グループあたり 8~9 匹のマウスを使用した (WT オス ; n=8, WT メス ; n= 8, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=9, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メス ; n=9)。

## 2-8. ホルモンによる平滑筋細胞治療、in vitro

in vitro 実験は、1 グループにつき、16 週齢の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス 5-6 個体の上行/大動脈基部検体から、大動脈平滑筋細胞 (smooth muscle cell; 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。SMC ( $2.0 \times 10^5$  cells/mL) を培地でコンフルエントになるまで培養し、

治療の 24 時間前に無血清培地で飢餓状態にした。SMC は、内因性アンドロゲンである Dihydrotestosterone (DHT, 10 nmol/L) (Sigma-Aldrich) 、 Flutamide (1 μmol/L) (Selleckchem, Houston, TX) 、 マウス組換え TGF-β1 (5 ng/mL) (R&D Systems , Minneapolis, MN) 、 または vehicle control で治療した。インキュベートに要した時間は p-Erk1/2 タンパク質アッセイでは 24 時間、MMP (matrix metalloproteinase) 活性アッセイでは 48 時間、アンドロゲン受容体タンパク質アッセイでは 24 時間および 48 時間とした。p-Smad2 タンパク質アッセイでは、SMC を DHT、Flutamide、または vehicle control で 24 時間インキュベートした後、マウス組換え TGF-β1 (5 ng/mL) または vehicle control を加え、さらに 1 時間インキュベートした。アンドロゲン受容体の活性化をブロックする場合は、DHT を投与する 3 時間前に Flutamide を培地に加えた。

## 2-9. MMP 活性アッセイ (ザイモグラフィ)

組織または SMC からタンパク質を抽出し、上記のようにタンパク質濃度を測定した。組織からの MMP-2 活性を測定するために、10%ゼラチンゲル (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた非変性電気泳動により、総タンパク質 5 μg を分離した。実験には、グループ当たり 7 ~10 匹のマウスを使用した (WT オス ; n=10, WT メス ; n=10, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=10, *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メス ; n=10, flutamide-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=7, vehicle control-treated *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス ; n=7)。平滑筋細胞の実験では、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの SMC (2.0×10<sup>5</sup> cells/mL) を SMC 培地でコンフルエントになるまで培養し、無血清培地で 24 時間飢餓状態とした後、

DHT、Flutamide、TGF- $\beta$ 1 または vehicle control で 48 時間治療した。薬物治療後、SMC 培養上清を収集し、Amicon Ultra-4 遠心フィルター (Ultracel-30K) (Millipore sigma, Billerica, MA) を使用して濃縮した。2  $\mu$ g の濃縮タンパク質を、10% ゼラチンゲル (Invitrogen) による非変性電気泳動によって分離した。MMP 活性の分子サイズは、10  $\mu$ L の MMP 標準マーカー (Cosmobio, Tokyo, Japan) を使用して決定した。デンストメトリーによるタンパク質の定量化は、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) を使用して行った。実験には、グループごとに n=6 の cell line を使用した。

## 2-10. 免疫細胞染色

培養細胞を 4% PFA/PBS で 20 分間固定し、その後 1% BSA/0.3% Triton X-100/PBS で 45 分間インキュベートした。Androgen receptor (1:100) (Abcam、ab133273) またはアイソタイプコントロール (1:100) (Abcam、ab172730) に対する一次抗体を加え、一晩インキュベートした。Alexa Fluor-594 標識抗ウサギ二次抗体を 1 : 1000 希釈で投与し、1 時間インキュベートした。細胞核は、PBS で希釈した 1:10,000 の濃度の Hoechst 試薬 (bisBenzide H33258、Sigma-Aldrich) で 10 分間染色した。Leica DM4000B 顕微鏡 (Buffalo、Grove、IL) を使用して、サンプルを 20 倍の倍率で画像化した。

## 2-11. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

16 週齢のマウスの上行/大動脈基部から蛋白質を抽出し、タンパク質濃度を測定した。

TGF- $\beta$ 1 Mouse ELISA Kit (ab119557, Abcam) は付属のプロトコールに従って使用した。active/free TGF- $\beta$ 1 の測定には、20  $\mu$ g の総タンパク質を使用した。450 nm での比色検出に続いて、標準曲線を使用して free TGF- $\beta$ 1 リガンド濃度を測定した。実験には、グループあたり 4 匹のマウスを使用した。

## 2-12. 統計分析

大動脈径は、平均 $\pm$ 標準誤差と中央値（四分位範囲）の両方で表記した。大動脈径以外の連続変数は、中央値（四分位範囲）で示した。各遺伝子型内の性差を含む以下の 2 グループ [(1) *Fbn1*C1039G/+オス vs. *Fbn1*C1039G/+メス、(2) WT オス vs. WT メス、(3) flutamide-treated *Fbn1*C1039G/+オス vs. vehicle control-treated *Fbn1*C1039G/+オス] 間の群間差は、Mann-Whitney U 検定で評価した。3 群以上のグループ間の比較を行う場合は、Kruskal-Wallis テストを行い、その後 Dunn's posttest で 2 グループ間の比較を行った。

オスとメスの大動脈径の成長パターンの相違を評価するため、混合効果モデルを使用した。マウスの週齢と体重は大動脈径の成長の交絡因子と考えられるため、週齢と体重を混合効果モデルに含め解析した。また性別が大動脈径の成長に影響するか調査するため、週齢と性別の相互作用に関しても混合効果モデルに含め解析した。*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスと WT マウスのそれぞれの大動脈径の成長に対する性別の影響を確認するために、各遺伝子型グループ内で層別化した混合効果モデルを調査した。すべての分析で、 $P < 0.05$  を統計的有意差ありとした。すべての統計分析は、GraphPad Prism バージョン 7 (GraphPad Software,



La Jolla, CA)、SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL)、または SAS バージョン 9.4 (SAS Institute Inc, Cary, NC) を使用して行った。

### 3. 結果

#### 3-1. *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスの大動脈瘤成長と elastin break の性差

オスおよびメスの *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>および WT コントロール マウスの大動脈径および成長率を、経胸壁心エコー検査を使用して、6、8、12、および 16 週齢で測定した (図 1A)。16 週齢までに、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈基部径は平均  $1.86 \pm 0.08$  mm、中央値 1.86 (1.82–1.91) mm に達し、WT オスでは平均  $1.54 \pm 0.03$  mm、中央値 1.54 (1.53–1.55) mm に達した ( $P < 0.001$ )。16 週齢の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メスでは、大動脈基部径は平均  $1.70 \pm 0.03$  mm および中央値 1.70 (1.68–1.73) mm であったのに対し、WT メスでは平均  $1.52 \pm 0.03$  mm および中央値 1.52 (1.50–1.54) mm であった ( $P < 0.001$ )。上行大動脈径は、大動脈基部径と同様の傾向を示した (図 1B)。6 週から 16 週までの大動脈基部径の成長率を比較すると、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈基部径成長率は *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メスよりも有意に高かった ( $P < 0.001$ )。対照的に、WT では大動脈基部径の成長率に有意な性差を認めなかった ( $P = 0.579$ )。オスの体重はメスよりも有意に重かったため、交絡因子を調整して大動脈瘤径の性差を調査するために多変数分析を実行した。交絡変数 (マウスの週齢と体重) で大動脈基部径を調整後、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスでは大動脈基部径 ( $P = 0.004$ ) および大動脈基部径の成長率 ( $P < 0.001$ ) がメスと比較して有意に増加していた (表)。対照的に、WT マウスの大動脈基部径では統計

学的な性差を認めなかった。週齢、体重で調整した混合効果モデルにより、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスでは、オスはメスと比較して大動脈瘤の成長が有意に増加していることが確認された (表)。*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈瘤成長率の増加と関連して、Accustain Elastin Verhoeff 's Van Gieson 染色では、16 週齢の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの elastin break がメスよりも有意に増加していた (*Fbn1* オス ; 3.67 [3.47–3.87] vs. *Fbn1* メス ; 1.17 [3.47–3.87] elastin breaks/lamina, P=0.032) (図 1C)。

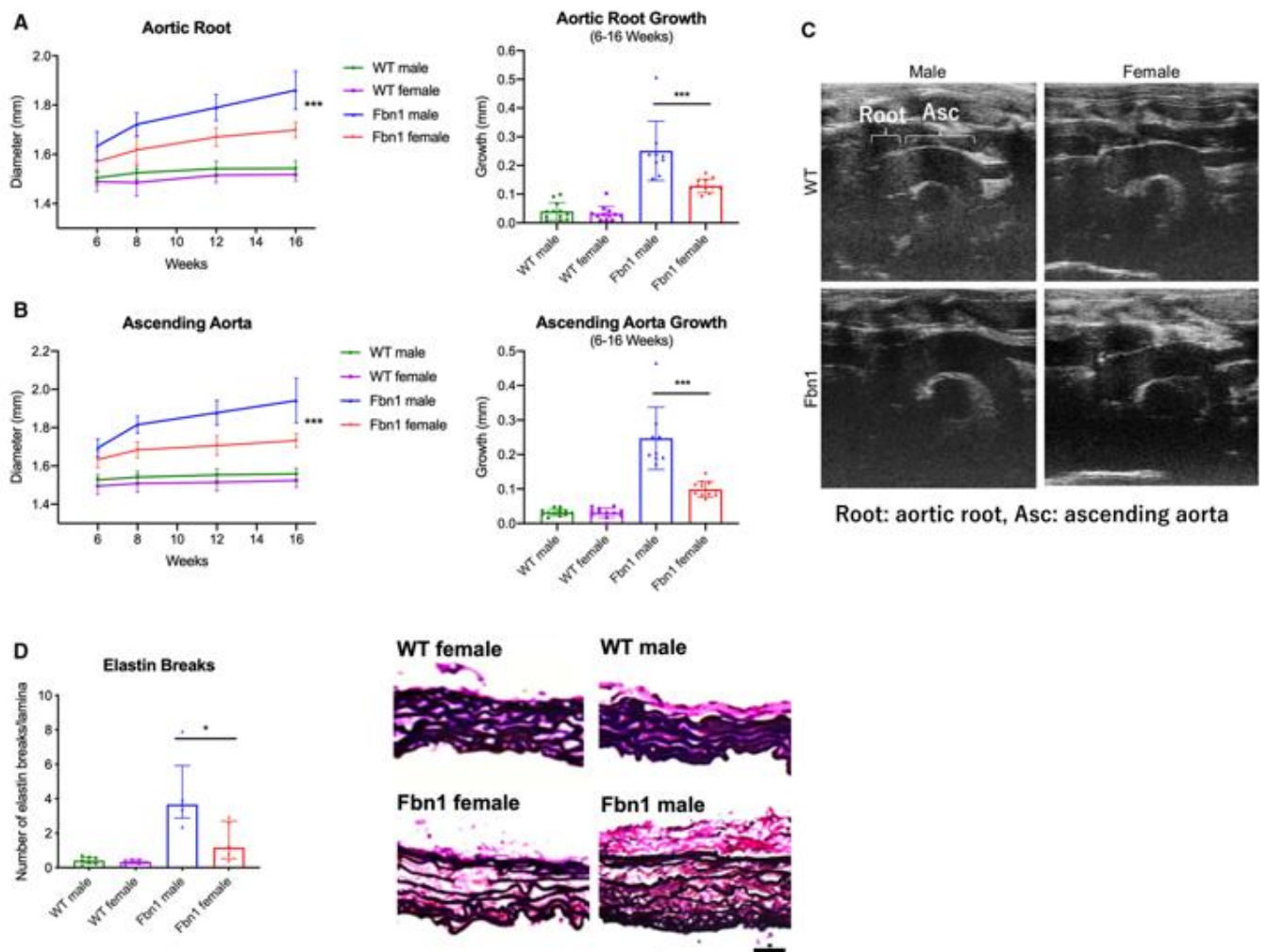


図 1. *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>および WT のオスとメスにおける大動脈の成長と elastin break を示す。

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (*Fbn1*) および同腹の野生型マウス (WT) における (A) 大動脈基部および (B) 上行大動脈の直径 (mm)、また大動脈の成長 (mm) を経胸壁心エコー検査によって 6、8、12、および 16 週齢で測定した (WT オス ; n=12, WT メス ; n=12, *Fbn1* オス ; n=9, *Fbn1* メス ; n=11)。結果は平均値±標準誤差として示す。グループ間および各遺伝子型内の大動脈成長は混合効果モデルを使用して比較した。(C) 16 週齢のマウスからの代表的なエコー画像を示す。(D) 16 週齢の *Fbn1* および WT の上行大動脈における Accustain Elastin Verhoeff's Van Gieson (EVG) 染色の代表画像と共に、弾性板あたりの elastin break 数の平均を示す (WT オス ; n=7, WT メス ; n=5, *Fbn1* オス ; n=5, *Fbn1* メス ; n=5)。スケールバーは 50 μm を表し、結果は中央値±四分位数として示した。各遺伝子型内の性別の比較に Mann-Whitney U 検定を使用した。\*P≤0.05、\*\*\*P<0.001 を表す。

表.

Factors included in model	Factor significances (Type III test p-value) in models		
	All-cohort model	Genotype-stratified model: <i>Fbn1</i> sub-cohort	Genotype-stratified model: WT sub-cohort
Genotype	<.0001	NA	NA
Sex	0.034	0.0043	0.9715
Age	<.0001	<.0001	0.3635
Body Weight	0.0655	0.0729	0.0156
Genotype * Age	<.0001	NA	NA
Sex * Age	0.0403	0.0003	0.4714

#### 表. 大動脈基部径における混合効果モデル

すべてのコホートモデル (All-cohort model) は、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (*Fbn1*) および同腹の野生型マウス (WT) (オスとメスの両方) を含むコホート全体に当てはめた。*Fbn1* サブコホートモデル (*Fbn1* sub-cohort) は *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスのオスとメスのみを含むコホートであり、WT サブコホートモデル (WT sub-cohort) は、オスとメス両方の WT マウスのみを含むコホートである。因子効果の有意性はモデルのパラメーターのタイプ III F 検定の P 値によって提示した。P<0.05 を統計的に有意差ありとした。

### 3-2. *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部大動脈瘤における p-Erk1/2 および p-Smad2 シグナル伝達の増加、および MMP 活性レベルの上昇

TGF- $\beta$ により活性化された Erk1/2 および Smad2 シグナル伝達は、成体の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスの大動脈瘤形成に寄与することが報告されている(6, 7, 25, 26)。この報告に基づき、我々は、Erk1/2 および Smad2 シグナル伝達が、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈瘤径の拡大と関連して大動脈瘤壁内で増強するという仮説を立てた。本仮説の検証のため、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>および WT における異なる胸部大動脈部位 [上行/大動脈基部・胸部下行大動脈] での Erk1/2、Smad2 (非活性型)、リン酸化 Erk1/2 (p-Erk1/2) およびリン酸化 Smad2 (p-Smad2) の組織内発現を、WES およびウェスタンブロット分析で測定した。*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>および WT マウスのオスとメスを比較した場合、Erk1/2 および Smad2 レベルに有意差を認めなかったが、p-Erk1/2 および p-Smad2 活性化は、16 週齢の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>のオスの上行/大動脈基部で有意に増加していた (p-Erk1/2 : *Fbn1* オス ; 2.12 [1.83–2.17] vs. *Fbn1* メス ; 1.63 [1.36–1.82], P=0.007, p-Smad2 : *Fbn1* オス ; 1.49 [1.37–1.5] vs. *Fbn1* メス ; 1.11 [0.95–1.33], P=0.026)。一方、WT オスとメスの上行/大動脈基部では有意差を認めなかった (p-Erk1/2 : P=0.315, p-Smad2 : P=0.132) (図 2A-D)。成体の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスでは血中 TGF- $\beta$  シグナル伝達が増強されていると報告されているが(6)、16 週齢の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>のオスまたはメスの胸部下行大動脈では WT と比較して p-Erk1/2 および p-Smad2 の発現に有意差を認めなかった (p-Erk1/2 : P=0.128, p-Smad2 : P=0.24) (図 2E・F)。

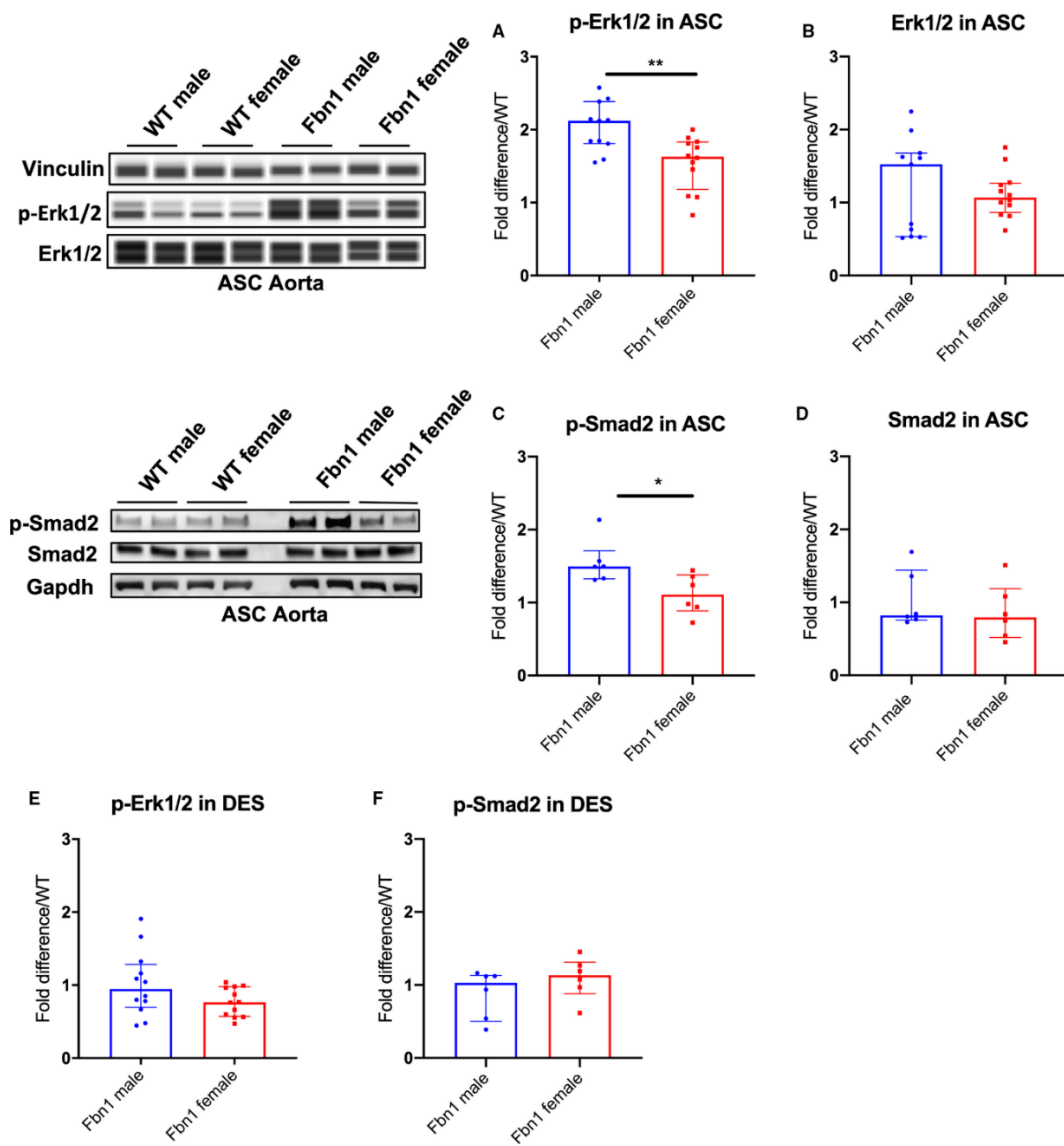


図 2. オスとメスの *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>および WT の上行/大動脈基部および胸部下行大動脈における p-Erk1/2 および p-Smad2 シグナル伝達を示す。

16 週齢 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウス (Fbn1) および同腹の野生型マウス (WT) の上行/大動脈基部標本 (ASC) における (A) リン酸化 Erk1/2 (p-Erk1/2) と (B) Erk1/2 (WT オス ; n=10, WT メス ; n=10, Fbn1 オス ; n=11, Fbn1 メス ; n=12)、および (C) リン酸化 Smad2 (p-Smad2) と (D) Smad2 (n=6, 各グループ) のタンパク質分析を示す。16 週齢 Fbn1 および WT の胸部下行大動脈標本 (DES) における (E) p-Erk1/2 (n=12, 各グループ) および (F) p-Smad2 (n=6, 各グループ) のタンパク質分析を示す。Vinculin または Gapdh をローディングコントロールとして使用した。結果は WT と比較した倍数差を求め、中央値±四分位数として示す。各遺伝子型内の性別の比較に Mann-Whitney U 検定を使用した。\*P≤0.05、\*\*P<0.01 を表す。Erk は細胞外シグナル調節キナーゼを示す。

MMPは大動脈瘤のECMリモデリングにおいて重要な役割を果たし(11, 27)、MFSの大動脈瘤拡大におけるp-Erk1/2活性の増加に関連している(7, 28)。Fbn1<sup>C1039G/+</sup>オスにおける大動脈瘤成長率の増加を裏付けるものとして、我々は、Fbn1<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部においてMMP-2活性レベルが有意に増加していることを発見した (Fbn1 オス ; 2.22 [2.03–3.00] vs. Fbn1 メス ; 1.44 [1.24–2.06], P=0.029) (図 3A)。しかし WT オスと WT メスではMMP-2活性レベルに有意な差を認めなかった。この所見は、大動脈瘤を形成した Fbn1<sup>C1039G/+</sup>の上行/大動脈基部に特異的であり、胸部下行大動脈では有意差を認めなかった (図 3B)。

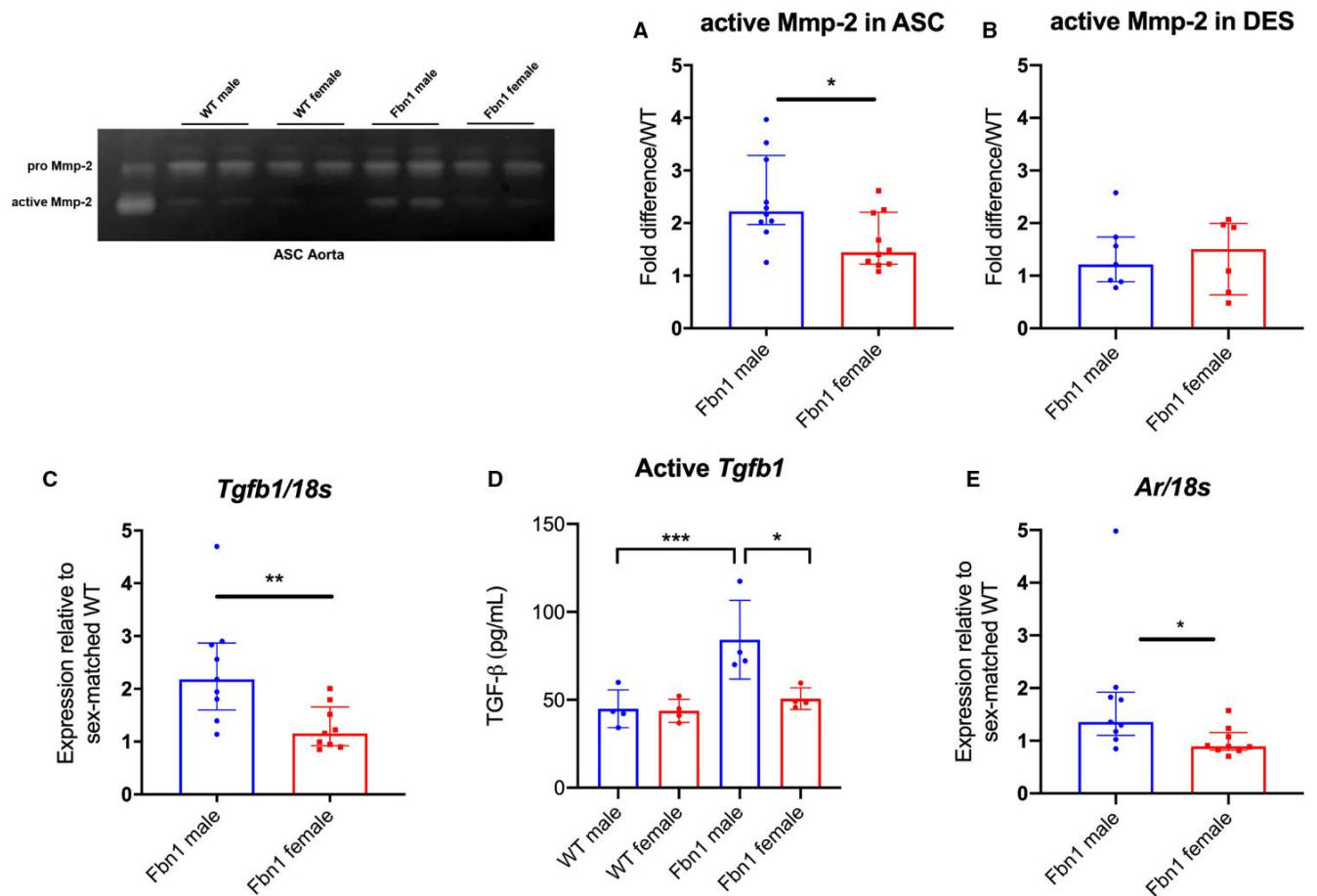


図 3. オスとメスの *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>および WT の上行/大動脈基部および胸部下行大動脈における MMP-2 活性、*Tgfb1*、およびアンドロゲン受容体遺伝子の発現を示す。

16 週齢の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウス (*Fbn1*) および同腹の野生型マウス (WT) の (A) 上行/大動脈基部 (ASC) および (B) 胸部下行大動脈 (DES) における MMP (matrix metalloproteinase) ザイモグラフィーを示す (ASC : 各グループあたり n=10, DES : WT オス ; n=7, WT メス ; n=6, *Fbn1* オス ; n=7, *Fbn1* メス ; n=6)。検査値は、性別が一致した WT と比較した倍数差として示す。16 週齢の ASC における (C) TGF-β1(トランスフォーミング成長因子-ベータ 1)リガンド (*Tgfb1*) および (E) アンドロゲン受容体 (*Ar*) の RT-PCR (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) の結果を示す (WT オス ; n=8, WT メス ; n=8, *Fbn1* オス ; n=9; *Fbn1* メス ; n=9)。(D) ASC における活性 TGF-β1 リガンド (Active *Tgfb1*) の ELISA 法の結果を示す (各グループあたり n=4)。Fbn1 における mRNA 発現値はハウスキーピング遺伝子として 18S に正規化され、2-ΔΔCt メソッドを使用して WT と比較した倍率差を計測した。結果は中央値±四分位数として示す。各遺伝子型内の性別の比較に Mann-Whitney U 検定を使用した。\*P≤0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001 を表す。

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部における Smad および Erk のシグナル伝達は、メスに比

べて増強しており、TGF- $\beta$  シグナル伝達がより活性化していることが示唆された。我々は、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部における TGF- $\beta$ 1 リガンドの bioavailability の増加がこれらの所見に関連するという仮説を立て、本仮説の検証のため、上行/大動脈基部における TGF- $\beta$ 1 (*Tgfb1*) 遺伝子および活性（非結合）TGF- $\beta$ 1 リガンドの発現を調査した。RT-PCR 実験では *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの ASC における TGF- $\beta$ 1 (*Tgfb1*) 遺伝子発現がメスのそれよりも有意に高かった (*Fbn1* オス ; 2.18 [1.83–2.81] vs. *Fbn1* メス ; 1.16 [0.95–1.52], P=0.006, 図 3C)。さらに、ELISA では *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部における活性（非結合）TGF- $\beta$ 1 リガンドが有意に増加していた (*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メスに対して *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスでは 1.66 倍の増加, 図 3D)。最後に、上行/大動脈基部におけるアンドロゲン受容体 (*Ar*) 遺伝子発現は、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メスと比較して、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスでは有意に増加していた (*Fbn1* オス ; 1.36 [1.18–1.83] vs. *Fbn1* メス ; 0.89 [0.83–1.08], P=0.0142, 図 3E)。これらの所見から、MFS における大動脈瘤拡大に関するメディエーターが、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メスと比較して *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスでは増強しており、動脈瘤拡大の進行と関連している可能性が示唆された。

### 3-3. *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈由来 SMC におけるアンドロゲンによる TGF- $\beta$ 誘導性の p-Erk1/2 および p-Smad2 シグナル伝達の増強

アンドロゲンは TGF- $\beta$  リガンド遺伝子の発現を増加させると報告されている(29, 30)。我々は、アンドロゲンが *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈瘤において、TGF- $\beta$  誘導性の p-Erk1/2 および p-Smad2 シグナル伝達を増強させると仮定し、SMC におけるアンドロゲンの TGF- $\beta$  シ



グナル伝達への影響を調査するため、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部由来の SMC を使用して *in vitro* 実験を施行した。*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス SMC への TGF- $\beta$ 1 投与 (5 ng/mL、24 時間) によって、p-Erk1/2 シグナル伝達は有意に増加した (2.23 [2.20–2.30], P=0.008)。また、DHT 単独投与では p-Erk1/2 レベルは上昇しなかったが、DHT は TGF- $\beta$  誘導性の p-Erk1/2 活性化を有意に増強させた (TGF- $\beta$ +DHT ; 3.11 [3.06-3.33], P=0.047, 図 4A)。DHT による p-Erk1/2 の活性化は Flutamide (アンドロゲン受容体遮断薬) 投与によるアンドロゲン受容体遮断後、有意に減少した (TGF- $\beta$ +DHT ; 3.11 [3.06-3.33] vs. TGF- $\beta$ +DHT+Flutamide ; 2.03 [1.90-2.19], P=0.005)。同様に、DHT は TGF- $\beta$  誘導性の p-Smad2 シグナル伝達を増強させ (TGF- $\beta$ +DHT ; 1.34 [1.19-1.50], P=0.014, 図 4B)、この反応は、Flutamide 治療後に有意に減少した (TGF- $\beta$ +DHT ; 1.34 [1.19-1.50] vs. TGF- $\beta$ +DHT+ Flutamide ; 0.99 [0.83-1.09], P=0.031)。

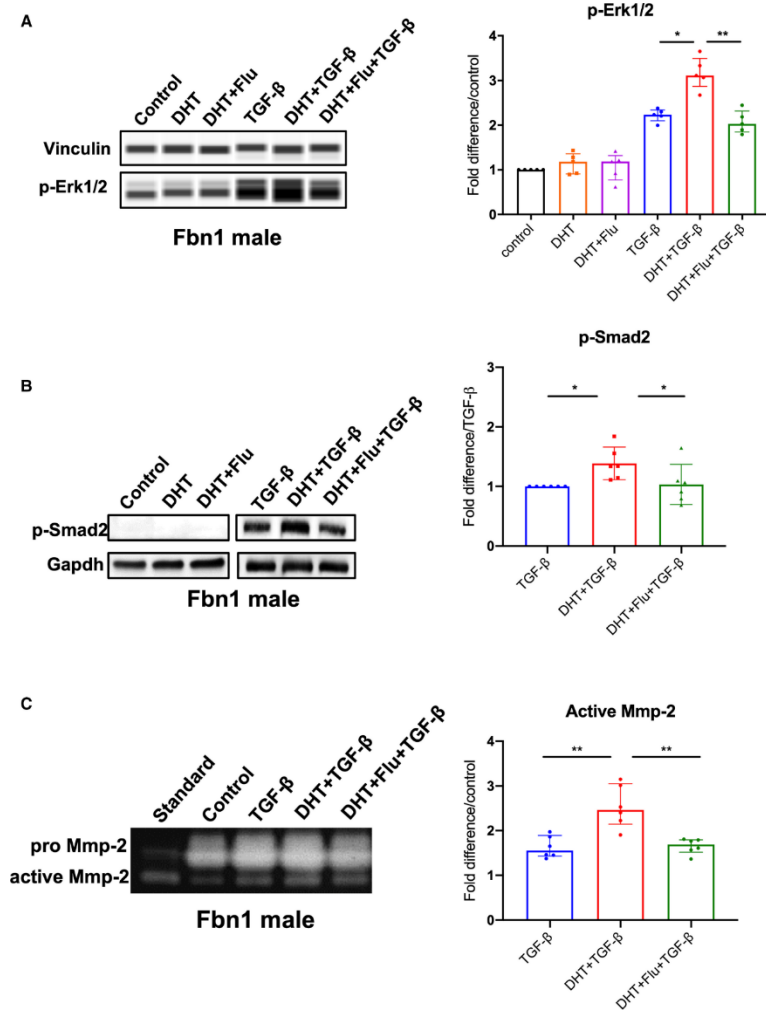


図 4. ホルモン治療後の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> オスの上行/大動脈基部由来の平滑筋細胞における p-Erk1/2、p-Smad2 シグナル伝達および MMP-2 活性を示す。

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (*Fbn1*) オスの上行/大動脈基部検体 (ASC) 由来の平滑筋細胞 (SMC) に Dihydrotestosterone 10 nmol/L (DHT)、DHT+flutamide 1  $\mu$ mol/L (Flu)、TGF- $\beta$ 1 5 ng/mL (TGF- $\beta$ ) +DHT、TGF- $\beta$ +DHT+Flu または vehicle control で治療し、(A) リン酸化 Erk1/2 (p-Erk1/2) (各グループあたり n=5) および (B) リン酸化 Smad2 (p-Smad2) (各グループあたり n=6) のタンパク質分析を示す。ローディングコントロールとして vinculin または Gapdh を使用した。p-Erk1/2 の測定値は vehicle control との倍数差として示す。p-Smad2 では vehicle control で治療した SMC ではシグナルが検出されなかったため、TGF- $\beta$  投与で検出したシグナルとの倍数差として値を示す。(C) 上記ホルモンで治療した SMC における、細胞培養上清中の MMP-2 活性 (各グループあたり n=6)。結果は vehicle control と比較した倍数差として測定し、中央値 $\pm$ 四分位数として代表的な画像と共に示す。3 群以上のグループ間の比較を行う場合は、Kruskal-Wallis テストを行い、その後 Dunn's posttest で 2 グループ間の比較を行った (vehicle control vs. DHT vs DHT+Flu、TGF- $\beta$  vs. TGF- $\beta$ +DHT vs. TGF- $\beta$ +DHT+Flu)。\* $P \leq 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  を表す。

アンドロゲン、TGF- $\beta$  依存性の Erk/Smad シグナル伝達と MMP 活性との関連性を調査するために、MMP-2 活性レベルをゼラチンザイモグラフィで測定した (図 4C)。MMP-2 活性は vehicle control と比較して TGF- $\beta$  投与後に有意に増加した (TGF- $\beta$  ; 1.56 [1.45-1.81] fold increase/vehicle control, P=0.002)。さらに、TGF- $\beta$ +DHT は、MMP-2 活性レベルを増強させた (TGF- $\beta$ +DHT ; 2.47 [2.27-2.89] vs. TGF- $\beta$  ; 1.56 [1.45-1.81], P=0.009)。その効果は、Flutamide 投与により有意に減少した (TGF- $\beta$ +DHT ; 2.47 [2.27-2.89] vs. TGF- $\beta$ +DHT+Flutamide ; 1.69 [1.58-1.78], P=0.008)。

TGF- $\beta$  と DHT は双方とも前立腺間質細胞のアンドロゲン受容体活性を増強させるが[(31-33)]、大動脈 SMC におけるアンドロゲン受容体に TGF- $\beta$  および DHT が及ぼす影響は解明されていない。この関連性を評価する目的で、SMC に TGF- $\beta$  または DHT の 24 時間負荷を行い、SMC におけるアンドロゲン受容体のタンパク質レベルの発現をウェスタンブロッティング法で測定した。*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの SMC のアンドロゲン受容体レベルは vehicle control と比較して TGF- $\beta$  および DHT 治療の両方で有意に増加した (TGF- $\beta$  ; 1.33 [1.29-1.35] fold increase/vehicle control, P=0.046, 図 5A)。これらの所見と合致し、SMC の免疫化学染色では、TGF- $\beta$  または DHT 投与後にアンドロゲン受容体の発現増加を認めた (図 5B)。

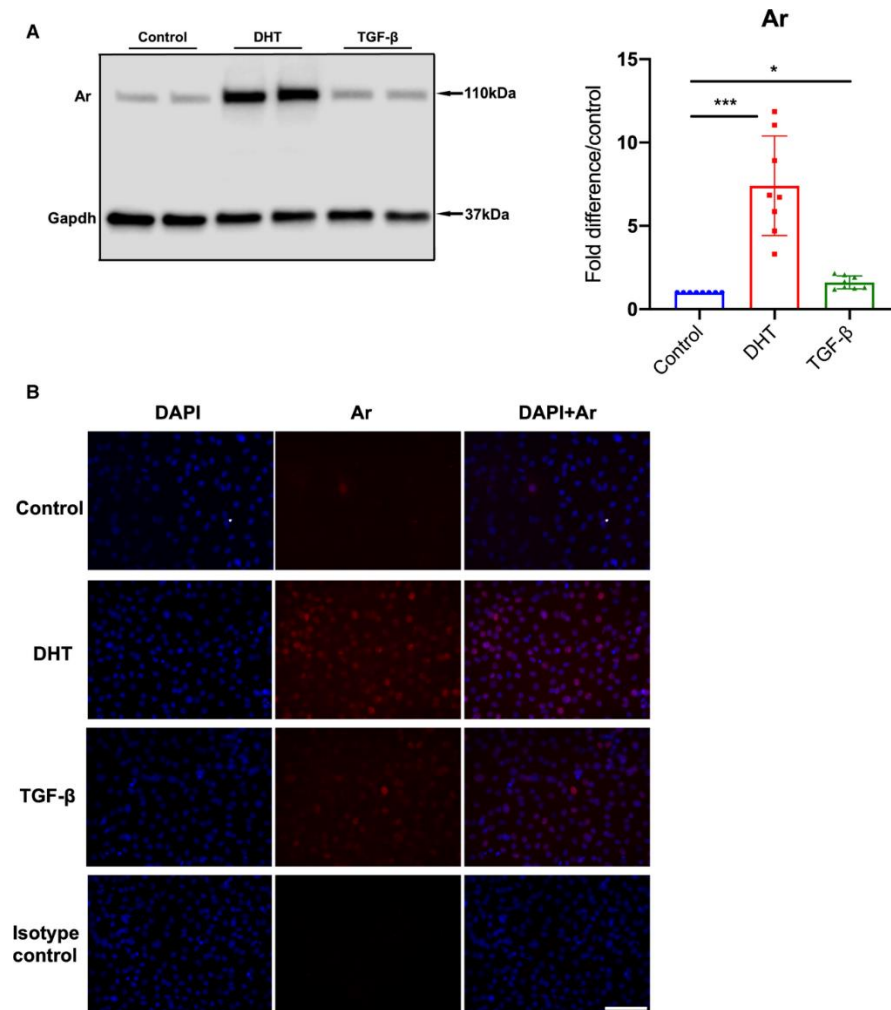


図5. TGF- $\beta$  投与後の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部由来の平滑筋細胞におけるアンドロゲン受容体タンパク質レベルを示す。

(A) TGF- $\beta$ 1 5 ng/mL (TGF- $\beta$ )、Dihydrotestosterone 10 nmol/L (DHT) または vehicle control (control) で 24 時間治療後、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (*Fbn1*) オスに由来する上行/大動脈基部 (ASC) 由来の平滑筋細胞 (SMC) におけるアンドロゲン受容体 (Ar) のタンパク質分析を行った (各グループあたり n=8)。ローディングコントロールとして Gapdh を使用した。代表的な画像と共に、値は vehicle control との倍数差として測定し、中央値 $\pm$ 四分位数として示す。3群以上のグループ間の比較を行う場合は、Kruskal-Wallis検定を行い、その後 Dunn's posttest で2グループ間の比較を行った: control vs DHT vs TGF- $\beta$ 。

(B) vehicle control、DHT、TGF- $\beta$ 、またはアイソタイプコントロールで 48 時間治療した後に Hoechst 試薬 (青) およびアンドロゲン受容体抗体 (赤) で染色した *Fbn1* オス ASC 由来 SMC の免疫蛍光画像を示す。スケールバーは 100  $\mu$ m を表す。全ての画像は、3回以上の独立した実験を行った代表的な画像である。\* $P \leq 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$  を表す。

### 3-4. アンドロゲン受容体遮断薬による *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈瘤の成長と Erk1/2 および

#### Smad2 活性化の抑制

アンドロゲンによる大動脈瘤形成のメディエーターの増強が MFS 男性の動脈瘤拡大に寄与するという仮説を検証するため、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>および WT オスに (1) Flutamide (アンドロゲン受容体遮断薬) または (2) vehicle control のいずれかを 6~16 週齢まで投与した。特筆すべき点として、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの Flutamide 治療群では大動脈基部の大動脈瘤の直径とその成長速度が vehicle control 治療群と比較して有意に減少していた (16 週齢の大動脈基部径 ; Flutamide 治療群 vs. vehicle control 治療群: 平均  $1.71 \pm 0.04$  mm および中央値 1.69 [1.68–1.72] mm vs. 平均  $1.86 \pm 0.08$  mm および中央値 1.88 [1.78–1.90] mm、 $P=0.001$ ) (図 6A)。上行大動脈瘤でも同様の結果が認められた (図 6B)。対照的に、WT オスの Flutamide 治療群では大動脈基部または上行大動脈の直径は vehicle control 群と有意差を認めなかった。Accustain Elastin Verhoeff ‘s Van Gieson 染色による組織学的検査では、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの Flutamide 治療群の上行/大動脈基部における elastin break が有意に減少していた (Flutamide 治療群 vs. vehicle control 治療群 ; 1.41 [1.13–1.72] vs. 2.45 [2.02–2.71] elastin breaks/lamina、 $P=0.032$ ) (図 6C)。

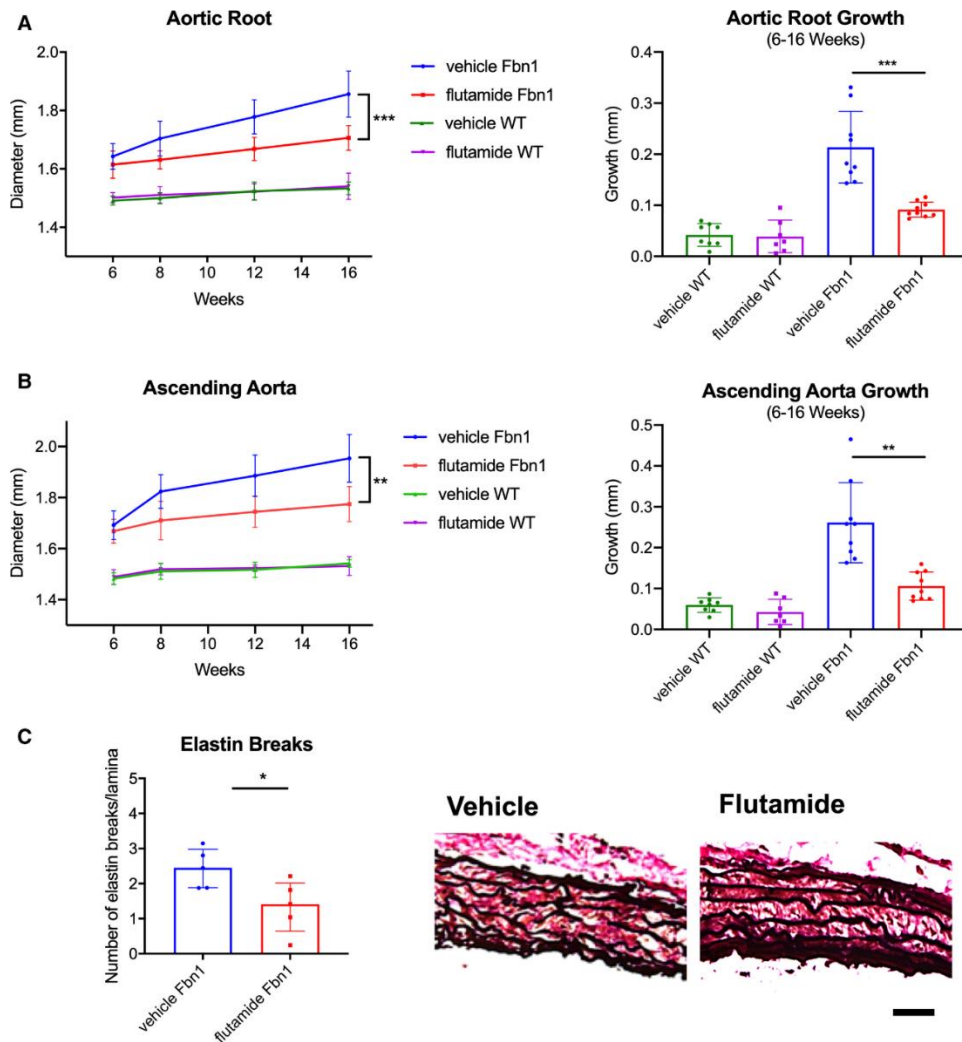
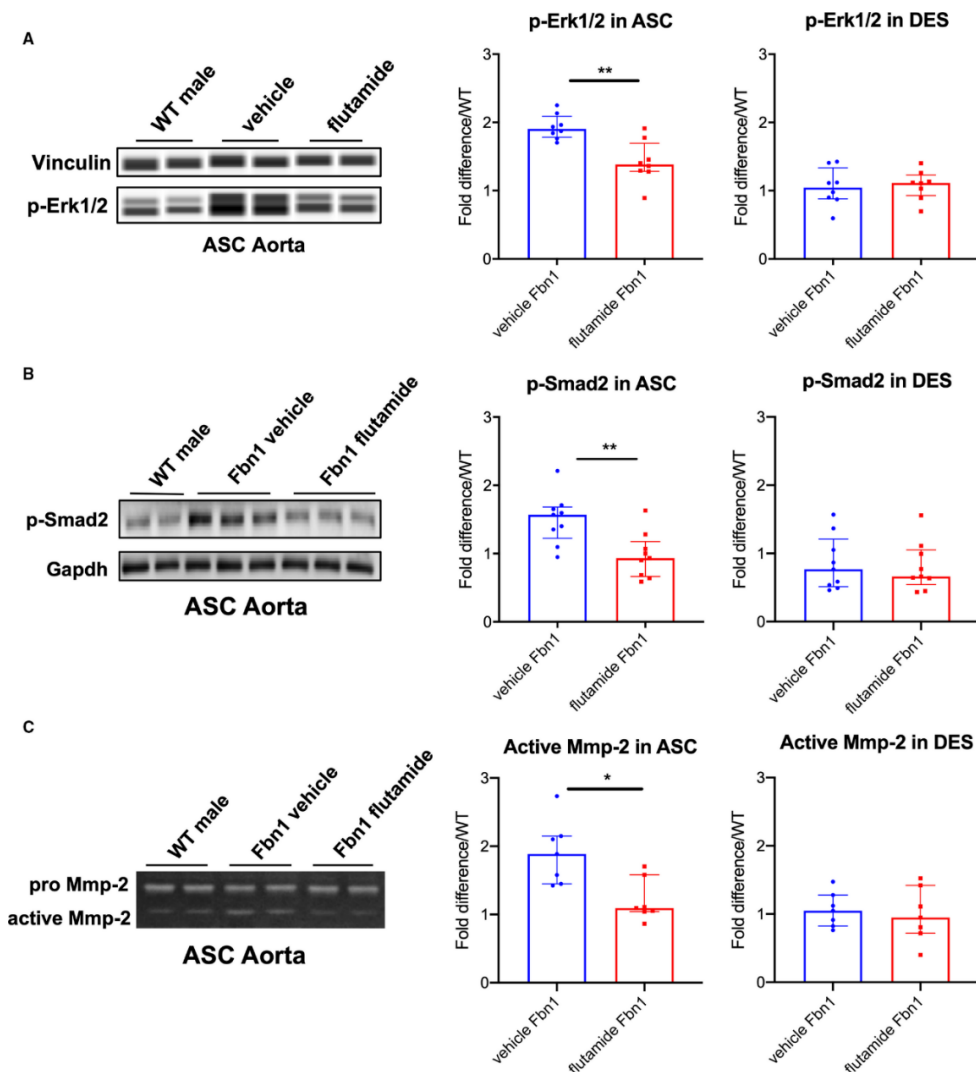


図 6. Flutamide で治療した *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスにおける大動脈瘤の発生および elastin break 6、8、12、および 16 週齢における *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (Fbn1) および同腹仔野生型コントロール マウス (WT) オスの (A) 大動脈基部および (B) 上行大動脈の直径 (mm) および大動脈の成長 (mm) の時系列データを示す (Fbn1 vehicle control 治療群 n=9, Fbn1 flutamide 治療群 n=9, WT vehicle control 治療群 n=8, WT Flutamide 治療群 n=7)。結果は平均値±標準誤差として示す。グループ間の大動脈成長の違いは混合効果モデルを使用して比較した。(C) Flutamide または vehicle control で治療された 16 週齢の Fbn1 における上行/大動脈基部の代表的な Accustain Elastin Verhoeff's Van Gieson (EVG) 染色と共に、弾性板あたりの elastin break の平均数を示す (各グループあたり n=5)。スケールバーは 50 μm を表し、結果は中央値±四分位数として示す。グループ間の比較には Mann-Whitney U 検定を使用した。\*P≤0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001 を表す。

さらに *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの Flutamide 治療群では vehicle control 群と比較して上行/大動脈基部における p-Erk1/2 および p-Smad2 発現の有意な減少を認めた (p-Erk1/2 : Flutamide 治療

群 ; 1.38 [1.30–1.46] vs. vehicle control 治療群 ; 1.91 [1.84–1.96],  $P=0.005$ , p-Smad2 : Flutamide 治療群 ; 0.93 [0.69–1.07] vs. vehicle control 治療群 ; 1.57 [1.35–1.65],  $P=0.006$ ) (図 7A、7B)。

一方、胸部下行大動脈検体は p-Erk1/2 および p-Smad2 の発現に両群で有意差を認めなかった (図 7A、7B)。 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの Flutamide 治療群における elastin break の減少と関連して、 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの Flutamide 治療群の上行/大動脈基部における MMP-2 活性レベルは有意に減少していた (Flutamide 治療群 vs. vehicle control 治療群, 1.09 [1.05–1.23] vs. 1.89 [1.55–2.11],  $P=0.016$ )。また一方で、胸部下行大動脈では MMP-2 活性に両群で有意差を認めなかった (図 7C)。



**図 7. Flutamide で治療した *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスにおける上行/大動脈基部および下行大動脈における p-Erk1/2、p-Smad2 シグナル伝達および MMP-2 活性**

flutamide または vehicle control で治療した *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスにおける 16 週齢の上行/大動脈基部 (ASC) および下行大動脈 (DES) 検体から (A) リン酸化 Erk1/2 (p-Erk1/2) (*Fbn1* Flutamide 治療群 n=8、*Fbn1* vehicle control 治療群 n=8) および (B) リン酸化 Smad2 (p-Smad2) (各グループあたり n=9) のタンパク質分析を行った。vinculin または Gapdh をローディングコントロールとして使用した。値は同腹の野生型コントロール (WT) のオスと比較した倍数差として表した。(C) Flutamide または vehicle control で治療した *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスにおける 16 週齢の ASC および DES からゼラチンザイモグラフィを行った (各グループあたり n=7)。値は同様に WT オスと比較した倍数差として測定し、結果は中央値±四分位数として示す。グループ間の比較に Mann-Whitney U 検定を使用した。\*P<0.05、\*\*P<0.01 を表す。

#### 4. 考察

MFS の大動脈瘤発生における病態生理は、複雑な多因子プロセスが存在する。MFS ヒトおよびマウスの大動脈瘤標本では TGF- $\beta$  シグナルの下流である p-Erk1/2 および p-Smad2 シグナル伝達は増加していると報告されており、MFS の大動脈瘤形成過程において TGF- $\beta$  の病原性役割が示唆されている(6, 7, 25, 27, 28)。しかしながら、MFS の大動脈瘤において、TGF- $\beta$  シグナル伝達異常が疾患発生に及ぼす影響に関しては、十分に解明されていない部分も多い。新生児 MFS マウスにおける TGF- $\beta$  シグナルの遮断は胸部大動脈の拡大をもたらすが(26, 34-36)、後期段階 (6~8 週齢) での TGF- $\beta$  シグナルの中和は大動脈の拡大を抑制するという報告されており(7, 25, 26)、TGF- $\beta$  シグナルによる大動脈瘤形成への影響は大動脈発達の多段階に関連していると考えられる。今回我々は、確立した MFS モデルである *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウス (in vivo) と大動脈 SMC (in vitro) の 2 つの実験を施行し、MFS の既知



の生化学的変化（TGF- $\beta$  誘導性 Erk/Smad シグナル伝達の強化を含む）の性差および大動脈瘤の拡大に対するアンドロゲンの効果を多角的に調査した。本研究の主な所見は次のとおりである。(1) *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスはメスと比較して大動脈瘤の拡大、成長が有意に進行していた。(2) *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行大動脈において p-Erk1/2 および p-Smad2 シグナル伝達は有意に増加し、それに関連して MMP-2 活性も同様に増加していた。(3) *in vitro* 研究で *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部由来の SMC において、アンドロゲンは直接的もしくは間接的に TGF- $\beta$  誘導性の p-Erk1/2 および p-Smad2 の活性化、および MMP-2 活性を増強させた。(4) *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス マウスへの Flutamide 治療は、上行/大動脈基部の大動脈拡大を抑制した。

現在の MFS の大動脈瘤に対する治療ガイドラインでは、大動脈瘤のサイズと大動脈拡大の成長率に基づいて外科治療の適応を定めている(4)。今回の *in vivo* 実験モデルは、ヒト MFS 症例の大動脈拡大に類似しており、MFS モデルマウスにおける大動脈瘤の進行および薬物治療による疾患発症予防効果は、臨床的意義を有する。一方、ヒト MFS 症例と比較し、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> MFS マウスモデルは、大動脈拡大の程度が軽度であるため 1 年以上生存することが多く、青壮年期に大動脈解離または大動脈破裂を発症することは比較的稀である。よって、本モデルを使用した研究は大動脈イベントのリスクにおいて、ヒト男性 MFS 症例におけるアンドロゲンの影響を反映していない可能性がある。

本研究では、体重と週齢の調整した後も、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスが同種メスと比較し、有意な大動脈瘤の拡大と成長率の増加を示した。また *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈瘤サイズの増加と

関連し、組織学的にも大動脈瘤壁の *elastin break* が同種メスと比較して増加していることも確認された。*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスの大動脈瘤形成における性差の原因としては、オスの大動脈瘤で TGF- $\beta$  誘導性の p-Erk1/2 および p-Smad2 のリン酸化が同種メスよりも亢進していることが明らかとなったが、雄雌間での血压差が影響した可能性は否定できない。小児 MFS 症例 (5-18 歳) では、男児・女児間で末梢血压の格差はなかったが(37)、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスの血压の性差に関する報告はない。今後の研究では、tail cuff 法や direct canulation 法による血压測定を発生の各段階で経時的に行い、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスの雄雌での血压格差と大動脈瘤拡大の関連性も評価していく予定である。

in vitro 実験においては、SMC に DHT と TGF- $\beta$  を投与した群で p-Erk1/2 および p-Smad2 のリン酸化促進が確認された。マウス大動脈の SMC では報告されていないが、ヒト血管内皮細胞や末梢動脈の SMC(38)、及びヒト胎児肺線維芽細胞(39)では、TGF- $\beta$  シグナル伝達以外の経路によるアンドロゲン受容体を介した p-Erk1/2 活性化現象が報告されている。マウス大動脈 SMC でも、AR を介した TGF- $\beta$  以外の p-Erk 活性化経路が存在する可能性はありうる。今回の in vitro 実験では、DHT 単独投与による p-Erk1/2 発現増強効果がなかったものの、DHT・TGF- $\beta$  共負荷による p-Erk1/2 および p-Smad2 のリン酸化促進現象は、TGF- $\beta$  を直接介する経路とそれ以外の間接的な経路によりもたらされた可能性がある。TGF- $\beta$  を直接介する経路に関しては、細胞質内に存在するアンドロゲン受容体が DHT と結合し、核内に移動後に下流遺伝子の転写が促進されるため(40)、細胞質内もしくは核内でアンドロゲン受容体・DHT 複合体が、直接的あるいは間接的に TGF- $\beta$  のリガンド、または TGF- $\beta$  受容

体の発現に影響を及ぼし、その下流の Erk/Smad シグナル伝達のリン酸化を促進している機序が推測される。DHT と TGF- $\beta$  の相互的メカニズムに関しては、今後更なる調査が必要である。

in vivo の薬物投与実験では、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスへの Flutamide 投与は Erk/Smad シグナルのリン酸化を抑制し、大動脈瘤の拡大と ECM リモデリングを減少させた。本現象に関しては、アポ E 欠損マウスを使用した腹部大動脈瘤モデルでは、アンドロゲンが腹部大動脈壁アンギオテンシンII受容体の発現を増強させるという報告もあり(19)、Flutamide にアンドロゲン受容体阻害が TGF- $\beta$  シグナル伝達以外の経路で大動脈瘤壁の Erk/Smad シグナルの一部を抑制した可能性も考えられる。MFS の大動脈瘤におけるアンギオテンシンIIおよびアンギオテンシンII受容体の性差やアンドロゲンのアンギオテンシンII受容体への影響などに関する報告はなく、今後の研究課題と思われる。尚、若年～青年の MFS 男性症例に対する将来的なアンドロゲン受容体拮抗薬の臨床使用に際しては、長期間服用に伴う女性化乳房、肝機能障害、骨粗しょう症など副作用の発症に注意を要する。副作用対策としては、定期的に採血検査や骨密度測定を行い、副作用の早期発見に努めるとともに、副作用発症時にはアンドロゲン受容体拮抗薬投与を直ちに中止し経過観察を行う。

Jimenez-Altayo らは本研究と同様の *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウス モデルを使用し、大動脈瘤の性差を報告した(17)。彼らによると上行大動脈の生理的収縮反応は、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メスと比較してオスの方が有意に大きかった。さらに興味深いことに、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスにおいてフェニレフリンに対する上行大動脈の収縮反応の増強を認めたが、胸部下行大動脈では収縮反応が

軽減していた。本研究でも同様に大動脈の部位的特異性が観察され、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部では p-Erk1/2、p-Smad2 および MMP-2 活性の増加を認めたが、胸部下行大動脈ではこれらの反応を認めなかった。大動脈は発生の段階でセグメントによって異なる胚の起源があるため、MFS において増強した全身性 TGF- $\beta$  シグナル伝達に対する SMC レベルの反応が大動脈部位別に異なった応答をするのかもしれない。

文献的調査の範疇では、本研究は、アンドロゲンが TGF- $\beta$  誘導性の Erk/Smad 活性化を増強し、最終的に *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスにおける ECM リモデリングと大動脈瘤成長の進行に寄与することを報告した最初の研究である。また本研究では実行されていないが、前述したメカニズムの遠位の拮抗薬 (Erk または MMP 遮断) による *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスへの治療は、大動脈瘤の進行における性差を是正する可能性があると考えられる。*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部では活性型 TGF- $\beta$  の増加が検出されたが、アンドロゲン依存性の TGF- $\beta$  受容体発現の増加も関与している可能性がある(33)。興味深いことに、Bowen らは血管 Ehlers-Danlos 症候群のマウスモデルを使用し、アンドロゲンがプロテインキナーゼ C (PKC) /Erk 経路を介して大動脈瘤を進行させ破裂リスクを増加すると報告した(41)。今回我々は *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスに対してアンドロゲン受容体遮断薬を投与することにより大動脈瘤拡大の抑制を確認したが、腹部大動脈瘤モデルのオスマウスを去勢することによって大動脈瘤の拡大を抑制したという報告があり(42)、去勢により内因性アンドロゲンを減少させることで *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈瘤拡大が抑制される可能性も考えられた。また、本研究では *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの大動脈 SMC への TGF- $\beta$  または DHT の治療はアンドロゲン受容体の発

現レベルを有意に増加させることが明らかになった。血管 SMC における TGF- $\beta$  シグナル伝達とアンドロゲンの相関関係は未だ明らかではないが、TGF- $\beta$  は前立腺間質細胞のアンドロゲン受容体を活性化し(28)、アンドロゲンは心筋細胞の TGF- $\beta$ /Smad 経路を増強する(11)。さらにいくつかの研究では、アンドロゲンが p-Erk1/2 活性化を介して血管 SMC のアポトーシス、増殖、遊走に影響を与えると報告されており(38, 43, 44)、SMC のアポトーシス、増殖、遊走は大動脈瘤形成に重要な役割を果たすと考えられている(10)。

また重要なことにエストロゲンが *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メスの大動脈瘤の成長を軽減させている可能性も否定できない。マウスモデルにおいてエストロゲンは腹部大動脈瘤の発達を軽減し、腹部大動脈瘤発生に関連する抗酸化作用と抗炎症作用を軽減する作用があると報告されている(45-47)。さらに興味深いことに、エストロゲンは血管 SMC における MAPK (マイトジェン活性化プロテインキナーゼ) および TGF- $\beta$  誘導性 p-Smad2 活性化を軽減する可能性がある(48, 49)。

ベータ遮断薬、ロサルタン、スタチンなどの薬物治療は MFS 大動脈瘤の進行を遅らせる可能性があるが、今のところ大動脈瘤への予防的外科的手術が MFS 患者の平均寿命を効果的に延長する確立された唯一の治療法である(25, 50)。本研究は MFS 大動脈瘤の進行を軽減する新しい薬物療法として、食品医薬品局によってすでに承認されているいくつかの抗アンドロゲン薬 (フルタミド、スピロノラクトンなど) は、大動脈瘤の進行を抑制し、外科的手術までの時間を延長する役割を果たす可能性があることを示唆している。

本研究の limitation としては、以下の点が挙げられる。まず、本研究で使用した *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスは、発生の異なる大動脈基部 (second heart field 由来) と上行大動脈 (neural crest 由来) の両部位で大動脈瘤が形成されるため、大動脈基部に特異的に大動脈瘤を形成するヒト MFS 症例とは異なる生物学的特性を有する。この点、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>マウスを使用した実験モデルは、ヒト MFS 症例の大動脈瘤の病態を正確に反映していない可能性がある。第二に、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスの上行/大動脈基部検体から作成した SMC は血管平滑筋主体の細胞であるが、一定数の線維芽細胞を含む可能性がある。また、培養細胞の継代過程で SMC の表現型が収縮型から合成型に変化するため、培養 SMC 細胞は、生体内とは異なる生物学的特性を有する可能性がある。第三に、今回我々は、MFS の大動脈瘤形成に関する報告が多い MMP-2 (11, 27, 51, 52) に着目した解析実験を行ったが、他の MMPs 群の発現に関する実験を施行しなかった。サイモグラフィーで計測可能な MMP-9 は、MMP-2 と同様に MFS の大動脈病変で活性化することが報告されている(51, 52)。悪性腫瘍の疾患モデルでは、アンドロゲン受容体が MMP-9 の発現増強が報告されおり(53)、*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オスへのアンドロゲン受容体遮断薬投与により、大動脈瘤壁の MMP-9 も抑制された可能性がある。今後の研究で、MMP-2 以外の MMPs 発現にアンドロゲンが及ぼす影響を解析する予定である。第四に、今回の研究では、図 1 で示した *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>メス (未治療メス群) と図 6 で示したアンドロゲン受容体拮抗薬治療を受けた *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>オス (Flutamide 投与オス群) の週齢 6—16 週での上行大動脈/大動脈基部径の成長率を比較では、未治療メス群 vs. Flutamide 投与オス群; 0.123 [0.118-0.144] vs. 0.085 [0.081-0.101], P<0.001 と有意に Flutamide 投与オス群で

大動脈拡大の抑制効果が得られた。しかしながら、上記 2 群の実験は、異なる世代間で行われたこと、バイアス除去のためには、未治療メス群も Flutamide の溶媒治療 (vehicle control) を行う必要があることなどを考慮すると、Flutamide 投与が未治療のメスより大動脈拡大効果が強いと述べるためには、追加実験を行う必要があると考えられた。

## 5. 結論

本研究では MFS モデルマウスにおいて、大動脈瘤の成長や既知のシグナル伝達 (Erk/Smad2 シグナル伝達の活性化) の性差を明らかにした。また、上行/大動脈基部由来の平滑筋細胞研究では、アンドロゲンが TGF- $\beta$ 1 誘導性の Erk/Smad シグナル伝達をより増強することが判明した。さらにオスへのアンドロゲン受容体遮断薬 (Flutamide) による治療は大動脈瘤の p-Erk1/2 および p-Smad2 の活性化を減少させ、その拡大を抑制した。

## 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(15):804-8.
2. Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *Lancet.* 2005;366(9501):1965-76.
3. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature.* 1991;352(6333):337-9.
4. JCS Joint Working Group. Guidelines for diagnosis and treatment of aortic aneurysm and aortic dissection (JCS 2011): digest version. *Circ J.* 2013;77(3):789-828.
5. Benke K, Agg B, Szilveszter B, Tarr F, Nagy ZB, Polos M, et al. The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Cardiol J.* 2013;20(3):227-34.
6. Matt P, Schoenhoff F, Habashi J, Holm T, Van Erp C, Loch D, et al. Circulating transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Circulation.* 2009;120(6):526-32.
7. Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, Bedja D, Chen Y, van Erp C, et al. Noncanonical TGFbeta signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science.* 2011;332(6027):358-61.
8. Dietz HC, Loeys B, Carta L, Ramirez F. Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2005;139C(1):4-9.
9. Cheng J, Zhou X, Jiang X, Sun T. Deletion of ACTA2 in mice promotes angiotensin II induced



- pathogenesis of thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Thorac Dis.* 2018;10(8):4733-40.
10. Emrich FC, Okamura H, Dalal AR, Penov K, Merk DR, Raaz U, et al. 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(1):146-54.
  11. Xiong W, Knispel RA, Dietz HC, Ramirez F, Baxter BT. Doxycycline delays aneurysm rupture in a mouse model of Marfan syndrome. *J Vasc Surg.* 2008;47(1):166-72; discussion 72.
  12. Groth KA, Stochholm K, Hove H, Kyhl K, Gregersen PA, Vejstrup N, et al. Aortic events in a nationwide Marfan syndrome cohort. *Clin Res Cardiol.* 2017;106(2):105-12.
  13. Franken R, Groenink M, de Waard V, Feenstra HM, Scholte AJ, van den Berg MP, et al. Genotype impacts survival in Marfan syndrome. *Eur Heart J.* 2016;37(43):3285-90.
  14. Detaint D, Faivre L, Collod-Beroud G, Child AH, Loeys BL, Binquet C, et al. Cardiovascular manifestations in men and women carrying a FBN1 mutation. *Eur Heart J.* 2010;31(18):2223-9.
  15. Meijboom LJ, Timmermans J, Zwinderman AH, Engelfriet PM, Mulder BJ. Aortic root growth in men and women with the Marfan's syndrome. *Am J Cardiol.* 2005;96(10):1441-4.
  16. Renard M, Muino-Mosquera L, Manalo EC, Tufa S, Carlson EJ, Keene DR, et al. Sex, pregnancy and aortic disease in Marfan syndrome. *PLoS One.* 2017;12(7):e0181166.
  17. Jimenez-Altayo F, Siegert AM, Bonorino F, Meirelles T, Barbera L, Dantas AP, et al. Differences in the thoracic aorta by region and sex in a murine model of Marfan syndrome. *Front Physiol.* 2017;8:933.

18. Huang CK, Luo J, Lai KP, Wang R, Pang H, Chang E, et al. Androgen receptor promotes abdominal aortic aneurysm development via modulating inflammatory interleukin-1alpha and transforming growth factor-beta1 expression. *Hypertension*. 2015;66(4):881-91.
19. Henriques T, Zhang X, Yiannikouris FB, Daugherty A, Cassis LA. Androgen increases AT1a receptor expression in abdominal aortas to promote angiotensin II-induced AAAs in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(7):1251-6.
20. Davis JP, Salmon M, Pope NH, Lu GY, Su G, Meher A, et al. Pharmacologic blockade and genetic deletion of androgen receptor attenuates aortic aneurysm formation. *J Vasc Surg*. 2016;63(6):1602-12.
21. Luo SQ, Martel C, Chen CL, Labrie C, Candas B, Singh SM, et al. Daily dosing with flutamide or Casodex exerts maximal antiandrogenic activity. *Urology*. 1997;50(6):913-9.
22. Mueller GC, Stark V, Steiner K, von Kodolitsch Y, Rybczynski M, Weil J, et al. Impact of age and gender on cardiac pathology in children and adolescents with Marfan syndrome. *Pediatr Cardiol*. 2013;34(4):991-8.
23. Jean-Faucher C, Berger M, de Turckheim M, Veysièrè G, Jean C. Testosterone and dihydrotestosterone levels in the epididymis, vas deferens and preputial gland of mice during sexual maturation. *Int J Androl*. 1985;8(1):44-57.
24. Sato T, Arakawa M, Tashima Y, Tsuboi E, Burdon G, Trojan J, et al. Statins reduce thoracic aortic aneurysm growth in Marfan syndrome mice via inhibition of the Ras-induced ERK (extracellular

- signal-regulated kinase) signaling pathway. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(21):e008543.
25. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science.* 2006;312(5770):117-21.
26. Cook JR, Clayton NP, Carta L, Galatioto J, Chiu E, Smaldone S, et al. Dimorphic effects of transforming growth factor-beta signaling during aortic aneurysm progression in mice suggest a combinatorial therapy for Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(4):911-7.
27. Xiong W, Meisinger T, Knispel R, Worth JM, Baxter BT. MMP-2 regulates Erk1/2 phosphorylation and aortic dilatation in Marfan syndrome. *Circ Res.* 2012;110(12):e92-e101.
28. Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM, Aziz H, Schoenhoff F, Bedja D, et al. Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science.* 2011;332(6027):361-5.
29. Zatelli MC, Rossi R, degli Uberti EC. Androgen influences transforming growth factor-beta1 gene expression in human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(2):847-52.
30. Montalvo C, Villar AV, Merino D, Garcia R, Ares M, Llano M, et al. Androgens contribute to sex differences in myocardial remodeling under pressure overload by a mechanism involving TGF-beta. *Plos One.* 2012;7(4):e35635.
31. Yang F, Chen Y, Shen T, Guo D, Dakhova O, Ittmann MM, et al. Stromal TGF-beta signaling induces AR activation in prostate cancer. *Oncotarget.* 2014;5(21):10854-69.

32. Zhu ML, Partin JV, Bruckheimer EM, Strup SE, Kyprianou N. TGF-beta signaling and androgen receptor status determine apoptotic cross-talk in human prostate cancer cells. *Prostate*. 2008;68(3):287-95.
33. Zhu ML, Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4):841-9.
34. Wei H, Hu JH, Angelov SN, Fox K, Yan J, Enstrom R, et al. Aortopathy in a mouse model of Marfan syndrome is not mediated by altered transforming growth factor beta signaling. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(1):e004968.
35. Li W, Li Q, Jiao Y, Qin L, Ali R, Zhou J, et al. Tgfbr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *J Clin Invest*. 2014;124(2):755-67.
36. Hu JH, Wei H, Jaffe M, Airhart N, Du L, Angelov SN, et al. Postnatal deletion of the type II transforming growth factor-beta receptor in smooth muscle cells causes severe aortopathy in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(12):2647-56.
37. Grillo A, Salvi P, Marelli S, Gao L, Salvi L, Faini A, et al. Impaired central pulsatile hemodynamics in children and adolescents with Marfan syndrome. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(11):e006815.
38. Nheu L, Nazareth L, Xu GY, Xiao FY, Luo RZ, Komesaroff P, et al. Physiological effects of androgens on human vascular endothelial and smooth muscle cells in culture. *Steroids*. 2011;76(14):1590-6.
39. Lee MK, Smith SM, Murray S, Pham LD, Mino P, Nielsen HC. Dihydrotestosterone potentiates

- EGF-induced ERK activation by inducing SRC in fetal lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;51(1):114-24.
40. Lv S, Song Q, Chen G, Cheng E, Chen W, Cole R, et al. Regulation and targeting of androgen receptor nuclear localization in castration-resistant prostate cancer. *J Clin Invest.* 2021;131(4):e141335.
41. Bowen CJ, Calderon Giadrosic JF, Burger Z, Rykiel G, Davis EC, Helmers MR, et al. Targetable cellular signaling events mediate vascular pathology in vascular Ehlers-Danlos syndrome. *J Clin Invest.* 2020;130(2):686-98.
42. Zhang X, Thatcher S, Wu CQ, Daugherty A, Cassis LA. Castration of male mice prevents the progression of established angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery.* 2015;61(3):767-76.
43. Lopes RA, Neves KB, Pestana CR, Queiroz AL, Zanotto CZ, Chignalia AZ, et al. Testosterone induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via extrinsic apoptotic pathway with mitochondria-generated reactive oxygen species involvement. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;306(11):H1485-94.
44. Chignalia AZ, Schuldt EZ, Camargo LL, Montezano AC, Callera GE, Laurindo FR, et al. Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src-dependent pathways. *Hypertension.* 2012;59(6):1263-71.
45. Novensa L, Selent J, Pastor M, Sandberg K, Heras M, Dantas AP. Equine estrogens impair nitric

- oxide production and endothelial nitric oxide synthase transcription in human endothelial cells compared with the natural 17 $\beta$ -estradiol. *Hypertension*. 2010;56(3):405-11.
46. Martin-McNulty B, Tham DM, da Cunha V, Ho JJ, Wilson DW, Rutledge JC, et al. 17 Beta-estradiol attenuates development of angiotensin II-induced aortic abdominal aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(9):1627-32.
47. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev*. 2002;23(5):665-86.
48. Montague CR, Hunter MG, Gavrilin MA, Phillips GS, Goldschmidt-Clermont PJ, Marsh CB. Activation of estrogen receptor-alpha reduces aortic smooth muscle differentiation. *Circ Res*. 2006;99(5):477-84.
49. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B, Keller PJ. Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(4):964-72.
50. McLoughlin D, McGuinness J, Byrne J, Terzo E, Huuskonen V, McAllister H, et al. Pravastatin reduces Marfan aortic dilation. *Circulation*. 2011;124(11 Suppl):S168-73.
51. Chung AW, Yang HH, Radomski MW, van Breemen C. Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Circ Res*. 2008;102(8):e73-85.
52. Chung AW, Au Yeung K, Sandor GG, Judge DP, Dietz HC, van Breemen C. Loss of elastic fiber

integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome.

Circ Res. 2007;101(5):512-22.

53. Larsson P, Syed Khaja AS, Semenas J, Wang T, Sarwar M, Dizeyi N, et al. The functional interlink between AR and MMP9/VEGF signaling axis is mediated through PIP5K1alpha/pAKT in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2020;146(6):1686-99.