

Ras/MEK/ERK signaling pathway and RASopathy

石黒友也

Tomoya Ishiguro

大阪市立総合医療センター 脳神経外科

Department of Neurosurgery, Osaka City General Hospital

Key words: Ras/MEK/ERK signaling pathway, RASopathy, vascular malformation

1. はじめに

血管奇形 (vascular malformation)は脈管形成異常により構成された病変で、これまで発見されている遺伝子異常の多くは、PI3Kinase/AKT/mTOR 経路, Ras/MEK/ERK 経路といった血管新生 (angiogenesis), リンパ管新生 (lymphangiogenesis)に重要なシグナル伝達路上の分子に集中している。病変の表現型 (phenotype)は遺伝子変異の部位や発症する時期などによって多彩なものとなるが^{4, 9)}, PI3Kinase/AKT/mTOR 経路の異常 (PIKopathy)によって生じる血管奇形は静脈奇形 (venous malformation (VM))やリンパ管奇形 (lymphatic malformation (LM))といった slow-flow のもので、一方, Ras/MEK/ERK 経路の異常 (RASopathy)は動静脈奇形 (arteriovenous malformation (AVM))などの high-flow のものとなる傾向がある^{21,39,56)}。これらの経路に関与する遺伝子の変異は、主に機能獲得型変異 (gain of function (GoF) mutation)であるため、近年では血管奇形に対するこれらの経路の過剰活性化 (overactivation)を抑える分子標的療法 (molecular target therapy)が注目されている。PI3Kinase/AKT/mTOR 経路と PIKopathy については2024年のproceedingを参照していただき、本稿ではRas/MEK/ERK 経路およびRASopathyによる血管奇形を概説する。

2. Ras/MEK/ERK 経路

細胞内情報伝達の根幹を成すシグナル伝達システムとして mitogen-activated protein kinase (MAPK)経路があり、細胞の増殖, 分化, アポトーシス, 運動性, 免疫, ストレス反応など多彩な細胞機能の制御, 調整に中心的な役割を果たしている。MAPK 経路は酵母からヒトに至る全ての真核細胞に共通するセリン/スレオニン キナーゼ (serine/threonine kinase)であり, MAPK kinase kinase (MAPKKK), MAPK kinase (MAPKK), MAPK の3種類のタンパク質リン酸化酵素 (キナーゼ)から構成され, 細胞外からのシグナルによって MAPKKK-MAPKK-MAPK の順に活性化し, 細胞外のシグナルを核内へと伝えている。哺乳類では extracellular-signal-regulated kinases (ERKs), p38/stress-activated protein kinases (p38/SAPKs), Jun amino-terminal kinases (JNKs)の少なくとも3つのファミリーに分けられ, ERK 経路は主に増殖因子によって活性化され, 特に細胞増殖, 分化, 血管新生などの制御に作用している (Fig.1)。一方, JNK と p38/SAPK 経路はストレス応答 MAPK 経路とも呼ばれ, 様々な環境ストレス刺激 (紫外線, 放射線, 酸化ストレス, 高浸透圧など)や炎症性サイトカイン (tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1)など)によって活性化

され、アポトーシス誘導や免疫応答の制御に重要な役割を果たしている^{30,35,38,48)}。ERK 経路はさらに ERK1 と ERK2 からなるサブファミリーと ERK5 サブファミリーの 2 つに分けられ、前者は最も早くに発見された MAPK であることから古典的 MAPK とも呼ばれる³⁵⁾。古典的経路である ERK1 および ERK2 の MAPK 経路は、主に Ras, Raf, MEK, ERK1・2 から構成される。

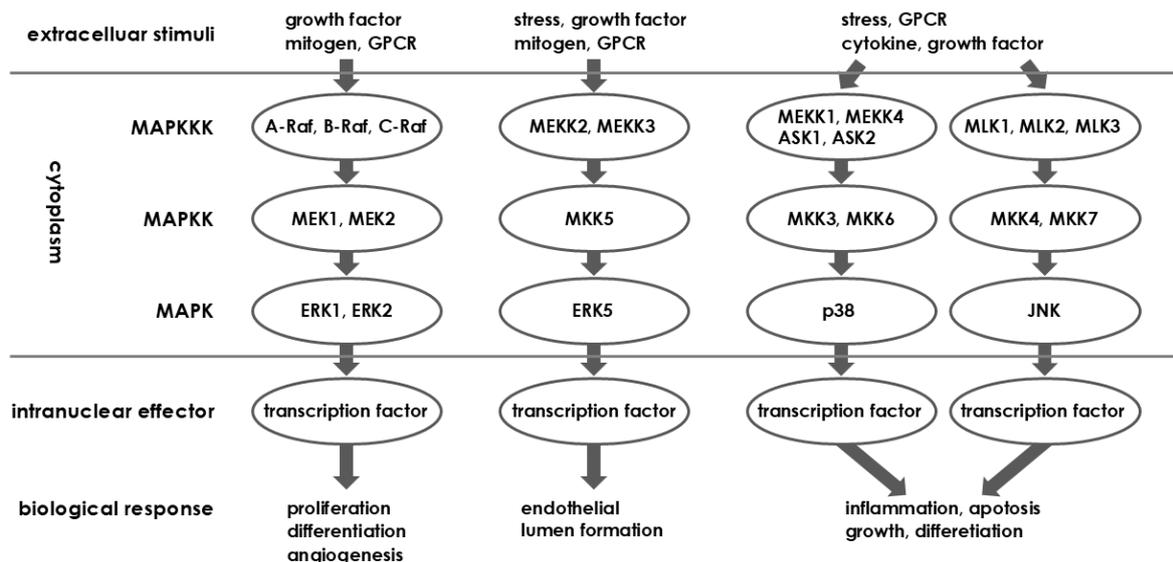


Fig.1: MAPK 経路

MAPK 経路は ERK, JNK, p38 経路の 3 つのファミリーがあり、ERK はさらに ERK1/2 と ERK5 経路に分けられる。最終的に細胞の増殖、分化、アポトーシス、運動性、免疫、ストレス反応など多彩な細胞機能の制御、調整に中心的な役割を果たしている。

Ras は低分子量 (21kDa^{*}) のグアノシン-ヌクレオチド結合タンパク質 (guanosine-nucleotide binding protein^{*}) で、細胞内膜に位置しており、不活性型 (guanosine diphosphate (GDP^{*}) 結合型) Ras がリン酸化されて活性型 (guanosine triphosphate (GTP^{*}) 結合型) へ変換されることにより、様々な下流のシグナル伝達経路を活性化させる分子スイッチとして機能している。Ras は複数のサブファミリーを含み、その代表が H-Ras, K-Ras, N-Ras で、それぞれを encode する遺伝子は *H-Ras*, *K-Ras*, *N-Ras* となり、それぞれ第 11, 第 12, 第 1 染色体に位置している^{3,17,28,37,50)}。Ras はヒトで最初に発見された癌遺伝子 (oncogene) で、歴史的には Harvey と Kirsten がラットに肉腫を誘発するレトロウイルスを 1964 年と 1967 年にそれぞれ報告し^{23,29)}、その後、ウイルスに見出された遺伝子は *Harvey-Ras (Ha-Ras)*, *Kirsten-Ras (Ki-Ras)* と呼ばれるようになった。ちなみに Ras は *rat sarcoma* に由来している。ヒトでは 1982 年に Der らが膀胱がんの腫瘍細胞からラットの *Harvey-Ras*, *Kirsten-Ras* と高い相同性を示す遺伝子を発見し、現在の *H-Ras*, *K-Ras* となっている^{15,17)}。さらに 1983 年にはヒト神経芽細胞腫から *H-Ras*, *K-Ras* とは異なる Ras 遺伝子が同定され、それが *N-Ras* である^{17,46)}。Ras の活動は細胞膜にある受容体チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase

(RTK)), G タンパク質共役受容体 (G-protein-coupled receptor (GPCR)), 細胞接着分子であるインテグリン (integrin)などを介して細胞外からの様々な刺激によって開始される^{28,30,39}。RTK は増殖因子が細胞外の特異的なリガンドへ結合することに 2 量体化し, それによって自己リン酸化を起こすことで細胞内へシグナルを伝える。すると細胞内ではリン酸化されたチロシンを認識して, src homology 2 (SH2) domain を持つタンパク質の 1 つである growth factor receptor bound protein 2 (Grb2)が結合する。Grb2 は別のタンパク質を活性化するアダプタータンパク質 (adaptor protein)で, SH3 domain によって Son of Sevenless (Sos1)と結合している。すなわち Grb2-Sos1 complex が活性化した RTK と結合することで, 結果的に Sos1 が活性化される。Sos1 はグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor^{*} (GEF))としての作用を持ち, 不活性型 Ras と結合し, これを活性型 Ras に変換させるが, Ras の活性化にはさらに細胞膜上で 2 量体構造をとる必要もある^{6,17,20,25,26,28,30,34,54}。Sos1 とは逆に GTPase 活性化タンパク質 (GTPase activating protein (GAP))である neurofibromin (NF1)は, GTP を GDP に加水分解することで Ras を不活性化する²⁸。詳細は解明されていないが, H-Ras, K-Ras, N-Ras は細胞膜での分布や優先的に活性化する下流のシグナル経路などが異なり, また生殖細胞変異 (germline mutation^{*})や体細胞変異 (somatic mutation^{*})における過剰活性時の表現型も異なることから, 各々で異なった機能を担っていることが示唆されている^{3,37}。

活性型 Ras は様々な下流の effector を有し, その代表が phosphoinositide-3-kinase (PI3K)や Raf である^{17,20}。Raf はセリン/スレオニン キナーゼで, MAPKKK に相当し, A-Raf, B-Raf, C-Raf の 3 つの isoform^{*}がある。これら 3 つの Raf タンパク質を encode する遺伝子が *A-Raf*, *B-Raf*, *C-Raf*で, それぞれ X, 第 7, 第 3 染色体に位置している。Raf 遺伝子の発見は 1983 年で, マウスに肉腫を誘発するレトロウイルスから *v-RAF*が分離された。また同時に *v-RAF*のヒト相同体 (human homolog)も報告され, 細胞質に存在する Raf 遺伝子として *C-Raf*と命名された。ちなみに Raf は線維肉腫を誘発したことから, その名称は rapidly accelerated fibrosarcoma に由来している。C-Raf は最初に発見された Raf であることから Raf-1 とも呼ばれていたが, 1990 年代に入ると isoform である A-Raf と B-Raf が同定されたこともあり, C-Raf と称することが一般的である^{13,16,40,50,54}。Ras と同様に A-Raf, B-Raf, C-Raf の機能は全てが解明されたわけではないが, 過剰活性時の表現型は異なっている。しかしその基本構造は共通しており, いずれも 3 つの保存領域 (conserved region (CR))を有している。CR1 は調節ドメイン (regulatory domain), CR2 はヒンジドメイン (hinge domain)で, CR3 がキナーゼドメイン (kinase domain)である。CR1 は上流である Ras と結合する Ras 結合ドメイン (Ras-binding domain (RBD))と Raf の自己抑制に関わる cysteine-rich domain (CRD)より構成されている。Raf は不活性型では CR1 が CR3 のリン酸化を自己抑制しており, さらに 14-3-3 protein とヘテロ 2 量体 (heterodimer^{*})を形成し, 折りたたまれた構造として安定している^{5,19,16,18,30,54}。Ras が活性化されると細胞質にある脱リン酸化酵素である protein phosphatase 1, 2A (PPA1, PPA2A)が, Raf の 259 番目のセリン (S259)を脱リン酸化し, 14-3-3 protein の位置が変わることで, Raf は細胞膜へ移動して RBD を介して 活性型 Ras と結合する。Raf も Ras と同様に 2 量体を形成し, そのことで活性型となり高いキナーゼ活性を有する^{5,16,19,27,30,54}。

Raf の下流の effector が MAPKK である MEK (mitogen-activated protein kinase kinase (または ERK kinase))1, 2 で, それぞれ第 15 染色体に存在する *MAP2K1*, 第 19 染色体に存在する *MAP2K2*によって encode される。MEK の基本構造は中心部のキナーゼドメインと N 末端および C

末端アミノ酸配列からなり、N末端アミノ酸配列にはERKとの結合ドメインだけでなく、MEKの細胞質内での位置を調節する領域 (nuclear export sequence (NES))や、自己抑制する負の調節領域 (negative regulatory region (NRR))などがある。一方、C末端アミノ酸配列にはRafとの結合ドメインなどがある。MEK1はキナーゼドメインにある218番目と222番目のセリン (S218, S222)が、MEK2では222と226番目のセリン (S222, S226)がリン酸化されることで活性化する。またMEK1のキナーゼドメインには下流のeffectorであるERKからnegative feedbackを受けるスレオニン292 (Thy292)を持つ^{10,31,42,50,55}。MEKの活性化の機序は十分に解明されていないが、以下のように考えられている。不活性型のMEKとRafはヘテロ2量体を形成しており、Rafが活性化して2量体化するとともにMEKとの間の結合が弱くなり、その後MEKはRaf2量体の表面でホモ2量体 (homodimer^{*})を形成してRafによって活性化される。活性化したMEK2量体は、一部はRaf2量体と結合したままで、一部はRaf2量体から分離して、下流のeffectorである古典的MAPKであるERK1とERK2を活性化させる^{14,30,31,52}。

ERK1, 2はそれぞれMAPK3 (p44MAPK), MAPK1 (p42MAPK)とも呼ばれ、ERK1をencodeする遺伝子が第16染色体にある*MAPK3*で、ERK2は第22染色体の*MAPK1*である。いずれも基本構造はMEKとよく似ており、中心部のキナーゼドメインとN末端およびC末端アミノ酸配列とからなり、C末端アミノ酸配列にはMEKと結合するドメインが存在する^{49,50}。MEKは2重特異性キナーゼ (dual specificity kinase)であり、ERK1, 2のキナーゼドメインにあるセリンとチロシンの両アミノ酸残基をリン酸化させる。すなわちERK1ではS202とY204が、ERK2ではS185とY187がリン酸化されることで活性化される^{10,42,50}。活性化したERK1, 2は細胞質内に局在する様々なタンパク質をリン酸化させるとともに、一部は細胞質から核への局在変化 (核移行)を起こし、核内で転写因子 (transcription factor (TF))であるMYCやspecificity protein 1 (SP1), C-terminal binding protein (CtBP)などをリン酸化させる。その結果、これらの転写活性が亢進し、細胞増殖に必要な初期応答遺伝子 (immediate early gene (IEG))の転写を導く^{8,10,14,49,50}。

以上がRas/MEK/ERK経路のメインストリーム (Fig.2)であるが、実際にはそれぞれのfeedback機構や、Grb10やkinase suppressor of RAS (KSR)などのアダプタータンパク質の存在など、多彩な因子が関与していることは留意しなければならない。Ras/MEK/ERK経路は細胞の増殖や分化、生存、細胞運動、血管新生など様々な細胞機能の発現に関与しているが、その制御はその細胞密度やERK活性の発火頻度などが関与している⁴⁾。

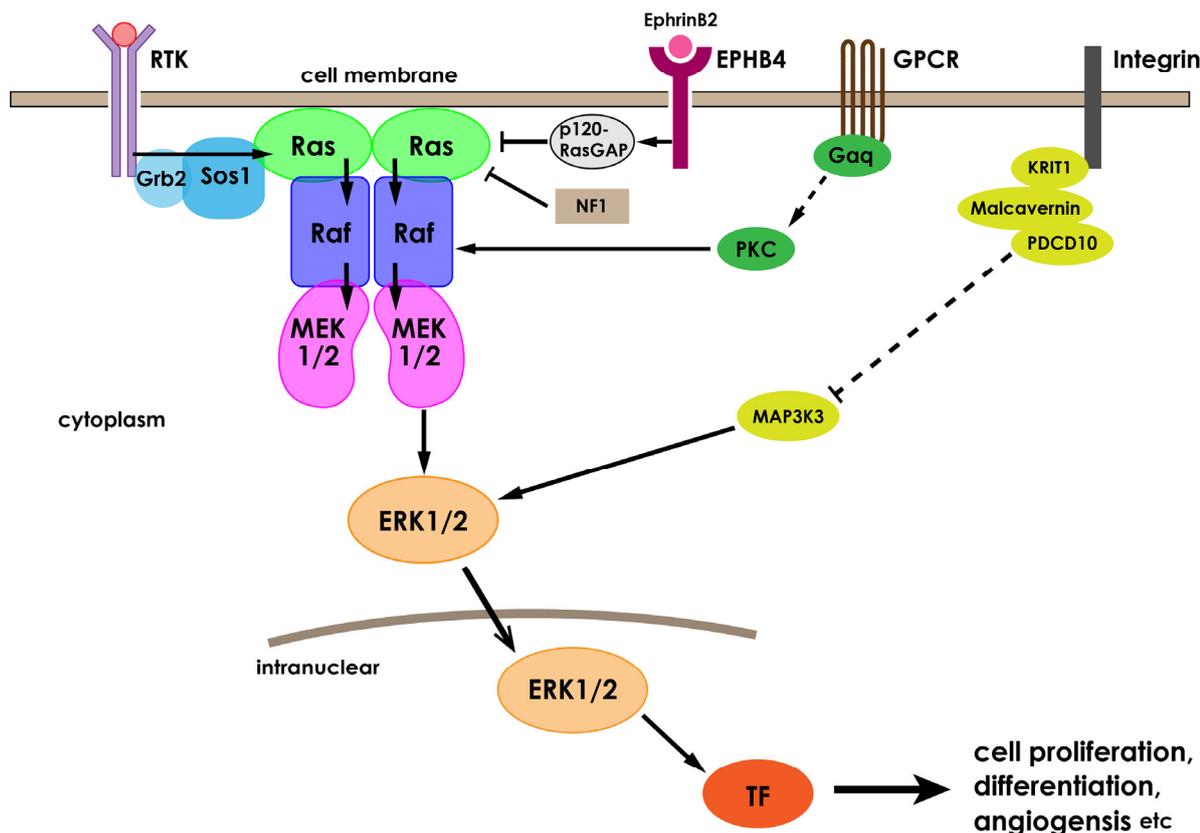


Fig2:

Ras/MEK/ERK 経路

増殖因子を受け取った RKT によって Ras が活性化される。活性化した Ras は細胞膜上で Raf を活性化させ、Raf は MEK を活性化させる。MEK は細胞質内の ERK を活性化させ、ERK は核内に移行して、転写因子を活性化させて、最終的に細胞増殖、分化、血管新生などを制御している。

3. Vascular malformations associated with RASopathy

Ras/MEK/ERK 経路に関する遺伝子の体細胞変異は様々な固形癌や各種血液悪性腫瘍で指摘されており、また一方で生殖細胞変異は Noonan 症候群, Cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群, Costello 症候群, 神経線維腫 1 型 (neurofibromatosis type1 (NF1)) などの心奇形, 特異顔貌, 骨格異常, 知的障害といった多系統の組織に機能・形態異常を有する症候群を引き起こすことも知られている^{28,49)}。その他にも Ras/MEK/ERK 経路は血管新生やリンパ管新生にも重要な役割を担っているため, RASopathy によって様々な血管奇形が生じうる。

3-a. 毛細血管奇形 (capillary malformation (CM))

毛細血管奇形は孤発性でも Sturge-Weber 症候群における port-wine stain においても、多くの例で *GNAQ* の体細胞変異が指摘されている⁴⁵⁾。 *GNAQ* は第 9 染色体に位置しており、ヘテロ 3 量体 G タンパク質のサブユニットである $G\alpha_q$ を encode する^{7,22)}。 $G\alpha_q$ は不活性化状態では GDP と結合している

が、リン酸化を受け GDP が GTP となると活性化する。活性化した $G\alpha_q$ は下流であるホスホリパーゼ C (phospholipase C (PLC)) を活性化し、結果的にリン脂質依存性プロテインキナーゼ (lipid-dependent protein kinase^{*}) であるプロテインキナーゼ C (protein kinase C (PKC)) 伝達路を活性化させる。PKC はその下流で Raf を活性化させる²²⁾。GNAQ の変異は機能獲得型で、結果として Ras/MEK/ERK 経路の過剰活性につながっている。

3-b. 孤発性動静脈奇形 (sporadic AVM)

動静脈奇形に関しては、頭蓋外では 2017 年に Couto らが病変の内皮細胞で *MAP2K1* の体細胞変異を 25 例中 16 例 (64%) で認めたと報告した¹²⁾。また 2018 年には Al-Olabi らが頭蓋外動静脈奇形での *K-Ras*, *B-Raf* の体細胞変異を発見している¹⁾。一方、頭蓋内の動静脈奇形は 2018 年に Nikolaev らが 72 例中 45 例 (62.5%) で病変の内皮細胞で *K-Ras* の体細胞変異を指摘している³⁶⁾。さらに翌 2019 年には Hong らが脳動静脈奇形 21 例に対して遺伝子検査を行い、21 例中 17 例 (81%) で *K-Ras* または *B-Raf* の体細胞変異を認めた (*K-Ras* 16 例, *B-Raf* 1 例)。また同様に脊髄動静脈奇形 10 例に対しても遺伝子検査を行っており、10 例中 10 例 (100%) でいずれかの体細胞変異を認めていた (*K-Ras* 9 例, *B-Raf* 1 例)²⁴⁾。このように孤発性の動静脈奇形は、頭蓋外でも頭蓋内でも *K-Ras*, *B-Raf* の体細胞における機能獲得型変異によって発生している可能性が示唆されており、頭蓋外ではさらに *MAP2K1* 変異が関与することもある⁴⁴⁾。

3-c. 毛細血管奇形-動静脈奇形 (CM-AVM)

毛細血管奇形-動静脈奇形は生殖細胞変異による常染色体顕性 (優性) 遺伝性疾患で、原因遺伝子には第 5 染色体に位置する Ras P21 Protein Activator 1 (*RASA1*) と第 7 染色体の Ephrin type-B receptor-4 (*EPHB4*) が同定されている^{2,41)}。*RASA1* は p120-Ras GTPase activating protein (p120-RasGAP) を encode し、p120-RasGAP は Ras を活性型から不活性型に変換する negative regulator である。また *EPHB4* は細胞膜に存在する受容体である EPHB4 を encode している。EPHB4 は静脈の内皮細胞に発現しており、動脈に特異的な膜結合型リガンドである EphrinB2 と結合することで血管形成や動静脈の分化などに重要な役割を果たしている。また EPHB4 は p120-RasGAP を活性化する役割もある。したがって *EPHB4* や *RASA1* の変異は機能喪失型 (loss of function (LoF)) で、Ras/MEK/ERK 経路の活性化の制御が十分にできなくなる^{39,51,56)}。

3-d. 家族性脳海綿状血管奇形 (familial cerebral cavernous malformation (fCCM))

家族性脳海綿状血管奇形は常染色体顕性遺伝で、原因遺伝子として第 7 染色体に位置する *CCM1* (Krev Interaction Trapped 1 (*KRIT1*)) と *CCM2* (Mammalian Gene Collection 4607 (*MGC4607*)), 第 3 染色体の *CCM3* (Programmed Cell Death 10 (*PDCD10*)) が同定されており、これらはそれぞれ *KRIT1* (*CCM1*), Malcavernin (*CCM2*), *PDCD10* (*CCM3*) を encode している^{39,56)}。これらの表現型としては多発性の脳海綿状血管奇形だけでなく、9-21% の割合で皮膚の血管奇形を合併することが知られている。皮膚の血管奇形は hyperkeratotic cutaneous capillary venous malformation (HCCVM), deep blue nodule (DBN), punctate capillary malformation (PCM) など、四肢に認めることが多い^{32,47)}。*KRIT1*, Malcavernin, *PDCD10* は複合体を形成しており、これは

MAPKKK である MAP3K3 などを通して、間接的に ERK を抑制している。したがって *CCM1*, *CCM2*, *CCM3* の変異は機能喪失型で、間接的に ERK の活性化につながる。また KRIT1 は単独でも、細胞外受容体であるインテグリン (integrin) を介した細胞接着とシグナル伝達において重要な役割を果たすインテグリン細胞内領域結合蛋白 (integrin cytoplasmic-associated protein 1 (ICAP1)) や、細胞間のシグナル伝達を担う 4-Notch 経路とも関与している。4-Notch 経路は間接的に AKT の活性化や ERK の抑制にも関与している。したがって KRIT1 の機能喪失は、間接的に ERK 活性の亢進につながるだけでなく、様々な経路の障害によって血管内皮の発達などに異常を来す^{39,43,53,56)}。

malformation	mutated gene	type of mutation
CM/SWS	<i>GNAQ</i>	somatic, GoF
sporadic AVM (extracranial)	<i>K-Ras, B-Raf, MAP2K1</i>	somatic, GoF
sporadic AVM (intracranial)	<i>K-Ras, B-Raf</i>	somatic, GoF
CM-AVM	<i>RASA1</i>	germline, LoF
	<i>EPHB4</i>	germline, LoF
fCCM	<i>CCM1, CCM2, CCM3</i>	germline, LoF

Table 1: 代表的な Rasopathy 関連の血管奇形

[略語] AVM: arteriovenous malformation, fCCM: familial cerebral cavernous malformation, CM: capillary malformation, GoF: gain of function, LoF: loss of function, SWS: Sturge-Weber syndrome

以上が Rasopathy に関係する代表的な血管奇形 (Table) であるが、他に静脈奇形でも孤発性の 1 つである verrucous venous malformation (VVM) では *MAP3K3* の体細胞変異が、リンパ管奇形でも複雑型である Gorham-Stout disease (GSD) や Kaposiform lymphangiomatosis (KLA) で *K-Ras*, *N-Ras* の体細胞変異がそれぞれ指摘されており、いずれも機能獲得型変異である^{39,56)}。

4. おわりに

血管奇形に対する分子標的薬は、本邦では mTOR 阻害薬である sirolimus が 2024 年に難治性リンパ管疾患に加えて静脈奇形や混合型脈管奇形なども保険承認された。Sirolimus は PI3Kinase/AKT/mTOR 経路に対する分子標的薬であるが、近い将来 Ras/MEK/ERK 経路に対する分子標的薬である MEK 阻害薬や B-Raf 阻害薬などが動静脈奇形に対する治療薬として使用されていくと考えられ、実際に報告例も散見される^{11,33)}。分子標的薬の出現により血管奇形の治療には paradigm shift が起こっており、その基となる PI3Kinase/AKT/mTOR 経路や Ras/MEK/ERK 経路の理解は避けて通ることができない。

【用語】(本文中に*がついているもの)

Da (ダルトン) : 原子質量単位で, 1Da は ^{12}C 原子の 1/12 と定義されており, 約 $1.66 \times 10^{-27}\text{kg}$ となる.

guanosine-nucleotide binding protein (グアノシン-ヌクレオチド結合タンパク質) : グアニンヌクレオチド (guanine nucleotide*) と結合するタンパク質の総称

guanosine (グアノシン) : グアニンにリボースが結合したものの

guanine nucleotide (グアニンヌクレオチド) : 核酸を構成する主な塩基のうちの 1 つで, GDP や GTP はこれに含まれる.

guanosine diphosphate (GDP) (グアノシン 2 リン酸) : ヌクレオチドの 1 種で, グアノシンにリン酸が 2 つ結合した構造をもつ.

guanosine triphosphate (GTP) (グアノシン 3 リン酸) : ヌクレオチドの 1 種で, GDP にリン酸が付加されて生成される.

guanine nucleotide exchange factor (GEF) (グアニンヌクレオチド交換因子) : GTP 結合タンパク質上に結合している GDP の放出を促進して, GTP を結合させる作用を持つ.

germline mutation (生殖細胞変異) : 生殖細胞 (精子や卵子) に遺伝子変異が存在し, したがって常染色体顕性 (優性) 遺伝で家族性に発症する.

somatic mutation (体細胞変異) : 生殖細胞 (精子や卵子) 以外の細胞 (体細胞) に存在する突然変異. 個体発生のどの時期にも起こりうるが, 特に初期と終期に起こりやすい.

isoform (アイソフォーム) : 構造 (アミノ酸配列) は異なるが, 同じ機能をもつタンパク質

heterodimer (ヘテロ 2 量体) : 異なる 2 つのタンパク質が結合して形成された構造体

homodimer (ホモ 2 量体) : 同じ種類のタンパク質 2 つが結合して形成された構造体

lipid-dependent protein kinase (リン脂質依存性プロテインキナーゼ) : 細胞膜のリン脂質を基質として, その代謝物によって活性化されるプロテインキナーゼ

参考文献：

1. Al-Olabi L, Polubothu S, Dowsett K, et al: Mosaic RAS/MAPK variants cause sporadic vascular malformations which respond to target therapy. *J Clin Invest* 2018; 128: 1496-1508
2. Amyere M, Revencu N, Helaers R, et al: Germline loss of function mutations in EPHB4 cause a second form of capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM2) deregulating RAS-MAPK signaling. *Circulation* 2017; 136: 1037-1048
3. 青木 洋子, 松原 洋一: ヒト発生と RAS/MAPK シグナル伝達. 2007; 79: 34-38
4. 青木 一洋: ERK MAP キナーゼによる細胞増殖と細胞集団運動の制御. *生化学* 2019; 91: 73-80
5. Balijus A, Kholodenko BN, Kolch W: It takes two to tango—signalling by dimeric Raf kinases. *Mol Biosyst* 2013; 9: 551-558
6. Bar-Sagi D: The Sos (Son of sevenless) protein. *Trends Endocrinol Metab* 1994; 5: 165-169
7. Bichsel C, Bischoff J: A somatic missense mutation in GNAQ causes capillary malformation. *Curr Opin Hematol* 2019; 26: 179-184
8. Brunet A, Roux A, Lenormand P, et al: Nuclear translocation of p42/44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 1999; 29: 664-674
9. Canaud G, Hammil AM, Adams D, et al: A review of mechanisms of disease across PIK3CA-related disorders with vascular malformations. *Ophanet J Rare Dis* 2021; 16: 306.doi: 10.1186/s13023-021-01929-8
10. Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, et al: MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 577-592
11. Cooke DL, Frieden IJ, Shimano KA: Angiographic evidence of response to trametinib therapy for a spinal cord arteriovenous malformation. *J vasc anom* 2021; 2: e018.doi: 1097/JOVA.0000000000000018
12. Couto JA, Huang AY, Konczyk DJ, et al: Somatic MAP2K1 mutations are associated with extracranial arteriovenous malformation. *Am J Hum Genet* 2017; 100: 546-554
13. Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, et al: The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 474-480
14. Degirmenci U, Wang M, Hu J: Target aberrant RAS RAF MEK ERK signaling for cancer therapy. *Cells* 2020; 9: 198.doi: 10.3390/cells9010198
15. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM: Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 3637-3640
16. 衣斐 寛倫: Raf 遺伝子異常を標的とした治療. *生体の科学* 2023; 74: 295-299
17. Fernández-Medarde A, De Las Rivas J, Santos E: 40 years of RAS—A historic overview. *Genes (Basel)* 2021; 12:681.doi: 10.3390/genes12050681
18. Fisher A, Baljuls A, Reinders J, et al: Regulation of RAF activity by 14-3-3 proteins: RAF kinase associated functionally with both homo- and hetero dimeric forms of 14-3-3 proteins. *J Biol Chem* 2009; 284: 3183-3194

19. Freeman AK, Ritt DA, Morrison DK: The importance of Raf dimerization in cell signaling. *Small GTPase* 2013; 4: 180-185
20. Giehl K: Oncogenic Ras in tumor progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; 386: 193-205
21. Greene AK, Gross JA: Vascular anomalies: From a clinicohistologic to a genetic framework. *Plast Reconstr Surg* 2018; 141: 709e-717e
22. Gu Y, Pham JP, Sebaratnam DF: Towards precision medicine in vascular anomalies: Could protein kinase C inhibitors be repurposed for GNAQ/11-related phakomatoses?. *Skin Res Technol* 2024; 30: e13736.doi: 10.1111/srt.13736
23. Harvey JJ: An unidentified virus which cause the rapid production of tumors in mice. *Nature* 1964; 204: 1104-1105
24. Hong T, Yan Y, Li J, et al: High prevalence of KRAS/BRAF somatic mutations in brain and spinal cord arteriovenous malformations. *Brain* 2019; 142: 22-34
25. Innocenti M, Tenca P, Frittoli E, et al: Mechanism through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *J Cell Biol* 2002; 156: 125-136
26. Inouye K, Mizutani S, Koide H, et al: Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 3737-3740
27. Jaumot M, Hancock JF: Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 2001; 20: 3949-3958
28. Kang M, Lee YS: The impact of RASopathy-associated mutations on CNS development in mice and humans. *Mol Brain* 2019; 12: 96.doi: 10.1186/s13041-019-0517-5
29. Kirsten WH, Mayer LA: Morphologic response to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 1967; 39: 311-335
30. Kolch W: Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interaction. *Biochem* 2000; 351: 289-305
31. Maloney RC, Zhang M, Liu Y, et al: The mechanism of activation of MEK1 by B-Raf and KSR1. *Cell Mol Life Sci* 2022; 79: 281.doi: 10.1007/s00018-022-04296-0
32. Manole AK, Forrester VJ, Zlotoff BJ, et al: Cutaneous findings of familial cerebral cavernous malformation syndrome due to the common Hispanic mutation. *Am J Med Genet A* 2020; 182: 1066-1072
33. Mansur A, Radovanovic I: Defining the role of oral pathway inhibitors as targeted therapeutics in arteriovenous malformation care. *Biomedicines* 2024; 12: 1289.doi: 10.3390/biomedicines12061289
34. McCormick F: Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 1993; 363: 15-16
35. Morrison DK: MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a011254.doi: 10.1101/cshperspect.a011254
36. Nikolaev SI, Vetiska S, Bonilla X, et al: Somatic activating KRAS mutations in arteriovenous malformations of the brain. *N Engl J Med* 2018; 78: 250-261
37. Olson MF, Marais R: Ras protein signalling. *Semin Immunol* 2000; 12: 63-73
38. Pearson G, Robinson F, Gibson TB, et al: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22: 153-183

39. Queisser A, Seront E, Boon LM, et al: Genetic basis and therapies for vascular anomalies. *Circ Res* 2021; 129: 155-173
40. Rapp UR, Gordsborough MD, Mark GE, et al: Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 4218-4222
41. Revencu N, Boon LM, Mulliken JB, et al: Parkes Weber syndrome, vein of Galen aneurysmal malformation, and other fast-flow vascular anomalies are caused by RASA1 mutation. *Hum Mutat* 2008; 29: 959-965
42. Roskoski Jr R: MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417: 5-10
43. Russo A, Neu MA, Theruvath J, et al: Novel loss of function mutation in KRIT1/CCM1 is associated with distinctly progressive cerebral and spinal cavernous malformations after radiochemotherapy for intracranial germ cell tumor. *Childs Nerv Syst* 2017; 33: 1275-1283
44. Schmidt VF, Kapp FG, Goldmann C, et al: Extracranial vascular anomalies driven by RAS/MAPK variants: Spectrum and genotype-phenotype correlation. *J Am Heart Assoc* 2024; 13: e033287.doi: 10.1161/JAHA.123.033287
45. Shirley MD, Tang H, Gallione CJ, et al: Sturge-Weber and port-wine stains caused by somatic mutation in GNAQ. *N Engl J Med* 2013; 368: 1971-1979
46. Simizu K, Goldfarb M, Perucho M, et al: Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 383-387
47. Sirvente J, Enjolras O, Wassef M, et al: Frequency and phenotypes of cutaneous vascular malformations in a consecutive series of 417 patients with familial cerebral cavernous malformations. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23: 1066-1072
48. 武川 睦寛: MAP キナーゼ情報伝達経路の活性制御機構と疾患発症機構の解明. *電気泳動* 2015; 60: 7-10
49. 武川 睦寛, 久保田 裕二: ERK シグナル伝達ネットワークと疾患. *生化学* 2023; 95: 579-593
50. Ullah R, Yin Q, Snell AH, et al: RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Semin Cancer Biol* 2022; 85: 123-154
51. Yu JD, Streincher JL, Medne L, et al: EPHB4 mutation implicated in capillary malformation-arteriovenous malformation syndrome: A case report. *Pediatr Dermatol* 2017; 34: e227-e230
52. Yuan J, Ng WH, Tian Z, et al: Activating mutations in MEK1 enhance homodimerization and promote tumorigenesis. *Sci Signal* 2018; 11: eaar6795.doi: 10.1126/scisignal.aaf6795
53. Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlik MT, et al: CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implication for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2521-2531
54. Zebisch A, Troppmair J: Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1314-1330
55. Zheng CF, Guan KL: Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 1993; 268: 23933-23939
56. Zúñiga-Castillo M, Teng CL, Teng JMC: Genetics of vascular malformation and therapeutic implications. *Curr Opin Pediatr* 2019; 31: 498-508