

스타틴 그리고 배아줄기세포에서의 작용

이미희 · 한용만¹ · 조이숙[†]

한국생명공학연구원 재생의학연구센터, ¹한국과학기술원 생명과학과

Statins and Their Effects on Embryonic Stem Cells

Mi-Hee Lee, Yong-Mahn Han¹ and Yee Sook Cho^{1,†}

Regenerative Medicine Research Center, KRIBB, 52 Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

¹Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
373-1 Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

ABSTRACT : Understanding molecular mechanisms that control embryonic stem cell (ESC) self-renewal and differentiation is important for the development of ESC-based therapies. Statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase), potently reduce cholesterol level. As well as inhibiting cholesterol synthesis, statins inhibit other intermediates in the mevalonate pathway such as farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), major substrates for protein isoprenylation. Studies showed that pleiotropic effects of statins beyond cholesterol lowering property arise from inhibition of protein isoprenylation that is involved in various cellular functions including proliferation and differentiation. It has been determined that statins have inhibitory effect on ESC self-renewal and stimulatory effect on ESC differentiation into adipogenic/osteogenic lineages. Importantly, statins mediate down-regulation of ESC self-renewal by inhibiting RhoA-dependent signaling, independently of their cholesterol-lowering properties. Understanding statin's actions on ESCs may provide important insights into the molecular mechanisms that regulate self-renewal or differentiation of ESCs.

Key words : Statin, GGPP, FPP, Isoprenylation, Embryonic Stem Cells, G-protein.

요 약 : 배아줄기세포를 이용한 치료법 개발을 위해서는 배아줄기세포의 자가재생산 및 분화과정을 조절하는 분자적 기전을 이해하는 것이 매우 중요하다. 지질합성경로(Mevalonate pathway)에 작용하는 HMG-CoA 환원효소(Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase)의 억제제인 스타틴은 콜레스테롤 저하제로 잘 알려져 있으며, 콜레스테롤 이외에 단백질 isoprenylation의 기질로 작용하는 아이소프레노이드(Isoprenoids)(Farnesyl pyrophosphate(FPP), Geranylgeranyl pyrophosphate(GGPP))의 생성을 억제하는 효능을 가지고 있다. 스타틴에 의해 매개되는 표적단백질의 isoprenylation 억제는 다양한 세포내 신호전달과정에 영향을 미치게 되며, 결과적으로 세포기능을 조절하는데 핵심적인 역할을 하게 된다. 스타틴이 첨가된 배양배지에서 배양된 배아줄기세포는 자가재생산능이 억제되고 분화가 촉진되는데, 특히 지방/골세포 직계 열로의 분화가 촉진된다. 배아줄기세포에서의 스타틴의 효과 및 작용기전에 대한 이해가 아직은 미비한 수준이나, 최근 우리 연구팀에서는 스타틴이 콜레스테롤 작용과는 무관하게 RhoA G-단백질의 세포내 분포 및 활성을 억제함으로써 배아줄기세포의 자가재생산능을 억제하고 있음을 규명하였다. 스타틴 다면효과와 그 작용에 대한 이해는 배아줄기세포의 미분화 및 분화상태를 조절하는데 관여하는 분자적 조절기전을 이해하는데 중요한 모델이 될 수 있을 것으로 추정된다.

서 론

1981년 에반스 등에 의해 생쥐 배아줄기세포의 배양이 성

공한 이래(Evans & Kaufman, 1981), 1987년 톰슨 등에 의해 인간 배아줄기세포의 배양이 성공하면서(Thomson *et al.*, 1998) 배아줄기세포에 대한 연구가 계속적으로 활성화 되고 있다. 배아줄기세포는 체외 배양조건에서 이론적으로 무한대로 증식이 가능하며, 모든 조직세포로의 분화가 가능하다는 특징을 가지고 있어 배아줄기세포로부터 기능적으로 우

[†] 교신저자: 대전광역시 유성구 어은동 52, 한국생명공학연구원 재생의학연구센터, (우) 305-806, (전) +82-42-860-4479, (팩) +82-42-860-4608, E-mail: june@kribb.re.kr

수한 조직세포를 분화 유도하고 세포 치료제 및 신약 개발 과정에 활용하고자 하는 노력이 증가되고 있다.

일반적으로, 배아줄기세포는 체외 배양조건에서 영양세포와 함께 공배양함으로써 장기간 미분화 상태를 유지하는 것이 가능한데, 이때 배아줄기세포는 영양세포로부터 외부적으로 미분화 유지 및 분화 억제에 관련된 신호 전달 분자를 공급받는 것으로 추정된다. 서로 다른 종에서 확립된 배아줄기세포는 많은 특성을 공유하고 있지만 신호 전달, 세포 주기, 표지 마커 등에서 종간의 차이점이 확인되고 있으며(Rao, 2004), 체외 배양시 사용하는 배양액 첨가물에도 차이가 있다. IL6 superfamily에 속하는 백혈병 억제인자(leukemia inhibitory factor, LIF)는 생쥐 배아줄기세포의 가장 잘 알려진 분화 억제인자이며, 일정조건으로 배양배지에 첨가하고 배아줄기세포를 배양할 경우 영양세포 없이 미분화 상태를 유지하는 것이 가능하다(Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). 반면, 인간 배아줄기세포는 LIF에 비존재적이며 FGF (fibroblast growth factor) 신호 전달 과정에서 작용하는 FGF2가 미분화 인간 배아줄기세포의 유지를 위한 배양배지의 필수적인 첨가물로 알려져 있다(Xu *et al.*, 2005; Thomson *et al.*, 1998; Levenstein *et al.*, 2006). 이외에도 Wnt 신호 전달 과정에서 작용하는 GSK-3(Glycogen synthase kinase-3) 특이적 억제제인 BIO(6-bromindirubin-3-oxime)를 배양액에 첨가할 경우, 생쥐 및 인간 배아줄기세포의 미분화가 유지됨이 알려져 있다(Sato *et al.*, 2004). 많은 연구 노력에도 불구하고 미분화 상태를 유지하면서 배아줄기세포를 계속적으로 배양하는 데는 정교한 배양 기술과 많은 시간이 소요되며, 현 수준의 배양 기술로는 배아줄기세포의 자발적 분화를 완전하게 억제하는 것이 불가능하다.

배아줄기세포의 배양 시스템을 개선하고 활용 가능성을 높이기 위해서는 배아줄기세포의 신호 전달 체계를 이해하고 이로부터 미분화 유지 및 분화 억제 인자를 동정하는 것이 필수적이다. 스타틴은 콜레스테롤을 저하하는 고유의 효능뿐만 아니라 세포내 신호 전달 조절과 연관된 다양한 다면 효과를 가지고 있는 바, 스타틴의 작용을 배아줄기세포에서 연구한다면 자가 재생산 및 분화 조절 기전을 이해하는데 주요한 실마리를 제공할 수 있을 것으로 추정하여 소개하고자 한다.

1. 콜레스테롤

지질 합성 경로(Mevalonate pathway)에서 아세틸조효소(Ace-

tyl-CoA)로부터 효소반응을 통해 이소프레노이드(isoprenoids)의 전구체인 메발론산(mevalonate)이 생성되며, 이로부터 콜레스테롤을 포함한 다양한 생성물(이소프레노이드, 스크알렌(squalene), dolicol, haem A, ubiquinone, isopentenyl adenine(tRNA))이 만들어지게 된다(Goldstein & Brown, 1990). 콜레스테롤은 세포막(cell membrane)과 미엘린(myelin)의 주요 성분이며, 에스트로겐, 테스토스테론 등을 포함한 스테로이드 호르몬(steroid hormone), 비타민 D, 담즙(bile acids), 지단백(lipoproteins) 등의 전구체로 이용되는 등 세포 기능을 조절하는데 중요한 역할을 담당한다. 콜레스테롤은 주로 간에서 합성되며, 혈중에서 밀도에 따라 구분되는 초저밀도 지단백(Very low-density lipoprotein/VLDL), 저밀도 지단백(Low-density lipoprotein/LDL), 고밀도 지단백(High-density lipoprotein/HDL)과 결합하여 전신의 세포로 운반된다. 콜레스테롤은 내부적으로 아세틸조효소로부터 생합성되지만, 외부적으로 동물성 식품 섭취를 통해 흡수되기도 하기 때문에 이들 간의 적절한 균형이 중요하며, 지질 합성 경로에서 순차적으로 작용하는 Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A(HMG-CoA) 합성효소와 HMG-CoA 환원효소, 그리고 콜레스테롤의 흡수에 관여하는 LDL 수용체의 피드백 조절(feedback regulation)이 균형 조절에 중요한 역할을 하고 있다. 혈중 콜레스테롤 농도는 다양한 질환의 발생과 치료에 상관관계가 있다고 알려져 있으며, 적용 범위가 넓어지고 있다. 그 예로, 혈관 내벽에 지단백(LDL-c)의 축적이 이상적으로 계속되면 아테로마(atheroma)가 형성되는데, 이는 관상동맥질환(Coronary heart disease, CHD)을 포함한 심혈관질환(Cardiovascular disease, CVD)의 발병 원인이 된다.

2. 스타틴 콜레스테롤 저하제

스타틴 (Statin)은 1976년 일본 동경농대 엔도 박사 등이 미생물(*Penicillium citrinum*)에서 최초로 분리함으로써 연구의 기초가 확립되었다(Endo *et al.*, 1976). Fig. 2에서 보여지는 것처럼 Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A(HMG-CoA)와 구조적으로 유사한 스타틴은 지질 합성 경로의 속도 결정 단계에 작용하는 HMG-CoA 환원효소에 결합함으로써 HMG-CoA 환원효소의 작용을 억제하는 저분자 화합물로 *de novo* 콜레스테롤 합성을 억제한다(Istvan & Deisenhofer, 2001). 이와 더불어, 세포 표면에 존재하면서 콜레스테롤 흡수를 담당하는 LDL 수용체의 발현을 증가시킴으로써 혈중 콜레스

테롤 농도를 저하시키는데 탁월한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Brown & Goldstein, 1986). 현재 다양한 천연 [Lovastatin(Mevacor, Altacor, Altoprev; Merk & Co., Inc), Pravastatin(Lipostat, pravacol; Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals Ltd), Simvastatin(Zocor; Merk Sharp & Dohme Ltd)] 및 합성 [Fluvastatin(Lescol, Lescol XL; Novartis Pharmaceuticals UK Ltd), Atorvastatin(Lipitor; Pfizer Ltd), Cerivastatin(Baycol; Bayer Inc), Rosuvastatin(Crestor; Astra-Zeneca UK Ltd), Pitavastatin] 스타틴계 약제가 개발되어 심혈관계 치료를 위한 콜레스테롤 저하제 의약품으로 출시되고 있다(Fig. 1). Simvastatin, Pravastatin과 같이 발효과정을 통해 분리된 천연 스타틴들은 매우 유사한 구조를 가지고 있는 반면 합성과정을 통해 만들어진 스타틴들은 구조가 매우 다르다. 각 스타틴계 의약품은 구조적 특성에 따라 물과 기름에 녹는 성질(hydrophilicity/lipophilicity), 수동확산(passive diffusion)에 의한 세포막 통과능 등에 차이를 나타내는데, Simvastatin, Atorvastatin와 같은 친유성 물질은 쉽게 세포막을 통과하여 세포내로 유입되지만 Pravastatin, Rosuvastatin 같은 친수성 물질은 세포내로 유입되기 위해서 담체(carrier)를 이용해야 한다(Corsini *et al.*, 1999). 이는 결과적으로는 스타틴의 의약품으로써의 효능에 영향을 미치게 되며, 근래에 개발된 Atorvastatin은 앞서 개발된 Simvastatin, Pravastatin,

Lovastatin에 비해 혈중 콜레스테롤 농도를 저하하는데 효과적으로 작용한다고 알려져 있다. 2005년 화이자의 리피토(Lipitor)은 \$12.19 billion달러로 세계에서 가장 많은 매출을 기록하였고, 머크(Merk)의 조코(Zocor)도 \$4.40 billion달러의 매출을 기록하며, 꾸준한 성장세를 유지하고 있다(7th annual report on the world's top 50 pharmaceutical companies, Pharmaceutical Executive, May 2006; www. pharmexec.com).

3. 단백질 Isoprenylation

스타틴은 HMG-CoA 환원효소를 저해함으로써 콜레스테롤 생합성을 억제할 뿐만 아니라 콜레스테롤 생합성 과정(Mevalonate pathway)의 중요한 중간 산물인 이소프레노이드(Isoprenoids)(Farnesylpyrophosphate(FPP)와 Geranylgeranylpyrophosphate(GGPP))의 합성을 저해한다(Fig. 2). FPP와 GGPP는 전사후 단백질 변형(Post-translation modification)의 하나인 단백질 isoprenylation(Farnesylation, Geranylgeranylation)의 기질로서 작용하며, 각각 단백질 Farnesyltransferase(FTase)와 Geranylgeranyltransferase(GGTase)의 촉매작용에 의해 표적단백질의 C-말단에 결합하게 된다(Zhang & Casey, 1996). α -heterotrimeric G-단백질, heme-a, nuclear lamins, small-GTP-binding 단백질(G-단백질)(Ras, Rho, Rab, Rac, Ral, Rap)등 세포내 신호 전달과정에서 중요한 역할을 하고 있는

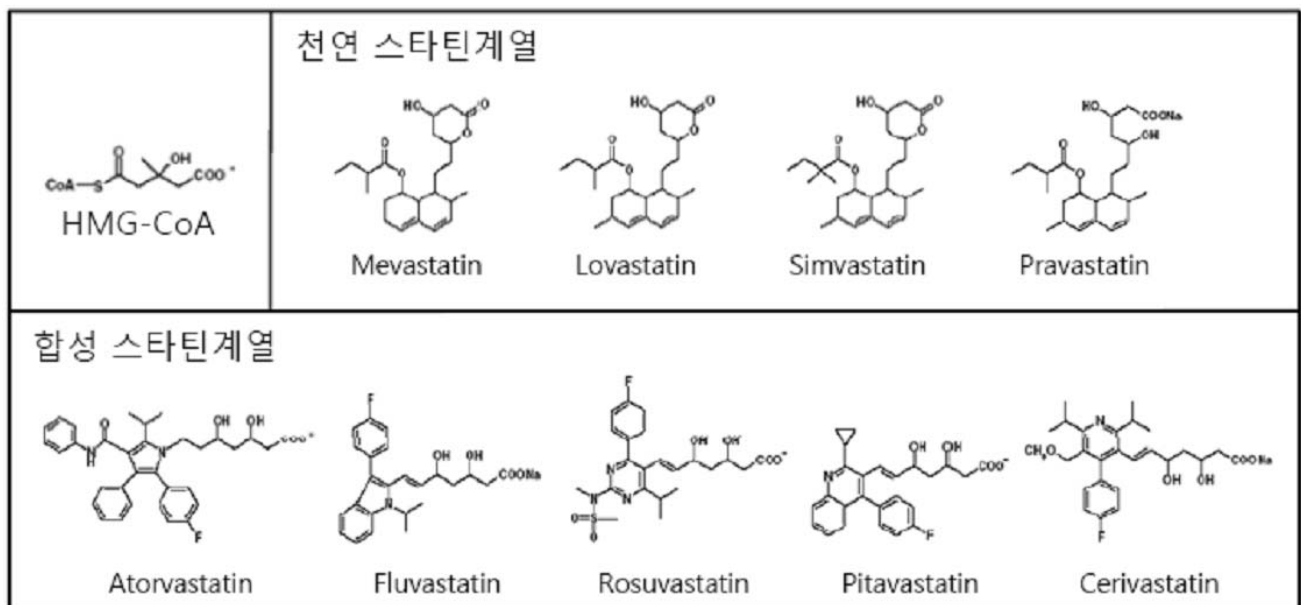


Fig. 1. 스타틴계 약제들의 화학구조.

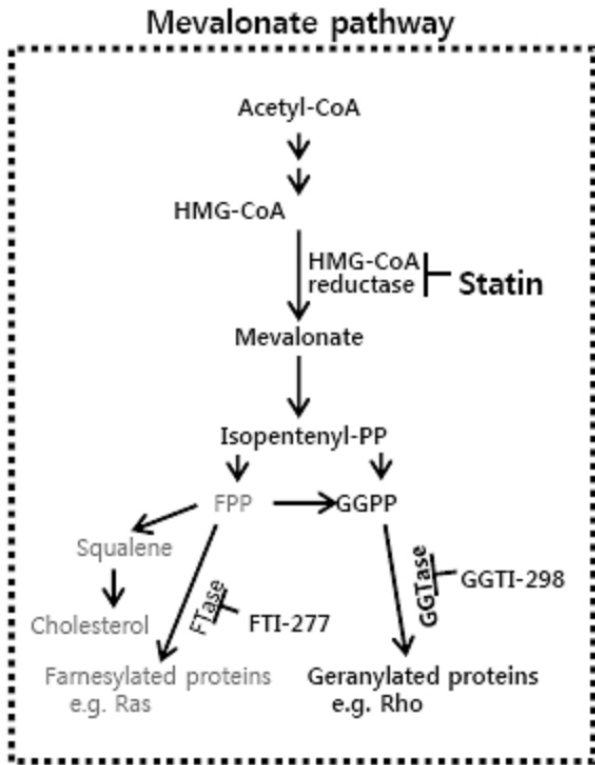


Fig. 2. Mevalonate pathway.

다양한 단백질들이 isoprenylation의 표적분자로 알려져 있다(Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997; Lowy & Willumsen, 1989; Casey, 1995). 표적 단백질의 isoprenylation 변형은 공유 부착(covalent attachment), 세포내 분포(subcellular localization), 세포간 교환(intracellular trafficking)을 조절한다고 알려져 있다. 스타틴에 의해 매개되는 FPP, GGPP의 결핍은 결과적으로 표적단백질의 isoprenylation을 방해하게 되고 세포내 기능을 조절하기 위한 신호전달경로에 중요한 영향을 미치게 된다. G-단백질은 세포 분열과 분화, 유전자 발현, cytoskeletal assembly, 세포 이동성, 단백질과 지질의 trafficking, 핵 수송, 세포 사멸 등 다양한 세포 기능을 조절하는데 관여하며(Takai *et al.*, 2001), 일반적으로, Ras G-단백질은 Farnesylation에 의해, Rho G-단백질은 Geranylgeranylation에 의해 변형된다(Casey, 1995). 분자 스위치로 작용하는 G-단백질은 GDP가 결합된 비활성화 상태에서는 대부분 세포질 내에 존재하고 GTP가 결합된 활성화 상태에서는 세포막에 존재한다. G-단백질의 isoprenylation 억제는 세포질에 위치하고 있던 G-단백질의 세포막으로의 이동을 방해함

으로써 비활성 G-단백질의 세포질내 축적을 야기하고, 세포막 이동으로 활성화되는 신호 전달 경로에 영향을 미치는 다른 분자(regulator 또는 effector)와의 접촉을 방해하게 된다(Zhang & Casey, 1996).

4. 스타틴의 다면 효과

기저 콜레스테롤 농도(base-line cholesterol level) 또는 콜레스테롤 농도 저하와 무관한 스타틴의 의학적 치료 효과가 다양한 질병[치매(Wolozin *et al.*, 2000), 허혈성 뇌졸중(Crouse *et al.*, 1998), 골다공증(Chan *et al.*, 2000), 암(Demierre *et al.*, 2005)]을 대상으로 밝혀지고 있다. 항염증, 세포 증식 억제, 혈관 내피 세포 보호, 항산화, 면역 억제 그리고 항혈전 작용(Bellosta *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2007; Libby & Aikawa, 2003; Nissen *et al.*, 2005) 등 콜레스테롤 저하 효과와 무관하게 나타나는 스타틴의 다면 효과(Pleiotropic effects)는 대부분 단백질 isoprenylation 억제를 통해 매개된다고 알려지고 있으며, G-단백질은 잘 알려진 표적분자로 스타틴 작용의 중요한 조절 기전을 제공한다.

이와 관련하여 스타틴은 RhoA, Rac1의 isoprenylation을 억제함으로써 액틴 세포 골격(actin cytoskeleton), 초점 부착의 결합(focal adhesion assembly)에 변이를 유도하고 내피 세포 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)의 발현을 증진시키는데, 이는 대뇌허혈(cerebral ischemia) 손상을 완화시키는 작용과 연관되어 있다고 알려져 있다(Endres *et al.*, 1998). 또한, 스타틴은 G-단백질의 isoprenylation을 억제함으로써 조직형 플라스미노겐 활성화제(tissue-type plasminogen activator)의 발현을 증진시키고 플라스미노겐 활성화제 억제제-1(plasminogen activator inhibitor-1)와 endothelin-1의 발현을 저하시킴이 보고된 바 있다(Essig *et al.*, 1998; Hernandez-Perera *et al.*, 2000). 암세포의 증식 저해 및 세포 사멸(Khazada *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2003), 뇌허혈 현상(cerebral ischemia) 완화(Endres *et al.*, 1998), 세포 분화(Fernandez-Hernando *et al.*, 2005)를 유도하는 스타틴의 작용 또한 G-단백질의 isoprenylation 억제를 매개로 작용한다고 알려져 있다.

스타틴이 백혈구 이동(leukocyte migration) 및 T 림프구 활성화 과정에서 중요한 역할을 하는 integrin LFA1에 직접 결합함으로써 LFA1의 구조에 변형을 초래하고 이로 인해 intercellular-adhesion molecule 1(ICAM1)과의 상호작용을 방

해한다고 보고된 바 있다(Weitz-Schmidt *et al.*, 2001). 이는 스타틴이 HMG-CoA 환원효소 이외의 표적분자와 상호작용함으로써 스타틴의 다면 효과에 기여하고 있음을 시사하고 있는 바, 스타틴의 효능을 규명하기 위해서는 지금까지 동정되지 않은 스타틴의 표적분자들에 대한 이해가 요구된다.

5. 배아줄기세포에서의 스타틴의 효과

스타틴은 뼈 형성을 촉진하고(Mundy *et al.*, 1999), 골형성 단백질(BMP-2)의 발현을 증진하며(Sugiyama *et al.*, 2000), 골세포 분화를 촉진한다(Sugiyama *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2001)고 알려져 있다. 이와 유사하게 생쥐 배아줄기세포에서 스타틴이 골세포로의 분화를 촉진한다(Phillips *et al.*, 2001)고 보고된 바 있지만, 배아줄기세포에서의 스타틴의 효과 및 작용에 대한 연구 결과는 미비한 실정이다.

최근 우리 연구팀은 Fig. 3A에서 보여지는 바와 같이, 생쥐 배아줄기세포에 스타틴을 처리하였을 때 미분화 배아줄기세포에 고유적으로 나타나는 콜로니 형태의 변형이 유도되고 염기성 인산화효소(alkaline phosphatase, AP)을 포함한 미분화-특이적 배아줄기세포 표지인자의 발현이 저하됨으로써 배아줄기세포 자가 재생산능이 저하되고 분화가 유도됨을 확인하였다. 배아줄기세포에서의 스타틴의 작용이

콜레스테롤 저하 효과에 의해 유도되는지를 조사하기 위해 배양액에 외부적으로 콜레스테롤을 첨가하고 스타틴의 작용을 조사한 결과, 스타틴에 매개되는 배아줄기세포 자가 재생산 억제가 콜레스테롤과 무관하게 유도됨을 확인하였다. 스타틴의 작용을 좀 더 이해하기 위해 단백질 isoprenylation의 기질로 작용하는 FPP, GGPP을 일정조건으로 배양액에 첨가하고 스타틴 효과를 조사한 결과, 스타틴에 매개되는 배아줄기세포 자가 재생산 억제가 GGPP 결핍, 단백질 geranylgeranylation과 연관되어 있음을 확인하였다(Lee *et al.*, 2007). 또한, 단백질 geranylgeranylation 과정의 중요한 표적 단백질을 동정하기 위해 G-단백질을 조사한 결과, 스타틴에 의해 RhoA G-단백질의 세포막으로의 이동이 저해됨을 확인하였다(Fig. 3B). 이로부터, 본 연구팀은 배아줄기세포에서 G-단백질 RhoA가 스타틴 다면 효과를 위한 중요한 표적분자로 작용하며, 배아줄기세포의 분화 억제인자로서 작용할 수 있음을 제시하였다.

결론

콜레스테롤 저하 효능이 뛰어난 스타틴은 고지혈증 및 심혈관계 질환 치료제로 사용되고 있다. 콜레스테롤 저하 효과

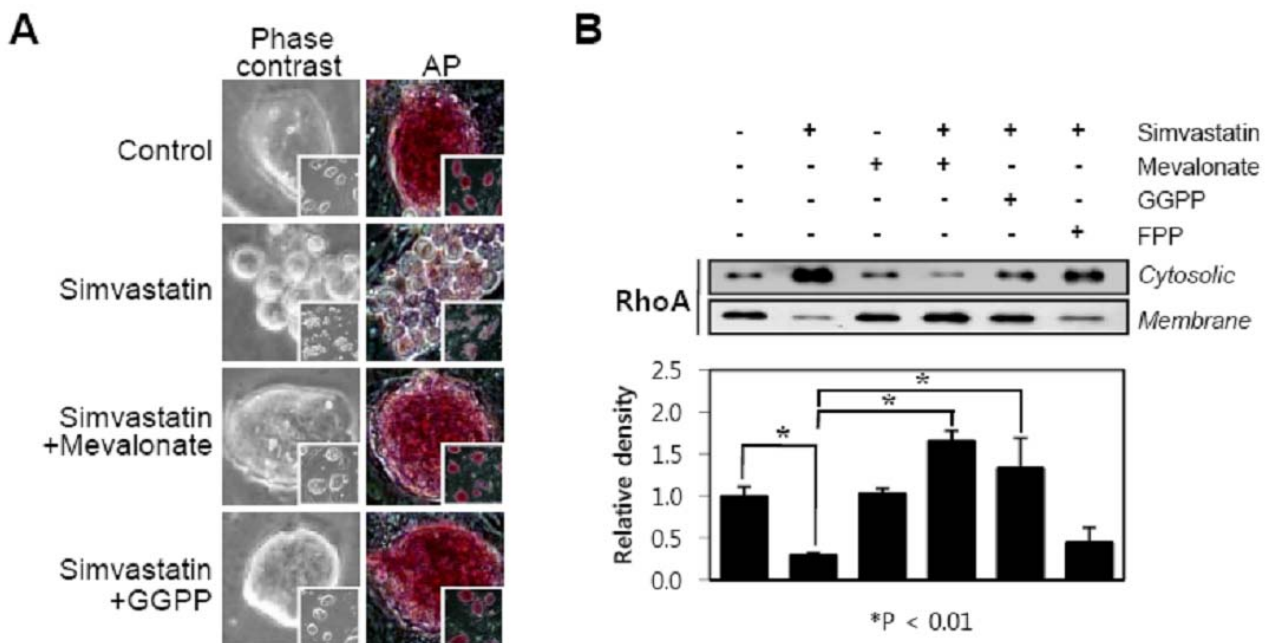


Fig. 3. 배양중인 생쥐 배아줄기세포에 미치는 스타틴의 효과(A, B: 본문참조).

와 무관하게 나타나는 스타틴 다면 효과의 대부분이 스타틴에 의해 억제되는 단백질 isoprenylation(Farnesylation, Geranylgeranylation)에 의해 매개된다고 알려져 있다. 스타틴은 생쥐 배아줄기세포에서 콜레스테롤과 무관하게 RhoA geranylgeranylation을 억제함으로써 자가 재생산능을 억제하는데, 이는 배아줄기세포의 자가 재생산능을 유지하는데 RhoA 신호전달과정이 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다. 인간 배아줄기세포에서의 스타틴의 효능은 아직 보고된 바가 없지만, 이와 관련하여, 최근 보고에서 RhoA 신호 전달 경로의 하류 표적 분자인 ROCK의 저해제(Y37632)가 단일 세포로 분리된 인간 배아줄기세포의 세포 사멸을 억제함으로써 생존을 증가시키고 콜로니 형성을 증가시킨다고 보고된 바 있다(Watanabe *et al.*, 2007). 현재, 배아줄기세포에서의 스타틴 효과 및 작용 기전에 관여하는 표적 분자로 RhoA 만이 동정되었으나, 세포내 다양한 스타틴의 표적 분자가 있을 것으로 기대되며, 이에 대한 체계적인 연구는 배아줄기세포의 자가 재생산 및 골세포 분화 조절 기전을 이해하는데 중요한 단서를 제공할 것으로 추정된다.

인용문헌

- Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A (2000) Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 32:164-176.
- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
- Casey PJ (1995) Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem Soc Trans* 23:161-166.
- Chan KA, Andrade SE, Boles M, Buist DS, Chase GA, Donahue JG, Goodman MJ, Gurwitz, JH, LaCroix AZ, Platt R (2000) Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet* 355:2185-2188.
- Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F (1999) New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther* 84:413-428.
- Crouse JR 3rd, Byington RP, Furberg CD (1998) HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data. *Atherosclerosis* 138:11-24.
- Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM (2005) Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 5:930-942.
- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y (1976) ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot(Tokyo)* 29:1346-1348.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl(HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8880-8885.
- Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G (1998) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res* 83:683-690.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Fernandez-Hernando C, Suarez Y, Lasuncion MA (2005) Lovastatin-induced PC-12 cell differentiation is associated with RhoA/RhoA kinase pathway inactivation. *Mol Cell Neurosci* 29:591-602.
- Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430.
- Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Soria E, Lamas S (2000) Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res* 87:616-622.
- Istvan ES, Deisenhofer J (2001) Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292:1160-1164.
- Khanzada UK, Pardo OE, Meier C, Downward J, Seckl MJ, Arcaro A (2006) Potent inhibition of small-cell lung cancer cell growth by simvastatin reveals selective func-

- tions of Ras isoforms in growth factor signalling. *Oncogene* 25:877-887.
- Lee MH, Cho YS, Han YM (2007) Simvastatin suppresses self-renewal of mouse embryonic stem cells by inhibiting RhoA geranylgeranylation. *Stem Cells* 25:1654-1663.
- Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, Llanas RA, VanDenHeuvel-Kramer K, Manning D, Thomson JA (2006) Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24:568-574.
- Libby P, Aikawa M (2003) Effects of statins in reducing thrombotic risk and modulating plaque vulnerability. *Clin Cardiol* 26:111-14.
- Lowy DR, Willumsen BM (1989) Protein modification: new clue to Ras lipid glue. *Nature* 341:384-385.
- Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N (2001) Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280:874-877.
- Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G (1999) Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. *Science* 286:1946-1949.
- Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, Orazem J, Magorien RD, O'Shaughnessy C, Ganz P (2005) Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:29-38.
- Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C, Ailhaud G, Dani C (2001) Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284:478-484.
- Rao M (2004) Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol* 275:269-286.
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10:55-63.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688-690.
- Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S (2000) Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271:688-692.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11:2295-2322.
- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Murguruma K, Sasai Y (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25:681-686.
- Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U (2001) Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 7:687-692.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684-687.
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57:1439-1443.
- Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA (2005) Basic FGF and suppression of BMP signaling

- sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2:185-190.
- Zhang FL, Casey PJ (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Ann Rev Biochem* 65:241-269.
- Zhong WB, Wang CY, Chang TC, Lee WS (2003) Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of protein geranylgeranylation and de novo protein synthesis. *Endocrinology* 144:3852-3859.