

心血管疾患リスクに対する運動効果を予測できる 血中バイオマーカーの探索

立命館大学 藤江隼平
(共同研究者) 同 家光素行
同 真田樹義
早稲田大学 前田清司
東京医科大学 浜岡隆文

Identification of Predictive Blood Biomarker for Exercise Effects on Cardiovascular Disease Risks

by

Shumpei Fujie, Motoyuki Iemitsu, Kiyoshi Sanada
Ritsumeikan University
Seiji Maeda
Waseda University
Takafumi Hamaoka
Tokyo Medical University

ABSTRACT

Aging-induced deterioration of arterial stiffness is decreased by aerobic exercise training, and increased nitric oxide (NO) production is involved in this effect. Apelin promotes NO production via upregulation of endothelial NO synthase, resulting in improvement of arterial stiffness. However, the time-dependent effects of aerobic exercise training on circulating apelin levels remain unclear.

PURPOSE: This study aimed to determine whether the changes in circulating apelin levels by aerobic exercise training may be a novel predictive biomarker for the decrease

in arterial stiffness in middle-aged and older adults.

METHODS: Twenty Japanese healthy middle-aged and older subjects (66 ± 1 years) were randomly divided into two groups: exercise intervention and sedentary controls. Subjects in the training group completed 8-week of middle-intensity aerobic exercise training. We evaluated plasma apelin levels and brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV), measured every 2 weeks for 8-week in the training group.

RESULTS: Plasma apelin levels were significantly increased after 4-week intervention ($P < 0.05$). However, baPWV was gradually declined from baseline to 8-week and significantly decreased after 8-week intervention ($P < 0.05$). Interestingly, the exercise training-induced increase in plasma apelin levels before and after 4-week exercise training was negatively correlated with the decrease in baPWV before and after 8-week exercise training ($r = -0.700, P < 0.05$).

CONCLUSION: These results suggest that the plasma apelin levels were increased at the early stage of exercise training intervention and was associated with exercise training-induced alternation of arterial stiffness in middle-aged and older adults. Thus, plasma apelin levels may be a predictive biomarker of exercise training-induced improvement of arterial stiffness in middle-aged and older adults.

要 旨

中高齢者の有酸素性トレーニングによる動脈硬化度の低下には、血管拡張物質：apelinの分泌増加が影響することが報告されているが、有酸素性トレーニングによる血中apelin濃度の経時的な変化が動脈硬化度の低下効果に及ぼす影響は明らかでない。

【目的】本研究は、apelinが動脈硬化に対する運動効果を予測できる血中バイオマーカーになりうるか否か検討することを目的とした。

【方法】健常な中高齢男女20名を対象に、中等強度の自転車エルゴメータ運動を8週間実施するトレーニング群10名とコントロール群10名にランダムに分けた。トレーニング群は2週間ごとに、動脈硬化度の指標である上腕-足首間の脈波伝播速度 (baPWV) および血中のapelin濃度を測定した。

【結果】血中apelin濃度は介入開始4週目から有意に増加したが、baPWVは介入開始8週目に有意に低下した。さらに、血中apelin濃度の介入開始から4週目の増加量とbaPWVの介入開始から8週目の低下量は、有意に負の相関関係を示した。

【結論】apelinは、有酸素性トレーニングによる動脈硬化度の低下を予測する血中バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

緒 言

近年、世界の死亡原因の第一位が心血管疾患であることから、その原因の1つである動脈硬化を予防・改善させることは、重要な課題である。動脈硬化の増大要因として、加齢が関与しているが、習慣的な有酸素性運動は動脈硬化度を低下させることが知られている。しかしながら、我が国における運動継続率は約3割と極めて低く、その要因として運動効果が獲得できるまでに数ヶ月以上必

要であり、それまでの運動に対するモチベーションを維持することが困難であることが考えられている。先行研究において、前田・家光らの動物実験では、動脈血管に対する運動効果が獲得できるよりも早期の段階で複数の遺伝子発現の変動が起きていることが示されている^{1,2)}。したがって、運動によって変動するホルモン・ペプチドを血液バイオマーカーとして捉えることができれば、動脈硬化に対する運動効果を予測する血液バイオマーカーを同定することができるかもしれない。

Apelinは血管や骨格筋をはじめ数多くの組織で発現しており、受容体であるAPJ受容体に結合することで各組織に作用することが報告されている^{3,4,5,6)}。血管内皮細胞においては、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) シグナル経路を介して、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) リン酸化を増大させ、動脈血管のnitric oxide (NO) 産生を促進させることで、血管拡張を介して動脈硬化度を低下させることが報告されている^{3,4,5,6)}。我々は、これまでに、中高齢者における8週間の有酸素性トレーニングが血中apelin濃度を増大させ、その増大が動脈硬化度の低下効果と相関関係があることを明らかにしてきた⁷⁾。そのため、もし有酸素性トレーニングの実施によりapelinが早期に変動すれば、運動による動脈硬化度の低下の起因となるかもしれない。しかしながら、有酸素性トレーニングによる動脈硬化度の低下効果に対するapelin分泌の経時的変動は明らかでない。そこで本研究では、中高齢者における有酸素性トレーニングが血中apelin濃度および動脈硬化度に及ぼす経時的影響を検討し、apelinが動脈硬化に対する運動効果を予測する血中バイオマーカーになりうるか否か検討することを目的とした。

1. 方法

1.1 対象者

運動習慣のない健常な中高齢者20名(平均年齢: 67.0 ± 1.3 歳, 男性:8名, 女性:12名)を対象とし、2群に分割した:有酸素性トレーニング群10名(平均年齢: 66.4 ± 2.1 歳, 男性:4名, 女性:6名), コントロール群10名(平均年齢: 67.8 ± 1.5 歳, 男性:4名, 女性:6名)。すべての被験者は糖尿病, 高血圧, 脂質異常症, 心疾患, 腎疾患などの慢性疾患がなく, 非喫煙者であった。また, 本研究への参加に先立ち, すべての被験者に実験の内容や手順, 予想される結果および予測されるリスクを説明した後に文書による実験参加の同意を得た。なお, 本研究は「立命館大学 人を対象とする医学系研究倫理審査委員会」の承諾を受け, ヘルシンキ宣言の精神に則り実施した。

1.2 実験手順

被験者には, 測定の24時間前から激しい運動, カフェイン摂取を中止し, 12時間前から絶食させた。なお, 飲水は自由摂取とした。実験中の室温は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ にて実施した。被験者は実験室に到着後, 身長・体重を測定し, 30分間安静にした後に前腕肘静脈から採血, その後に血圧, 心拍数, 動脈硬化度として上腕-足首間脈波伝播速度(brachial-ankle pulse wave velocity: baPWV)の測定を実施し, $\dot{V}\text{O}_{2\text{peak}}$ の測定は最後に実施した。2群とも介入前後で同様の測定を実施し, トレーニング群は有酸素性トレーニング終了まで2週間ごとにbaPWVの測定および採血を2週ごとの最後の運動から48時間以上空けて, 実施した。また, コントロール群の被験者には, 実験以前と同様の生活を送るように指示した。

1.3 有酸素性トレーニング

有酸素性トレーニングは, 自転車エルゴメータ

(828E: Monark 社製, Vansbro, Sweden) を使用し、1日45分、週3回、8週間実施した。1回のトレーニングは、ウォームアップを40% $\dot{V}O_{2peak}$ の運動強度で5分間行い、60-70% $\dot{V}O_{2peak}$ の運動負荷の本運動を45分間行った後に、クールダウンを40% $\dot{V}O_{2peak}$ の運動強度で5分間行った。いずれも、自転車エルゴメータのペダルの回転数を60回転/分に設定した。有酸素性トレーニングはすべて監視下で実施した。さらにトレーニング実施期間中は、普段どおりの食事内容や身体活動を心掛けるよう指示した。

1. 4 血圧、心拍数および動脈硬化度の測定

baPWV, 上腕部の血圧および心拍数は、最低15分間の仰臥位安静後、form PWV/ABI (血圧脈波検査装置 HBP-RPE3-SP, オムロンヘルスケア社製, Kyoto, Japan) を用いて測定した。測定は、カフを両上腕と足首に装着し、心電計電極を両手首に、心音センサーを左第4肋間胸骨左縁に装着した。カフ内に内蔵されたプレチスモグラフィックセンサーがオシロメトリック法によって血圧を含めた波形データを測定・解析した。baPWV は、上腕と足首の間の距離を時間で除すること (cm/s) で計算された。baPWV における時間は、上腕と足首における脈波の到着時間の差であり、距離は、 $L=La - Lb$ によって被験者の身長から推定した (La: 心臓から足首までの距離, Lb: 心臓から上腕までの距離)。また、左右の上腕および足首から得られた血圧は平均化し、上腕の収縮期血圧 (SBP) と上腕の拡張期血圧 (DBP) を算出した。また、血圧および PWV 測定中の心拍数は一拍の心室興奮を示す R 波と次の一拍の R 波の間隔である R-R 間隔から1分間当たりの心拍数を自動的に計測した。

1. 6 最高酸素摂取量測定 ($\dot{V}O_{2peak}$)

$\dot{V}O_{2peak}$ の測定は、自転車エルゴメータ (828E: デサントスポーツ科学 Vol. 42

Monark 社製, Vansbro, Sweden) を用いた多段階漸増負荷法で行った。自転車エルゴメータのペダルの回転数を60回転/分に設定し、目標心拍数を110-120拍/分として5分間のウォームアップを行わせ、その後、被験者は90W (60-120W) から運動を開始し、疲労困憊に至るまで1分毎に15Wずつ負荷を増加した。運動中、各負荷ステージの心拍数と主観的運動強度 (rating of perceived exertion: RPE) をモニターした。運動中の呼気ガスは breath-by-breath 法により測定し、酸素と二酸化炭素の濃度分析およびガス量は30秒ごとの平均値を算出した (AE-310SRD: ミナト医科学社製, Osaka, Japan)。 $\dot{V}O_{2peak}$ の評価基準は、1) $\dot{V}O_2$ のレベリングオフが確認されること、2) 年齢から推定される最大心拍数 ($208 - 0.7 \times \text{age}$) の90%にほぼ到達していること、3) 換気交換比が1.1以上であること、4) RPEが18以上であることとし、この4つの指標のうち3つ以上を満たすことを条件とした。

1. 7 血中 apelin 濃度測定

座位安静状態にて、肘正中静脈から採血した血液は、4℃で3,000回転、10分間の遠心によって上清を分離し、血漿 apelin 濃度を測定するまで -80℃で冷凍保存した。血漿 apelin 濃度は、Phoenix Pharmaceuticals 社製 (Burlingame, CA, USA) の実験プロトコルに従って、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) により測定した。吸光度値は、マイクロプレートリーダー (xMark Microplate Spectrophotometer; Bio-Rad Laboratories 社製, Hercules, CA, USA) を用いて450nmの波長で測定し、標準曲線から各被験者の血漿 apelin 濃度を算出した。各被験者の血漿 apelin 濃度はデュプリケートで測定し、その2つの値の平均値をデータとして用いた。

1. 8 統計処理

本研究結果は、すべて平均値±標準誤差で表した。介入前後の2群間の各測定項目の比較は、繰り返しのある二元配置分散分析法により検定し、交互作用が認められた項目において、FisherのPLSD法を用いてpost-hocテストを実施した。介入前後の2群間の各測定項目の変化量の比較は、対応のないt検定を実施した。トレーニング群の血中apelin濃度およびbaPWVの経時的变化は繰り返しのある一元配置分散分析により検討した。トレーニング開始前から2週間ごとの血中apelin濃度の変化量とbaPWVの変化量の関係をピアソンの相関係数によって検討するとともに、単回帰により回帰直線を求めた。危険率(P)は5%未満を有意水準とした。すべての統計解析は、StatView 5.0 (SAS社製, Cary, NC, USA) を使用した。

2. 研究結果

2. 1 介入前後のトレーニング群とコントロール群の比較

介入前におけるトレーニング群とコントロール群の体重、心拍数、SBP、DBP、baPWV、 $\dot{V}O_{2peak}$ 、血中apelin濃度には、有意な差が認められなかった(表1)。介入前後の2群間の比較を二

元配置分散分析にて検討した結果、血中apelin濃度には有意な交互作用が認められ(P=0.0009, 表1)、トレーニング群の血中apelin濃度は有酸素性トレーニング介入後に有意に増加した。しかしながら、コントロール群の血中apelin濃度は介入後に有意な差が認められなかった。一方、介入前後の2群間の体重、心拍数、SBP、DBP、baPWV、 $\dot{V}O_{2peak}$ の比較を二元配置分散分析にて検討した結果、有意な交互作用は認められなかった(表1)。また、トレーニング群の介入前後の $\dot{V}O_{2peak}$ および血中apelin濃度の変化量はコントロール群の変化量よりも有意に高値を示した。加えて、トレーニング群の介入前後のbaPWVの変化量はコントロール群の変化量よりも有意に低値を示した。

2. 2 経時的变化

トレーニング群の血中apelin濃度は有酸素性トレーニング開始4週目以降に有意に増加した(表2)。また、トレーニング群のbaPWVは有酸素性トレーニング開始8週目に有意に低下した(表2)。

2. 3 相関関係

トレーニング開始前から2週間ごとの血中apelin濃度の変化量とbaPWVの変化量の相関

表1 Comparison of characteristics in training and control groups and changes (Δ) in characteristics before and after intervention

	Control (n=10;M=4,F=6)		Training (n=10;M=4,F=6)		Two-way ANOVA	Δ control	Δ Training	Unpaired t-test
	Pre	Post	Pre	Post				
Age, years	66.80±1.71		64.5±2.40					
Height, cm	160.70±2.87		169.75±3.14					
Body weight, kg	56.61±2.31	56.46±2.24	62.733.45	62.68±3.43	0.9864	-0.22±0.45	0.05±0.27	0.6066
HR, bpm	56.50±2.57	54.4±2.69	57.00±1.05	57.20±2.26	0.6102	-2.10±1.88	0.20±2.07	0.4211
SBP, mmHg	129.85±3.94	127.65±4.02	128.00±5.97	120.55±4.75	0.5832	-2.20±2.71	-7.45±2.96	0.2069
DBP, mmHg	77.70±2.52	77.00±2.77	73.25±3.28	70.15±2.95	0.6805	-0.70±2.07	-3.10±2.13	0.4305
baPWV, cm/s	1443.10±47.89	1419.65±44.41	1475.50±58.66	1287.25±62.38	0.1288	-23.45±24.74	-188.25±19.25 [†]	0.0001
$\dot{V}O_{2peak}$, ml/kg/min	26.38±2.26	26.44±2.07	23.30±1.86	29.02±2.27	0.1908	0.05±0.52	5.72±0.71 [†]	0.0001
Plasma apelin, ng/ml	2.56±0.23	3.13±0.17	2.24±0.29	5.25±0.54*	0.0009	0.58±0.14	3.01±0.45 [†]	0.0001

M: male, F: female, Δ : change before and after intervention, HR: heart rate, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, baPWV: brachial-ankle pulse wave velocity, $\dot{V}O_{2peak}$: peak oxygen uptake. values are means and SE.

Differences between groups and time points were assessed by two-way repeated-measure ANOVA followed by a Fisher's post hoc. *P<0.05, before training vs. after training.

Differences between Δ Control and Δ training were assessed by unpaired Student's t-tests. [†] P<0.05, Δ Control vs. Δ Training.

表2 Time-course of changes in characteristics throughout an 8-week aerobic exercise intervention

	0-week	2-week	4-week	6-week	8-week	ANOVA
baPWV,cm/s	1575.50±58.66	1453.38±55.54	1407.25±55.82	1367.25±55.91	1287.25±62.38*	0.0498
Plasma apelin, ng/ml	2.32±0.31	2.42±0.30	4.08±0.48 *	4.09±0.51 *	5.39±0.65*	0.0002

baPWV: brachial-ankle pulse wave velocity. Values are means and SE. *P<0.05,vs.0-week

表3 Correlation matrix between changes (Δ) in baPWV and circulating apelin levels in Training group

	Δ baPWV			
	Δ 0wk-2wk	Δ 0wk-4wk	Δ 0wk-6wk	Δ 0wk-8wk
Δ apelin (0wk-2wk)	r=0.093, P=0.8110	r=0.014, P=0.9709	r=0.075, P=0.8488	r=-0.152, P=0.6961
Δ apelin (0wk-4wk)	r=-0.328, P=0.3887	r=-0.400, P=0.2527	r=-0.274, P=0.4428	r=-0.700, P=0.0243
Δ apelin (0wk-6wk)	r=-0.376, P=0.3181	r=-0.650, P=0.0417	r=-0.641, P=0.0460	r=-0.681, P=0.0301
Δ apelin (0wk-8wk)	r=-0.522, P=0.1494	r=-0.553, P=0.0975	r=-0.463, P=0.1782	r=-0.643, P=0.0448

Δ : change before and after intervention, baPWV: brachial-ankle pulse wave velocity.

関係を検討した(表3)。トレーニング開始前から4週目までの血中 apelin 濃度とトレーニング開始前から8週目までの baPWV には有意な負の相関関係が認められた ($r=-0.700$, $P=0.0243$)。また、トレーニング開始前から6週目までの血中 apelin 濃度とトレーニング開始前から4週目までの baPWV には有意な負の相関関係が認められた ($r=-0.650$, $P=0.0417$)。加えて、トレーニング開始前から6週目までの血中 apelin 濃度とトレーニング開始前から6週目までの baPWV には有意な負の相関関係が認められた ($r=-0.641$, $P=0.0460$)。さらに、トレーニング開始前から6週目までの血中 apelin 濃度とトレーニング開始前から8週目までの baPWV には有意な負の相関関係が認められた ($r=-0.681$, $P=0.0301$)。トレーニング開始前から8週目までの血中 apelin 濃度とトレーニング開始前から8週目までの baPWV には有意な負の相関関係が認められた ($r=-0.643$, $P=0.0448$)。

3. 考 察

本研究では、中高齢者における8週間の有酸素性トレーニングが血中 apelin 濃度および動脈硬化度に及ぼす影響を経時的に検討した結果、血中 apelin 濃度はトレーニング開始4週目以降に有意に増加し、baPWV はトレーニング開始8週目に有意に低下した。そのため、有酸素性トレーニング

による血中 apelin 濃度の早期の増加がその後の動脈硬化度の低下改善効果を誘発している可能性が考えられる。さらに、トレーニング開始前から4週目の血中 apelin 濃度の変化量とトレーニング開始から8週目の baPWV の変化量は、有意な負の相関関係が認められ、トレーニング開始前から6週目の血中 apelin 濃度の変化量とトレーニング開始から8週目の baPWV の変化量は、有意に負の相関関係が認められた。したがって、apelin は、有酸素性トレーニングによる動脈硬化度の低下を予測する血中バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

本研究において、中高齢者における有酸素性トレーニングはトレーニング開始8週間後に baPWV を有意に低下させた。つまり、動脈硬化に対する運動効果を獲得するまでには8週間の期間を必要とする。8週間の運動を継続しないと運動効果を獲得できないとなると、8週間の中でモチベーションが低下し、運動を継続することができず、運動効果を獲得するまでにドロップアウトしてしまう運動実施者も多いことが考えられる。しかしながら、本研究では有酸素性トレーニング開始4週目での血中 apelin 濃度の増加は、8週目での baPWV の低下と有意に負の相関関係が認められたことから、有酸素性トレーニング開始4週目で血中 apelin 濃度を評価することで運動が功を

奏しているか否か運動実施者に情報提供することができる。したがって、従来であればトレーニング開始8週目まで動脈硬化に対する運動効果を獲得できているか否か不明であったが、本研究の血中バイオマーカーを用いればトレーニング開始4週目で運動効果の獲得に対する情報提供が可能となる。本研究結果により、**apelin**が動脈硬化に対する運動効果を予測する血中バイオマーカーとなりうる可能性が示されたことで、加齢に伴う動脈硬化度の悪化の早期治療や運動プログラムの軌道修正ができるため、本研究は臨床的に極めて意義の高い研究成果を示した。

本研究では、**apelin**に着目して、有酸素性トレーニングによる動脈硬化度の低下を予測する血中バイオマーカーの探索を実施した。しかしながら、有酸素性トレーニングによる動脈硬化改善効果は血管拡張物質：**apelin**のみで調節されているわけではない。骨格筋から分泌される **irisin** は、有酸素性トレーニングにより分泌増加し、動脈硬化度の低下効果に関連することが明らかとなっている^{8,9)}。一方、動脈血管は血管拡張物質の変動のみで調節されているわけではなく、血管収縮物質の変動も影響している。**Endothelin-1**は血管収縮作用を有しており、有酸素性トレーニングにより分泌低下することで、動脈硬化度を低下させることが報告されている^{10,11)}。したがって、今後は有酸素性トレーニングが動脈硬化度を低下させる機序に関与する **apelin**以外の血管拡張・収縮物質の経時的な検討も必要である。

4. 結 論

本研究では、中高齢者における有酸素性トレーニングが血管拡張物質：**apelin**の血中濃度および動脈硬化度に及ぼす影響を経時的に検討した。その結果、有酸素性トレーニング開始後、血中 **apelin**濃度は早期に増加し、その早期の増加がその後の動脈硬化度の低下効果に関連することを明

らかにした。したがって、血管拡張物質：**apelin**は、有酸素性トレーニングによる動脈硬化改善効果を予測する血中バイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究に参加して頂いた実験対象者の皆様に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Maeda S., Iemitsu M., Miyauchi T., Kuno S., Matsuda M., Tanaka H., Aortic stiffness and aerobic exercise: mechanistic insight from microarray analyses, *Med. Sci. Sports. Exerc.*, **37**:1710-1716 (2005)
- 2) Iemitsu M., Maeda S., Otsuki T., Goto K., Miyauchi T., Time course alterations of myocardial endothelin-1 production during the formation of exercise training-induced cardiac hypertrophy., *Exp. Biol. Med.*, **231**:871-875 (2006)
- 3) Andersen C.U., Hilberg O., Mellekjær S., Nielsen-Kudsk J.E., Simonsen U., Apelin and pulmonary hypertension., *Pulm. Circ.*, **1**:334-346 (2011)
- 4) Besse-Patin A., Montastier E., Vinel C., Castan-Laurell I., Louche K., Dray C., Daviaud D., Mir L., Marques M.A., Thalamas C., Valet P., Langin D., Moro C., Viguerie N., Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine., *Int. J. Obes.*, **38**:707-713 (2013)
- 5) Kunduzova O., Alet N., Delesque-Touchard N., Millet L., Castan-Laurell I., Muller C., Dray C., Schaeffer P., Herault J.P., Savi P., Bono F., Valet P., Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes., *FASEB J.*, **22**:4146-4153 (2008)
- 6) Mughal A., Sun C., O'Rourke S.T., Apelin Reduces Nitric Oxide-Induced Relaxation of Cerebral Arteries by Inhibiting Activation of Large-Conductance, Calcium-Activated K Channels., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **71**:223-232 (2018)

- 7) Fujie S., Sato K., Miyamoto-Mikami E., Hasegawa N., Fujita S., Sanada K., Hamaoka T., Iemitsu M., Reduction of arterial stiffness by exercise training is associated with increasing plasma apelin level in middle-aged and older adults., *PLoS One.*, 9:e93545 (2014)
- 8) Fu J., Han Y., Wang J., Liu Y., Zheng S., Zhou L., Jose P.A., Zeng C., Irisin Lowers Blood Pressure by Improvement of Endothelial Dysfunction via AMPK-Akt-eNOS-NO Pathway in the Spontaneously Hypertensive Rat., *J. Am. Heart. Assoc.*, 5:e003433 (2016)
- 9) Inoue K., Fujie S., Hasegawa N., Horii N., Uchida M., Iemitsu K., Sanada K., Hamaoka T., Iemitsu M., Aerobic exercise training-induced irisin secretion is associated with the reduction of arterial stiffness via nitric oxide production in adults with obesity., *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 45:715-722 (2020)
- 10) McEniery C.M., Qasem A., Schmitt M., Avolio A.P., Cockcroft J.R., Wilkinson I.B., Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 42:1975-1981 (2003)
- 11) Maeda S., Miyauchi T., Kakiyama T., Sugawara J., Iemitsu M., Irukayama-Tomobe Y., Murakami H., Kumagai Y., Kuno S., Matsuda M., Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans., *Life Sci.*, 69:1005-1016 (2001)