

新規アディポサイトカイン omentin の高血圧症の病態に及ぼす  
影響に関する研究

風間 恭輔

平成 26 年度

Studies on the effects of a novel adipocytokine, omentin, on  
pathogenesis of hypertension development

Kyosuke Kazama

2014

I.	緒論 .....	1
II.	第一章 .....	5
1.	緒言 .....	5
2.	材料および方法 .....	6
2-1.	試薬 .....	6
2-2.	一次抗体 .....	6
2-3.	二次抗体 .....	6
2-4.	ラット腸間膜動脈由来 SMCs の単離と培養 .....	7
2-5.	SMCs の形態観察 .....	7
2-6.	ラット摘出動脈標本 .....	7
2-7.	ウェスタンブロット法 .....	8
2-8.	Lucigenin assay .....	9
2-9.	単球接着能の測定 .....	9
2-10.	統計解析 .....	10
3.	実験結果 .....	11
3-1.	Omentin 単独処置の SMCs 形態に及ぼす影響 .....	11
3-2.	Omentin 単独処置の炎症性シグナル因子の活性化及び炎症性タンパク質発現に及ぼす影響 .....	11
3-3.	Omentin の TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導に及ぼす影響	11
3-4.	Omentin の TNF- $\alpha$ による炎症性シグナル因子活性化に及ぼす影響 .....	12
3-5.	TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導に及ぼす p38 または JNK 阻害薬の影響 .....	12
3-6.	Omentin の TNF- $\alpha$ による NOX 活性化に及ぼす影響 .....	13

3-7. 抗酸化薬の TNF- $\alpha$ による p38 及び JNK 活性化に及ぼす影響	13
3-8. Omentin の TNF- $\alpha$ による単球接着誘導に及ぼす影響	14
3-9. ラット摘出胸部大動脈における omentin の TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導に及ぼす影響	14
4. 考察	15
III. 第二章	18
1. 緒言	18
2. 材料および方法	19
2-1. 試薬	19
2-2. 一次抗体	19
2-3. 二次抗体	19
2-4. ラット腸間膜動脈由来 SMCs の単離と培養	19
2-5. 細胞増殖能測定	20
2-6. Boyden chamber assay	20
2-8. Lucigenin assay	21
2-9. Ex vivo out-growth assay	21
2-10. マウス頸動脈結紮 (ligation)モデル	22
2-11. 形態学的観察	22
2-12. 統計解析	22
3. 実験結果	24
3-1. Omentin 単独又は前処置の SMCs 増殖に及ぼす影響	24
3-2. Omentin の PDGF-BB による SMCs 遊走に及ぼす影響	24
3-3. Omentin の PDGF-BB による SMCs 遊走に関わるシグナル因	

子の活性化に及ぼす影響 .....	24
3-4. Omentin の PDGF-BB による NOX 活性化に及ぼす影響 ..	25
3-5. ラット摘出腸間膜動脈における omentin の FBS による SMCs out-growth に及ぼす影響 .....	25
3-6. Omentin 長期間投与のマウス頸動脈結紮モデルにおける新 生血管内膜形成に及ぼす影響 .....	26
4. 考察 .....	27
IV. 第三章 .....	30
1. 緒言 .....	30
2. 材料および方法 .....	31
2-1. 試薬 .....	31
2-2. 生体パラメーター .....	31
2-3. 観血的血圧測定 .....	31
2-4. 統計解析 .....	32
3. 実験結果 .....	33
3-1. Omentin 単独急性静脈内投与の Wistar rat 血圧に及ぼす影 響 .....	33
3-2. Omentin の NA または Ang II による昇圧作用に及ぼす影響	33
3-3. Omentin の dimorpholamine による昇圧作用に及ぼす影響	34
3-4. Omentin の L-NAME 処置 Wistar rat における NA による昇圧 作用に及ぼす影響 .....	34
4. 考察 .....	36
V. 第四章 .....	39
1. 緒言 .....	39

2.	材料および方法 .....	41
2-1.	試薬 .....	41
2-2.	動物実験 .....	41
2-3.	平均肺動脈圧の測定 .....	41
2-4.	形態学的観察 .....	42
2-5.	張力測定法 .....	42
2-6.	統計解析 .....	43
3.	実験結果 .....	44
3-1.	Omentin 長期間投与の MCT による肺高血圧に及ぼす影響 .....	44
3-2.	Omentin の MCT による右心肥大に及ぼす影響 .....	44
3-3.	Omentin の MCT による肺内肺動脈壁リモデリングに及ぼす 影響 .....	45
3-4.	Omentin の MCT による肺内肺動脈の弛緩反応障害に及ぼす 影響 .....	45
4.	考察 .....	47
VI.	総括 .....	50
VII.	謝辞 .....	56
VIII.	引用文献 .....	57
Table	.....	71
Figs	.....	72

## I. 緒論

高血圧症の患者数は世界中で増加の一途を辿り、今や 25 歳以上の 3 人に 1 人が高血圧症であると推測される(世界保健機関 2013 年)。内臓脂肪の蓄積を伴う肥満症患者では、交感神経活性やインスリン抵抗性が亢進することで高血圧が発症・進展することが知られているが、その病態機序の全体像は解明されていない。これまで脂肪組織は単にエネルギーを蓄える貯蔵庫のようなものと考えられていた。しかし近年、様々な生理活性物質(アディポサイトカイン)を分泌することが認識されるようになり、特に肥満により肥大化した内臓脂肪組織において、アディポサイトカインの分泌は増減する。アディポサイトカインは肥満により誘発される心血管疾患を促進する悪玉と、抑制する善玉に分類される。すなわち、肥満により血中アディポサイトカインのバランス(善玉 vs. 悪玉)は不均衡となり、高血圧症のみならず 2 型糖尿病、脂質代謝異常症などアテローム性動脈硬化症のリスクとなる疾患の発症リスクが高まると考えられている。現在、悪玉としては tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin-6, leptin などが知られているが、善玉としては唯一 adiponectin が同定されている(79, 80)。

Omentin は 2005 年に大網脂肪組織の cDNA ライブラリー解析により同定された、313 個のアミノ酸から成る比較的新規のアディポサイトカインである(53, 84)。Omentin は主に健

常体の内臓脂肪組織中に多く発現しているが、別の組織でも低いレベルではあるが発現していることが確認されており、腸パネート細胞に発現するインテレクチン(23, 66)、新生児小腸上皮細胞に発現するラクトフェリン受容体(62)、血管内皮細胞に発現する内皮レクチン(29)とも呼ばれている。血中 omentin 濃度は高血圧を伴う肥満症患者で低下しているが、体重減少に伴い血中 omentin 濃度は上昇し血圧は低下する(37, 51)。また、その有病率が肥満症と正の相関性がある睡眠時無呼吸症候群の患者においても、血中 omentin 濃度は低下する(73)。さらに、胃の部分切除術を行った肥満症患者において、血中 omentin 濃度の低下が術後の心疾患発症リスクを高めるという報告もある(27)。そして、2型糖尿病患者において血中 omentin 濃度が低下していることから、omentin が2型糖尿病の病態に関わることも推察される(85)。また、血中 omentin 濃度はアテローム性動脈硬化症を合併している内臓肥満症患者において低下している(33)。このように疫学調査において、内臓肥満による血中 omentin 濃度の低下が高血圧症、2型糖尿病やアテローム性動脈硬化症などの発症率の増加と相関するという報告は非常に多い。よって omentin は、単なる肥満から高血圧症、2型糖尿病を合併した肥満症移行への鍵を握る、重要なアディポサイトカインであると推察される。発見当初の *in vitro* の研究では、omentin がヒト脂肪細胞においてプロテインキナーゼ Akt のリン酸化を介して、インスリンによるグルコースの取り込みを促進することが報告されていた(84)。当研究室では特に肥満による高血圧発症・進展の機序に着目



し検討を行ってきた。その結果、omentin がラット摘出血管組織において nitric oxide (NO)産生を介して弛緩反応を誘導すること(83)、また培養血管内皮細胞において NO 産生を介して TNF- $\alpha$ による炎症性反応を抑制することを明らかにしてきた(81)。しかし、それ以外の omentin の病態生理的役割に関する基礎的な検討は全くなされてこなかった。これらの背景から、本研究では『omentin が肥満による高血圧症の病態に抑制的に働くのではないか』との仮説を立て、特に血管系に焦点を当てて研究を行った。

高血圧の発症・進展に関わる血管病態プロセスとして、血管反応性(収縮・弛緩機能)の障害、血管内皮及び平滑筋の炎症性反応の亢進、血管平滑筋の増殖・遊走を介した血管壁リモデリングが非常に重要である。血管平滑筋における TNF- $\alpha$ による活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)産生を介した炎症性反応の亢進は、高血圧症やアテローム性動脈硬化症の進展に重要な役割を担っている(7, 32, 36, 48)。本研究では初めに、培養血管平滑筋細胞(smooth muscle cells; SMCs)における omentin の TNF- $\alpha$ による炎症性反応に及ぼす影響を検討した(第一章)。また、血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor; PDGF)-BB による ROS 産生を介した SMCs 増殖・遊走は高血圧症の進展に重要な役割を担っている(3, 28)。そこで次に、PDGF-BB による SMCs 増殖・遊走に及ぼす omentin の影響を検討した(第二章)。さらに本研究では in vivo の実験により omentin のラット血圧に及ぼす影響(急性・長期間)を検討した。まず、omentin 急性静脈内投与が血管作動性

物質による昇圧作用に及ぼす影響をラットで検討した(第三章)。そして最後に、**omentin** 長期間投与の影響を検討するため、**monocrotaline** 誘発肺高血圧モデルラットを用いて検討を行った(第四章)。

結論として **omentin** は肥満による高血圧症の病態に抑制的に働いており、新規高血圧症治療のターゲットと成り得る非常に魅力的な分子であることが示唆された。

## II. 第一章

### 1. 緒言

血中 omentin 濃度は内臓肥満症患者で減少し、反対に体重減少後に増加する(9)。内臓肥満により高血圧症や動脈硬化症などの血管系疾患の発症率が増加する(16)。高血圧症の初期病変は血管内皮細胞及び SMCs の炎症性反応である。炎症性反応の亢進は血管障害を誘導し、血管機能(収縮・弛緩機能)の障害や血管壁リモデリングを介して高血圧症を引き起こす。当研究室ではこれまでに、omentin が培養血管内皮細胞において NO 産生を介して炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  による cyclooxygenase (COX)-2 の発現誘導を抑制することを明らかにしてきた(81)。しかしながら、omentin の血管 SMCs における炎症性反応に及ぼす影響は明らかにされていない。そこで第一章では、それを明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 試薬

Recombinant human omentin (BioVendor, Candler, NC, USA); TNF- $\alpha$  (Roche Applied Science, Mannheim, Germany); SB203580 (Calbiochem, San Diego, CA, USA); SP600125 (Jena Bioscience, Jena, Germany); N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### 2-2. 一次抗体

Inducible NO synthase (iNOS) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), phospho-nuclear factor (NF)- $\kappa$ B p65 (Ser 536), phospho-p38 (Thr180/Tyr182), phospho-c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Thr183/Tyr185), total-JNK, phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK), phospho-Akt (Ser473) and total-Akt (Cell Signaling, Beverly, MA, USA); total-NF- $\kappa$ B p65, total-p38, total-ERK, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 and COX-2 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA);  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -actin) (DAKO, Glostrup, Denmark).

### 2-3. 二次抗体

Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody, anti-mouse IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK); anti-goat IgG horseradish peroxidase linked whole antibody

(Sigma-Aldrich).

#### 2-4. ラット腸間膜動脈由来 SMCs の単離と培養

雄性 Wistar rat (0.2-0.4 kg, CLEA Japan, Tokyo, Japan) にウレタン (1.5 g/kg, i.p.) で深麻酔をかけ放血により安楽死させた後に、無菌的に前腸間膜動脈の主部を摘出した。滅菌 Tris-buffered saline (TBS) 中で外膜周囲脂肪及び結合組織を剥離した後に、ピンセットの平らな面で血管内腔を軽く擦り、内皮細胞を剥離した。SMCs は explant 法で単離し、10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中で培養し継代 (passage 3-23 を使用) した (71)。単離した細胞は抗  $\alpha$ -actin 抗体を用いた免疫蛍光染色法により SMCs であることを確認した。細胞密度が 80-90% になった SMCs を 0.5% FBS を添加した DMEM 中で 6-24 時間、血清飢餓状態にした後に薬物処置を行った。なお、動物の取り扱いについては '北里大学における動物実験と動物の飼育及び保管等に関する規定' に従い適切に行った。

#### 2-5. SMCs の形態観察

SMCs の形態は位相差顕微鏡 (CKX31, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察し、デジタルカメラ (SP-350, Olympus) で写真を撮影した。

#### 2-6. ラット摘出動脈標本

雄性 Wistar rat (0.2-0.4 kg) にウレタン(1.5 g/kg, i.p.) で深麻酔をかけ放血により安楽死させた後に胸部大動脈を摘出した(40)。滅菌 TBS 中で外膜周囲脂肪及び結合組織を剥離した後に、ピンセットの平らな面で血管内腔を軽く擦り、内皮細胞を剥離した。摘出胸部大動脈標本を 37°C で 30 分間無血清の DMEM 中で安定化させた後に、omentin (300 ng/ml)を 30 分前処置し、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)で 24 時間刺激した。標本を急速凍結した後、タンパク質サンプルの抽出に用いた。

#### 2-7. ウェスタンブロット法

SMCs または摘出動脈組織標本に Triton-based lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerol phosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ g/ml leupeptin and 0.1% protease inhibitor mixture; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を処置し可溶化した後に遠心分離し(13000 rpm, 4°C)、細胞タンパク質サンプルを得た(38, 46)。サンプル中のタンパク質濃度は bicinchoninic acid (BCA) 法(Pierce, Rockford, IL, USA)を用いて定量した。等量のタンパク質(7-15  $\mu$ g)を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 7.5%)で分離した(80-120 V, 1.5-2 時間)後、ニトロセルロース膜(Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA)に転写した(400 mA, 1.5 時間)。転写膜を 3%ウシ血清アルブミン(抗リン酸化抗体を用いる場合)または 0.5%スキムミルク(その他)でブロッキングした後、一次抗体(1:500 希釈)を 4°C で一晩反応させた。

転写膜に結合した一次抗体はペルオキシダーゼ標識二次抗体 (1:10,000 希釈、1 時間) と EZ-ECL system (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) を用いて可視化した。可視化したバンドは CS Analyzer 3.0 software (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて定量・解析した。タンパク質が等量泳動されていたことは抗  $\alpha$ -actin 抗体または抗 total 抗体で発現量を調べることにより確認した。

#### 2-8. Lucigenin assay

SMCs に omentin (300 ng/ml) を 30 分間前処置し TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 1 時間刺激した後に、タンパク質を抽出し、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) の活性化を lucigenin assay で測定した(46)。Lucigenin (10  $\mu$ M, Alexis, San Diego, CA, USA) と NADPH (500  $\mu$ M, Wako, Osaka, Japan) をタンパク質サンプル (10-15  $\mu$ g) に加えて lysis buffer で全量を 200  $\mu$ l に調節し混和・反応させた後、TriStar LB941 luminometer (Berthold, Bad, Wildbad, Germany) を用いて発光量 (NOX 活性) を 30 分間連続して測定した。結果は 10 秒ごとに算出した relative light units per second (RLU/s) で表し、最大 RLU/s 値を比較した。

#### 2-9. 単球接着能の測定

SMCs に omentin (300 ng/ml) を 30 分間前処置し TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 24 時間刺激した後に、37°C に加温した滅菌 TBS で洗浄し、5% FBS 添加 RPMI1640 培地 (Sigma Aldrich) で培養

した単球 U937 細胞 (RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan) を加えた (37°C, 1 時間) (69)。その後 37°C に加温した滅菌 TBS で洗浄し、4% paraformaldehyde (37°C, 10 分間, Wako) で固定した後、位相差顕微鏡 (CKX31) を用いて SMCs に付着した U937 細胞の数を計測した (100 倍, 3 視野)。

## 2-10. 統計解析

データは平均値 ± 標準誤差で示した。また、統計評価は分散分析 (one-way analysis of variance; ANOVA) した後、多重比較として全ての 2 群同士の比較 (Tukey のテスト) を行った。また、危険率 (p 値) 5% 未満 ( $p < 0.05$ ) を有意差有りと判断した。



### 3. 実験結果

#### 3-1. Omentin 単独処置の SMCs 形態に及ぼす影響

最初に omentin 単独処置が SMCs の形態に及ぼす影響を検討した。Omentin (50-300 ng/ml, 24 時間)単独処置は SMCs の形態に影響を及ぼさなかった(図 1, n=4)。

#### 3-2. Omentin 単独処置の炎症性シグナル因子の活性化及び炎症性タンパク質発現に及ぼす影響

次に omentin 単独処置が炎症性シグナル因子の活性化に及ぼす影響を検討した。Omentin (50-300 ng/ml, 20 分間)単独処置は NF- $\kappa$ B p65 (図 2A, n=3-6)、p38 (図 2A, n=4-8)及び JNK (図 2A, n=3-6)のリン酸化に影響を及ぼさなかった。また、omentin (50-300 ng/ml, 24 時間)単独処置は VCAM-1 (図 2B, n=3-6)、COX-2 (図 2B, n=3-6)及び iNOS (図 2B, n=3-6)発現に影響を及ぼさなかった。

#### 3-3. Omentin の TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導に及ぼす影響

次に omentin の TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導に及ぼす影響を検討した。Omentin (50-300 ng/ml, 30 分間)前処置は TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 24 時間)による VCAM-1 発現誘導を有意に抑制した(TNF- $\alpha$ ;  $5.6 \pm 0.4$ -fold relative to cont, n=8 vs. +omentin

(50 ng/ml);  $3.5 \pm 0.6$ -fold relative to cont,  $n=5$ ,  $p<0.05$ , +omentin (100 ng/ml);  $2.8 \pm 0.5$ -fold,  $n=5$ ,  $p<0.01$ , +omentin (300 ng/ml);  $2.6 \pm 0.5$ -fold,  $n=7$ ,  $p<0.01$ , 図 3)。

#### 3-4. Omentin の TNF- $\alpha$ による炎症性シグナル因子活性化に及ぼす影響

次に omentin による VCAM-1 発現誘導抑制の上流に存在するシグナル経路を検討した。Omentin (300 ng/ml, 30 分間) 前処置は TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 20 分間)による p38 (TNF- $\alpha$ ;  $9.6 \pm 0.3$ -fold,  $n=4$  vs. +omentin (300 ng/ml);  $4.7 \pm 1.5$ -fold,  $n=6$ ,  $p<0.05$ , 図 4A) 及び JNK (TNF- $\alpha$ ;  $3.3 \pm 0.5$ -fold,  $n=6$  vs. +omentin (300 ng/ml);  $1.5 \pm 0.3$ -fold,  $n=9$ ,  $p<0.01$ , 図 4B) のリン酸化を有意に抑制した。一方で omentin (50-300 ng/ml, 30 分間)前処置は ERK (図 5A,  $n=3-5$ )、Akt (図 5B,  $n=3-5$ )及び NF- $\kappa$ B p65 (図 5C,  $n=3-5$ )のリン酸化には影響を及ぼさなかった。

#### 3-5. TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導に及ぼす p38 または JNK 阻害薬の影響

TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導が p38 及び JNK の活性化を介するかを確かめるため、p38 阻害薬 SB203580 (10  $\mu$ M, 30 分間)または JNK 阻害薬 SP600125 (10  $\mu$ M, 30 分間)前処置の TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 24 時間)による VCAM-1 発現誘導に及ぼす影

響を検討した。SB203580 及び SP600125 は TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導を有意に抑制した (TNF- $\alpha$ ;  $3.2 \pm 0.3$ -fold vs. +SB203580;  $2.6 \pm 0.2$ -fold, n=11, p<0.05, 図 6A: TNF- $\alpha$ ;  $4.7 \pm 0.4$ -fold vs. +SP600125;  $2.8 \pm 0.7$ -fold, n=5, p<0.05, 図 6B)。

### 3-6. Omentin の TNF- $\alpha$ による NOX 活性化に及ぼす影響

炎症性反応誘導の主要な経路の一つに ROS 産生がある (7, 47, 65)。また NOX の活性化は SMCs における ROS 産生の主要な機序である (8, 59)。そこで omentin の TNF- $\alpha$ による NOX 活性化に及ぼす影響を lucigenin assay により検討した。Omentin (300 ng/ml, 30 分間)前処置は TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 1 時間)による NOX の活性化を有意に抑制した (TNF- $\alpha$ ;  $1.8 \pm 0.2$ -fold vs. +omentin (300 ng/ml);  $1.2 \pm 0.2$ -fold, n=6, p<0.05, 図 7)。

### 3-7. 抗酸化薬の TNF- $\alpha$ による p38 及び JNK 活性化に及ぼす影響

TNF- $\alpha$ による ROS 産生が p38 及び JNK の活性化を誘導するかを確認するために、抗酸化薬 NAC (20 mM, 30 分間)前処置の TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 20 分間)による p38 及び JNK のリン酸化に及ぼす影響を検討した。NAC は TNF- $\alpha$ による p38 (TNF- $\alpha$ ;  $3.4 \pm 0.6$ -fold vs. +NAC;  $1.4 \pm 0.2$ -fold, p<0.05, n=6, 図 8A)及び JNK (TNF- $\alpha$ ;  $3.0 \pm 0.4$ -fold vs. +NAC;  $1.7 \pm 0.3$ -fold, n=8, p<0.05, 図 8B)のリン酸化を有意に抑制した。

### 3-8. Omentin の TNF- $\alpha$ による単球接着誘導に及ぼす影響

Omentin が TNF- $\alpha$ による単球(U937 細胞)接着誘導に及ぼす影響を検討した。Omentin (300 ng/ml, 30 分間)前処置は TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 24 時間)による単球接着誘導を有意に抑制した ( $0.6 \pm 0.1$ -fold relative to TNF- $\alpha$ , n=8,  $p < 0.01$ , 図 9)。

### 3-9. ラット摘出胸部大動脈における omentin の TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導に及ぼす影響

最後に、omentin の組織レベルでの作用を確かめるために、ラット摘出胸部大動脈標本において omentin の TNF- $\alpha$ による VCAM-1 発現誘導に及ぼす影響を検討した。内皮を剥離した胸部大動脈標本において omentin (300 ng/ml, 30 分間)前処置は TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 24 時間)による VCAM-1 発現誘導を有意に抑制した (TNF- $\alpha$ ;  $1.8 \pm 0.1$ -fold vs. +omentin (300 ng/ml);  $1.5 \pm 0.1$ -fold, n=9,  $p < 0.05$ , 図 10)。

#### 4. 考察

第一章では、アディポサイトカイン omentin の血管 SMCs における炎症性反応に及ぼす影響を検討した。最初に omentin 単独処置は SMCs の形態に影響を及ぼさないこと(図 1)、さらに炎症性シグナル因子を活性化せず炎症性タンパク質の発現も誘導しないことを明らかにした(図 2)。これらの結果から、omentin は SMCs において催炎症作用を示さないことが示唆された。一方で omentin は TNF- $\alpha$  による p38 及び JNK のリン酸化を抑制し(図 4)、その下流にある VCAM-1 の発現誘導を抑制した(図 3)結果、SMCs に対する単球接着誘導を抑制すること(図 9)を示した。これらの結果から omentin は SMCs において抗炎症作用を有することが示唆された(図 11)。さらに、摘出動脈組織においても omentin は TNF- $\alpha$  による VCAM-1 発現誘導を抑制した。Omentin が TNF- $\alpha$  による NOX の活性化すなわち O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生を抑制したことから、omentin の抗炎症作用は抗酸化作用を介すると考えられる。

高血圧症やアテローム性動脈硬化症の初期病変は血管の炎症性変化であり(32, 45, 48)、TNF- $\alpha$  による ROS 産生を介した炎症性反応の亢進は高血圧の発症・進展に重要な役割を担っている(7, 47, 65)。また SMCs において TNF- $\alpha$  による ROS 産生の主たる経路は NOX の活性化である(8, 59)。本章では、omentin が TNF- $\alpha$  による NOX の活性化を抑制することを明らかにした。血管 SMCs には NOX アイソフォームとして NOX-1, NOX-2 (gp91<sup>phox</sup>), NOX-4 が存在することが報告されている

(15, 26, 59)。今後、omentin がどの NOX アイソフォームを抑制するのかを検討する必要がある。また NOX は p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, rac1/2, p22<sup>phox</sup> など複数のタンパク質サブユニットからなる複合体を形成することにより活性化するため(8, 31, 67)、omentin が具体的にどのサブユニットに作用するかについても検討する必要がある。

Omentin の受容体はこれまでに単離されていない。一方で、同じアディポサイトカインである adiponectin と chemerin に対する受容体は同定されている。Adiponectin の受容体は主に骨格筋に発現する AdipoR1 と肝臓に発現する AdipoR2 が知られており、これらは共に 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体である(78)。加えて最近の研究では T-cadherin が adiponectin の受容体としてアテローム性動脈硬化症の抑制に関与している可能性があるという報告がなされた(63)。一方、chemerin の受容体としてはマクロファージ、樹状細胞、内皮細胞などに発現する ChemR23 (chemokine-like receptor; CMKLR1) と造血細胞に発現する chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2) が知られており、共に 7 回膜貫通型受容体である(86)。これらの報告から、同じアディポサイトカインの一つである omentin に対しても 7 回膜貫通型受容体が存在する可能性がある。また、チロシンキナーゼや T-cadherin などの細胞内シグナル伝達を調節する因子を介して作用することも考えられる。今後 omentin 受容体を同定し、その機能を解析することは非常に興味深い研究課題である。

当研究室では過去に、omentin が摘出血管組織の内皮細

胞から NO 産生を介して弛緩反応を誘導すること(83)、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞において AMP-activated protein kinase (AMPK)/endothelial NOS (eNOS)経路を活性化し抗炎症作用を示すこと(81)を報告している。また、血中 omentin 濃度は肥満症で減少すること(9)、ヒト脂肪細胞においてインスリン感受性を増強すること(84)などが報告されている。これらに加えて、本研究では omentin が SMCs において抗炎症作用を有することを初めて明らかにした。Adiponectin は培養血管内皮細胞において AMPK/eNOS 経路を活性化すること(10)、SMCs において抗炎症作用を有すること(2, 39, 58)、肥満症により血中濃度が減少すること(6)、そして adiponectin と受容体の発現増加がインスリン感受性を増強させること(6)などが報告されている。これら adiponectin の作用は omentin による作用との類似点が多いことから、omentin も adiponectin と同様に善玉アディポサイトカインの1つである可能性が非常に高いと考えられる。

結論として、本章では初めて omentin が血管 SMCs において TNF- $\alpha$ による ROS 産生を抑制することにより、その下流にある p38 及び JNK のリン酸化を抑制し、VCAM-1 発現誘導を阻害した結果、単球接着誘導を抑制することを明らかにした。

### III. 第二章

#### 1. 緒言

高血圧の発症・進展に関わる血管病態プロセスとして、血管反応性(収縮・弛緩機能)の障害と、血管内皮及び平滑筋の炎症性反応の亢進に加えて、血管平滑筋の増殖・遊走を介した血管壁リモデリングが重要である。当研究室ではこれまでに、*omentin* がラット摘出血管組織において内皮由来 NO 産生を介して弛緩反応を誘導すること(83)、また培養血管内皮細胞において NO 産生を介して TNF- $\alpha$ による炎症性反応を抑制することを明らかにしてきた(81)。さらに第一章では、*omentin* が血管 SMCs において抗酸化作用により TNF- $\alpha$ による炎症性反応を抑制することを明らかにした(22)。しかしながら、*omentin* の血管 SMCs 増殖・遊走を介した血管壁リモデリングに及ぼす影響は検討されていない。そこで第二章ではそれを明らかにすることを目的とした。



## 2. 材料および方法

### 2-1. 試薬

Recombinant human omentin (BioVendor); murine PDGF-BB (PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ); DMEM, NADPH (Wako); lucigenin (Alexsis); gp91ds-tat (Anaspec, Fremont, CA).

### 2-2. 一次抗体

Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), phospho-Akt (Ser473), phospho-ERK (Thr202/Tyr204), phospho-PDGF- $\beta$  receptor (Tyr751), total PDGF- $\beta$  receptor, total Akt (Cell signaling); total p38, total ERK (Santa Cruz Biotech); phospho-heat shock protein (HSP)27 (Ser15) (Enzo Life Science, Plymouth Meeting, PA);  $\alpha$ -smooth muscle actin (DAKO).

### 2-3. 二次抗体

Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody, anti-mouse IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (Amersham Biosciences).

### 2-4. ラット腸間膜動脈由来 SMCs の単離と培養

第一章、2. 材料及び方法、2-4. ラット腸間膜動脈由来 SMCs の単離と培養の項を参照(71)。なお本章の実験では細胞密度が 80-90% になった SMCs を 0.5% FBS 添加または無血清の

DMEM 中で 6-24 時間、血清飢餓状態にした後に薬物処置を行った。

#### 2-5. 細胞増殖能測定

SMCs 増殖能の測定は cell proliferation kit II (XTT assay, Biological industries) 試薬を用いて比色法により行った(24)。細胞密度が 30-50%になるように継代した SMCs を 0.5% FBS を添加した DMEM 中で 2 時間、血清飢餓状態にした後に薬物処置を行った。Omentin (50-300 ng/ml) 単独処置または 24 時間前処置した後に PDGF-BB (20 ng/ml) で 24 時間刺激した。細胞を TBS で洗浄し、XTT 試薬 (100  $\mu$ l/1 ml 培地) と activator (2  $\mu$ l/1 ml 培地) を加え 37°C で 2 時間インキュベートした後に、マイクロプレートリーダー (Berthold Technologies) を用いて吸光度 (485 nm) を測定した。

#### 2-6. Boyden chamber assay

前処置としてポリカーボネート膜 (Costar, Cambridge, MA, USA) を 2%ゼラチン溶液 (Wako) で 30 分間コーティングした (37 °C)。Lower chamber には無血清の DMEM を 600  $\mu$ l 加えた。Upper chamber には  $5 \times 10^5$  個の SMCs を 100  $\mu$ l の無血清 DMEM 中に懸濁して撒いた (68)。Lower chamber に omentin (50-300 ng/ml) を 2 時間前処置した後 PDGF-BB (10 ng/ml) で 6 時間刺激した。ポリカーボネート膜を通過し遊走した SMCs を室温で 15 分間メタノール固定し、ギムザ染色 (Nacalai Tesque) を行った。ポリカーボネート膜を通過しなかった

SMCs を綿棒で除去した後、位相差顕微鏡 (CKX31) にとりつけた CCD カメラ (BMS, Tokyo, Japan) で遊走した細胞を撮影、計測した (100 倍, 3 視野)。

#### 2-7. ウェスタンブロット法

第一章 2. 材料及び方法、2-7. ウェスタンブロット法の項を参照 (38, 46)。

#### 2-8. Lucigenin assay

第一章 2. 材料及び方法、2-8. Lucigenin assay の項を参照 (46)。なお本章の実験では lucigenin (5  $\mu$ M) と NADPH (1 mM) をタンパク質サンプル (30  $\mu$ g) に加えて lysis buffer で全量を 200  $\mu$ l に調節し混和・反応させた。

#### 2-9. Ex vivo out-growth assay

雄性 Wistar rat (0.2-0.4 kg, CLEA Japam) にウレタン (1.5 g/kg, i.p.) で深麻酔をかけ放血により安楽死させた後に、無菌的に前腸間膜動脈の主部を摘出した (40)。滅菌 TBS 中で外膜周囲脂肪及び結合組織を剥離した後に、ピンセットの平らな面で血管内腔を軽く擦り、内皮細胞を剥離した。摘出前腸間膜動脈を 12-well 細胞プレート中でコラーゲンゲル (Nitta-zelatin, Osaka, Japan) 上に静置した (68)。30 分間無血清の DMEM 中で安定化させた後に、omentin (300 ng/ml) を 24 時間前処置し、10% FBS で 4 日間刺激した。位相差顕微鏡 (BKX-51, OLYMPUS) を用いて遊走・増殖した SMCs を観察し

た。

#### 2-10. マウス頸動脈結紮(ligation)モデル

雄性 BALB/c マウス(20-30 g, CLEA Japan)にペントバルビタール(50 mg/kg, i.p.)で麻酔をかけ、背位に固定し頸部中央を切開した。左右の総頸動脈を分離して左頸動脈の分岐部付近を絹糸で結紮した(ligation) (68)。右頸動脈は結紮せずに sham control とした。結紮後、omentin (5 µg/mouse; + Omentin) または溶媒の生理食塩水(50 µl/mouse)を生体吸収性ハイドロゲル Medgel PI 9 (5 mg/mouse; MedGEL Corporation, Tokyo, Japan)に浸透させ結紮部位に留置した(25)。4週間後マウスにウレタン (1.5 g/kg, i.p.)で深麻酔をかけ放血により安楽死させた後に、左右の頸動脈を摘出し外膜周囲脂肪及び結合組織を剥離した。摘出した頸動脈標本は Hematoxylin and eosin (H&E)染色に使用した。

#### 2-11. 形態学的観察

摘出した頸動脈標本を 4% paraformaldehyde (4°C, Wako)で一晩固定した後パラフィンで包埋した。薄切切片(4 µm)を H&E 染色した後、光学顕微鏡(BX-51)を用いて観察し、デジタルカメラ(MicroPublisher 5.0, QImaging, Surrey, Canada)で写真を撮影した。新生血管内膜/中膜比は Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA)を用いて計測した。

#### 2-12. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。3群以上の統計評価は分散分析(ANOVA)した後に、多重比較として全ての2群同士の比較(図 12-17; Bonferroni のテスト)を行った。一方、2群間の統計評価は Student の t テストを行った(図 18)。危険率(p 値) 5%未満( $p < 0.05$ )を有意差有りと判断した。

### 3. 実験結果

#### 3-1. Omentin 単独又は前処置の SMCs 増殖に及ぼす影響

最初に omentin 単独処置及び前処置が SMCs 増殖に及ぼす影響を XTT assay を用いて検討した。Omentin (50-300 ng/ml, 24 時間) 単独処置は SMCs 増殖に影響を及ぼさなかった (n=6-12, 図 12A)。Omentin 前処置 (50-300 ng/ml, 24 時間) も PDGF-BB (20 ng/ml, 24 時間) による SMCs 増殖に影響を及ぼさなかった (n=6-12, 図 12B)。

#### 3-2. Omentin の PDGF-BB による SMCs 遊走に及ぼす影響

次に、omentin の PDGF-BB による SMCs 遊走に及ぼす影響を Boyden chamber assay を用いて検討した。Omentin (50-300 ng/ml, 2 時間) 前処置は PDGF-BB (10 ng/ml, 6 時間) による SMCs 遊走を有意に抑制した (+omentin (100 ng/ml);  $0.24 \pm 0.07$ -fold relative to PDGF,  $p < 0.01$ , +omentin (300 ng/ml);  $0.08 \pm 0.02$ -fold,  $n=4$ ,  $p < 0.01$ , 図 13AB)

#### 3-3. Omentin の PDGF-BB による SMCs 遊走に関わるシグナル因子の活性化に及ぼす影響

p38 及び HSP27 シグナルの活性化は SMCs 遊走に関わることが報告されている (17)。よって、omentin が PDGF-BB に

よる p38 及び HSP27 の活性化に及ぼす影響をウェスタンブロット法により検討した。Omentin (300 ng/ml, 2 時間)前処置は PDGF-BB (10 ng/ml, 30 分間)による p38 (+ omentin;  $0.80 \pm 0.05$ -fold relative to PDGF, n=19-23,  $p < 0.01$ , 図 14A)及び HSP27 (+ omentin;  $0.79 \pm 0.05$ -fold relative to PDGF, n=14-17,  $p < 0.01$ , 図 14B)のリン酸化を有意に抑制した。一方で omentin (300 ng/ml, 2 時間)前処置は PDGF-BB (10 ng/ml, 30 分間)による Akt (n=4, 図 14C), ERK (n=4, 図 14D)及び PDGF- $\beta$ 受容体 (n=6, 図 14E)のリン酸化には影響を及ぼさなかった。

#### 3-4. Omentin の PDGF-BB による NOX 活性化に及ぼす影響

NOX の活性化を介した ROS ( $O_2^-$ )産生は SMCs 遊走の主要な機序の 1 つである (30, 54, 75)。よって、omentin の PDGF-BB による NOX の活性化に及ぼす影響を lucigenin assay により検討した。Omentin (300 ng/ml, 2 時間)前処置は PDGF-BB (10 ng/ml, 30 分間)による NOX の活性化を有意に抑制した (+ omentin;  $0.89 \pm 0.04$ -fold relative to PDGF, n=6,  $p < 0.05$ , 図 15)。さらに、選択的 NOX 阻害薬 gp91ds-tat (1  $\mu$ M, 2 時間)が PDGF-BB (10 ng/ml, 30 分間)による p38 のリン酸化を抑制することを確認した (+ omentin;  $0.70 \pm 0.05$ -fold relative to PDGF, n=10,  $p < 0.05$ , 図 16)。

#### 3-5. ラット摘出腸間膜動脈における omentin の FBS による SMCs out-growth に及ぼす影響

Omentin の組織レベルでの作用を検討するため、ラット摘出腸間膜動脈における FBS による SMCs out-growth に及ぼす影響を検討した。Omentin (300 ng/ml, 24 時間)前処置は FBS (5%, 4 日間)による SMCs out-growth を有意に抑制した (+ omentin;  $0.23 \pm 0.15$ -fold relative to FBS, n=6,  $p < 0.05$ , 図 17AB)。

### 3-6. Omentin 長期間投与のマウス頸動脈結紮モデルにおける新生血管内膜形成に及ぼす影響

最後に omentin 長期間投与のマウス頸動脈結紮 (ligation) モデルにおける新生血管内膜形成に及ぼす影響を検討した。Omentin は ligation による新生血管内膜/中膜比の増加を有意に抑制した (ligation;  $1.84 \pm 0.53$  vs. ligation + omentin;  $0.19 \pm 0.13$ , n=5-6,  $p < 0.01$ , 図 18AB)。



#### 4. 考察

第二章では、omentin の血管 SMCs 増殖・遊走を介した血管壁リモデリングに及ぼす影響を検討した。Omentin 単独処置は SMCs 増殖に影響を及ぼさず(図 12A)、omentin 前処置も PDGF-BB による SMCs 増殖に影響を及ぼさなかった(図 12B)。一方で omentin は PDGF-BB による NOX 活性化の阻害(図 15, 16)を介して p38/HSP27 シグナルの活性化を抑制することで(図 14AB)、SMCs 遊走を抑制した(図 13)。Omentin が *ex vivo* においては SMCs out-growth (図 17)を、*in vivo* においては頸動脈結紮による新生血管内膜形成を抑制することも明らかにした(図 18)。これらの結果から、omentin は SMCs 遊走を介した血管壁リモデリングを抑制することが明らかになった(図 19)。

血管 SMCs における炎症性反応の亢進は遊走とともに新生血管内膜形成に重要な役割を担っている(55)。さらに SMCs 炎症性反応及び増殖と遊走の亢進が頸動脈結紮による血管壁リモデリングの主たる要因であるという報告がある(52)。第一章では omentin が SMCs において抗炎症作用を有することを明らかにした。よって omentin のマウス頸動脈結紮モデルにおける新生血管内膜形成の抑制機序には、SMCs 遊走の抑制作用のみならず抗炎症性作用も関わりと考えられる。また第一章では、omentin の抗炎症作用の機序は TNF- $\alpha$  による NOX 活性化を抑制する抗酸化作用であることを明らかにした(図 7)。さらに本章では SMCs 遊走抑制作用の機序が PDGF-BB に

よる NOX 活性化を抑制する抗酸化作用であることを明らかにした。これらの結果から omentin は受容体(TNF 受容体と PDGF 受容体)の下流に存在する共通経路に作用することで抗酸化作用を示すと考えられる。Omentin が PDGF- $\beta$ 受容体の活性化には直接影響を及ぼさなかったこと(図 14E)は、この仮説を支持するものである。

PDGF-BB は protein kinase C (PKC)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)経路を介して NOX タンパク質の構成サブユニットである p47<sup>phox</sup> を活性化することで NOX を活性化することが報告されている(57)。よって、omentin は PDGF-BB による PKC/PI3K/p47<sup>phox</sup> 経路を阻害することで NOX 活性化を抑制する可能性が考えられる。血管 SMCs には NOX-1, NOX-2 (gp91<sup>phox</sup>), NOX-4 の 3 つのアイソフォームが存在する(15, 26, 60)。SMCs の遊走を介した新生血管内膜形成には NOX-1 が重要な役割を担うことが報告されている(30, 54, 75)。さらに、本章では NOX-1 阻害薬である gp91ds-tat が PDGF-BB による p38 の活性化を抑制することを示した(図 16)。よって、omentin は NOX-1 由来 O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生を介した p38 及び HSP27 の活性化を阻害することで SMCs 遊走を抑制し、これにより新生血管内膜の形成を抑制することが示唆された。

当研究室では過去に、omentin が摘出血管組織の内皮細胞から NO 産生を介して弛緩反応を誘導すること(83)、培養血管内皮細胞において AMPK/eNOS 経路を活性化し抗炎症作用を示すこと(81)を報告している。また第一章では、omentin が血管 SMCs において TNF- $\alpha$ による O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生を抑制することによ

り、その下流にある p38, JNK/VCAM-1 発現/単球接着誘導を抑制する抗炎症作用を示すことを明らかにした(22)。さらに本章では、omentin が SMCs 遊走と血管壁リモデリングを抑制することを明らかにした。最近、他の研究グループも omentin による心血管保護作用を報告している。例えば、血中 omentin 濃度の減少は 2 型糖尿病患者において左心室拡張機能不全の原因となり、omentin 前処置はラット心筋細胞において収縮機能不全とインスリン抵抗性を改善する(14)。さらに、omentin が Akt/eNOS 経路の活性化を介して血管内皮細胞の分化及び血管新生を誘導するという報告もある(34)。血中 omentin 濃度は肥満症で減少することから、omentin は高血圧症を含む肥満関連の心血管疾患に対し保護的に働く善玉アディポサイトカインであることが示唆される。

結論として、本章では初めて omentin が PDGF-BB による NOX/O<sub>2</sub><sup>-</sup>/p38/HSP27 経路を介した SMCs 遊走を抑制すること、また ex vivo において SMCs out-growth を抑制すること、さらに in vivo においてもマウス頸動脈結紮モデルにおける新生血管内膜形成を抑制することを明らかにした。

## IV. 第三章

### 1. 緒言

高血圧の発症・進展に関わる血管病態プロセスとして、血管反応性(収縮・弛緩機能)の障害、血管内皮及び平滑筋の炎症性反応の亢進、そして血管平滑筋の増殖・遊走を介した血管壁リモデリングが重要である。当研究室ではこれまでに、*omentin*がラット摘出血管組織において内皮由来 NO 産生を介して弛緩反応を誘導すること(83)、また培養血管内皮細胞において NO 産生を介して TNF- $\alpha$ による炎症性反応を抑制することを明らかにしてきた(81)。加えて、第一章では *omentin* が培養血管 SMCs において抗酸化作用により TNF- $\alpha$ による炎症性反応を抑制することを明らかにした(22)。さらに、第二章では *omentin* が抗酸化作用により PDGF-BB による SMCs 遊走を阻害することで血管壁リモデリングを抑制することを明らかにした(21)。これらの結果から *omentin* は高血圧の発症・進展に関わる重要な血管病態プロセスに対して抑制的に働いていることが明らかになった。しかしながら *omentin* の *in vivo* における血圧に及ぼす影響は、現在までのところ全く検討されていない。そこで本章ではまず、*omentin* 急性静脈内投与がラット血圧に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 試薬

Recombinant human omentin (BioVendor); noradrenaline (NA) and angiotensin II (Ang II) (Sigma-Aldrich); dimorpholamine (Eisai Co., Ltd. Tokyo, Japan); N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Dojindo, Kumamoto, Japan).

### 2-2. 生体パラメーター

雄性 Wistar rat (0.13-0.35 kg, Clea Japan Inc)と L-NAME 処置 Wistar rat の生体パラメーターを測定した。体重、心拍数、収縮期血圧 (systolic blood pressure (BP); SBP)、平均血圧 (mean BP; MBP)、拡張期血圧 (diastolic BP; DBP)を Table. 1 に示した。血圧はラットを 38 °C に保温した状態でテイルカフ法により非観血的に測定した (Softron, Tokyo, Japan) (42, 69)。L-NAME (80 mg/kg, 1 日)は水道水に溶かし経口摂取させた。

### 2-3. 観血的血圧測定

雄性 Wistar rat (0.13-0.35 kg)の血圧と心拍数をウレタン (1.5 g/ kg, i.p.)麻酔下で頸動脈カニューレーション法により測定した (43, 82)。左頸動脈を切開してヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテルを挿入し、MLT0670 BP transducer (ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA)に接続した。SBP、MBP、DBP 及び心拍数を ML117 BP Amp (ADInstruments)、

ML825 PowerLab 2/25 (ADInstruments) system と Chart5 software (ADInstruments)を用いて測定・記録した。Omentin (0.06-1.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )または溶媒の生理食塩水を伏在静脈から処置(5分間)した後に、NA (0.02-2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), Ang II (0.01-10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )または dimorpholamine (3 mg/kg)を投与した。アゴニスト投与後の血圧及び心拍数の変化を算出し、グラフで示した。なお、動物の取り扱いについては‘北里大学における動物実験と動物の飼育及び保管等に関する規定’に従い適切に行った。

#### 2-4. 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。3群以上の統計評価は分散分析(ANOVA)した後に、多重比較として全ての2群同士の比較(Bonferroniのテスト; 図24)を行った。一方、2群間の統計評価はStudentのtテスト(Table 1, 図21-23)を行った。危険率(p値)5%未満( $p < 0.05$ )を有意差有りと判断した。

### 3. 実験結果

#### 3-1. Omentin 単独急性静脈内投与の Wistar rat 血圧に及ぼす影響

初めに、omentin 単独急性静脈内投与のラット血圧に及ぼす影響を検討した。Omentin (0.06-18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 単独投与は血圧に影響を及ぼさなかった(図 20,  $n=11$ )。

#### 3-2. Omentin の NA または Ang II よる昇圧作用に及ぼす影響

次に、omentin の Wistar rat におけるアゴニストによる昇圧作用に及ぼす影響を検討した。Omentin (18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) は NA (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) による SBP (Control;  $20.5 \pm 2.0$  mmHg increase vs. Omentin;  $14.3 \pm 1.1$  mmHg increase,  $n=11$ ,  $p<0.05$ , 図 21AB) 及び MBP (Control;  $21.5 \pm 2.0$  mmHg increase vs. Omentin;  $16.7 \pm 1.0$  mmHg increase,  $n=11$ ,  $p<0.05$ , 図 21AC) の上昇を有意に抑制した。さらに omentin は NA (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) による DBP の上昇を抑制する傾向を示した (Control;  $22.2 \pm 2.2$  mmHg increase vs. Omentin;  $16.8 \pm 1.9$  mmHg increase,  $n=11$ , 図 21AD)。また omentin (18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) は Ang II (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) による DBP の上昇を有意に抑制した (Control;  $38.0 \pm 1.7$  mmHg increase,  $n=5$  vs. Omentin;  $30.8 \pm 1.2$  mmHg increase,  $n=5$ ,  $p<0.01$ , 図 22AD)。一方で SBP ( $n=5$ , 図 22AB) 及び MBP ( $n=5$ , 図 22AC) には影響を

及ぼさなかった。また omentin は NA または Ang II 投与による反射性の心拍低下作用を抑制する傾向を示した (n=11, 図 21E; n=5, 22E)。

### 3-3. Omentin の dimorpholamine による昇圧作用に及ぼす影響

Dimorpholamine は延髄の血管運動中枢に働きかけ昇圧を起こすことが知られている。そこで、omentin の Wistar rat における dimorpholamine による昇圧作用に及ぼす影響を検討した。Omentin (18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) は dimorpholamine (3  $\text{mg}/\text{kg}$ ) による DBP の上昇を有意に抑制した (Control;  $19.2 \pm 1.2$  mmHg increase vs. Omentin;  $14.0 \pm 1.5$  mmHg increase, n= 7,  $p < 0.05$ , 図 23AC)。一方で SBP には影響を及ぼさなかった (n=7, 図 23AB)。また omentin は dimorpholamine による反射性の心拍低下作用を抑制する傾向を示した (n=7, 図 23D)。

### 3-4. Omentin の L-NAME 処置 Wistar rat における NA による昇圧作用に及ぼす影響

内皮由来 NO は血管平滑筋を弛緩させることで降圧に関わる重要な生理活性因子の 1 つである。NO 合成酵素阻害薬 L-NAME (80  $\text{mg}/\text{kg}$ , 1 日間) 処置 Wistar rat における omentin の NA による昇圧作用に及ぼす影響を検討した。L-NAME 処置 Wistar rat において omentin (18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) は NA (0.02-2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) に



よる SBP の上昇を抑制しなかった ( $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  NA, Control;  $20.5 \pm 0.6$  mmHg increase,  $n=11$  vs. Omentin;  $11.3 \pm 0.5$  mmHg increase,  $n=16$ , L-NAME;  $33.3 \pm 5.1$  mmHg increase,  $n=5$ , L-NAME + omentin;  $31.2 \pm 7.2$  mmHg increase,  $n=8$ , 図 24)。

#### 4. 考察

第三章では omentin 急性静脈内投与が Wistar rat 血圧に及ぼす影響を検討した。Omentin 単独急性静脈内投与はラット血圧に影響を及ぼさなかった(図 20)。一方で、omentin は NA, Ang II 及び dimorpholamine による昇圧作用を有意に抑制した(図 21-23)。Omentin は NA による SBP 及び MBP の上昇を有意に抑制し、DBP を抑制する傾向を示した(図 21A-D)。一方で、omentin は Ang II または dimorpholamine による DBP の上昇を抑制したが、SBP には影響を及ぼさなかった。これらの結果から omentin は主としてアゴニストによる DBP の上昇を抑制することが明らかになった。DBP はより血管抵抗を反映することから、omentin の降圧作用には少なくとも一部は末梢血管における弛緩作用が関連していることが示唆される。

近年の疫学調査により、血中 omentin 濃度は肥満(310 ng/ml)では痩せ型(370 ng/ml)と比較して減少することが報告されている(9)。また糖尿病を合併している肥満症の女性(119 ng/ml)では糖尿病を合併していない女性(207 ng/ml)と比較して血中 omentin 濃度が減少しているという報告もある(64)。本章で使用した omentin 濃度(18 µg/kg)は、ラット体重 200 g 当たりの血液量が 12 ml であると仮定すると 300 ng/ml に相当する。この omentin 濃度(300 ng/ml)は、過去に当研究室で行った *in vitro* 及び *ex vivo* の実験において使用した omentin 濃度や、ヒトの血中 omentin 濃度と同レベルであり生理的な濃度であると言える。

今回 omentin 急性静脈内投与は Normal Wistar rat において NA による昇圧作用を抑制した(図 21A-D)。一方で、omentin は L-NAME 処置 Wistar rat においては NA による昇圧作用を抑制しなかった(図 24)。これらの結果から、omentin の NA による昇圧作用の抑制機序に少なくとも一部は内皮由来 NO 産生が関与している可能性が考えられる。当研究室では過去に、omentin が培養血管内皮細胞において NO 合成酵素を活性化すること(81)、さらに摘出腸間膜動脈において NO 産生を介して弛緩反応を誘導することを明らかにしている(83)。これらの結果は本章の結果を支持するものである。さらにデータは示していないが、omentin は自然発症高血圧ラットにおいて NA による昇圧作用を抑制しなかった(n=7-8)。自然発症高血圧ラットの動脈血管においては NO による内皮依存性弛緩反応が障害されているという報告があり(42, 69, 70)、これらは omentin の降圧作用の機序が内皮由来 NO 依存性であるという仮説を支持するものである。

現在までのところ、omentin 長期間投与のラット血圧に及ぼす影響は全く検討されていない。当研究室では過去に、omentin が培養血管内皮細胞において抗炎症作用を有することを明らかにしている(81)。さらに第一章では、omentin が培養血管 SMCs においても TNF- $\alpha$  による炎症性反応を抑制することを明らかにし(22)、第二章では omentin が PDGF-BB による SMCs 遊走を抑制することを明らかにした(21)。血管の慢性炎症は血管障害を誘導し、血管機能(収縮・弛緩)の低下や血管壁リモデリングを介して高血圧症を進展させる。また SMCs

遊走も血管壁リモデリングを介して高血圧の発症・進展に関わる(3, 28)。よって omentin 長期間投与は血管を炎症や壁リモデリングから保護することで高血圧の発症・進展を阻害する可能性が考えられ、今後検討する必要がある。

近年、アディポサイトカインは末梢における作用に加えて中枢神経系における作用も注目されている(4, 12)。しかしながら omentin の中枢神経系における作用はこれまで報告されていない。本章では omentin が dimorpholamine による昇圧作用を抑制することを明らかにした(図 23A-C)。Dimorpholamine による昇圧作用の機序として、延髄の血管運動中枢刺激作用と、カテコラミン放出を介した末梢血管刺激作用が報告されている(50)。よって omentin の dimorpholamine による昇圧抑制の機序としては中枢神経系における作用も考えられることから、今後 omentin 中枢投与の血圧に及ぼす影響を検討する必要がある。

結論として、本章では初めて omentin がアゴニストによる昇圧作用を抑制することを明らかにした。この作用機序に少なくとも一部は内皮由来 NO 産生が関与していることが示唆された。

## V. 第四章

### 1. 緒言

高血圧の発症・進展に関わる血管病態プロセスとして、血管反応性(収縮・弛緩機能)の障害、血管内皮及び平滑筋の炎症性反応の亢進、血管平滑筋の増殖・遊走を介した血管壁リモデリングが重要である。当研究室ではこれまでに、*omentin*がラット摘出血管組織において内皮由来 NO 産生を介して弛緩反応を誘導すること(83)、また培養血管内皮細胞において NO 産生を介して TNF- $\alpha$ による炎症性反応を抑制することを明らかにしてきた(81)。加えて、第一章では *omentin*が培養血管 SMCs において抗酸化作用により TNF- $\alpha$ による炎症性反応を抑制することを明らかにした(22)。さらに、第二章では *omentin*が抗酸化作用により PDGF-BB による SMCs 遊走を抑制することを明らかにした(21)。また第三章では、*in vivo*において *omentin*急性静脈内投与がアゴニストによる昇圧作用を抑制することを明らかにした(19)。しかしながら *in vivo*において *omentin*長期間投与の血管病態に及ぼす影響は検討されていない。

肺高血圧症は肺血管抵抗が増加し肺動脈圧が亢進することにより発症し、右心肥大が続発する。多くの場合、予後不良の経過をたどる致死性の疾患である。血管炎症性反応の亢進、血管反応性(収縮・弛緩機能)障害及び血管壁リモデリングなどが肺血管抵抗増大の原因である。現在、肺高血圧症の治療薬として、プロスタサイクリン、エンドセリン受容体

拮抗薬、フォスフォジエステラーゼ-5阻害薬などが併用処置で用いられている(5, 13, 74)。加えて最近、分子標的薬(チロシンキナーゼ阻害薬)イマチニブがPDGFによる血管壁リモデリングを阻害することで肺高血圧を抑制することが報告された(5, 13)。しかしながら、イマチニブの慢性投与はいくつかの副作用を伴うことも報告されている(61)。すなわち、肺高血圧症に対してより有効な治療薬の開発が求められている。第一章から第三章までの結果から、omentinは血管病態形成に抑制的に働くと考えられ肺高血圧症に対しても保護作用を示すことが期待される。そこで本章ではomentin長期間投与の肺高血圧症の病態に及ぼす影響を検討することを目的とした。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 試薬

Recombinant human omentin (BioVendor); monocrotaline (MCT; Wako); acetylcholine (ACh; Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan); NA and sodium nitroprusside (SNP; Sigma-Aldrich).

### 2-2. 動物実験

動物の取り扱いについては‘北里大学における動物実験と動物の飼育及び保管等に関する規定’に従い適切に行った。雄性 Wistar rat (120-150 g, Clea Japan)を無作為に 3 群に分け、control 群 (Control, n=8)、MCT 処置群 (MCT, n=10)、MCT 処置+omentin 投与群 (+Omentin, n=8)とした。Control 群には生理食塩水を単回腹腔内投与し、MCT 処置群には MCT (60 mg/kg)をラットに単回腹腔内投与することで肺高血圧症を誘発した(77)。生理食塩水 (MCT)または recombinant omentin (+Omentin; 18 µg/kg/day)を MCT 処置と同時に 14 日間腹腔内投与した。

### 2-3. 平均肺動脈圧の測定

Omentin を 14 日間投与した後、雄性 Wistar rat (200-260 g)の肺動脈圧をウレタン (1.5 g/kg, i.p.)麻酔下で頸静脈カニューレーション法により測定した(44)。右頸静脈を切開しヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテルを右心経由で挿入して、肺動脈圧を直接測定した。カテーテルは MLT0670 BP

transducer (ADInstruments)に接続した。肺動脈圧は ML117 BP Amp (ADInstruments)、ML825 PowerLab 2/25 (ADInstruments) system と Chart5 software (ADInstruments)を用いて測定・記録した。

#### 2-4. 形態学的観察

肺動脈圧を測定後、深麻酔下で心臓と肺を摘出して形態学的観察に使用した。摘出した心臓は 100% O<sub>2</sub> で酸素化した Krebs-Henseleit (119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 24.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10.0 mM Glucose)溶液内で瀉血後、左心房、右心房、左心室、右心室にそれぞれ分離した。右心室、左心室及び肺の重量を測定後、4% paraformaldehyde で固定しパラフィンで包埋した。薄切切片(4 μm)を H&E 染色した後、光学顕微鏡 (BX-51)を用いて観察し写真を撮影した(MicroPublisher 5.0, QImaging) (21, 44)。右心室心筋細胞の横断面積(μm<sup>2</sup>)は Image J software (NIH)を用いて算出した。血管壁リモデリングは肺内肺動脈(直径 100 μm 以下)の内腔/血管壁面積比(%)を Image J software を用いて算出し評価した。

#### 2-5. 張力測定法

肺内肺動脈(直径 1 mm 以下)の張力測定は正常栄養液中(136.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.5 mM Glucose, 0.001 mM ethylenediaminetetraacetic acid)で行った。等張性高濃度 K<sup>+</sup>液



(72.7 mM)は NaCl と同じ濃度の KCl を置換することにより作成した。これらの栄養液は 37 °C に保ち、95% O<sub>2</sub> と 5% CO<sub>2</sub> の混合ガスを通気して pH を 7.4 に保った。平滑筋の収縮は張カトランスデューサー(Nihon Kohden, Tokyo, Japan)により等尺性に測定し、アンプ (EF601G, Nihon koden) と PowerLab system を用いて記録した(41)。動脈標本は、正常栄養液を満たした容量 3 ml のマグヌス管内で静止張力 0.5 g を負荷し、30 分間静置した。実験は高濃度 K<sup>+</sup>液を繰り返し投与し、収縮張力が一定になった後に開始した。濃度反応曲線は NA (100 nM)による前収縮が安定した後に ACh (1 nM-30 μM)または SNP (100 pM-3 μM)を累積投与することにより求めた。

## 2-6. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。3 群以上の統計評価は分散分析(ANOVA)した後に、多重比較として全ての 2 群同士の比較(Bonferroni のテスト)を行った。危険率(p 値)5%未満 (p<0.05)を有意差有りと判断した。

### 3. 実験結果

#### 3-1. Omentin 長期間投与の MCT による肺高血圧に及ぼす影響

最初に omentin 長期間投与 (18  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , 14 日間) の MCT による Wistar rat 肺高血圧に及ぼす影響を検討した。Omentin は MCT (60  $\text{mg}/\text{kg}$ ) による平均肺動脈圧の上昇 (from  $16.8 \pm 1.9$  to  $27.2 \pm 2.6$   $\text{mmHg}$ ,  $n=9-10$ ,  $p<0.01$ , 図 25) を有意に抑制した (to  $18.7 \pm 1.4$   $\text{mmHg}$ ,  $n=8$ ,  $p<0.05$ , 図 25)。

#### 3-2. Omentin の MCT による右心肥大に及ぼす影響

慢性的な肺高血圧は右心肥大を引き起こす。そこで次に omentin の MCT による右心肥大に及ぼす影響を検討した。Omentin は MCT による右心室重量/左心室重量比の増加 (from  $0.28 \pm 0.01$  to  $0.36 \pm 0.02$   $\text{g}/\text{g}$ ,  $n=8$ ,  $p<0.01$ , 図 26A) を有意に抑制した (to  $0.28 \pm 0.02$   $\text{g}/\text{g}$ ,  $n=8$ ,  $p<0.01$ , 図 26A)。さらに omentin は MCT による肺重量/体重比の増加 (from  $4.3 \pm 0.09$  to  $6.1 \pm 0.18$   $\text{mg}/\text{g}$ ,  $n=8$ ,  $p<0.01$ , 図 26B) も有意に抑制した (to  $5.3 \pm 0.1$   $\text{mg}/\text{g}$ ,  $n=8$ ,  $p<0.01$ , 図 26B)。次に、omentin の MCT による右心室心筋細胞の肥大に及ぼす影響を検討した。Omentin は MCT による右心室心筋細胞の横断面積の増加 (from  $199.7 \pm 15.7$  to  $285.0 \pm 24.6$   $\mu\text{m}^2$ ,  $n=6-8$ ,  $p<0.01$ , 図 26CD) を有意に抑制した (to  $185.8 \pm 20.3$   $\mu\text{m}^2$ ,  $n=8$ ,  $p<0.01$ , 図 26CD)。

### 3-3. Omentin の MCT による肺内肺動脈壁リモデリングに及ぼす影響

肺動脈壁のリモデリングは肺高血圧症の進展に重要な役割を担っている。そこで omentin の MCT による肺内肺動脈壁の肥厚に及ぼす影響を検討した。Omentin は MCT による肺内肺動脈の内腔/血管壁面積比の減少 (from  $31.2 \pm 4.2$  to  $10.6 \pm 2.3\%$ ,  $n=8$ ,  $p<0.01$ , 図 27AB) を有意に抑制した (to  $21.6 \pm 2.7\%$ ,  $n=8$ ,  $p<0.01$ , 図 27AB)。

### 3-4. Omentin の MCT による肺内肺動脈の弛緩反応障害に及ぼす影響

肺内肺動脈の弛緩反応障害も肺高血圧症の進展に重要な役割を担っている。そこで最後に、omentin の MCT による内皮依存性及び非依存性弛緩反応の障害に及ぼす影響を検討した。NA で前収縮させた Control の肺内肺動脈において ACh ( $1 \text{ nM}$  to  $30 \text{ } \mu\text{M}$ ) の累積投与により濃度依存性の内皮依存性弛緩反応が見られた (黒丸,  $n=7-9$ , 図 28A)。MCT の肺内肺動脈において ACh 誘導性の弛緩反応は Control と比較して有意に減弱した (白丸,  $n=9-13$ ,  $p<0.05$ ,  $0.01$ , 図 28A)。Omentin 長期間投与は MCT による ACh 誘導性の内皮依存性弛緩反応の減弱を有意に抑制した (白四角,  $n=8$ ,  $p<0.05$ ,  $0.01$ , 図 28A)。同様に NA で前収縮させた Control の肺内肺動脈において SNP ( $100 \text{ pM}$  to  $3 \text{ } \mu\text{M}$ ) の累積投与により濃度依存性の内皮非依存性弛緩反応が見られた (黒丸,  $n=8$ , 図 28B)。MCT の肺内肺動脈において SNP 誘導性の弛緩反応は Control と比較して有意に減弱

した(白丸, n=8, p<0.05, 0.01, 図 28B)。Omentin 長期間投与は MCT による SNP 誘導性の内皮非依存性弛緩反応の減弱を有意に抑制した(白四角, n=7, p<0.05, 0.01, 図 28B)。

#### 4. 考察

第四章では omentin 長期間投与がラットにおいて MCT による平均肺動脈圧の上昇を抑制することを明らかにした(図 25)。また omentin は続発する MCT による右心肥大及び肺重量の増加を抑制した(図 26)。さらに omentin は MCT による肺内肺動脈壁リモデリングを抑制した(図 27)。加えて omentin は MCT による内皮依存性及び非依存性弛緩反応の減弱を抑制した(図 28)。これらの結果から omentin は血管壁リモデリング及び血管機能障害を改善することで MCT による肺高血圧及び右心肥大を抑制することが示唆された(図 29)。

肺高血圧症は肺血管抵抗が増大し肺動脈圧が亢進することにより誘発され、多くの場合が予後不良の経過をたどる致死性の疾患である。現在肺高血圧症の治療薬として、チロシンキナーゼ阻害薬、プロスタサイクリン、エンドセリン受容体拮抗薬、フォスフォジエステラーゼ-5 阻害薬などが併用処置で使用されている(5, 13, 74)。本章では omentin 長期間投与が MCT による血管壁リモデリング及び血管機能障害の両方を抑制することを明らかにした。このように omentin は 2 つの異なる作用により、MCT による肺高血圧を抑制したことから、単独で既存の治療薬以上の効果が期待できる可能性があり、非常に魅力的な創薬標的であると考えられる。

血管機能障害及び血管壁リモデリングは肺血管抵抗を増大させ、肺高血圧を介して右心肥大を誘発する。炎症性反応もまた血管機能障害や血管壁リモデリングを起こす重要な

要因である。当研究室の過去の研究と本研究第一章では、**omentin** が培養血管内皮細胞(81)及び **SMCs** (22)において **TNF- $\alpha$** による炎症性反応を抑制することを明らかにした。また第二章では **omentin**が **PDGF-BB**による **SMCs**遊走を抑制し、マウス頸動脈結紮モデルにおいて新生血管内膜形成を阻害することを明らかにした。これらの結果から **omentin** は抗血管炎症作用や抗 **SMCs** 遊走作用により肺高血圧及び右心肥大を抑制する可能性が考えられる。

第一章及び第二章では **omentin** が **NOX** の活性化を抑制する抗酸化作用により、抗炎症作用及び抗 **SMCs** 遊走作用を示すことを明らかにした(21, 22)。**NOX** の活性化は肺高血圧症の進展に重要な役割を担っている。近年、低酸素刺激により **NOX-4** 発現が増加し、肺動脈壁リモデリングを促進することが報告された(11, 18)。また **MCT** による肺高血圧において、**NOX-1** により肺動脈 **SMCs** の増殖・遊走が促進するという報告もある(72)。さらに **NOX** 阻害薬 **apocynin** は摘出肺動脈において **NO** による弛緩反応を促進し、**ROS** による収縮反応を抑制することが報告されている(76)。これらの報告から **omentin** は肺内肺動脈において **NOX-1** または **NOX-4** を抑制することで **MCT** による血管壁リモデリング及び血管機能障害を抑制し肺高血圧及び右心肥大を阻害する可能性が考えられる。

近年の疫学調査により血中 **omentin** 濃度は肥満症や 2 型糖尿病、高血圧症の罹患率と負の相関関係を示すことが明らかになっている(9, 56, 64)。また睡眠時無呼吸症候群 (**obstructive sleep apnea syndrome; OSAS**)患者においても血中

omentin 濃度が減少することが報告されている(73)。肥満は OSAS 発症の重要な因子である(1)。OSAS では長期的な低酸素状態となり肺高血圧及び右心不全が誘発される。これらの報告から omentin は肥満関連 OSAS による肺高血圧及び右心肥大を抑制する可能性も示唆される。

結論として本章ではラットにおける omentin 長期間投与が血管壁リモデリング及び血管機能障害を阻害することで MCT による肺高血圧を抑制することを初めて明らかにした(図 29)。今後 omentin は肺高血圧症治療のターゲットと成り得る非常に魅力的な分子である可能性が示唆された。

## VI. 総括

### 【背景・目的】

内臓肥満を原因とする高血圧症の患者数は増加の一途を辿っており、その病態機序の解明及び予防・治療法の確立は急務である。肥満により肥大化した内臓脂肪組織において、アディポサイトカインの分泌は増減する。その結果、血中アディポサイトカインのバランス（善玉 vs. 悪玉）は不均衡となり、高血圧症のみならず 2 型糖尿病、脂質代謝異常症などアテローム性動脈硬化症のリスクとなる疾患の発症リスクが高まると考えられている(80, 79)。多くの疫学調査により、内臓肥満による血中 omentin 濃度の低下が高血圧症、2 型糖尿病やアテローム性動脈硬化症などの発症率の増加と相関することが報告されている(27, 33, 37, 51, 73, 85)。よって omentin は単なる肥満から高血圧症、2 型糖尿病を合併した肥満症移行への鍵を握る、重要なアディポサイトカインであると推察される。そこで当研究室では特に肥満による高血圧発症・進展の機序に着目し検討を行ってきた。その結果、omentin がラット摘出血管組織において NO 産生を介して弛緩反応を誘導すること(83)、また培養血管内皮細胞において NO 産生を介して TNF- $\alpha$ による炎症性反応を抑制することを明らかにしてきた(81)。しかし、それ以外の omentin の病態生理的役割に関する基礎的な検討はこれまでなされてこなかった。

これらの背景から、本研究では『omentin が肥満による高血圧症の病態に抑制的に働くのではないか』との仮説を立



て、特に血管系に焦点を当てて研究を行った。高血圧症の発症・進展に関わる血管病態プロセスとして、血管反応性(収縮・弛緩機能)の障害、血管内皮及び平滑筋の炎症性反応の亢進、血管平滑筋の増殖・遊走を介した血管壁リモデリングが非常に重要である。そこで本研究では初めに、培養血管 SMCs における omentin の TNF- $\alpha$ による炎症性反応に及ぼす影響を検討した(第一章)。次に、PDGF-BB による SMCs 増殖・遊走に及ぼす影響を検討した(第二章)。さらに本研究では in vivo の実験により omentin のラット血圧に及ぼす影響(急性; 第三章, 長期間; 第四章)を併せて検討した。

## 【結果】

### (第一章)

NOX の活性化を介した  $O_2^-$  産生は血管 SMCs における炎症性反応に重要な役割を果たす(7)。Omentin の血管平滑筋における炎症性反応に及ぼす影響を検討するため、ラット腸間膜動脈由来 SMCs を用いて実験を行った。Omentin は NOX 由来  $O_2^-$  産生を抑制する「抗酸化作用」(図 7)により、TNF- $\alpha$  による p38, JNK シグナルの活性を抑制(図 4)し、VCAM-1 発現誘導を阻害(図 3)した結果、単球接着を抑制(図 9)することを明らかにした。さらに omentin は内皮剥離ラット摘出動脈組織においても TNF- $\alpha$  による VCAM-1 の発現誘導を抑制した(図 10)。このように in vitro と ex vivo の実験で、omentin が血管平滑筋における TNF- $\alpha$  による炎症性反応を抑制することが明らかになった(図 11) (22)。

## (第二章)

SMCs の増殖・遊走を介した血管壁リモデリングは高血圧の発症・進展に重要な役割を担っている。血中 PDGF-BB 濃度は高血圧症患者で上昇し、SMCs 増殖・遊走を介した血管壁リモデリングの主要な誘導因子である(3, 28, 49)。最初に、SMCs 増殖に及ぼす影響を検討したところ、omentin 単独処置は SMCs 増殖に影響を及ぼさず(図 12A)、前処置も PDGF-BB による SMCs 増殖に影響を及ぼさなかった(図 12B)。一方、omentin は PDGF-BB による SMCs 遊走を抑制した(*in vitro*)(図 13)。この omentin による SMCs 遊走の抑制作用は、NOX/O<sub>2</sub><sup>-</sup>/p38/ HSP27 経路の阻害によるもので、抗炎症作用の機序と同様に「抗酸化作用」(図 15)によるものであった。また omentin はラット摘出腸間膜動脈組織において FBS による SMCs out-growth を抑制した(*ex vivo*)(図 17)。さらに omentin 長期間投与は BALB/c マウスにおいて頸動脈結紮処置による新生血管内膜形成を抑制した(*in vivo*)(図 18)。これらの結果から、omentin は「抗酸化作用」により血管平滑筋の遊走を阻害し、血管壁リモデリングを抑制することが示唆された(図 19) (21)。

## (第三章)

当研究室の過去の研究結果及び第一章と第二章の結果から、omentin が *in vitro* において高血圧の発症・進展に関わる病態プロセスを抑制することが明らかになった。そこで次に *in vivo* の実験により omentin 急性静脈内投与がラット血圧に及ぼす影響を検討した。最初に omentin 単独急性静脈内投

与は Wistar rat 血圧に影響を及ぼさなかった(図 20)。一方で omentin 前処置後に NA を急性静脈内投与したところ SBP (図 21AB)及び MBP (図 21AC)の上昇を抑制し、DBP (図 21AD)も抑制する傾向を示した。また omentin は Ang II による DBP の上昇を抑制した(図 22AD)。同様に omentin は血管運動中枢興奮薬 dimorpholamine による DBP の上昇を抑制した(図 23AC)。一方で、NO 合成酵素阻害薬 L-NAME を処置したラットにおいて omentin は NA による昇圧作用を抑制しなかった(図 24)。これらの結果から omentin はアゴニストによる昇圧作用を抑制するが、この機序には少なくとも一部は内皮由来「NO 産生」が関与していることが示唆された(19)。Omentin の降圧作用の機序が内皮由来「NO 産生」であることは、過去に当研究室で行った摘出動脈組織を用いた張力実験(83)や培養血管内皮細胞を用いた in vitro の実験結果(81)と一致していた。

#### (第四章)

次に血管病態変化に続発する血圧増加に及ぼす omentin 長期間投与の影響を検討するため、MCT 誘発肺高血圧ラットを作成した。Omentin 長期間投与は MCT による平均肺動脈圧の上昇を抑制した(図 25)。また omentin は MCT による右心肥大及び肺重量の増加を抑制した(図 26)。さらに omentin は MCT による肺内肺動脈壁の肥厚を抑制した(図 27)。血管反応性に及ぼす影響を検討したところ、omentin は摘出肺内肺動脈組織において MCT による内皮依存性及び非依存性弛緩反応の減弱を抑制した(図 28AB)。これらの結果から omentin は血管壁リモデリング及び血管機能障害を抑制することで MCT によ

る肺高血圧及び右心肥大を抑制することが示唆された(図 29)(20)。

### 【考察】

本研究結果から、**omentin** は血管構成細胞に直接働きかけ、**SMCs** においては「抗酸化作用」により抗炎症作用及び抗遊走作用を介した血管壁リモデリングの阻害作用を示すことを明らかになった。また当研究室では過去に、**omentin** が内皮細胞においては「**NO** 産生」を促進することで血管弛緩作用及び抗炎症作用を示すことを明らかにしている。すなわち **omentin** はこれまで検討した高血圧の発症・進展に関わる様々な病態プロセスに対して抑制的に働いていることが示された。さらに *in vivo* の実験により、**omentin** 急性静脈内投与が内皮由来「**NO** 産生」によりアゴニストによる昇圧作用を抑制すること、さらに **omentin** 長期間投与が血管弛緩機能の障害及び血管壁リモデリングを阻害することで肺高血圧及び右心肥大を抑制することを明らかにした(図 30)。このように **omentin** は血管内皮において「**NO** 産生」を誘導し、また平滑筋においては「抗酸化作用」を有することから、高血圧症のみならず動脈硬化症や心筋梗塞など様々な心血管疾患に対してもその保護作用が期待される(図 31)。

数多くのアディポサイトカインが存在する中で、現在までに善玉アディポサイトカイン(心血管系疾患に保護的に働く)として広く認識されているのは、**adiponectin** のみである。最近、他の研究グループも **omentin** による心血管保護作用を報告している。例えば、血中 **omentin** 濃度の減少は 2 型糖尿

病患者において左心室拡張機能不全の原因となるが、omentin 前処置はラット心筋細胞において収縮機能不全とインスリン抵抗性を改善する(14)。さらに、omentin が Akt/eNOS 経路の活性化を介して血管内皮細胞の分化及び血管新生を誘導するという報告もある(34)。また、omentin が AMPK の活性化を介して圧負荷による心肥大を抑制するという報告もある(35)。このように当研究室及び他の研究グループの実験結果から、omentin は adiponectin に次ぐ第二の善玉アディポサイトカインである可能性が示唆される。しかし、この魅力的な分子を高血圧症の治療に応用するには解決すべき課題が数多く存在する。中でも、現在までに omentin 受容体に関する報告は皆無で、受容体の同定は特に重要な課題である。さらに今回 omentin 長期間投与の実験で使用したモデルは、MCT による肺高血圧ラットであり、肥満による高血圧症を再現したものではない。今後は例えば高脂肪食給餌による高血圧症のモデル動物（メタボリックシンドロームモデルラット）などを用いて、長期的に全身血圧に及ぼす影響を検討する必要がある。このように検討すべき課題は依然として多いが、omentin に関する更なる研究は肥満による高血圧症治療の新たな治療標的の探索に貢献するものと考えられる。

## VII. 謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御閲覧を承りました北里大学獣医学部獣医薬理学研究室、原幸雄名誉教授、山脇英之教授、岡田宗善講師に深く感謝の意を表します。本研究の計画から、論文作成まで終始丁寧に御指導賜り心から感謝を申し上げます。

また本実験にあたり助力を頂きましたアイオワ大学薬理学研究室向田昌司博士、山口大学獣医毒性学研究室臼井達哉助教、マハナコン大学 Phalitakul Sukanya 講師、ジョージア・リージェント大学血管生物学センター森田知佳博士、獣医薬理学研究室内の皆様に心から感謝を申し上げます。

さらに公私ともに御協力頂いた北里大学獣医解剖学研究室杉山真言助教に心より感謝を申し上げます。

## VIII. 引用文献

1. **Alonso-Alvarez ML, Cordero-Guevara JA, Teran-Santos J, Gonzalez-Martinez M, Jurado-Luque MJ, Corral-Penafiel J, Duran-Cantolla J, Kheirandish-Gozal L, and Gozal D.** Obstructive Sleep Apnea in Obese Community-Dwelling Children: The NANOS Study. *Sleep* 37: 943-949, 2014.
2. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Shimomura I, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, and Matsuzawa Y.** Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105: 2893-2898, 2002.
3. **Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, and Numazawa S.** Redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 760-768, 2013.
4. **Bassi M, do Carmo JM, Hall JE, and da Silva AA.** Chronic effects of centrally administered adiponectin on appetite, metabolism and blood pressure regulation in normotensive and hypertensive rats. *Peptides* 37: 1-5, 2012.
5. **Berghausen E, Ten Freyhaus H, and Rosenkranz S.** Targeting of platelet-derived growth factor signaling in pulmonary arterial hypertension. *Handb Exp Pharmacol* 218: 381-408, 2013.

6. **Blüher M, Bullen JW, Jr., Lee JH, Kralisch S, Fasshauer M, Klötting N, Niebauer J, Schön MR, Williams CJ, and Mantzoros CS.** Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2310-2316, 2006.
7. **Csanyi G, Taylor WR, and Pagano PJ.** NOX and inflammation in the vascular adventitia. *Free Radic Biol Med* 47: 1254-1266, 2009.
8. **De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, and Griendling KK.** Tumour necrosis factor alpha activates a p22<sup>phox</sup>-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 329 ( Pt 3): 653-657, 1998.
9. **de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pray J, Ndubuizu K, Patil S, Schwartz A, Kligman M, Fried SK, Gong DW, Shuldiner AR, Pollin TI, and McLenithan JC.** Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 56: 1655-1661, 2007.
10. **Deng G, Long Y, Yu YR, and Li MR.** Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int J Obes (Lond)* 34: 165-171, 2010.
11. **Diebold I, Petry A, Hess J, and Gørlach A.** The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Mol Biol Cell* 21: 2087-2096, 2010.
12. **Dubinion JH, da Silva AA, and Hall JE.** Chronic blood pressure and appetite responses to central leptin infusion in rats fed a high fat diet. *J Hypertens* 29: 758-762, 2011.



13. **Ghofrani HA, Distler O, Gerhardt F, Gorenflo M, Grunig E, Haefeli WE, Held M, Hoeper MM, Kahler CM, Kaemmerer H, Klose H, Kollner V, Kopp B, Mebus S, Meyer A, Miera O, Pittrow D, Riemekasten G, Rosenkranz S, Schranz D, Voswinckel R, and Olschewski H.** [Treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH): recommendations of the Cologne Consensus Conference 2010]. *Dtsch Med Wochenschr* 135 Suppl 3: S87-101, 2010.
14. **Greulich S, Chen WJ, Maxhera B, Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Jonker JT, Mueller H, de Wiza DH, Floerke RR, Smiris K, Lamb HJ, de Roos A, Bax JJ, Romijn JA, Smit JW, Akhyari P, Lichtenberg A, Eckel J, Diamant M, and Ouwens DM.** Cardioprotective properties of omentin-1 in type 2 diabetes: evidence from clinical and in vitro studies. *PLoS One* 8: e59697, 2013.
15. **Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, and Schieffer B.** Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* 92: e80-86, 2003.
16. **Gustafson B.** Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 17: 332-341, 2010.
17. **Hedges JC, Dechert MA, Yamboliev IA, Martin JL, Hickey E, Weber LA, and Gerthoffer WT.** A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 274: 24211-24219, 1999.
18. **Ismail S, Sturrock A, Wu P, Cahill B, Norman K, Huecksteadt T, Sanders K, Kennedy T, and Hoidal J.** NOX4 mediates hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells: the role of

autocrine production of transforming growth factor- $\beta$ 1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L489-499, 2009.

19. **Kazama K, Okada M, Hara Y, and Yamawaki H.** A Novel Adipocytokine, Omentin, Inhibits Agonists-Induced Increases of Blood Pressure in Rats. *J Vet Med Sci* 75: 1029-1034, 2013.

20. **Kazama K, Okada M, and Yamawaki H.** A novel adipocytokine, omentin, inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 452: 142-146, 2014.

21. **Kazama K, Okada M, and Yamawaki H.** A novel adipocytokine, omentin, inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration through anti-oxidative mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014.

22. **Kazama K, Usui T, Okada M, Hara Y, and Yamawaki H.** Omentin plays an anti-inflammatory role through inhibition of TNF- $\alpha$ -induced superoxide production in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 686: 116-123, 2012.

23. **Komiya T, Tanigawa Y, and Hirohashi S.** Cloning of the novel gene intelectin, which is expressed in intestinal paneth cells in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 759-762, 1998.

24. **Kong G, Lee S, and Kim KS.** Inhibition of racl reduces PDGF-induced reactive oxygen species and proliferation in vascular smooth muscle cells. *J Korean Med Sci* 16: 712-718, 2001.

25. **Konishi M, Tabata Y, Kariya M, Suzuki A, Mandai M, Nanbu K, Takakura K, and Fujii S.** In vivo anti-tumor effect through the controlled

- release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel. *J Control Release* 92: 301-313, 2003.
26. **Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, and Edens WA.** Novel homologs of gp91<sup>phox</sup>. *Trends Biochem Sci* 25: 459-461, 2000.
27. **Lapointe M, Poirier P, Martin J, Bastien M, Auclair A, and Cianflone K.** Omentin changes following bariatric surgery and predictive links with biomarkers for risk of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 13: 124, 2014.
28. **Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, and Griendling KK.** Novel gp91(<sup>phox</sup>) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88: 888-894, 2001.
29. **Lee JK, Schnee J, Pang M, Wolfert M, Baum LG, Moremen KW, and Pierce M.** Human homologs of the *Xenopus* oocyte cortical granule lectin XL35. *Glycobiology* 11: 65-73, 2001.
30. **Lee MY, San Martin A, Mehta PK, Dikalova AE, Garrido AM, Datla SR, Lyons E, Krause KH, Banfi B, Lambeth JD, Lassegue B, and Griendling KK.** Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 480-487, 2009.
31. **Li JM, Fan LM, Christie MR, and Shah AM.** Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47<sup>phox</sup> phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol Cell Biol* 25: 2320-2330, 2005.

32. **Libby P.** Atherosclerosis: the new view. *Sci Am* 286: 46-55, 2002.
33. **Liu R, Wang X, and Bu P.** Omentin-1 is associated with carotid atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 93: 21-25, 2011.
34. **Maruyama S, Shibata R, Kikuchi R, Izumiya Y, Rokutanda T, Araki S, Kataoka Y, Ohashi K, Daida H, Kihara S, Ogawa H, Murohara T, and Ouchi N.** Fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced revascularization via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 287: 408-417, 2012.
35. **Matsuo K, Shibata R, Ohashi K, Kambara T, Uemura Y, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Joki Y, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Kihara S, Murohara T, and Ouchi N.** Omentin functions to attenuate cardiac hypertrophic response. *J Mol Cell Cardiol* 2014.
36. **Meier CA, and Thalmann S.** [White adipose tissue, inflammation and atherosclerosis]. *Bull Acad Natl Med* 191: 897-908; discussion 908-810, 2007.
37. **Moreno-Navarrete JM, Catalan V, Ortega F, Gomez-Ambrosi J, Ricart W, Fruhbeck G, and Fernandez-Real JM.** Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutr Metab (Lond)* 7: 27, 2010.
38. **Morita T, Okada M, and Yamawaki H.** Mechanisms underlying a decrease in KCl-induced contraction after long-term serum-free organ culture of rat isolated mesenteric artery. *J Vet Med Sci* 76: 963-969, 2014.
39. **Motobayashi Y, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Orino S, Yamaguchi K, Kawazoe K, Hamano S, Tsuchiya K, Tomita S, and Tamaki T.** Adiponectin inhibits insulin-like growth factor-1-induced cell

migration by the suppression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, but not Akt in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 32: 188-193, 2009.

40. **Mukohda M, Morita T, Okada M, Hara Y, and Yamawaki H.**

Long-term methylglyoxal treatment causes endothelial dysfunction of rat isolated mesenteric artery. *J Vet Med Sci* 75: 151-157, 2013.

41. **Mukohda M, Morita T, Okada M, Hara Y, and Yamawaki H.**

Long-term methylglyoxal treatment impairs smooth muscle contractility in organ-cultured rat mesenteric artery. *Pharmacol Res* 65: 91-99, 2012.

42. **Mukohda M, Okada M, Hara Y, and Yamawaki H.** Methylglyoxal

accumulation in arterial walls causes vascular contractile dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Sci* 120: 26-35, 2012.

43. **Okada M, Kikuzuki R, Harada T, Hori Y, Yamawaki H, and Hara**

**Y.** Captopril attenuates matrix metalloproteinase-2 and -9 in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in rats. *J Pharmacol Sci* 108: 487-494, 2008.

44. **Okada M, Kosaka N, Hoshino Y, Yamawaki H, and Hara Y.**

Effects of captopril and telmisartan on matrix metalloproteinase-2 and -9 expressions and development of left ventricular fibrosis induced by isoprenaline in rats. *Biol Pharm Bull* 33: 1517-1521, 2010.

45. **Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, and Wamhoff BR.** Complex

regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. *J Vasc Res* 47: 168-180, 2010.

46. **Phalitakul S, Okada M, Hara Y, and Yamawaki H.** Vaspin

prevents methylglyoxal-induced apoptosis in human vascular endothelial

cells by inhibiting reactive oxygen species generation. *Acta Physiol (Oxf)* 209: 212-219, 2013.

47. **Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, and Aggarwal BB.**

Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49: 1603-1616, 2010.

48. **Ross R.** Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126, 1999.

49. **Rossi E, Casali B, Regolisti G, Davoli S, Perazzoli F, Negro A, Sani C, Tumiati B, and Nicoli D.** Increased plasma levels of platelet-derived growth factor (PDGF-BB + PDGF-AB) in patients with never-treated mild essential hypertension. *Am J Hypertens* 11: 1239-1243, 1998.

50. **Sakuma A, Kato H, and Saji Y.** Effects of dimorpholamine on blood pressure. *Jpn J Pharmacol* 15: 386-394, 1965.

51. **Saremi A, Asghari M, and Ghorbani A.** Effects of aerobic training on serum omentin-1 and cardiometabolic risk factors in overweight and obese men. *J Sports Sci* 28: 993-998, 2010.

52. **Satoh K, Matoba T, Suzuki J, O'Dell MR, Nigro P, Cui Z, Mohan A, Pan S, Li L, Jin ZG, Yan C, Abe J, and Berk BC.** Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 117: 3088-3098, 2008.

53. **Schaffler A, Neumeier M, Herfarth H, Furst A, Scholmerich J, and Buchler C.** Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1732: 96-102, 2005.

54. **Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, and Griendling KK.** Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 91: 406-413, 2002.
55. **Shen H, Eguchi K, Kono N, Fujiu K, Matsumoto S, Shibata M, Oishi-Tanaka Y, Komuro I, Arai H, Nagai R, and Manabe I.** Saturated fatty acid palmitate aggravates neointima formation by promoting smooth muscle phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2596-2607, 2013.
56. **Shibata R, Ouchi N, Takahashi R, Terakura Y, Ohashi K, Ikeda N, Higuchi A, Terasaki H, Kihara S, and Murohara T.** Omentin as a novel biomarker of metabolic risk factors. *Diabetol Metab Syndr* 4: 37, 2012.
57. **Simon F, and Stutzin A.** Protein kinase C-mediated phosphorylation of p47<sup>phox</sup> modulates platelet-derived growth factor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and cell proliferation in human umbilical vein endothelial cells. *Endothelium* 15: 175-188, 2008.
58. **Son BK, Akishita M, Iijima K, Kozaki K, Maemura K, Eto M, and Ouchi Y.** Adiponectin antagonizes stimulatory effect of tumor necrosis factor-alpha on vascular smooth muscle cell calcification: regulation of growth arrest-specific gene 6-mediated survival pathway by adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *Endocrinology* 149: 1646-1653, 2008.
59. **Sorescu D, Somers MJ, Lassegue B, Grant S, Harrison DG, and Griendling KK.** Electron spin resonance characterization of the NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 30: 603-612,

2001.

60. **Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, and Griendling KK.** Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105: 1429-1435, 2002.

61. **Souza R, Sitbon O, Parent F, Simonneau G, and Humbert M.** Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 61: 736, 2006.

62. **Suzuki YA, Shin K, and Lonnerdal B.** Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry* 40: 15771-15779, 2001.

63. **Takeuchi T, Adachi Y, Ohtsuki Y, and Furihata M.** Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease. *Med Mol Morphol* 40: 115-120, 2007.

64. **Tan BK, Heutling D, Chen J, Farhatullah S, Adya R, Keay SD, Kennedy CR, Lehnert H, and Randeve HS.** Metformin decreases the adipokine vaspin in overweight women with polycystic ovary syndrome concomitant with improvement in insulin sensitivity and a decrease in insulin resistance. *Diabetes* 57: 1501-1507, 2008.

65. **Touyz RM.** Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 37: 1263-1273, 2004.

66. **Tsuji S, Uehori J, Matsumoto M, Suzuki Y, Matsuhisa A, Toyoshima K, and Seya T.** Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J*



*Biol Chem* 276: 23456-23463, 2001.

67. **Ueyama T, Geiszt M, and Leto TL.** Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol* 26: 2160-2174, 2006.

68. **Usui T, Moriota T, Okada M, and Yamawaki H.** Histone diacetylase 4 controls neointimal hyperplasia via stimulating proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 63: 397-403, 2014.

69. **Usui T, Okada M, Hara Y, and Yamawaki H.** Death-associated protein kinase 3 mediates vascular inflammation and development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 60: 1031-1039, 2012.

70. **Usui T, Okada M, Mizuno W, Oda M, Ide N, Morita T, Hara Y, and Yamawaki H.** HDAC4 mediates development of hypertension via vascular inflammation in spontaneous hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1894-1904, 2012.

71. **Usui T, Yamawaki H, Kamibayashi M, Okada M, and Hara Y.** CV-159, a unique dihydropyridine derivative, prevents TNF-induced inflammatory responses in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 113: 182-191, 2010.

72. **Veit F, Pak O, Egemnazarov B, Roth M, Kosanovic D, Seimetz M, Sommer N, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Brandes RP, Schermuly RT, and Weissmann N.** Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal* 19: 2213-2231,

2013.

73. **Wang Q, Feng X, Zhou C, Li P, and Kang J.** Decreased levels of serum omentin-1 in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Ann Clin Biochem* 50: 230-235, 2013.

74. **Watanabe H.** [Pharmacological treatment of pulmonary hypertension at a turning point]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 143: 165-172, 2014.

75. **Weber DS, Taniyama Y, Rocic P, Seshiah PN, Dechert MA, Gerthoffer WT, and Griending KK.** Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Circ Res* 94: 1219-1226, 2004.

76. **Wedgwood S, Lakshminrusimha S, Farrow KN, Czech L, Gugino SF, Soares F, Russell JA, and Steinhorn RH.** Apocynin improves oxygenation and increases eNOS in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302: L616-626, 2012.

77. **Yamada Y, Maruyama J, Zhang E, Okada A, Yokochi A, Sawada H, Mitani Y, Hayashi T, Suzuki K, and Maruyama K.** Effect of thrombomodulin on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Anesth* 28: 26-33, 2014.

78. **Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, and Kadowaki T.** Cloning of adiponectin receptors that mediate

antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769, 2003.

79. **Yamawaki H.** Mechanisms of action of novel adipocytokines on the vascular system. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 137: 131-135, 2011.

80. **Yamawaki H.** Vascular effects of novel adipocytokines: focus on vascular contractility and inflammatory responses. *Biol Pharm Bull* 34: 307-310, 2011.

81. **Yamawaki H, Kuramoto J, Kameshima S, Usui T, Okada M, and Hara Y.** Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 408: 339-343, 2011.

82. **Yamawaki H, Takahashi M, Mukohda M, Morita T, Okada M, and Hara Y.** A novel adipocytokine, nesfatin-1 modulates peripheral arterial contractility and blood pressure in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 418: 676-681, 2012.

83. **Yamawaki H, Tsubaki N, Mukohda M, Okada M, and Hara Y.** Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 668-672, 2010.

84. **Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC, and Gong DW.** Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1253-1261, 2006.

85. **Yoo HJ, Hwang SY, Hong HC, Choi HY, Yang SJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi KM, Choi DS, and Baik SH.** Association of circulating omentin-1 level with arterial stiffness and carotid plaque in type 2

diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 10: 103, 2011.

86. **Yoshimura T, and Oppenheim JJ.** Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); two multifunctional receptors with unusual properties. *Exp Cell Res* 317: 674-684, 2011.

Table 1. Baseline characteristics of normal Wistar rats or N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 80 mg/kg, 1 day)-treated Wistar rats.

Body Weight (g)	Age (week)	HR (b.p.m.)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)
Normal rat (n=7)					
265.4±27.2	6-10	362.4±10.4	114.9±2.7	91.9±1.7	80.6±2.0
+ L-NAME (n=9)					
219.1±22.2	6-10	344.0±16.1	132.5±4.0**	109.1±2.8**	97.6±2.5**

Body weight, heart rate (HR, beats per minutes (b.p.m.)), systolic blood pressure (BP) (SBP), mean BP (MBP) and diastolic BP (DBP) were shown.

Data were shown as mean ± S.E.M. \*\*p<0.01 vs. Normal rat.

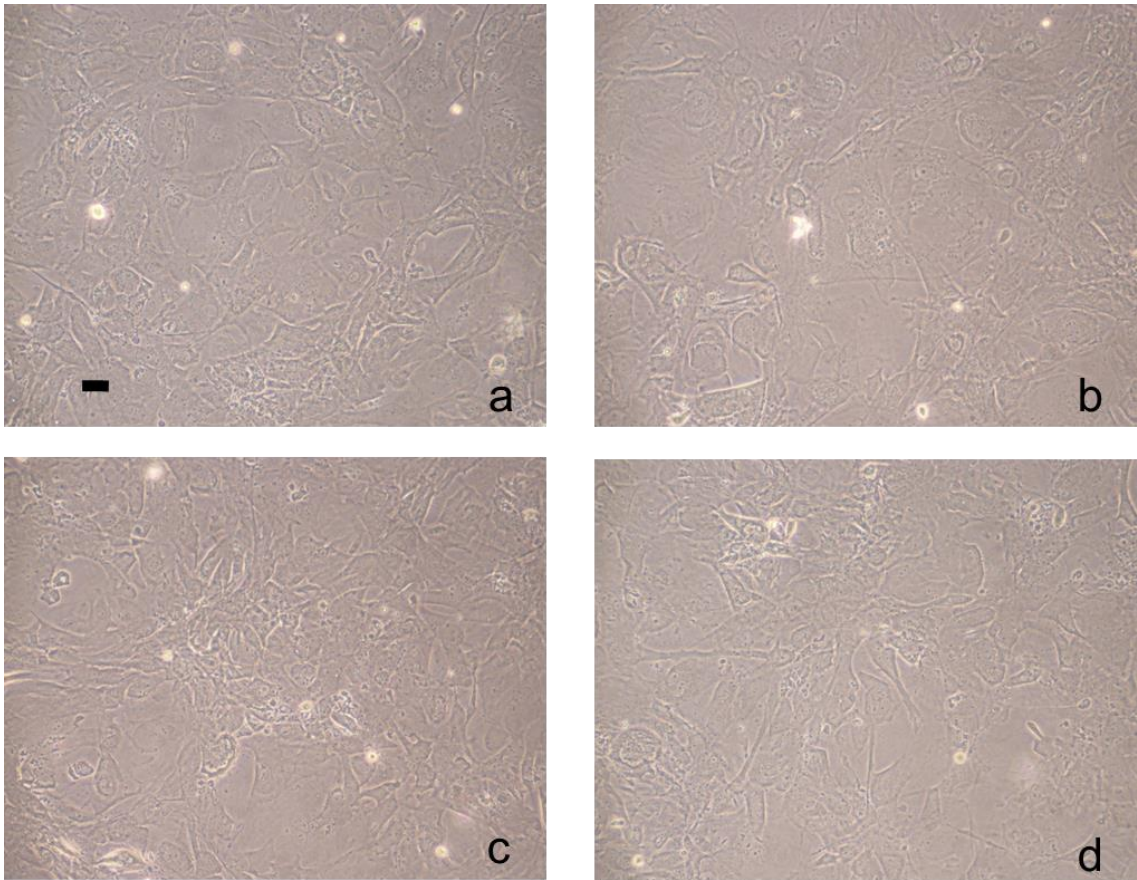


Fig. 1 Effect of omentin alone treatment on morphology of smooth muscle cells (SMCs).

Representative photomicrographs of SMCs treated for 24 h with omentin alone (a: 0; b: 50; c: 100; d: 300 ng/ml) were shown (n=4). Scale bar; 50  $\mu$ m.

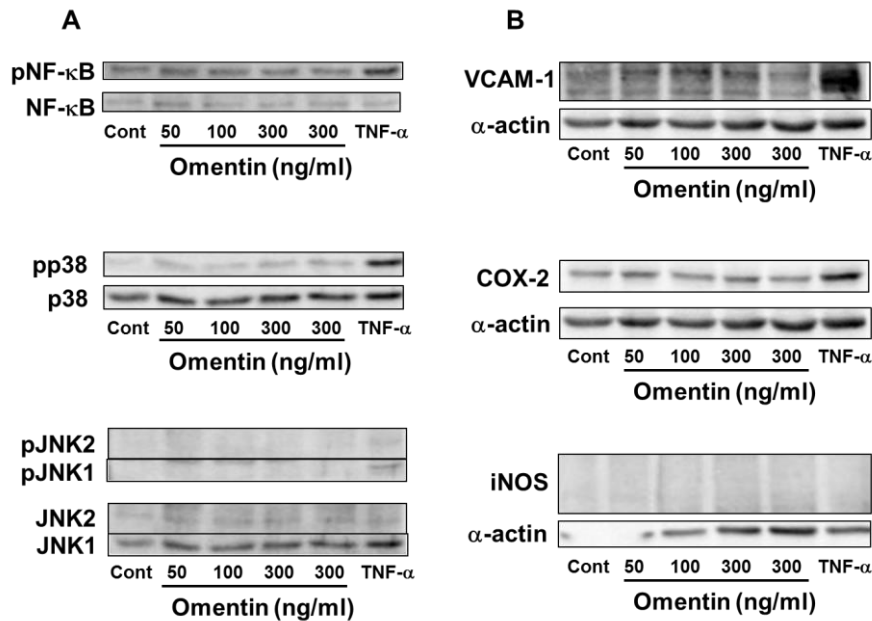


Fig. 2 Effects of omentin alone treatment on phosphorylation of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) (A) or expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, cyclooxygenase (COX)-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (B).

After SMCs were treated with omentin alone (50-300 ng/ml, 20 min (A) and 24 h (B)), phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (pNF- $\kappa$ B; n=3-6), p38 (pp38; n=4-8) and JNK (pJNK1, pJNK2; n=3-6) or expression of VCAM-1 (n=3-6), COX-2 (n=3-6), and iNOS (n=3-6) was determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total antibody or  $\alpha$ -actin antibody. TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 20 min or 24 h) was used as a positive control (Cont).

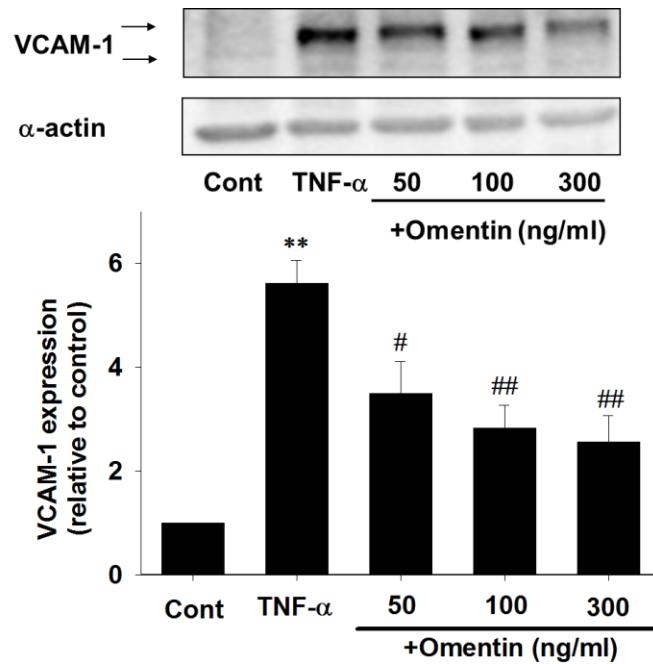


Fig. 3 Effect of omentin on TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1 expression.

After SMCs were treated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 24 h in the absence or presence of omentin (50-300 ng/ml, pretreatment for 30 min), total cell lysates were harvested. Expression of VCAM-1 (n=5-8) was determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using  $\alpha$ -actin antibody. Expression of VCAM-1 was shown as fold-increase relative to control (Cont). \*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05, ##p<0.01 vs. TNF- $\alpha$ .



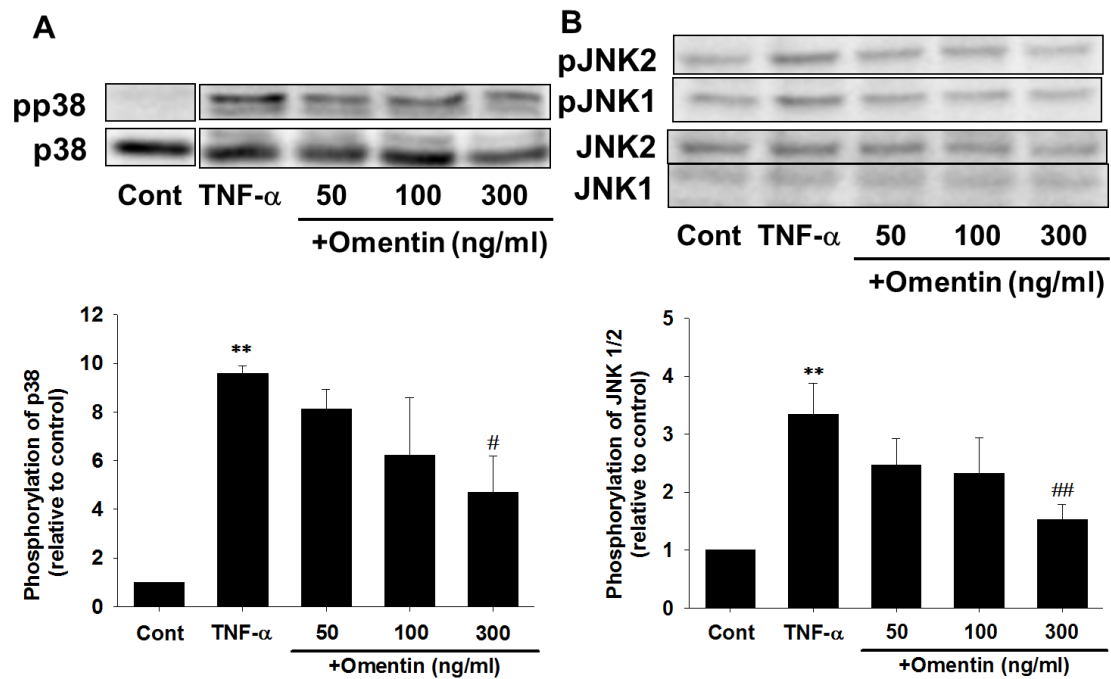


Fig. 4 Effect of omentin on TNF- $\alpha$ -induced phosphorylation of p38 (A) and JNK (B).

After SMCs were treated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 20 min in the absence or presence of omentin (50-300 ng/ml, pretreatment for 30 min), total cell lysates were harvested. Phosphorylation of p38 (pp38, A; n=4-6) or JNK (pJNK1, pJNK2, B; n=5-9) was determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total p38 or total JNK antibody. Phosphorylation of p38 or JNK was shown as fold increase-relative to control (Cont).

\*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. TNF- $\alpha$ ; ##p<0.01 vs. TNF- $\alpha$ .

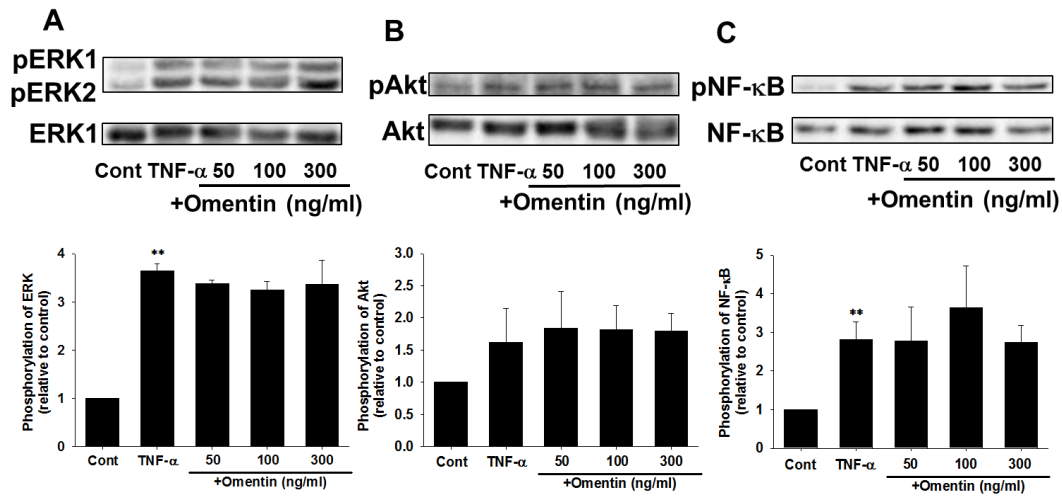


Fig. 5 Effect of omentin on TNF- $\alpha$ -induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) (A), Akt (B) and NF- $\kappa$ B (C).

After SMCs were treated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 20 min in the absence or presence of omentin (50-300 ng/ml, pretreatment 30 min), total cell lysates were harvested. Phosphorylation of ERK (pERK1, pERK2, A; n=3-5), Akt (pAkt, B; n=3-5) or NF- $\kappa$ B (Ser536) (pNF- $\kappa$ B, C; n=3-5) was determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total antibody. Phosphorylation of ERK, Akt or NF- $\kappa$ B was shown as fold-increase relative to control (Cont). \*\*p<0.01 vs. Cont.

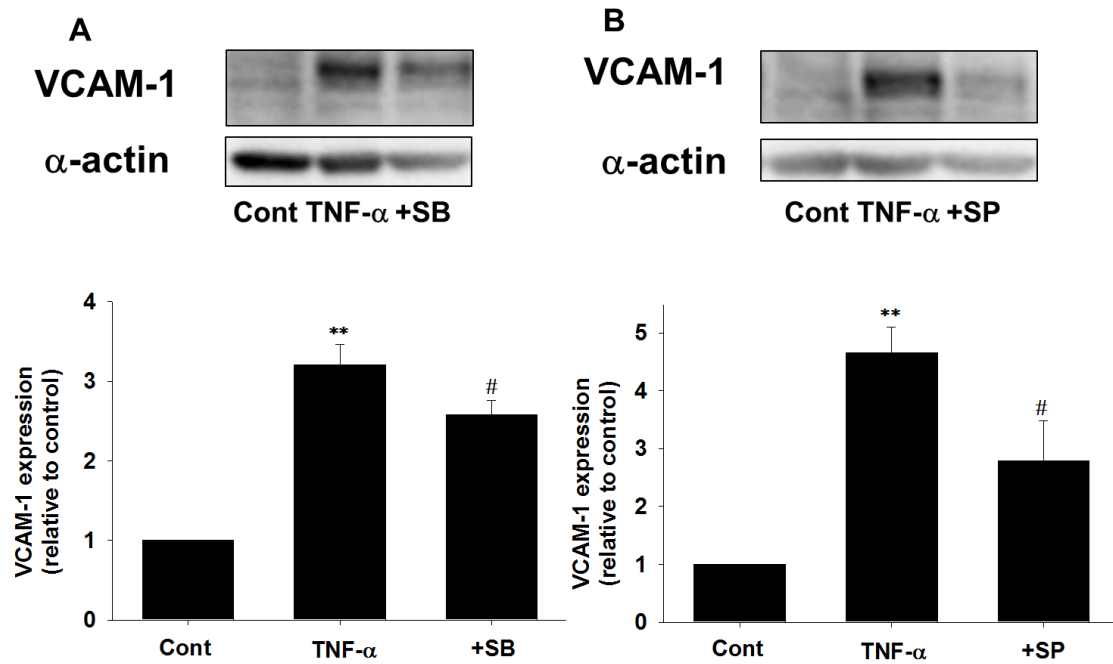


Fig. 6 Effects of an inhibitor of p38 (A) or JNK (B) on TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1 expression.

After SMCs were treated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 24 h in the absence or presence of a p38 inhibitor, SB203580 (SB, A; n=11) or a JNK inhibitor, SP600125 (SP, B; n=5) (each 10  $\mu$ M, pretreatment for 30 min), total cell lysates were harvested. Expression of VCAM-1 was determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using  $\alpha$ -actin antibody. VCAM-1 expression was shown as fold increase-relative to control (Cont). \*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. TNF- $\alpha$ .

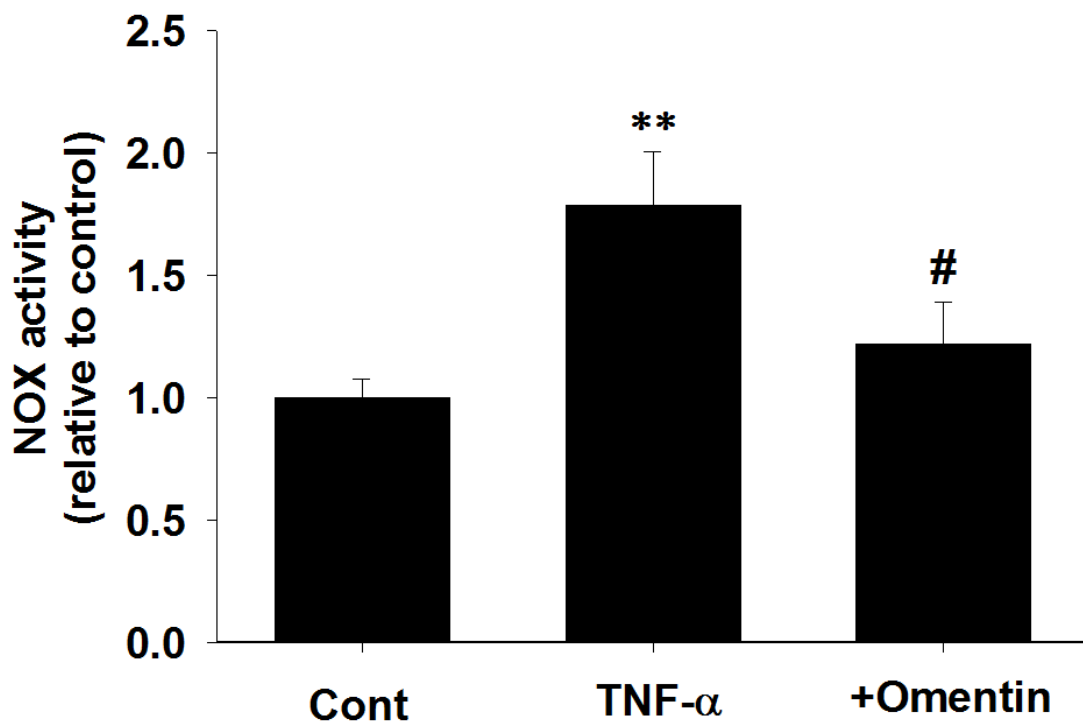


Fig. 7 Effect of omentin on TNF- $\alpha$ -induced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH) oxidase (NOX) activity.

After SMCs were treated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 1 h in the absence or presence of omentin (300 ng/ml, pretreatment for 30 min), total lysates were harvested. NOX activity was determined by lucigenin assay (n=6). The reaction carried out in total volume of 200  $\mu$ l assay buffer containing 10  $\mu$ M lucigenin, 500  $\mu$ M NADPH, and 10-15  $\mu$ g of cell lysates was measured by a luminometer. NOX activity was shown as fold-increase relative to control (Cont). \*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. TNF- $\alpha$ .

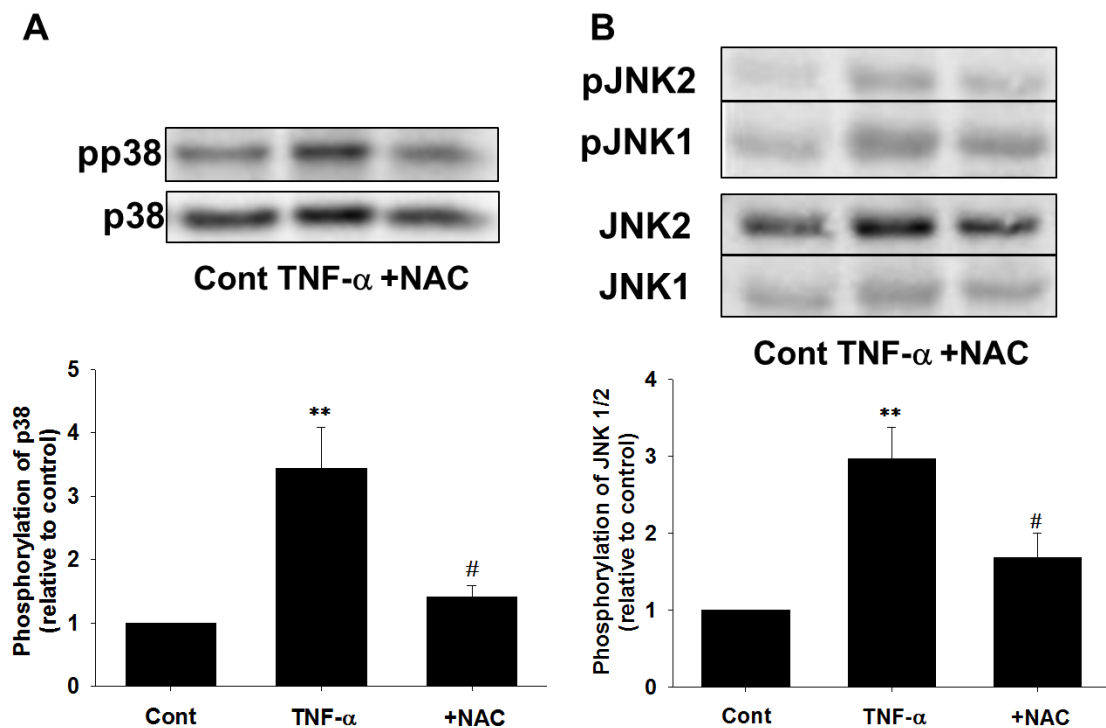


Fig. 8 Effect of an antioxidant drug on TNF- $\alpha$ -induced phosphorylation of p38 (A) or JNK (B).

After SMCs were treated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 20 min in the absence or presence of N-acetyl-L-cysteine (NAC; 20 mM, pretreatment for 30 min), total cell lysates were harvested. Phosphorylation of p38 (pp38, A; n=6) or JNK (pJNK1, pJNK2, B; n=8) was determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total p38 or total JNK antibody. Phosphorylation of p38 or JNK was shown as fold-increase relative to control (Cont). \*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. TNF- $\alpha$

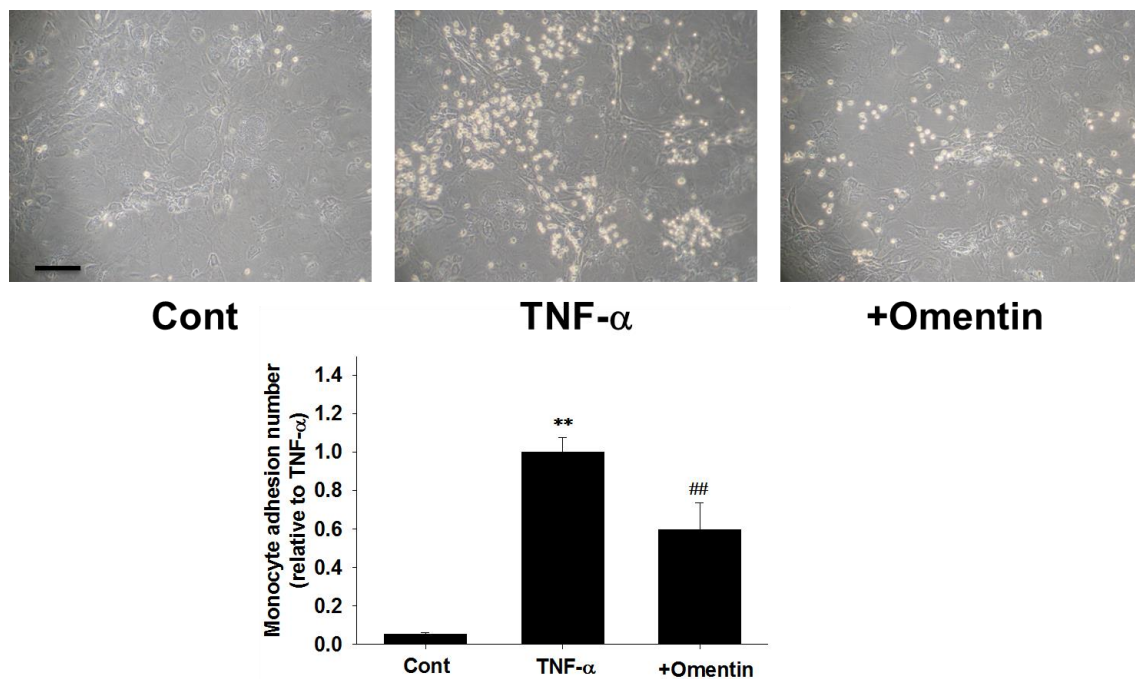


Fig. 9 Effect of omentin on TNF- $\alpha$ -induced monocytic U937 cells adhesion.

After SMCs were treated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 24 h in the absence or presence of omentin (300 ng/ml, pretreatment for 30 min), U937 cells were co-cultured for 1 h. After removing the non-adherent cells, the adherent cells were fixed with paraformaldehyde (4%) at 37°C, and the number of attached U937 cells was randomly counted in three areas per well at 200 $\times$  field. The number of U937 cells attached to SMCs was shown as fold increase-relative to TNF- $\alpha$  (n=8). Control; Cont.

\*\*p<0.01 vs. Cont; ##p<0.01 vs. TNF- $\alpha$ . Scale bar; 500  $\mu$ m.

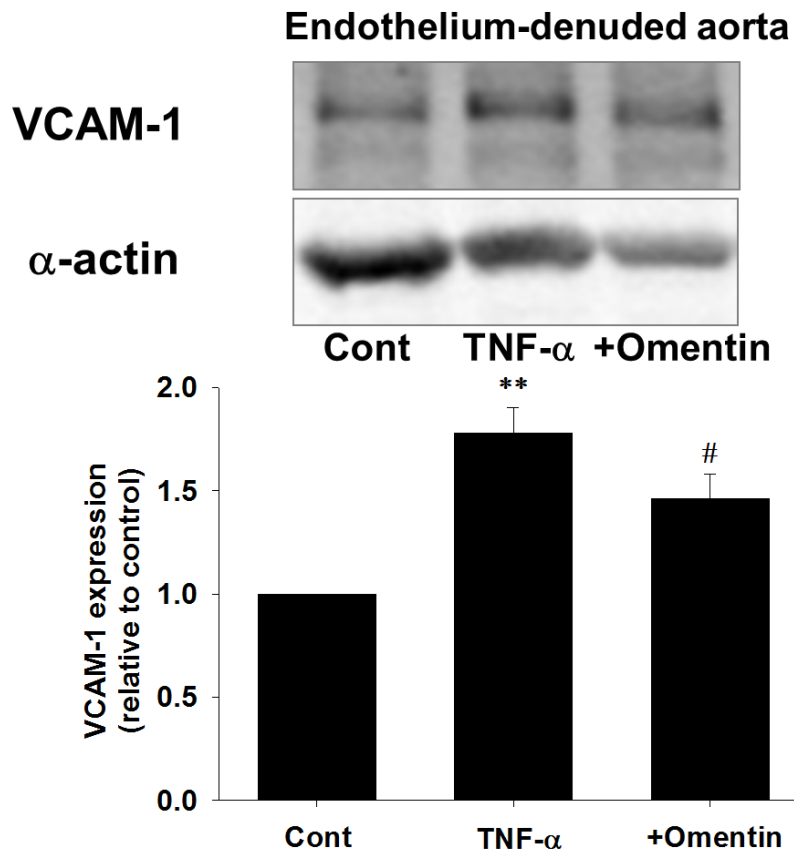


Fig. 10 Effect of omentin on TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1 expression in rat isolated thoracic aorta.

After endothelium-denuded isolated thoracic aorta was stimulated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 24 h in the absence or presence of omentin (300 ng/ml, pretreatment for 30 min), total cells lysates were harvested. Expression of VCAM-1 was determined by Western blotting (n=9). Equal protein loading was confirmed using  $\alpha$ -actin antibody. Expression of VCAM-1 was shown as fold increase-relative to control (Cont).

\*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. TNF- $\alpha$ .

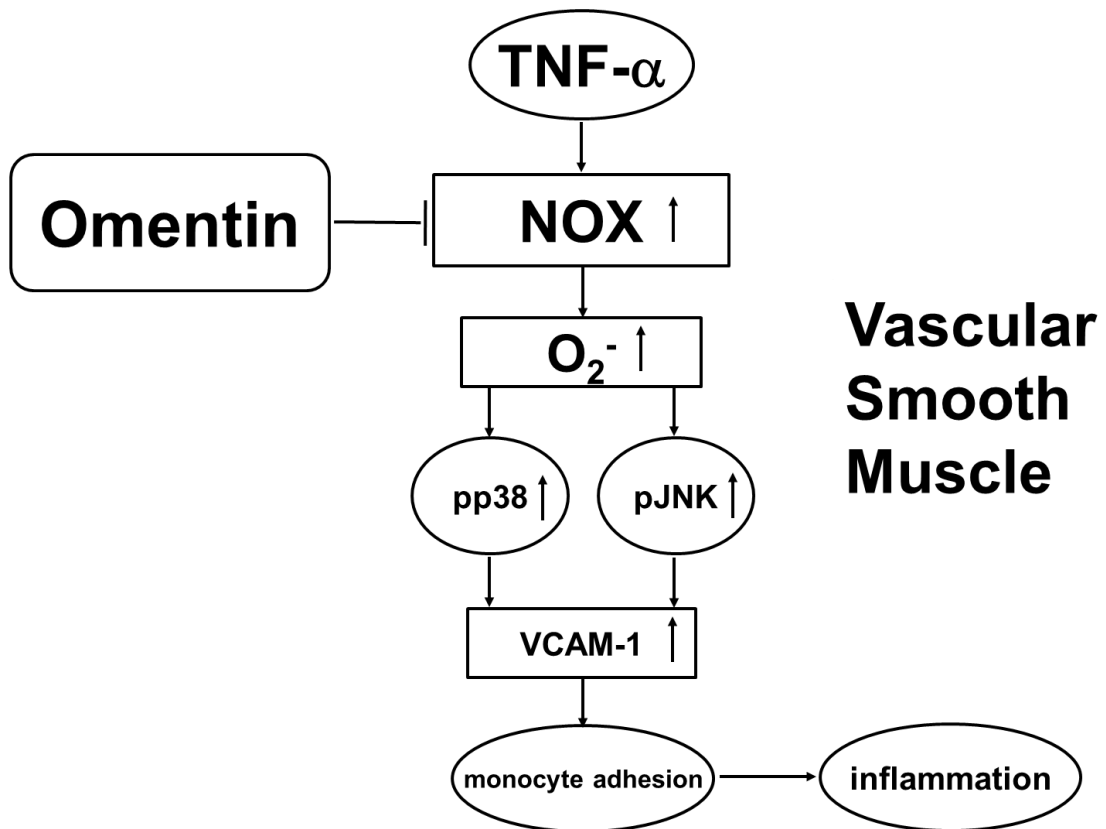


Fig. 11 Summary of the results in Chapter 1.

Omentin inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammation in vascular SMCs. Omentin inhibited TNF- $\alpha$ -induced expression of VCAM-1 and monocytes adhesion via inhibiting activation of p38 and JNK at least in part through preventing NOX-derived superoxide production (Kazama et al., Eur J Pharmacol. 2012).



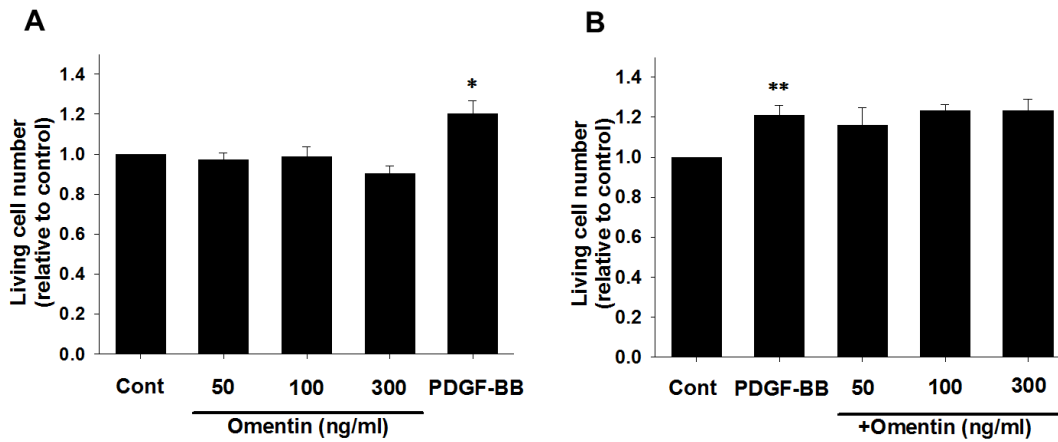


Fig. 12 Effects of omentin on SMCs proliferation.

(A) After SMCs were treated with omentin alone (50-300 ng/ml, 24 h), the living cell number was measured by an XTT assay and shown as fold-increase relative to control. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB (20 ng/ml, 24 h) was used as a positive control (Cont) (n=6-12). (B) After SMCs were treated without (Cont) or with PDGF-BB (20 ng/ml, 24 h) in the absence or presence of omentin (50-300 ng/ml, pretreatment for 24 h), the living cell number was measured by an XTT assay and shown as fold-increase relative to control (n=6-12). \*\*p<0.01 vs. Cont.

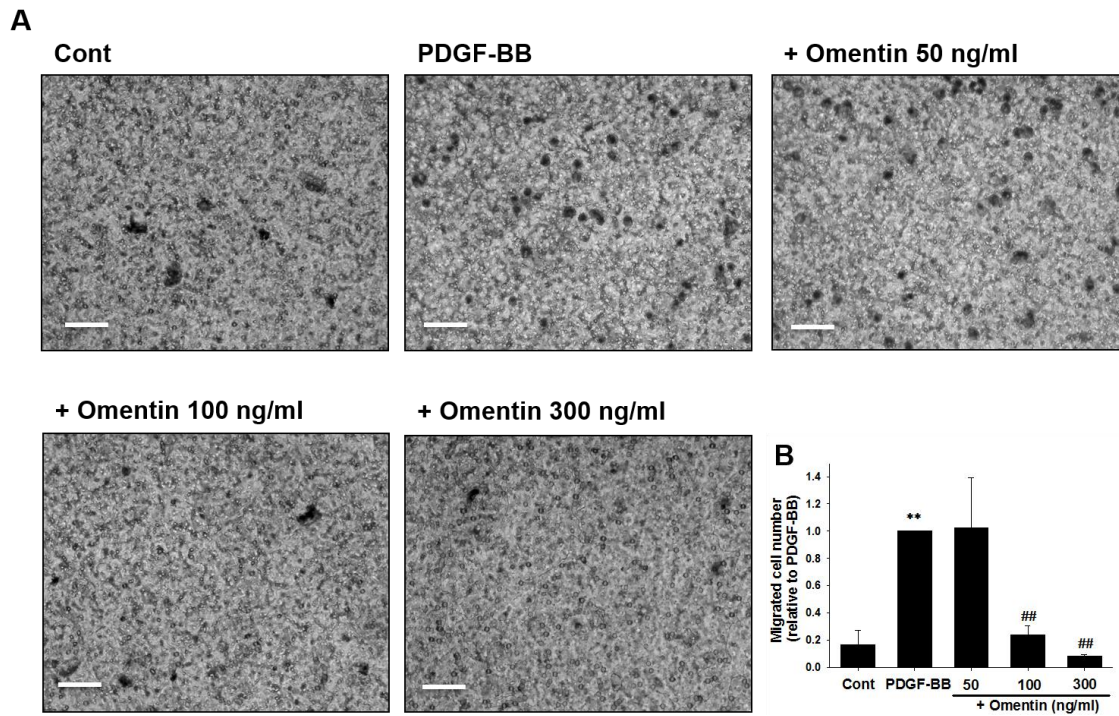


Fig. 13                      Effect of omentin on SMCs migration.

Representative photomicrographs of SMCs treated without (control; Cont) or with PDGF-BB (10 ng/ml, 6 h) in the absence or presence of omentin (50-300 ng/ml, pretreatment for 2 h) were shown (A; n=4). Migration was determined by Boyden chamber assay and shown as fold-increase relative to PDGF-BB (B).

\*\*p<0.01 vs. Cont; ##p<0.01 vs. PDGF-BB. Scale bar; 100  $\mu$ m.

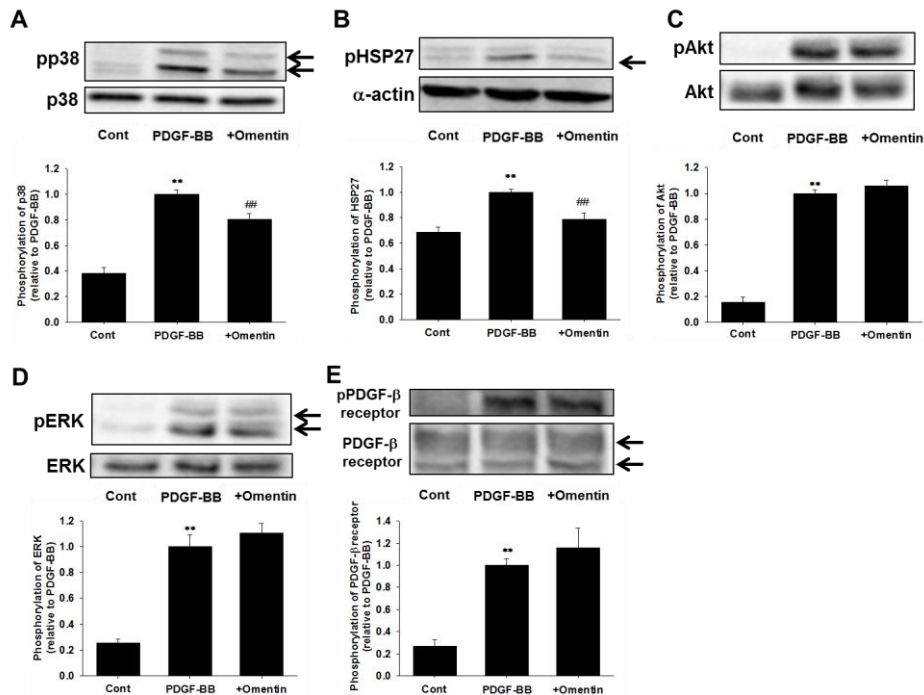


Fig. 14 Effect of omentin on PDGF-BB-induced activation of intracellular signaling in SMCs.

After SMCs were treated without (control; Cont) or with PDGF-BB (10 ng/ml, 30 min) in the absence or presence of omentin (300 ng/ml, pretreatment for 2 h), total cell lysates were harvested. Phosphorylation of p38 (pp38) (A; n=19-23), heat shock protein (HSP) 27 (Ser15) (pHSP27, B; n=14-17), Akt (Ser 473) (pAkt, C; n=4), ERK (pERK, D; n=4) and PDGF- $\beta$  receptor (Thy751) (pPDGF- $\beta$  receptor, E; n=6) was determined by Western blotting and shown as fold-increase relative to PDGF-BB. Equal protein loading was confirmed using total or  $\alpha$ -actin antibody.

\*\*p<0.01 vs. Cont; ##p<0.01 vs. PDGF-BB.

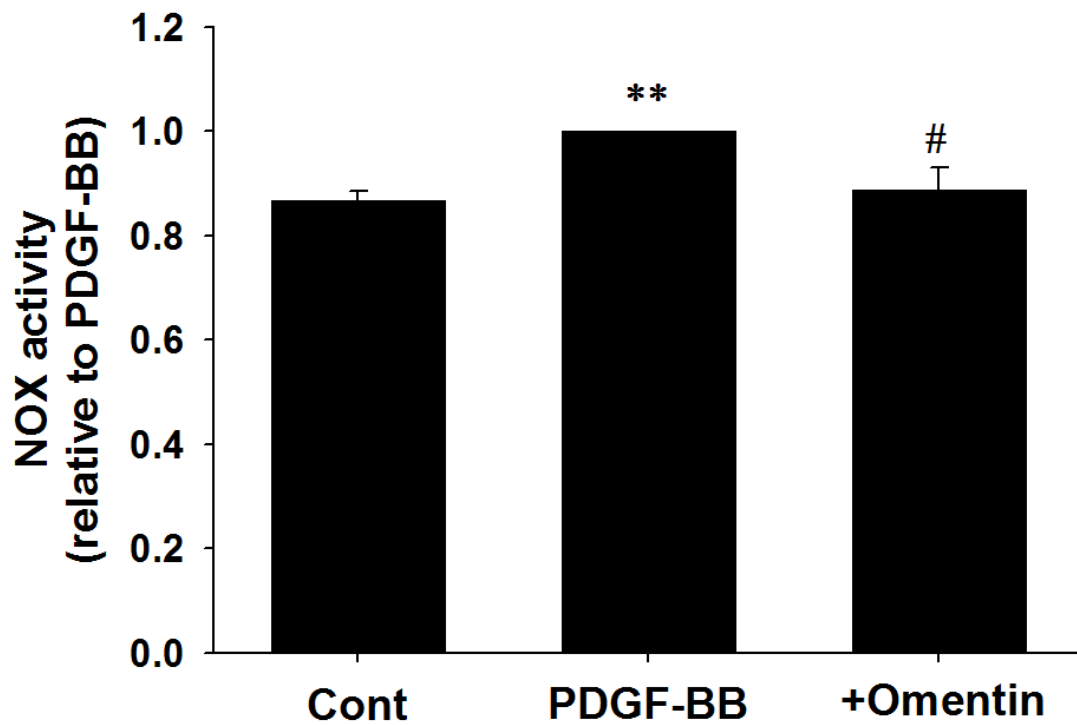


Fig. 15 Effect of omentin on PDGF-BB-induced NOX activation in SMCs.

After SMCs were treated without (control; Cont) or with PDGF-BB (10 ng/ml, 30 min) in the absence or presence of omentin (300 ng/ml, pretreatment for 2 h), total cell lysates were harvested. NOX activity was determined by a lucigenin assay (n=6) and shown as fold-increase relative to PDGF-BB.

\*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. PDGF-BB.

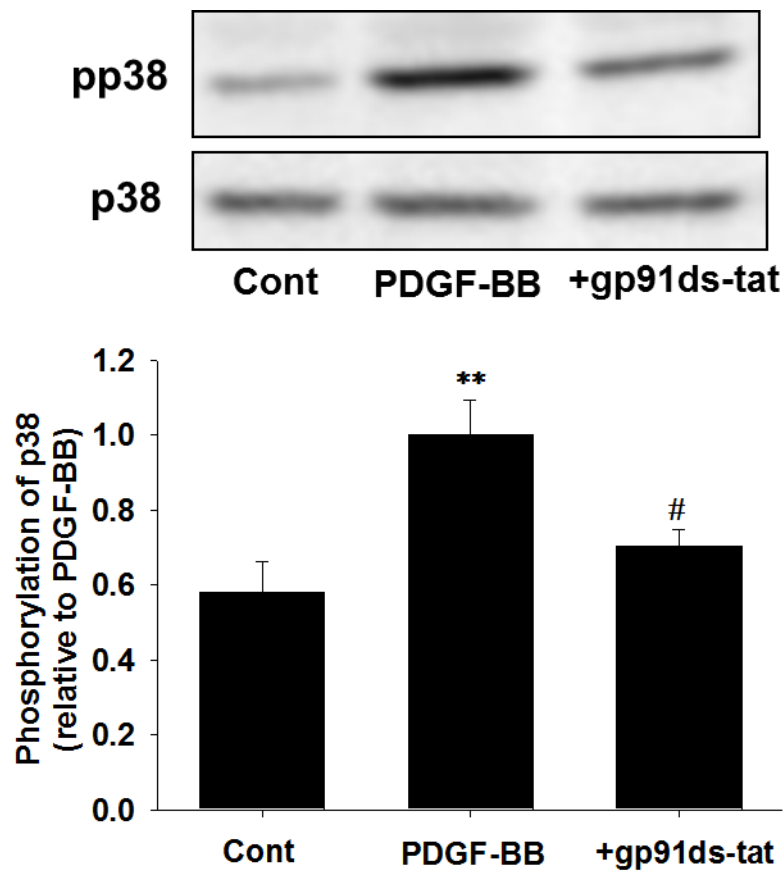


Fig. 16 Effect of a NOX inhibitor on PDGF-BB-induced phosphorylation of p38 in SMCs.

After SMCs were treated without (control; Cont) or with PDGF-BB (10 ng/ml, 30 min) in the absence or presence of a NOX inhibitor, gp91ds-tat (1  $\mu$ M, 2 h), total cell lysates were harvested. Phosphorylation of p38 (pp38) was determined by Western blotting (n=10) and shown as fold-increase relative to PDGF-BB. Equal protein loading was confirmed using total p38 antibody. \*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. PDGF-BB.

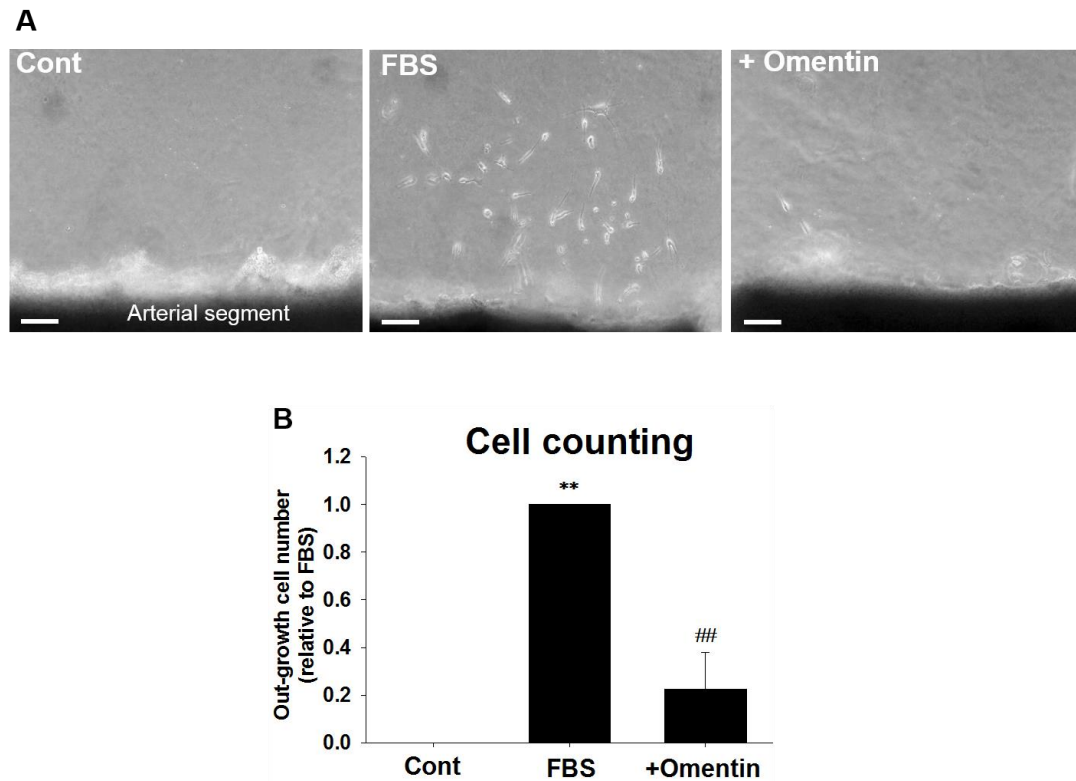


Fig.17 Effect of omentin on fetal bovine serum (FBS)-induced SMCs out-growth from rat isolated mesenteric artery.

Representative photomicrographs for SMCs out-growth from mesenteric artery treated without (control; Cont) or with FBS (5%, 4 days) in the absence or presence of omentin (300 ng/ml, pretreatment for 24 h) were shown (A; n=5). SMCs out-growth was shown as fold-increase relative to FBS by a cell counting in the bar graph (B). \*\* $p < 0.01$  vs. Cont; ## $p < 0.01$  vs. FBS. Scale bar; 100  $\mu\text{m}$ .

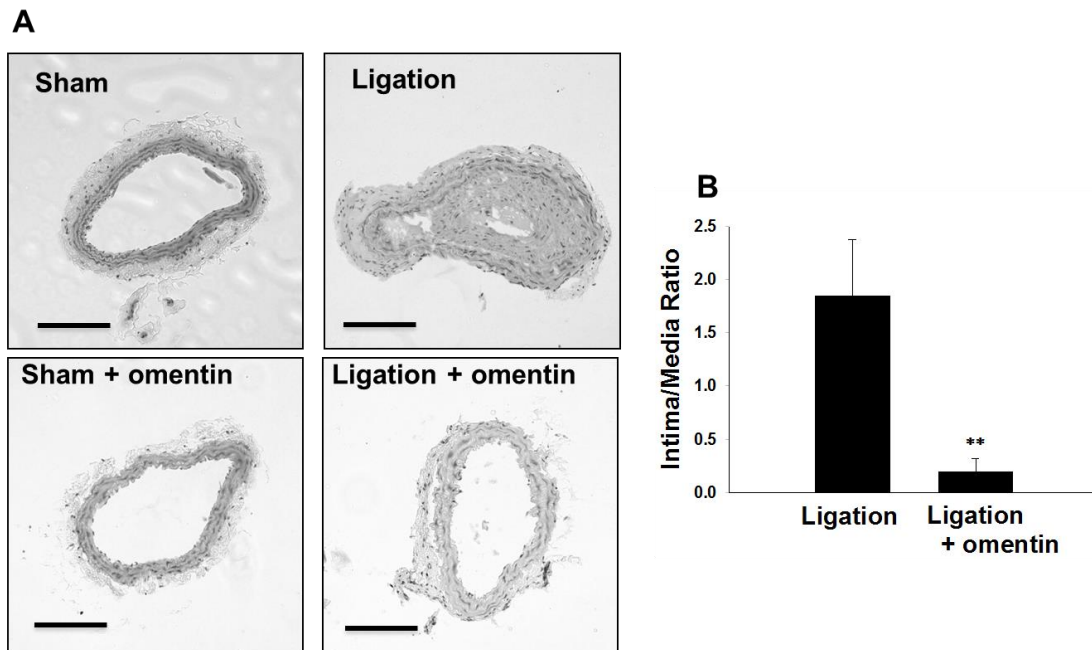


Fig. 18 Effect of chronic omentin administration on carotid intimal hyperplasia in mouse ligation model.

Representative hematoxylin and eosin (H&E) stained sections for carotids in mouse ligation model (sham or ligation) administrated with saline or omentin for 4 weeks were shown (A; n=5-6). Carotid intima/media ratio in the ligated artery was calculated and shown in the bar graph (B).

\*\*p<0.01, ligation vs. ligation + omentin. Scale bar; 100  $\mu$ m.

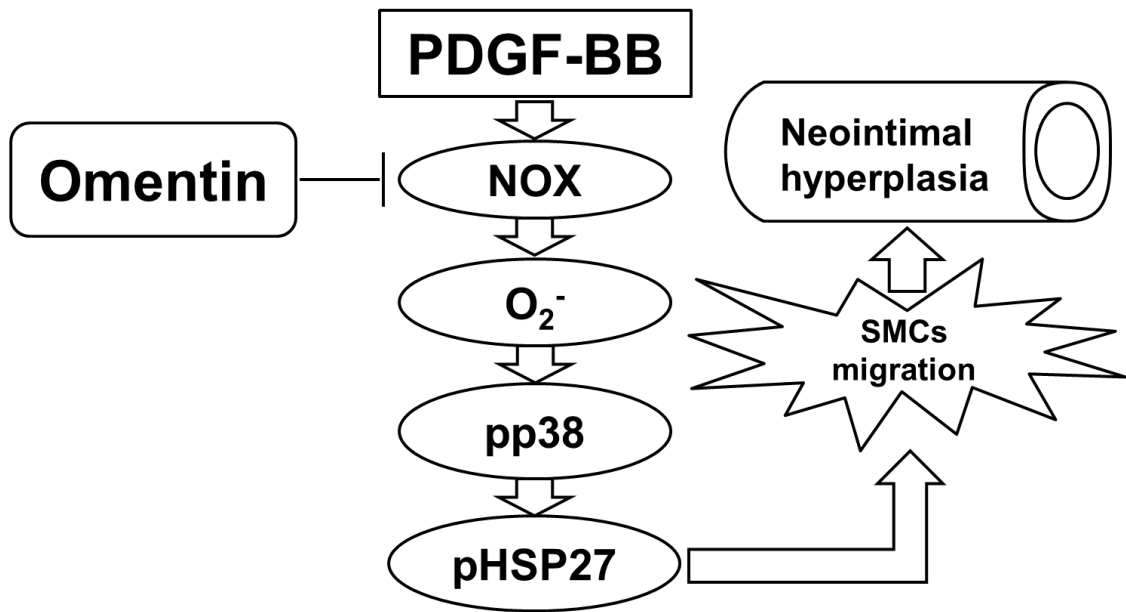


Fig. 19 Summary of the results in Chapter 2.

Omentin prevents PDGF-BB-induced SMCs migration by preventing NOX/O<sub>2</sub><sup>-</sup>/p38/HSP27 pathways, which might be at least partly responsible for the preventive effects on neointimal hyperplasia (Kazama et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014).



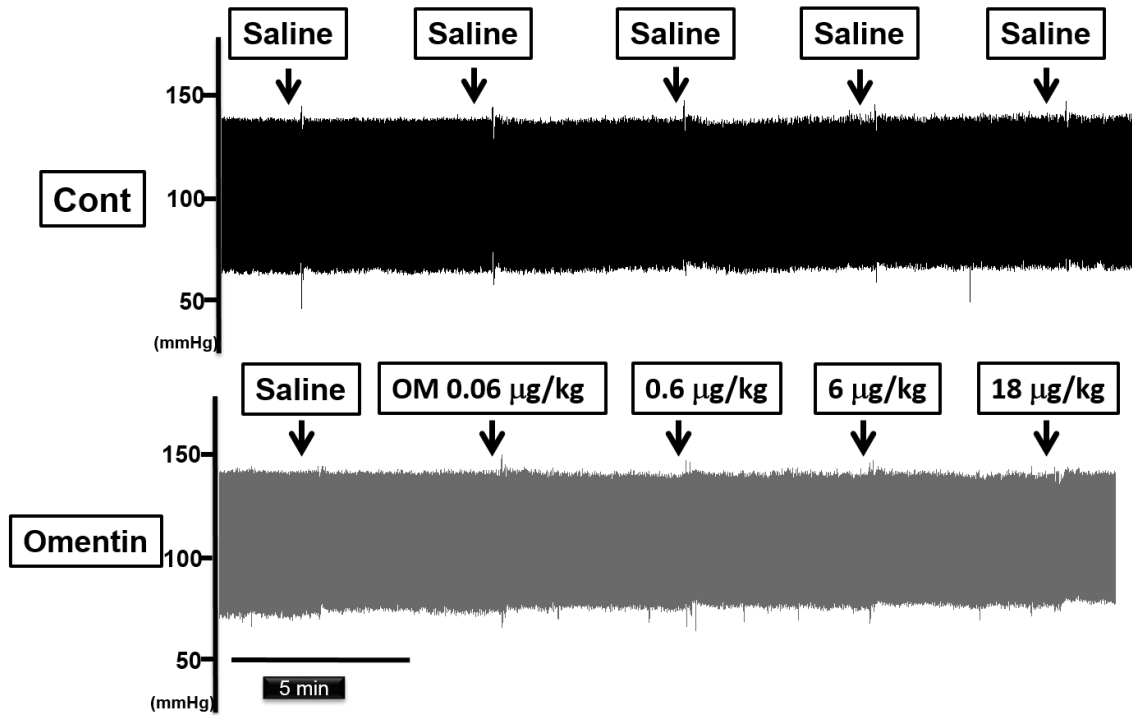


Fig. 20 Effect of omentin alone injection on blood pressure (BP) in Wistar rats.

Representative recordings of BP in Wistar rats which were intravenously injected with heparin-containing saline (Control; Cont) or omentin (OM; 0.06-18 µg/kg, 5-min-interval) were shown (n=11).

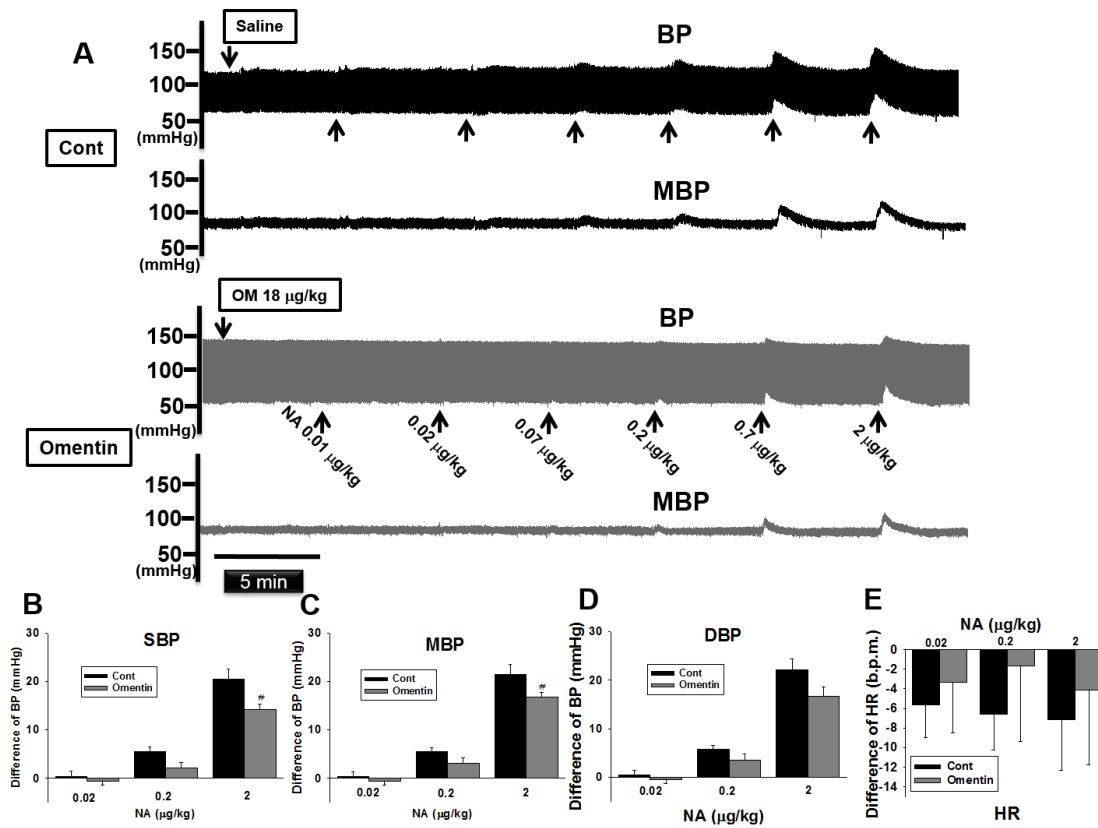


Fig. 21 Effect of omentin on noradrenaline (NA)-induced increases of BP in Wistar rats.

Representative recordings of BP (upper, A) in Wistar rats which were intravenously injected with NA (0.01-2 µg/kg) in the presence of saline (control; Cont) or omentin (OM; 18 µg/kg) were shown (n=11). Recordings of mean BP (MBP) were also shown (lower, A). Bar graph showed the changes of BP (Systolic BP (SBP); B, MBP; C, and diastolic BP (DBP); D) and heart rate (HR) (E) after injection with NA (0.02-2 µg/kg). #p<0.05 vs. Cont.

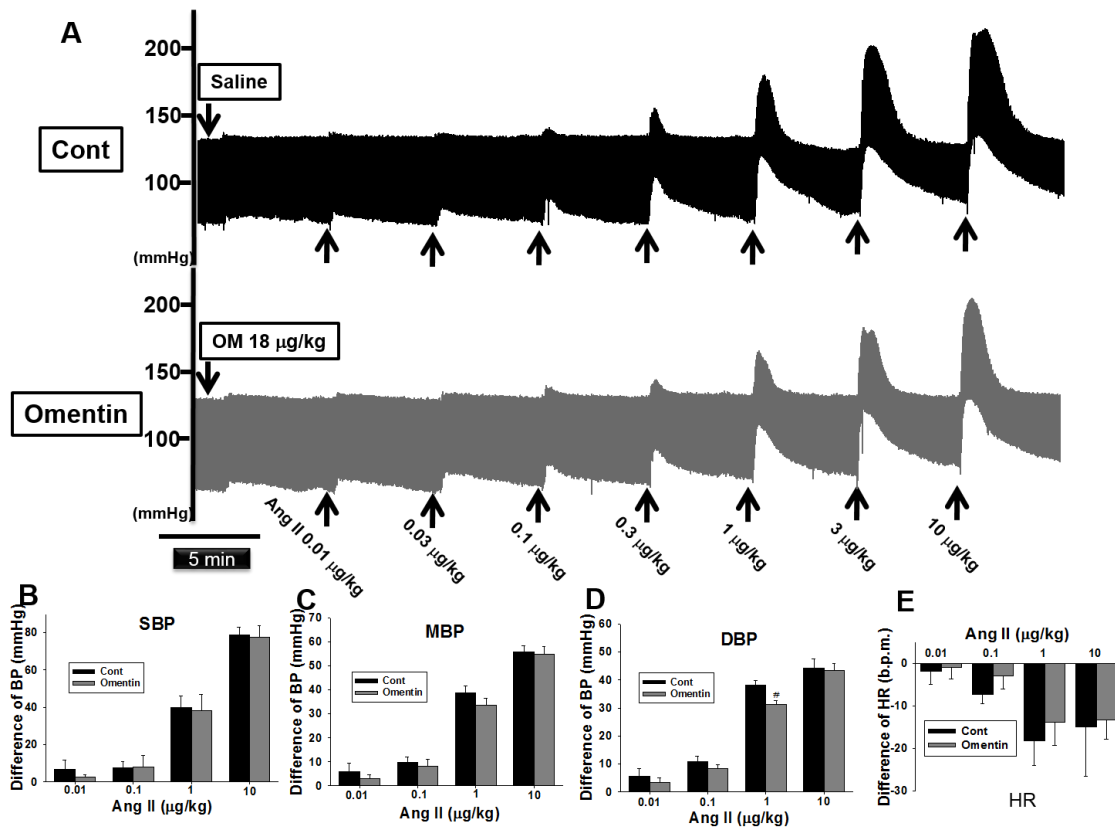


Fig. 22 Effect of omentin on angiotensin (Ang) II-induced increases of BP in Wistar rats.

Representative recordings of BP in Wistar rats which were intravenously injected with Ang II (0.01-10 µg/kg) in the presence of saline (control; Cont) (n=5) or omentin (OM; 18 µg/kg) (n=5) were shown (A). Bar graph showed the changes of BP (SBP; B, MBP; C, and DBP; D) and HR (E) after injection with Ang II (0.01-10 µg/kg). ##p<0.01 vs. Cont.

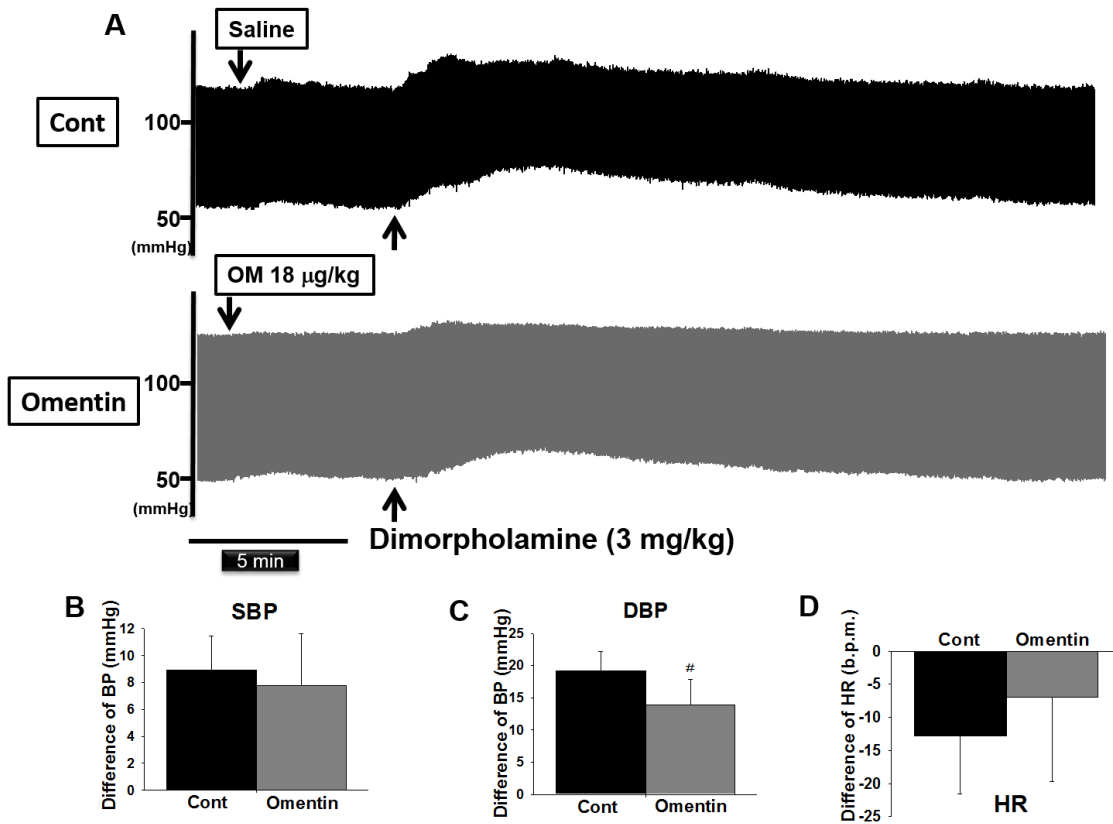


Fig. 23 Effect of omentin on dimorpholamine-induced increases of BP in Wistar rats.

Representative recordings of BP in Wistar rats which were intravenously injected with dimorpholamine (3 mg/kg) in the presence of saline (control; Cont) or omentin (18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were shown (n=7) (A). Bar graph showed the changes of BP (SBP; B, and DBP; C) and HR (D) after injection with dimorpholamine (3 mg/kg). #p<0.05 vs. Cont.

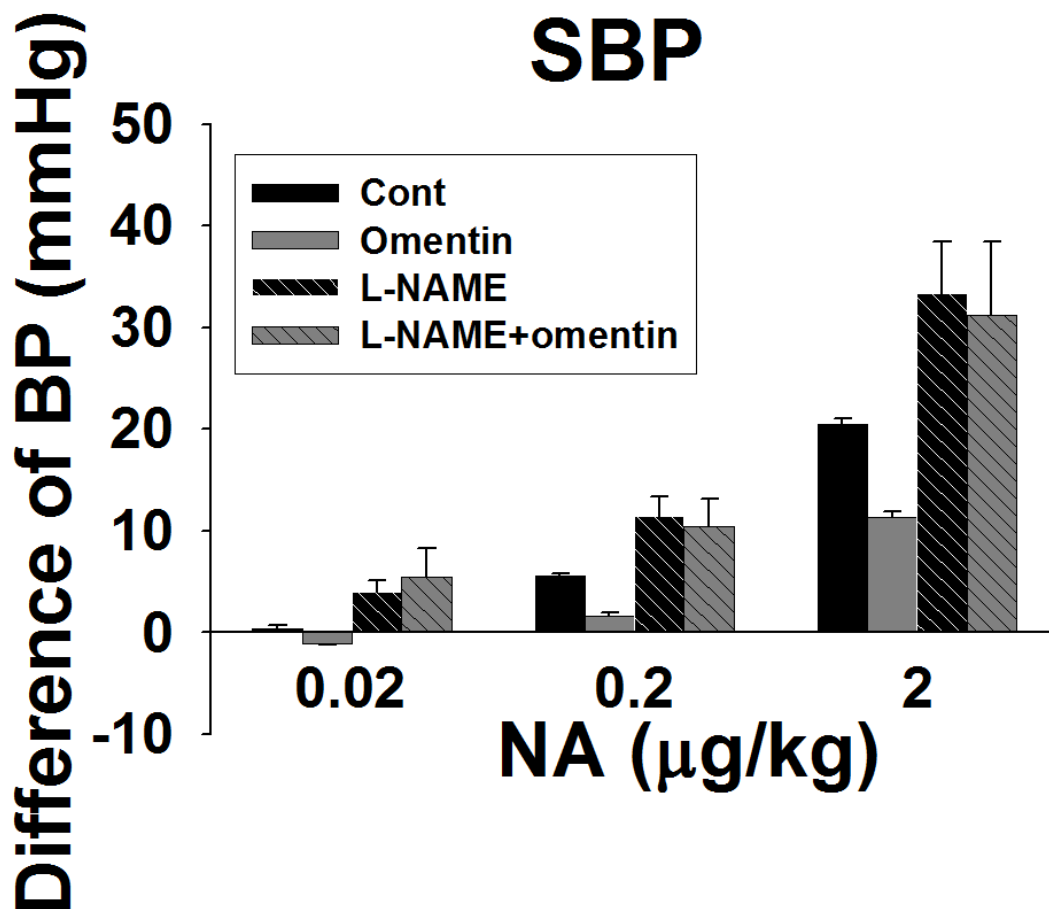


Fig. 24 Effect of omentin on NA-induced increases of SBP in N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-treated Wistar rats.

L-NAME (80 mg/kg) was dissolved in drinking water and given to Wistar rats one day before BP measurement. Bar graph showed the increases of SBP after injection with NA (0.02-2 µg/kg) in the control (Cont; n=11), omentin (18 µg/kg) (n=16), L-NAME (n=5), and L-NAME + omentin (n=8) groups.

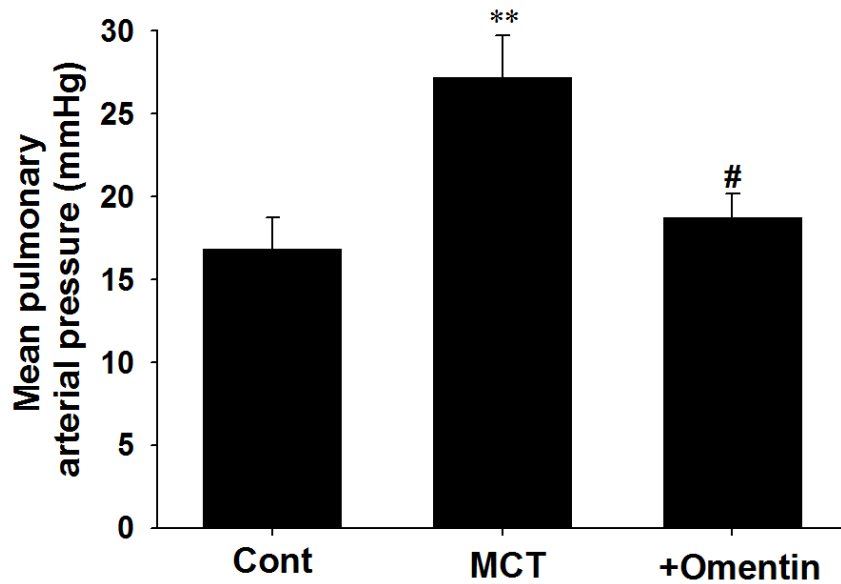


Fig. 25 Effect of chronic omentin treatment on monocrotaline (MCT)-induced increases in mean pulmonary arterial (PA) pressure of rats.

After saline (Control; Cont, n=8) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats (5-week-old), saline (MCT, n=10) or omentin (+Omentin; 18  $\mu$ g/kg/day, n=8) was intraperitoneally treated daily. After 14 days, mean PA pressure was directly measured by a cannulation method. \*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. MCT

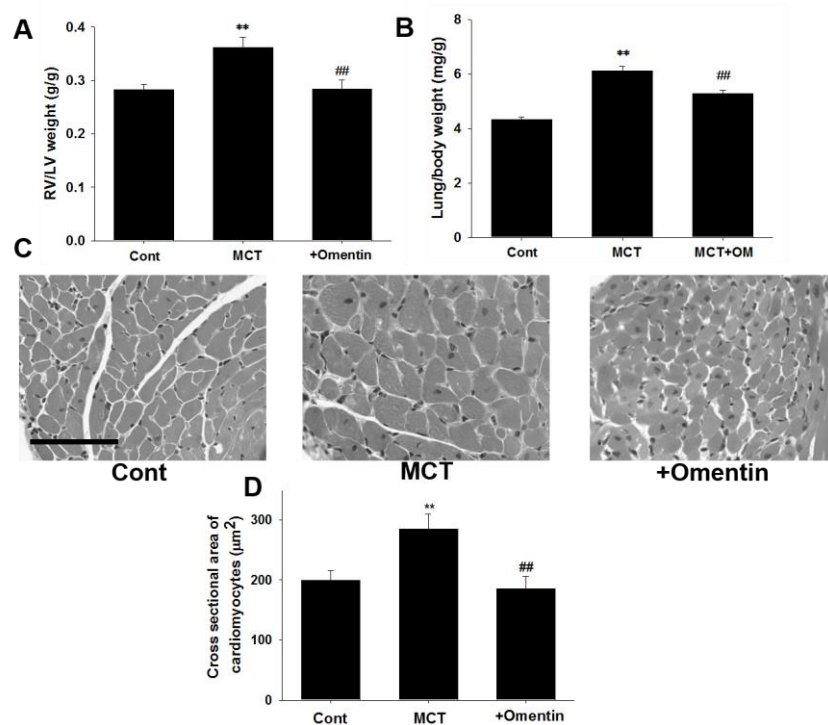
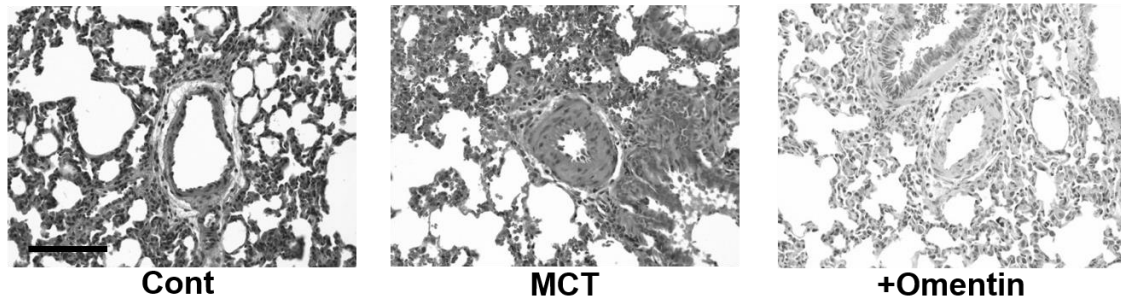


Fig. 26 Effect of omentin on MCT-induced right ventricular (RV) hypertrophy.

After saline (Control; Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, saline (MCT) or omentin (+Omentin; 18 µg/kg/day) was intraperitoneally treated daily. After 14 days, (A) RV to left ventricular (RV/LV) weight ratio (g/g, n=8) and (B) lung to body weight ratio (mg/g, n=8) were calculated and shown in the bar graph (C). Representative H&E stained sections for RV cardiomyocytes were shown (n=6-8) (D). Cross sectional area of cardiomyocytes (µm<sup>2</sup>) was calculated and shown in the bar graph (n=6-8). \*\*p<0.01 vs. Cont; ##p<0.01 vs. MCT. Scale bar; 100 µm.

**A**



**B**

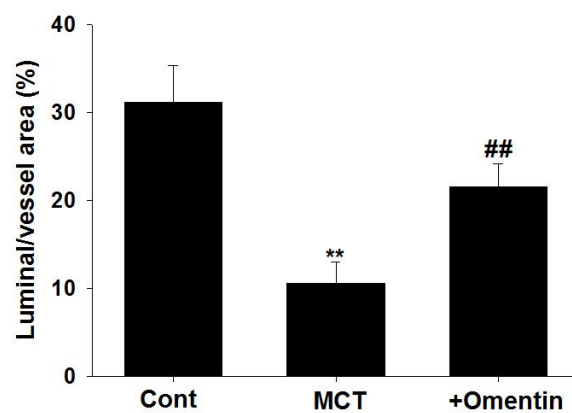


Fig. 27 Effect of omentin on MCT-induced PA hyperplasia.

After saline (Control; Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, saline (MCT) or omentin (+Omentin; 18  $\mu$ g/kg/day) was intraperitoneally treated daily. After 14 days, lungs were harvested. (A) Representative H&E stained lung sections for intrapulmonary arteries (IPAs) were shown (n=8). (B) Luminal to vessel area ratio (%) of IPAs (diameter: <100  $\mu$ m) was calculated and shown in the bar graph (n=8).

\*\*p<0.01 vs. Cont; ##p<0.01 vs. MCT. Scale bar; 100  $\mu$ m.



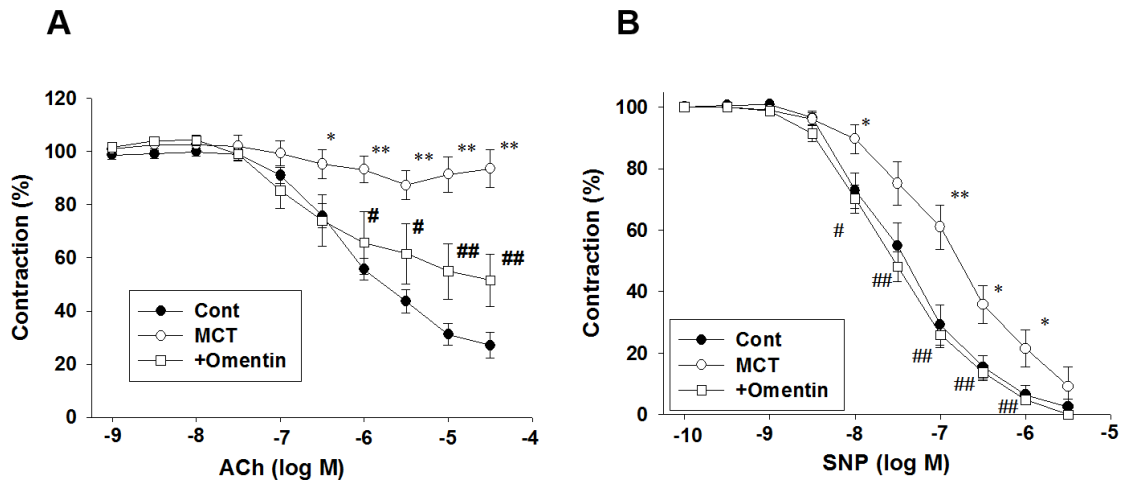


Fig. 28 Effect of omentin on MCT-induced impairment of endothelium-dependent and -independent relaxation mediated by acetylcholine (ACh, n=8-13, A) or sodium nitroprusside (SNP, n=7-8, B), respectively.

After saline (Control; Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, saline (MCT) or omentin (+Omentin; 18  $\mu$ g/kg/day) was intraperitoneally treated daily. After 14 days, IPAs were isolated. Contraction was expressed as relative to the precontraction induced by 100 nM noradrenaline. ACh (1 nM to 30  $\mu$ M) or SNP (100 pM to 3  $\mu$ M) was cumulatively applied. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. Cont; #p<0.05; ##p<0.01 vs. MCT.

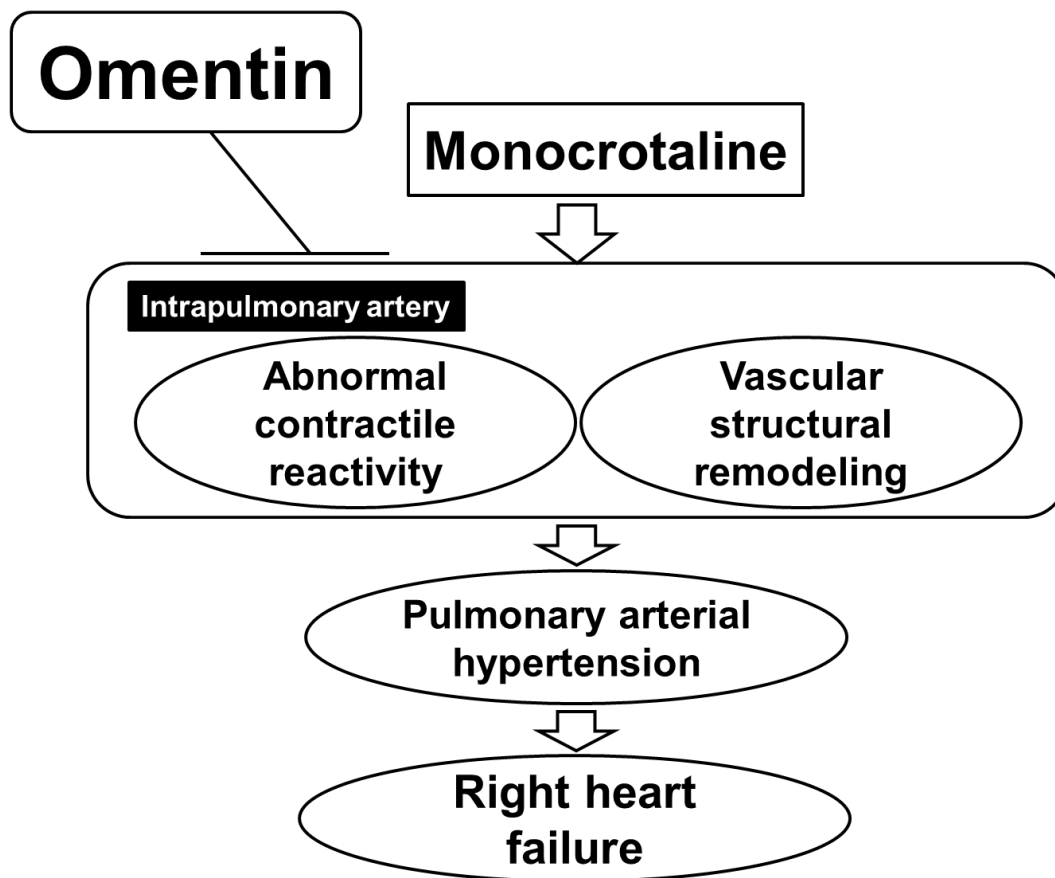


Fig. 29 Summary of the results in Chapter 4.

Chronic omentin treatment inhibits MCT-induced pulmonary arterial hypertension and right heart failure through the inhibition of vascular structural remodeling and abnormal contractile reactivity in the intrapulmonary arteries.

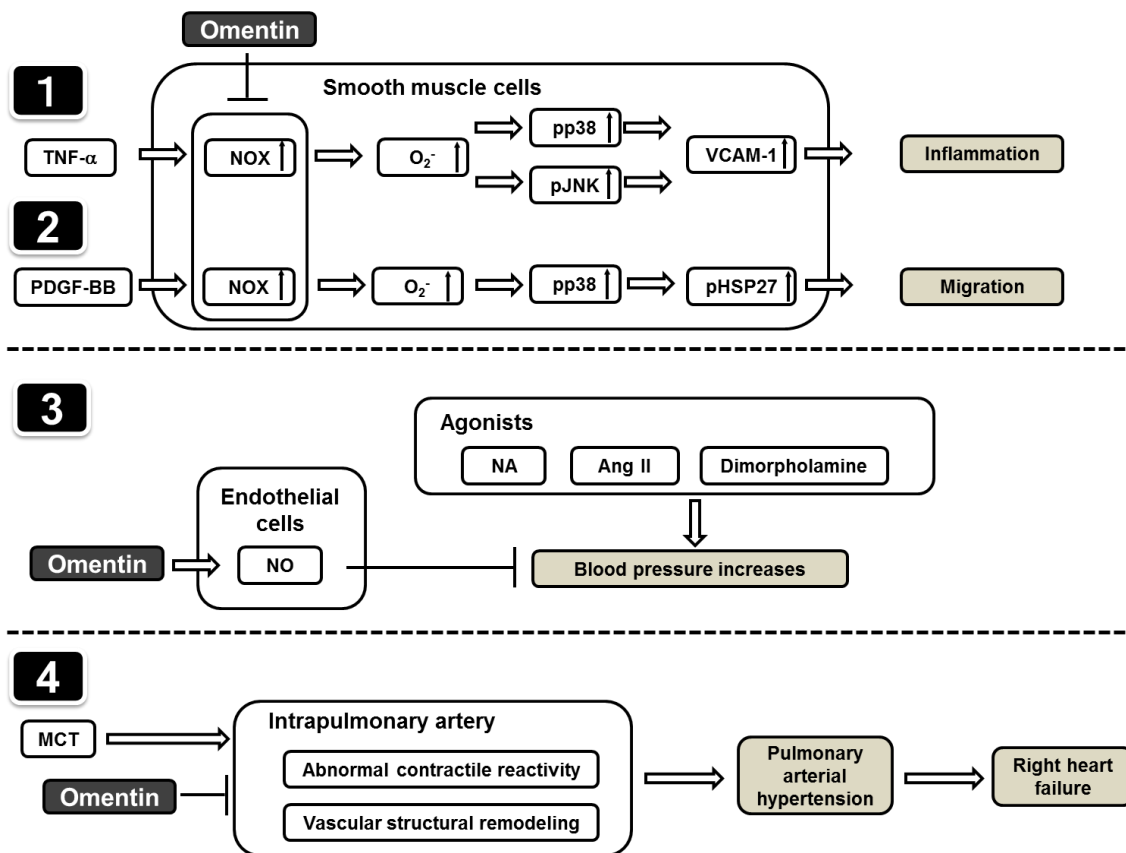


Fig. 30 Summary of the results in this research.

Omentin is anti-inflammatory (1) and anti-migratory (2) through the anti-oxidative effects in SMCs. Acute omentin treatment inhibits agonists-induced increases of blood pressure through the endothelial-derived NO production (3). Chronic omentin treatment inhibits MCT-induced pulmonary arterial hypertension and right heart failure through the inhibition of vascular structural remodeling and abnormal contractile reactivity in the intrapulmonary arteries (4).

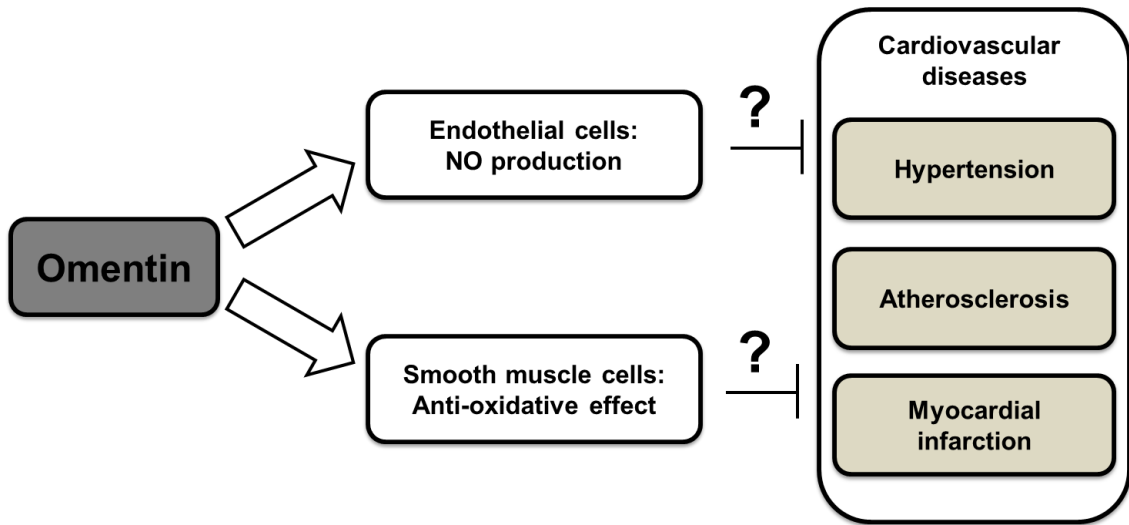


Fig. 31 Proposed cardiovascular effects of omentin

Omentin induces NO production in endothelial cells and has anti-oxidative effects in SMCs. Thus, omentin may inhibit cardiovascular diseases including not only hypertension but also atherosclerosis and myocardial infarction.