

アディポサイトカイン **chemerin** による中枢制御を介した高血圧症の
新たな病態機序解明

山本 篤範

Elucidation of a novel pathological mechanism of hypertension
through a central nervous control by adipocytokine chemerin

Atsunori YAMAMOTO

目次

I.緒言	1
II.第一章 ヒト chemerin-9 急性脳室内投与が全身血圧に及ぼす影響とメ カニズム	6
1.緒言	6
2.材料及び方法	7
2-1.材料	7
2-1-1.動物実験	7
2-1-2.試薬	7
2-1-3.一次抗体	7
2-1-4.二次抗体	8
2-2.実験方法	8
2-2-1.急性脳室内投与	8
2-2-2.非観血的血圧測定	8
2-2-3.観血的血圧測定	9
2-2-4. siRNA の脳室内投与	9
2-2-5.脳組織の摘出	9
2-2-6. Western blot 法	10
2-2-7.血清中 adrenaline 濃度測定	11
2-3.統計解析	11
3.実験結果	13
3-1. CMKLR1 siRNA 投与がヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇 圧作用に及ぼす影響	13

3-2. CMKLR1 siRNA 投与が摘出脳組織における CMKLR1 タンパク質 発現に及ぼす影響	13
3-3. ヒト chemerin-9 急性脳室内投与が血清中 adrenaline 濃度に及ぼ す影響	14
3-4. Prazosin がヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用に及 ぼす影響	14
4. 考察	22
III. 第二章 Chemerin C 末端断片の急性脳室内投与が全身血圧に及ぼ す影響	27
1. 緒言	27
2. 材料及び方法	29
2-1. 材料	29
2-1-1. 動物実験	29
2-1-2. 試薬	29
2-2. 実験方法	29
2-2-1. 急性脳室内投与	29
2-2-2. 観血的血圧測定	29
2-3. 統計解析	30
3. 実験結果	31
3-1. rChemerin-9 の急性脳室内投与がラット全身血圧に及ぼす影響	31
3-2. mChemerin-9 の急性脳室内投与がラット全身血圧に及ぼす影響	31
3-3. mChemerin-8 の急性脳室内投与がラット全身血圧に及ぼす影響	

.....	31
3-4. mChemerin-7 の急性脳室内投与がラット全身血圧に及ぼす影響	31
3-5.マウス chemerin 断片の濃度依存性の昇圧作用	32
4.考察	39
IV. 第三章 本態性高血圧症モデルラットの脳内における chemerin/CMKLR1 が全身血圧に及ぼす影響	41
1.緒言	41
2.材料及び方法	42
2-1.材料	42
2-1-1.動物実験	42
2-1-2.試薬	42
2-1-3.一次抗体	42
2-1-4.二次抗体	42
2-2.実験方法	43
2-2-1. siRNA の脳室内投与	43
2-2-2.非観血的血圧測定	43
2-2-3.脳組織の摘出	43
2-2-4.Western blot 法	43
2-3.統計解析	44
3.実験結果	45
3-1. WKY 及び SHR の脳室周囲における CMKLR1 タンパク質発現	45
3-2. WKY 及び SHR において CMKLR1 siRNA 脳室内投与(1日間) が収縮期血圧及び心拍数に及ぼす影響	45

3-3. SHR において CMKLR1 siRNA 脳室内投与(3日間)が収縮期血 圧及び心拍数に及ぼす影響	46
3-4. CMKLR1 siRNA 脳室内投与が WKY 及び SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現に及ぼす影響	46
3-5. WKY 及び SHR の脳室周囲における chemerin タンパク質発現	47
3-6. WKY 及び SHR の中枢(PVN 及び脳脊髄液)における chemerin タ ンパク質発現	47
3-7. WKY 及び SHR の末梢(血漿及び脂肪組織)における chemerin タ ンパク質発現	47
4. 考察	56
V. 総括	60
VI. 謝辞	69
VII. 引用文献	70

I. 緒言

ヒトの本態性高血圧症は自覚症状なく推移するが、腎機能障害や心血管疾患(心筋梗塞、心不全や脳卒中)の重要なリスク因子となる[1, 47]。本態性高血圧症の原因としては遺伝的素因と環境的要因(過剰な塩分摂取、肥満や喫煙習慣など)が挙げられる。高血圧症に関わりのある遺伝子は複数[*CAVI* (カベオラの主要な構成要素), *AGT/NM* (アンジオテンシノーゲン産生に關与する), *SGKI* (神経細胞の興奮性などに關与する)など]報告されているが、決定的な原因遺伝子は同定されていない[47]。環境的要因による高血圧症は生活習慣病の1つであり、特に肥満による交感神経の活性化を介した高血圧症が重要である。肥満による交感神経の活性化の原因として脂肪組織から産生・分泌された *leptin* が中枢に作用することがある[58]。加えて、中枢のレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (*renin-angiotensin-aldosterone system: RAAS*)により産生されるアンジオテンシン II の受容体であるアンジオテンシン 1 型受容体 (*angiotensin type 1 receptor: AT1R*)の発現が中枢において亢進することが挙げられる[33]。さらに肥満に伴い血中で増加したインスリンが中枢に作用し交感神経活性が亢進することも報告されている[12]。米国の *American College of Cardiology* と *American Heart Association* が 2018 年に公表したガイドラインによると収縮期血圧が 130-139 mmHg 以上または拡張期血圧が 80-89 mmHg 以上が *stage 1* の高血圧症、収縮期血圧が 140 mmHg 以上または拡張期血圧が 90 mmHg 以上がより心疾患の合併リスクが高くなる *stage 2* の高血圧症と定義されている[43]。2010 年において世界の 18 歳以上の成人(45 億人)のうち 14 億人近くが高血圧症であると推定されている(女性: 20%、男性: 25%) [47]。さらに、

今後、平均年齢の上昇や肥満患者の増加により本態性高血圧症の患者はさらに増えることが予想される[47]。現在、ヒトの本態性高血圧症の治療に主に用いられる降圧薬としては、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、AT1R拮抗薬、カルシウム拮抗薬や利尿薬などがあるが、完全に血圧をコントロールするには至っていない[1]。最近、RAASとネプリライシン(ナトリウム利尿ペプチドの分解酵素)を同時に阻害することにより、心血管系と交感神経活性の抑制に加えて利尿作用を示す新規の降圧薬[アンジオテンシン受容体ネプリライシン阻害薬(angiotensin receptor neprilysin inhibitor: ARNI)]が承認された。[32, 56]。しかしながら、新たな視点に立った新規の降圧薬の開発は今もなお求められている。

長らく脂肪組織の役割はエネルギーの貯蔵だと考えられてきた。しかしながら、近年、様々なサイトカイン(アディポサイトカイン)を分泌する内分泌器官として注目されている[80]。アディポサイトカインの1つである chemerin は *retinoic acid receptor responder protein (RARRES)2/tazarotene-induced gene (TIG)2* 遺伝子にコードされる分泌タンパク質である[60]。ヒト chemerin は非活性型の prochemerin (aa21-163)として分泌された後、C末端がプロテアーゼにより切断されることで、活性型 chemerin となる[81]。ヒトにおいて chemerin は白色脂肪組織(white adipose tissue: WAT)に高発現するが、肝臓、肺及び皮膚にも発現が認められる[20, 26]。発見当初の chemerin の役割は樹状細胞やマクロファージの走化作用であったが、新たな役割として前駆脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化や脂質代謝の調節作用が明らかになった[59, 73]。さらに、chemerin の血中濃度は肥満指数と正の相関を示すことから、肥満症のバイオマーカーとしての有用性も示唆されている[3]。

Chemerin の受容体として chemokine-like receptor 1 (CMKLR1)、

chemokine (CC motif) receptor-like 2 (CCRL2)及び G protein-coupled receptor 1 (GPR1)が同定されている[60]。CMKLR1 は樹状細胞、マクロファージと WAT をはじめ、肺、心臓、胎盤、血管平滑筋及び内皮細胞に発現が認められる[20, 26, 34, 38]。さらに、CMKLR1 は海馬及び大脳皮質の神経細胞、アストロサイト及びミクログリアなどの中枢神経系にも発現することが報告されている[83]。当研究室は以前に、マウス全長 chemerin (aa17-156)がラット血管平滑筋細胞の CMKLR1 を介して Akt 及び extracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化を亢進することで増殖・遊走能を促進すること、またマウス全長 chemerin のマウスにおける長期間腹腔内投与が収縮期血圧を上昇させることを明らかにした[41]。さらに、ヒト chemerin の活性断片で 149-157 番目のアミノ酸配列に相当するヒト chemerin-9 は血管周囲脂肪組織の交感神経に発現する CMKLR1 を介してラット前腸間膜動脈の収縮反応を増強することが明らかにされている[14]。高血圧の発症・進展において、血管平滑筋細胞の増殖・遊走による血管壁の肥厚(リモデリング)と血管の収縮性増強は末梢における重要なメカニズムである[69]。よって、末梢における chemerin/CMKLR1 は、本態性高血圧症の病態において重要な役割を果たすことが示唆される。CCRL2 は CMKLR1 と同様に樹状細胞やマクロファージ、肺、心臓及び脳に発現するが、シグナル伝達を引き起こさないデコイ受容体である[27, 48, 82]。一方で、CMKLR1 が chemerin の C 末端を認識するのに対して、CCRL2 は chemerin の N 末端を認識することから、CMKLR1 に chemerin の C 末端を提示することで chemerin/CMKLR1 の活性上昇に寄与することも示唆されている[15]。GPR1 は骨格筋や WAT に発現が認められる[62]。GPR1 は卵巣由来株化細胞において G タンパク質依存的に β -arrestin2 を介して ERK のリン酸化を亢進することで細胞内情報伝

達を活性化する[27]。また、このシグナル経路の活性化は、胃癌細胞の浸潤性促進に関与することが明らかになった[61]。さらに、GPR1 とヒト免疫不全ウイルス感染やグルコース恒常性との関連も示唆されている[36]。

脳内には心拍出量や心血管収縮の調節を介して血圧を制御する心血管運動中枢が存在する[29]。解剖学的に心血管運動中枢は延髄吻側腹外側野(rostral ventrolateral medulla: RVLM)に存在する[29, 39]。全身血圧制御に重要な他の神経核として脳弓下器官(subfornical organ: SFO)及び視床下部室傍核(paraventricular nucleus: PVN)などがある[39]。これらの神経核から端を発する神経伝導は RVLM に収束し、脊髓中間質外側核(intermediolateral nucleus: IML)を介して心臓、血管及び腎臓などの末梢臓器に伝えられる[29, 39]。血液脳関門(blood brain barrier: BBB)により脳と末梢組織における血液と物質の交換は制限されているが、SFO、終板器官(organum vasculosum lamina terminalis: OVLT)及び最後野においては有窓性毛細血管が存在するため BBB が機能していない[30]。特に SFO は血中ホルモンやナトリウム濃度を感知することで血圧の制御に関与する[30, 39]。中枢神経系において、抑制性神経伝達物質[γ -aminobutyric acid (GABA)、グリシン]と興奮性神経伝達物質(グルタミン酸、アンジオテンシン II、アセチルコリン)のバランスが血圧制御に重要である[28, 29, 31, 39]。これらの神経伝達物質のバランスの破綻が高血圧の発症・進展に寄与するという報告がある[39]。さらに、肥満ラットの PVN において AT1R のタンパク質発現亢進による活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)産生の増加や、本態性高血圧症の実験モデルである自然発症高血圧症ラット(spontaneously hypertensive rat: SHR)の PVN において GABA の受容体(GABA_A 受容体)の発現低下による交感神経活性の亢進を介して全身

血圧が上昇するなど、PVN と高血圧症の深い関係を示唆する報告がある [13, 33]。以上より、高血圧症の病態において末梢のみならず中枢性の血圧制御機構も重要であることが示されている。

近年、中枢における chemerin の役割がいくつか報告されている。例えば、ヒト全長 chemerin のラット視床下部弓状核への投与により視床下部において食欲抑制性 (proopiomelanocortin: POMC) と促進性 (agouti-related peptide: AgRP) の両方の遺伝子発現が亢進する [4]。さらに、ヒト全長 chemerin は新生仔ラットの脳室内出血による炎症から神経を保護する作用を示す報告がある [84]。以上より、chemerin は中枢においても様々な役割を持つことが示唆されている。しかしながら、chemerin が中枢性の血圧制御機構に及ぼす影響とそのメカニズムはこれまで全く検討されていない。そこで、本研究では脳内の chemerin/CMKLR1 がラット全身血圧及び高血圧症の病態に及ぼす影響とメカニズムを明らかにすることを目的として、以下を検討した。第一章では、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与が正常血圧の Wistar ラットの全身血圧に及ぼす影響を交感神経活性に着目して検討した。第二章では、ヒト chemerin-9 以外の chemerin の C 末端断片 (ラット及びマウス chemerin 断片) が Wistar ラットの全身血圧に及ぼす影響を検討した。さらに第三章では、本態性高血圧症モデルラットである SHR において脳内の chemerin/CMKLR1 が全身血圧に及ぼす影響を検討した。

II.第一章 ヒト chemerin-9 急性脳室内投与が全身血圧に及ぼす影響とメカニズム

1.緒言

当研究室は以前に、マウス全長 chemerin が CMKLR1 を介してラット血管平滑筋細胞の増殖・遊走能を促進すること、またマウス全長 chemerin のマウスにおける長期間腹腔内投与が収縮期血圧を上昇させることを明らかにした[41]。さらに、ヒト chemerin-9 はラット血管周囲脂肪組織の交感神経に発現する CMKLR1 を介してラット前腸間膜動脈の収縮反応を増強することが明らかにされている[14]。これらの報告から、末梢における chemerin/CMKLR1 は全身血圧の上昇に関与し、本態性高血圧症の病態においても重要な役割を果たすことが示唆される。

近年、中枢における chemerin の役割がいくつか報告されている。例えば、ヒト全長 chemerin のラット視床下部弓状核への投与により食欲抑制性 (POMC) と促進性 (AgRP) の遺伝子発現が亢進する[4]。さらに、ヒト全長 chemerin は新生仔ラットの脳室内出血による炎症から神経を保護する作用を示すことが報告されている[84]。以上より、chemerin は中枢においても様々な役割を持つことが示唆される。しかしながら、chemerin が中枢性血圧制御に及ぼす影響とそのメカニズムはこれまで全く検討されていない。そこで第一章では、chemerin の中枢性血圧制御における役割を包括的に検討するため、脳室に面している部位 (SFO や PVN) に広く作用する脳室内投与の手法を用いて、ヒト chemerin-9 急性投与が Wistar ラット全身血圧に及ぼす影響とメカニズムを解明することを目的とした。

2.材料及び方法

2-1.材料

2-1-1.動物実験

動物の飼育と取り扱いは北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 19-217, 19-227)、北里大学動物実験委員会が策定したガイドラインを遵守して行った。実験には雄性 Wistar ラット(9-11 週齢、CLEA, Tokyo, Japan)を使用し、本学部 5 号館または 9 号館の実験動物飼育室で固形飼料(CE2; CLEA)を給餌し、自由飲水で飼育した。

2-1-2.試薬

Recombinant ヒト chemerin-9 (YFPGQFAFS) (RP20248, Genscript, Piscataway, NJ, USA), prazosin (P0938, Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan), CMKLR1 small interfering RNA (siRNA) (Nippon Gene Material, Toyama, Japan) 及びユニバーサルネガティブ Control (Cont) siRNA (Nippon Gene Material)。CMKLR1 siRNA の標的塩基配列は以下の通りである。

Gene (gene accession number)	Sequence
CMKLR1 (NM_022218)	5'-CCAUCGUCUUCAAGUUGCA-dTdT-3'

2-1-3.一次抗体

Anti-ChemR23 (CMKLR1: sc-398769, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 及び anti-glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (GAPDH: 016-25523, Wako, Osaka, Japan)。

2-1-4. 二次抗体

Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase (HRP)-linked whole antibody (7076S, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)。

2-2. 実験方法

2-2-1. 急性脳室内投与

Wistar ラットにブプレノルフィン(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan)を皮下投与した。イソフルラン(導入: 5%、維持: 2-3%; Wako)吸入麻酔下でラットにイヤバー(SR-5R-HT, NARISHIGE, Tokyo, Japan)を装着し、頭部を脳定位置固定装置(SR-5R-HT, NARISHIGE)に固定した。頭蓋骨を露出させ、bregma と lambda の座標を読み取りラットの頭部が水平になるように高さを調節した。Bregma から尾側へ 0.8 mm、右方向へ 1.5 mm の部位にドリルで穴を開け、投与点とした[67]。マイクロマニピュレーター(SM15-R, NARISHIGE)に接続したインジェクションカニューレを投与点から脳室内へ向けて 4-4.5 mm 刺入した。溶媒の人工脳脊髄液 (artificial cerebro-spinal fluid: aCSF, 2 $\mu\text{l}/\text{head}$)またはヒト chemerin-9 (10 nmol/2 $\mu\text{l}/\text{head}$)の投与を 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ の速さで 20 分間隔でマイクロシリンジ(ITO CORPORATION, Shizuoka, Japan)を用いて行った。実験の最後にエバンスブルー(2 $\mu\text{l}/\text{head}$)を投与して着色を確認することにより脳室内投与の成否を判定した。

2-2-2. 非観血的血圧測定

意識下における Wistar ラットの収縮期血圧を非観血血圧測定装置 (BP-98AL, Softron, Tokyo, Japan)を用いてテイルカフ法により測定した[70]。

2-2-3. 観血的血圧測定

Wistar ラットにブプレノルフィン(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を皮下投与し、イソフルラン(導入: 5%、維持: 2-3%)吸入麻酔下で1%ヘパリン(AY PHARMACEUTICALS, Tokyo, Japan)加生理食塩水を満たしたカテーテルを左頸動脈及び右大腿静脈より挿入した。左頸動脈に挿入したカテーテルは MLT0670BP トランスデューサー(AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA), ML117BP Amp (AD instruments)及び ML825 PowerLab2/25 システム(AD instruments)に接続し、観血的に血圧を測定してデータをコンピューター内に記録した[37]。

2-2-4. siRNA の脳室内投与

Wistar ラットにブプレノルフィン(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を皮下投与した。イソフルラン(導入: 5%、維持: 2-3%)吸入麻酔下でラットにイヤーパー(NARISHIGE)を装着し、頭部を脳定位置固定装置(NARISHIGE)に固定した。Cont siRNA または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head)と in vivo jet PEI 試薬(Polyplus transfection, Illkirch-Graffenstanden, France)を混和し、総量が 4.3 μl になるように 10%グルコース溶液で希釈した。siRNA の脳室内投与は 2-2-1.急性脳室内投与の項に準じて行った。Cont siRNA または CMKLR1 siRNA の脳室内投与 3 日後に chemerin-9 急性脳室内投与(2-2-1.急性脳室内投与)または脳組織の採材(2-2-5.脳組織の摘出)を行った。

2-2-5. 脳組織の摘出

Wistar ラットをイソフルラン(5%)深麻酔により安楽殺した。ラットから全脳を摘出した。SFO, PVN 及び側脳室周囲を摘出するため、氷上で脳を 1 mm 厚のスライスにした。スライスは bregma から尾側へ約 0.5-1.5 mm と約 1.5-2.5 mm の部位で作製した。SFO は前方のスライスから、PVN は後方のスライスから摘出し、側脳室周囲は両方のスライスから摘出した[55]。

2-2-6. Western blot 法

摘出・採材した脳組織を液体窒素で急速凍結し、乳鉢と乳棒を用いて破碎した。破碎したサンプルに protease inhibitor mixture (0.1%) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を含む lysis buffer [組成; 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃Vo₄, 1 μ g/ml leupeptin (Cell Signaling Technology)]を室温で 10 分間反応させ可溶化した後、遠心分離(13000 rpm, 4 °C, 10 min)した。上清を回収し組織タンパク質抽出液とした。サンプル中のタンパク質濃度は bicinchoninic acid 法 (Pierce, Rockford, IL, USA)を用いて定量した。等量のタンパク質 (10 μ g)を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10%)で分離(80-120 V, 1.5-2 h)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 h)。転写膜をスキムミルク (0.5%)でブロッキングした後、一次抗体(1:500-2000 希釈)を 4 °Cで一晩反応させた。転写膜に HRP 標識二次抗体(1:10000 希釈, 45 min)を反応させた後、化学発光試薬(EZ-ECL system; Biological Industries Kibbutz, Beit-Haemek, Israel)を 3 分間処置し、Light-capture 装置(AE-6971/2 型 c/FC, ATTO, Tokyo, Japan)を用いてバンドを可視化した。タンパク質が等量

泳動されていたことは GAPDH の発現量で確認した。可視化したバンドは CS Analyzer 3.0 software (ATTO)を用いて定量・解析した[54]。

2-2-7.血清中 adrenaline 濃度測定

Wistar ラットにブプレノルフィン(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を皮下投与し、イソフルラン(導入: 5%、維持: 2-3%)吸入麻酔下で 1%ヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテルを血圧測定のため左頸動脈より、採血のため右大腿動脈より、輸液のために右大腿静脈より挿入した。全身血圧の測定は 2-2-3.観血的血圧測定 の項に準じて行った。循環血液量を維持するために MINIPLUS 3 Peristaltic Pump (GILSON, Middleton, WI, USA)を用いて滅菌生理食塩水を輸液した。aCSF (2 $\mu\text{l}/\text{head}$)またはヒト chemerin-9 (10 nmol/2 $\mu\text{l}/\text{head}$)の急性脳室内投与を 2-2-1.急性脳室内投与 の項に準じて行った。各試薬の投与前と投与 2.5 分後に大腿動脈より動脈血を採血した。血清サンプルを得るために、動脈血を遠心分離(3000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min)した。血清サンプル(100 μl)、活性アルミナ(30 mg)、3,4-dehydroxybenzylamine (DHBA, 1 ng)及び 0.5 M Tris Buffer (pH 8.6, 3 ml)を混和し、10 分間震盪後、上清を除去した。アルミナを氷冷 milliQ 水で 3 回洗浄し、吸着した adrenaline を 4%酢酸溶液で溶出した後、high performance liquid chromatography (HPLC)法に使用した。移動相[組成; 85% 0.1 M NaH_2PO_4 (pH 6.0), 15% methanol, 750 mg/l, 1-octane sulfate sodium, 50 mg/l EDTA dihydrate]を 0.18 ml/min で流し、電気化学検出器(450 mV) (ECD-300₂, Eicom, Kyoto, Japan)を用いて測定した。DHBA のピーク値との比から、血清中 adrenaline 濃度を定量した。保持時間は adrenaline を 7.8 分、DHBA を 14.2 分とした。HPLC カラムは Eicompak CA-50SD (Eicom)を使用した[52]。

2-3.統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計評価は Student の t 検定(図 3)、一元配置分散解析(one-way ANOVA) (図 4)または二元配置分散解析(two-way ANOVA) (図 1, 2, 5)を行った後に Bonferroni の *post-hoc* 検定を行い評価した。危険率 5%未満($P<0.05$)を有意差ありと判断した。

3. 実験結果

3-1. CMKLR1 siRNA 投与がヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用に及ぼす影響

最初に、CMKLR1 siRNA 投与が Wistar ラットの意識下における血圧に及ぼす影響を検討したところ、Cont siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットと CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットの間で収縮期血圧(day 1-3)に差はなかった(図 1, n=4)。次にヒト chemerin-9 急性脳室内投与による全身血圧の変化と CMKLR1 siRNA が及ぼす影響を検討した。Cont siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットにおいて、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は 2-4 分後をピークとして平均血圧を有意に上昇させた(図 2A, B, n=6, Δ mean blood pressure: 3.9 ± 1.7 mmHg at 3 min, $P < 0.05$ vs. aCSF)。平均血圧の上昇は 10 分以内にベースラインまで戻った。一方で CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットにおいて、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は平均血圧に影響を及ぼさなかった(図 2C, D, n=6)。

3-2 CMKLR1 siRNA 投与が摘出脳組織における CMKLR1 タンパク質発現に及ぼす影響

次に、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与が脳室周囲における CMKLR1 タンパク質発現に及ぼす影響を Western blot 法を用いて検討した。Cont siRNA 投与ラットと比較して、CMKLR1 siRNA 投与ラットの PVN において CMKLR1 タンパク質発現が減少していた(図 3A, C, n=4)。一方で、SFO と側脳室周囲の CMKLR1 タンパク質発現は

CMKLR1 siRNA 投与ラットと Cont siRNA 投与ラットの間で差はなかった(図 3A, B, D, n=4)。

3-3. ヒト chemerin-9 急性脳室内投与が血清中 adrenaline 濃度に及ぼす影響

ヒト chemerin-9 急性脳室内投与が交感神経活性に及ぼす影響を検討するため、ヒト chemerin-9 (10 nmol/2 μ l/head)急性脳室内投与前と投与 2.5 分後の血清中 adrenaline 濃度を HPLC 法により測定した。Cont siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットにおいて、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は血清中 adrenaline 濃度を上昇させた(Δ adrenaline: 147.7 \pm 61.8 pg/ml, Chemerin-9 vs. 24.1 \pm 14.6 pg/ml, aCSF、図 4, n=4)。一方で、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットにおいては、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は血清中 adrenaline 濃度に影響を及ぼさなかった(Δ adrenaline: 64.2 \pm 18.1 pg/ml, Chemerin-9 vs. 50.3 \pm 13.2 pg/ml, aCSF、図 4, n=5)。

3-4. Prazosin 静脈内投与がヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用に及ぼす影響

ヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用が交感神経活性の亢進によるかを検討するため、 α_1 adrenaline 受容体ブロッカーである prazosin (5 μ g/kg、静脈内投与)前処置がヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用に及ぼす影響を検討した。Prazosin の溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO、静脈内投与)前処置は、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与による平均血圧上昇に影響を及ぼさなかった。一方で、prazosin 前処置

はヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用を有意に抑制した[図
5C, n=5, Chemerin-9 (prazosin) at 3 and 4 min, $P<0.05$ vs. Chemerin-9
(DMSO)]。

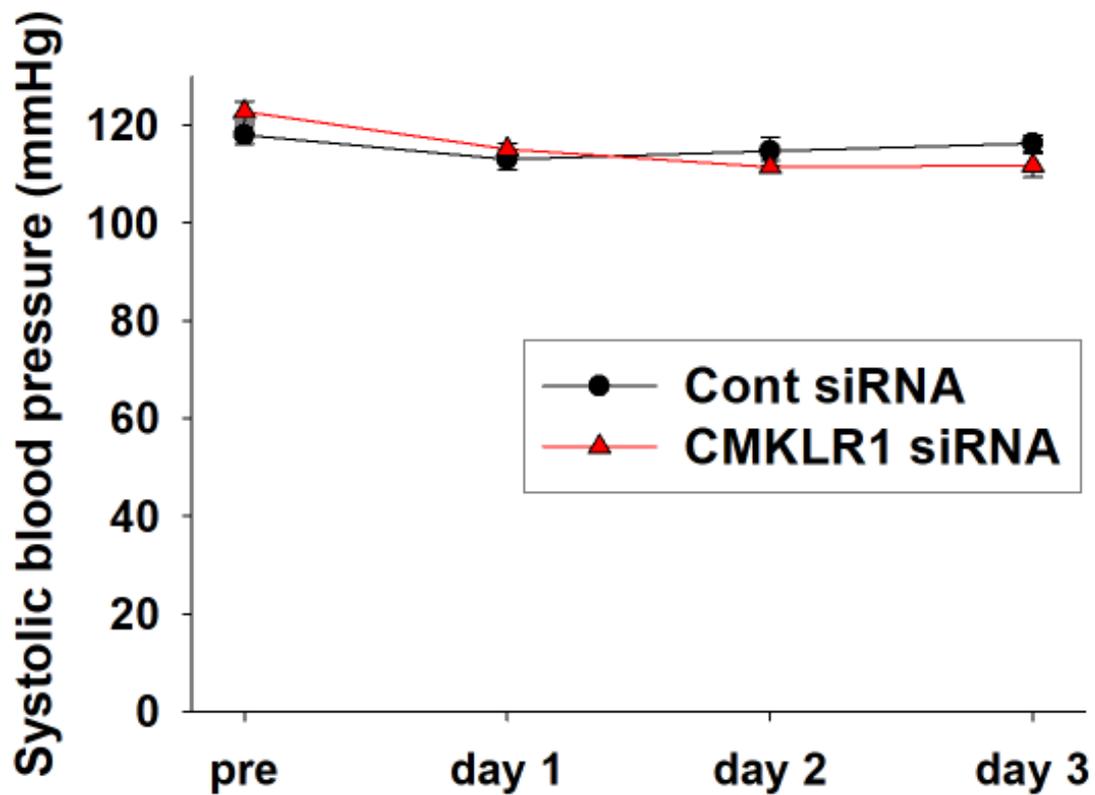


図 1. Control (Cont) small interfering RNA (siRNA)または chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) siRNA 投与が全身血圧に及ぼす影響

Wistar ラットに Cont siRNA (0.04 nmol/head)または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head)を脳室内投与した。意識下のラットの収縮期血圧をテイルカフ法により 3 日間測定し、結果をグラフで示した(平均値±標準誤差) (n=4)。Pre: siRNA 投与前、day 1-3: siRNA 投与 1-3 日後。

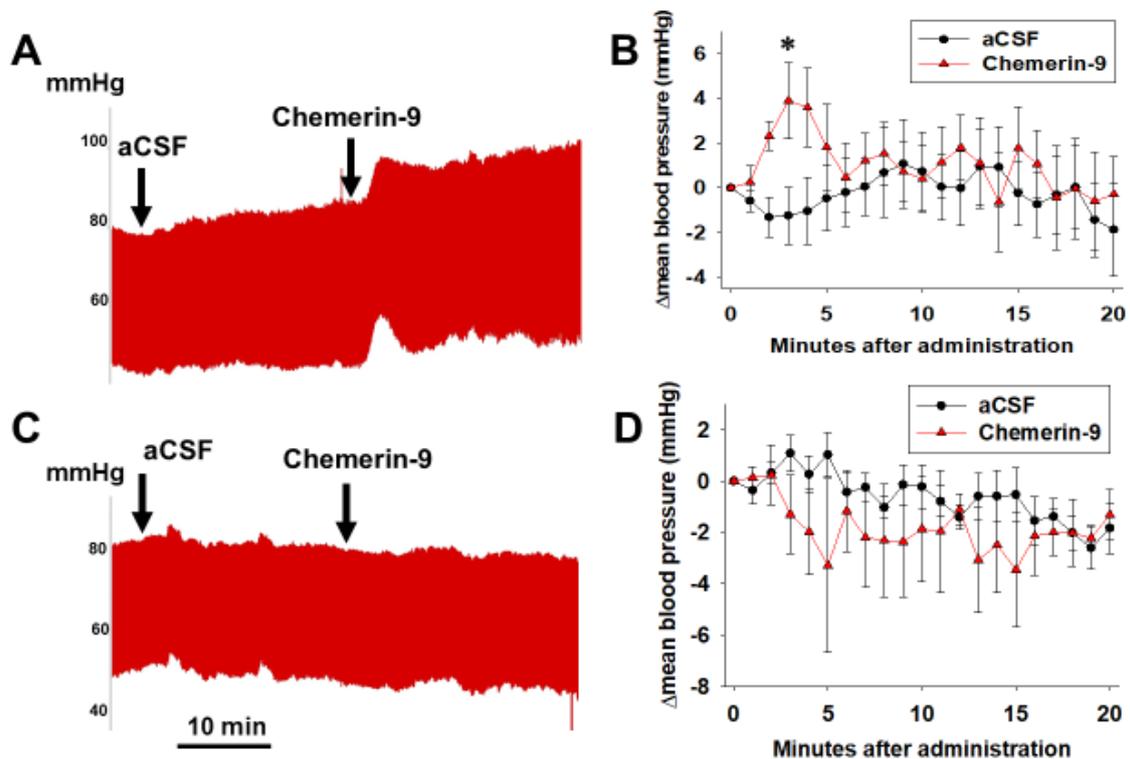


図 2. Cont siRNA または CMKLR1 siRNA 投与がヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用に及ぼす影響

Wistar ラットに Cont siRNA (0.04 nmol/head) または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head) を脳室内投与した。3 日後にイソフルラン麻酔下で頸動脈カニューレーション法により観血的に全身血圧を測定した。溶媒の人工脳脊髄液 (artificial cerebro-spinal fluid: aCSF; 2 μ l/head) またはヒト chemerin-9 (10 nmol/2 μ l/head) を急性脳室内投与した (n=6)。典型的な (A) Cont siRNA または (C) CMKLR1 siRNA 投与ラットの血圧測定の実記録を示した。(B) Cont siRNA 投与ラットまたは (D) CMKLR1 siRNA 投与ラットにおいて投与点からの平均血圧の変化 (Δ) をグラフで示した (平均値 \pm 標準誤差)。

* $P < 0.05$ vs. aCSF。

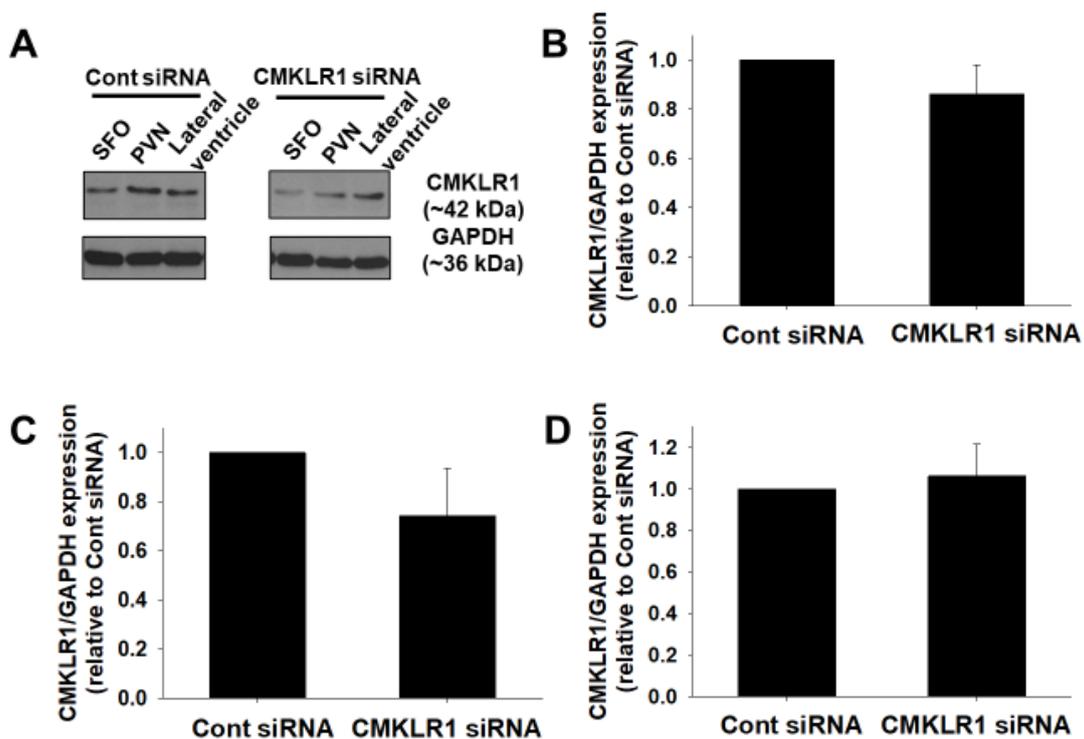


図 3. CMKLR1 siRNA 投与が抽出脳組織における CMKLR1 タンパク質発現に及ぼす影響

Wistar ラットに Cont siRNA (0.04 nmol/head) または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head) を脳室内投与した。3 日後に脳組織を抽出し、脳弓下器官 (subfornical organ; SFO)、視床下部室傍核 (paraventricular nucleus; PVN) 及び側脳室周囲 (Lateral ventricle) からタンパク質を抽出し、Western blot 法により CMKLR1 タンパク質発現を検討した (n=4)。(A) 典型的な CMKLR1 及び glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプロット像を示した。(B) SFO、(C) PVN、(D) Lateral ventricle における CMKLR1 発現を GAPDH 発現で補正し、Cont siRNA に対する比率で示した (平均値 ± 標準誤差)。

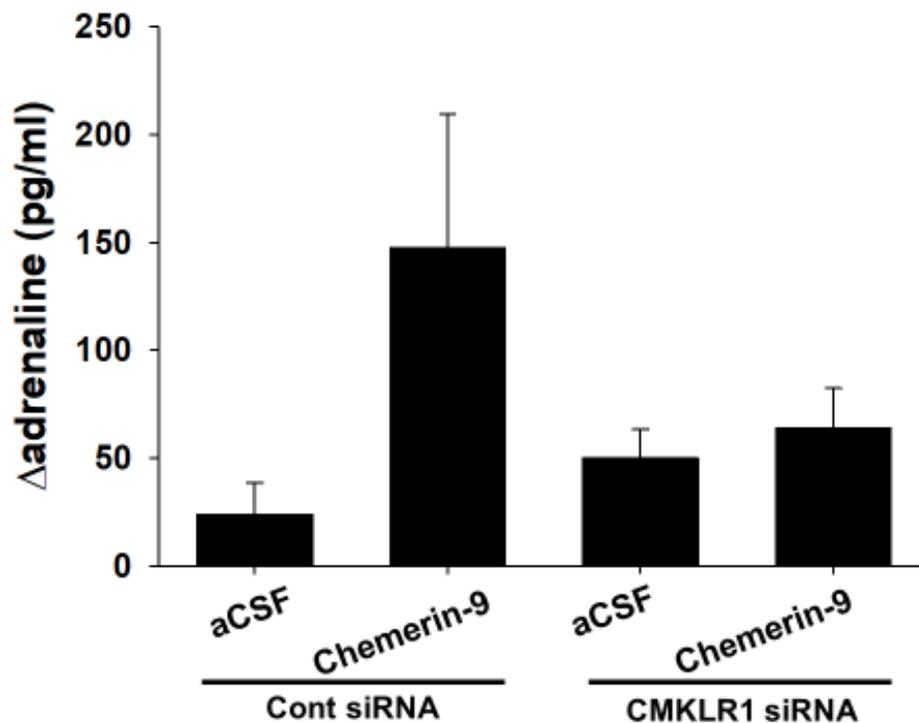


図 4. ヒト chemerin-9 急性脳室内投与が血清中 adrenaline 濃度に及ぼす影響

Wistar ラットに Cont siRNA (0.04 nmol/head)または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head)を脳室内投与した。3 日後にイソフルラン麻酔下で aCSF (2 μ l/head)またはヒト chemerin-9 (10 nmol/2 μ l/head)を急性脳室内投与した。投与前と投与 2.5 分後に大腿動脈から採血した(Cont siRNA: n=4, CMKLR1 siRNA: n=5)。血清を分離後、アルミナ吸着法を用いて血清中 adrenaline を抽出し、高速液体クロマトグラフィー法を用いて血清中 adrenaline 濃度を測定した。投与前に対する変化量(Δ)をグラフで示した(平均値 \pm 標準誤差)。

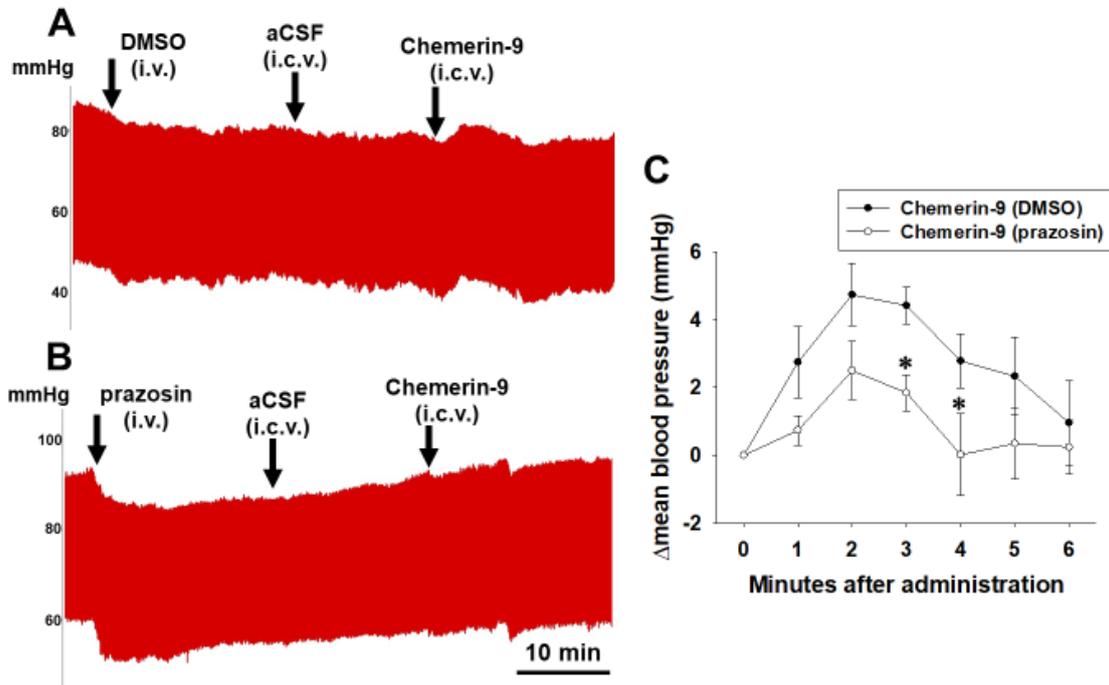


図 5. Prazosin 静脈内投与がヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用に及ぼす影響

イソフルラン麻酔下で頸動脈カニューレーション法により Wistar ラットの全身血圧を測定した。(A) 溶媒の dimethyl sulfoxide (DMSO) または (B) prazosin (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を大腿静脈より投与後、aCSF (2 $\mu\text{l}/\text{head}$) またはヒト chemerin-9 (10 nmol/2 $\mu\text{l}/\text{head}$) を急性脳室内投与した (n=5)。(A, B) 典型的な血圧測定の実記録を示した。(C) aCSF またはヒト chemerin-9 投与点からの平均血圧の変化 (Δ) をグラフで示した (平均値 \pm 標準誤差)。* $P < 0.05$ vs. Chemerin-9 (DMSO)。i.v.: intravenous injection、i.c.v.: intracerebroventricular injection。

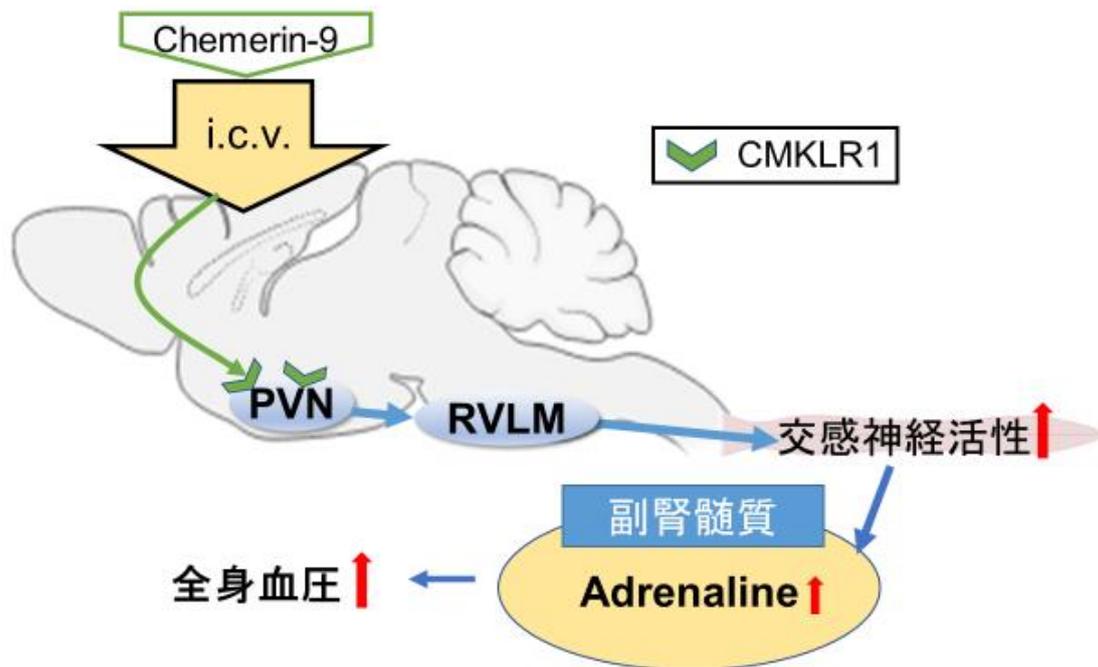


図 6. 第一章のまとめ

本章において、ヒト chemerin-9 が RVLM に投射している PVN に発現する CMKLR1 を介して交感神経を活性化させ、副腎髄質からの adrenaline 産生・分泌を介して全身血圧を上昇させることが初めて明らかになった[77]。

4. 考察

本章において、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与による Wistar ラット全身血圧に及ぼす影響を検討し、以下のことを明らかにした。1) Cont siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットと CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットの間で収縮期血圧(3日間: day 1-3)に差はなかった。2) Cont siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットにおいてヒト chemerin-9 急性脳室内投与は2-4分後をピークとして全身血圧を有意に上昇させた。一方で、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットにおいて、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は全身血圧に影響を及ぼさなかった。3) CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットの PVN において CMKLR1 タンパク質発現が減少した。4) Cont siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットにおいて、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は血清中 adrenaline 濃度を上昇させたが、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与ラットにおいては影響を及ぼさなかった。5) Prazosin 前処置(静脈内投与)はヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用を有意に抑制した。以上より、ヒト chemerin-9 は主に PVN に発現している CMKLR1 を介して交感神経を活性化させ、全身血圧を上昇させることが初めて明らかになった(図 6)。

本章において、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は Wistar ラット全身血圧を上昇させ、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days、脳室内投与)投与により昇圧作用が消失することを初めて明らかにした。脳には様々な刺激を感知し血圧の制御に関わる神経核が存在する[39]。本章においては、

CMKLR1 siRNA の脳室内投与により PVN において CMKLR1 発現が低下したことから、ヒト chemerin-9 は主に PVN に作用する可能性が示された。しかしながら、脳室内投与は脳室に面している他の部位 (SFO, OVLT や上衣細胞など) にも作用するため、これらの部位に作用する可能性も排除できない。例えば、OVLT 周囲のグリア細胞 (アストロサイトや上衣細胞) は血中や脳脊髄液中のナトリウム濃度を感知し血圧を制御する[39, 50]。グリア細胞に発現する電位依存性ナトリウムチャンネルを介してナトリウムイオンがグリア細胞内に流入すると水素イオンの放出が生じ、酸感受性イオンチャンネルを介して OVLT が活性化し PVN に投射することで全身血圧が上昇する[50]。このことから、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用は、OVLT 周囲の上衣細胞に発現する CMKLR1 を介する可能性も考えられる。一方で、ヒト chemerin-9/CMKLR1 は血管平滑筋細胞において Gi タンパク質を介して L 型カルシウムチャンネルを活性化し、カルシウム流入を引き起こすことから[18]、ヒト chemerin-9 は神経細胞に発現する CMKLR1 を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させる可能性も考えられる。神経細胞におけるカルシウム濃度の上昇はカルモジュリン依存性キナーゼ (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: CaMKII) の活性化を介して α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 受容体電流を引き起こす[46]。AMPA 受容体電流はグルタミン酸作動性神経における興奮性シナプス後電流の大部分を担う[9]。したがって、ヒト chemerin-9/CMKLR1 は PVN や OVLT などに存在する神経細胞に作用し、CaMKII の活性化を介して AMPA 受容体電流の上昇により、交感神経活性化を介した昇圧作用を引き起こす可能性が考えられる。

PVN は大細胞性神経細胞と小細胞性神経細胞の二つの領域で構成さ

れる[44]。大細胞性神経細胞は脳下垂体に投射している[44]。一方で、小細胞性神経細胞は脊髄のIMLと脳幹のRVLMに投射しており、交感神経活性を調節することにより全身血圧の制御に関わる[44]。PVNにおいて脳幹に投射している小細胞性神経細胞の約40%が vasopressin mRNA や vasopressin 受容体である V1a 受容体を発現する[22, 35, 44]。したがって、PVNの小細胞性神経細胞に vasopressin がオートクライン/パラクライン的に作用することにより活性化することが考えられる。これまで、vasopressin の脳室内投与が全身血圧、交感神経活性及び血漿中 adrenaline 及び noradrenaline 濃度を上昇させることが報告されている[16, 23, 51]。本章において、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与も同様に全身血圧及び血清中 adrenaline 濃度を上昇させることを明らかにした。よって、ヒト chemerin-9 は PVNにおいて vasopressin と類似した機構を介して、交感神経活性の亢進と昇圧作用を示す可能性も考えられる。

Chemerin は主に脂肪組織で産生されるホルモン(アディポサイトカイン)で、全身の器官に作用する[5]。これまで血中 chemerin が BBB を通過し中枢へ移行するかは明らかになっていない。しかしながら、ニワトリにおいてニワトリ chemerin の末梢投与が中枢における摂食に関する遺伝子(AgRP)発現に影響を及ぼす報告があることから[17]、血中 chemerin が BBB を通過し脳に作用する可能性はある。一方で、ラットの脳で chemerin mRNA 発現が確認されているため[25]、脳内で産生・分泌された chemerin が中枢に発現する CMKLR1 を介して昇圧作用を誘導することも考えられる。

ヒト chemerin は prochemerin (ヒト prochemerin163S)の C 末端が様々なプロテアーゼにより切断されることで活性型となる[20]。Chemerin の生物活性はその切断部位によって異なる[5]。例えば、ヒト chemerin157S (aa21-157、

137 アミノ酸残基)は最も活性が高く、ヒト chemerin156F (aa21-156、136 アミノ酸残基)も活性が高い[5]。一方で、ヒト chemerin158K (aa21-158、138 アミノ酸残基)やヒト chemerin155A (aa21-155、135 アミノ酸残基)は活性が低い[5]。本章で用いたヒト chemerin-9 はヒト chemerin157S の活性部位である C 末端 149-157 番目のアミノ酸で構成される合成ペプチドである。ヒト chemerin157S の EC₅₀ は約 4.5 nM であり、ヒト chemerin-9 の活性はヒト chemerin157S より約 40 倍低いことが報告されている(EC₅₀:約 26.4 nM) [66, 74]。ラット(12 週齢)の脳脊髄液の総量が約 280 µl であるため[10]、本章で投与したヒト chemerin-9 (10 nmol)の濃度は 36 nmol/ml であると推定される。肥満患者における血中 chemerin 濃度は約 350 ng/ml (0.022 nmol/ml) であるため[63]、本章で投与したヒト chemerin-9 の濃度は約 1600 倍高いことになる。しかしながら、ヒト chemerin-9 の活性はヒト chemerin157S より約 40 倍低いいため、本章において使用したヒト chemerin-9 の濃度は中枢局所の血圧制御機構(特に病態時)を検討する上で決して高過ぎるとは言えないかもしれない。

健常者の血中 chemerin 濃度は約 190 ng/ml であるが、肥満患者においては約 350 ng/ml まで上昇する[63]。肥満ラットにおいても血中 chemerin 濃度の上昇(正常ラット: 0.8 ng/ml、肥満ラット: 14.3 ng/ml)及び摘出胸部大動脈における CMKLR1 発現の亢進が報告されている[7, 72]。更に、肥満ラット由来摘出胸部大動脈において chemerin/CMKLR1 による収縮作用が正常ラットと比較して亢進することも報告されている[14]。よって、肥満において末梢の chemerin/CMKLR1 の発現亢進が全身血圧の上昇に関与することが示唆される。本章において、chemerin/CMKLR1 が中枢神経系の活性化を介して昇圧作用を示すことを初めて明らかにした。よって、本態性高血圧

症の病態において、**chemerin** は末梢組織(血管)のみならず、中枢性血圧制御機構にも影響を及ぼすことで昇圧に関わることが示唆される。**Leptin** や **adiponectin** は WAT から分泌されるアディポサイトカインである[6, 42]。これらのアディポサイトカインは中枢神経系に長期的に作用して摂食及び体重を調節することが報告されている[21, 58]。よって、本章において明らかにしたヒト **chemerin-9** 急性脳室内投与による昇圧作用は一過性のものであるが、肥満患者において WAT から分泌された高血中 **chemerin** が持続的に中枢神経系に作用し、血圧の上昇に関与している可能性が考えられる。

結論として、本章では **chemerin** は、RVLM に投射している PVN に発現する **CMKLR1** を活性化し末梢の交感神経活性を亢進させることで、昇圧作用を示すことが初めて明らかになった(図 6)。

III. 第二章 Chemerin C 末端断片の急性脳室内投与が全身血圧に及ぼす影響

1. 緒言

ヒト chemerin は活性のない prochemerin (aa21-163)として分泌され、C 末端がセリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼにより切断させることで、活性型 chemerin となる[81]。さらにプロテアーゼにより切断される部位によって活性が大きく異なり、ヒト chemerin157S (aa21-157: hChemerin157S)と 156F (aa21-156: hChemerin156F)の活性が高く、その他の chemerin 切断産物 [ヒト chemerin155A (aa21-155: hChemerin155A)など]は活性が低いことが報告されている [10, 74]。またマウス chemerin156S (aa17-156: mChemerin156S)及びマウス chemerin155F (aa17-155: mChemerin155F)は、hChemerin157S 及び hChemerin156F と C 末端のアミノ酸配列が高い相同性を示し、活性も高いことが報告されている[85]。以上より、chemerin の活性は C 末端の配列に依存することが示唆される。ヒト chemerin-9 は hChemerin157S の活性断片として広く研究に用いられている[18, 53]。しかしながら、種差による配列の違い(マウス及びラット chemerin-9)の生物活性は全く検討されていない。さらに、chemerin 切断産物 (hChemerin157S, 156F, 155A)の活性はこれまで *in vitro* で評価されており(hChemerin157S がカルシウム動態において最も高い活性を示す)[5]、生体内での作用、特に全身血圧に及ぼす影響は全く検討されていない。

第一章においてヒト chemerin-9 の急性脳室内投与が正常血圧の Wistar ラットの全身血圧を上昇させることを明らかにした。しかしながら、その他の

chemerin の C 末端断片が全身血圧に及ぼす影響や種差は明らかになっていない。そこで、第二章では、ラット chemerin-9 (rChemerin-9: 149F-157S)、マウス chemerin-9 (mChemerin-9: 148F-156S)、マウス chemerin-8 (mChemerin-8: 148F-155F)及びマウス chemerin-7 (mChemerin-7: 148F-155A)の急性脳室内投与を行い、Wistar ラットの全身血圧に及ぼす影響の種差および配列特異性を検討した。

2.材料及び方法

2-1.材料

2-1-1.動物実験

動物の飼育と取り扱いは北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 19-227)、北里大学動物実験委員会が策定したガイドラインを遵守して行った。実験には雄性 Wistar ラット(9-11 週齢、CLEA)を使用し、本学部 9 号館の実験動物飼育室で固形飼料(CE2; CLEA)を給餌し、自由飲水で飼育した。

2-1-2.試薬

rChemerin-9 (FFPGQFAFS), mChemerin-9 (FLPGQFAFS), mChemerin-8 (FLPGQFAF)及び mChemerin-7 (FLPGQFA) (Genscript)。

2-2.実験方法

2-2-1.急性脳室内投与

Wistar ラットの急性脳室内投与は第一章 2-2-1.急性脳室内投与の項に準じて行った。rChemerin-9, mChemerin-9, -8 または-7 の累積投与(1, 3, 10, 30 nmol/head を 20 分間隔) (1 μ l/min)をマイクロシリンジ(ITO CORPORATION)を用いて行った[67]。

2-2-2.観血的血圧測定

Wistar ラットの観血的血圧測定は第一章 2-2-3.観血的血圧測定の項に準じて行った。1%ヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテルを右大腿動

脈より挿入し、観血的に血圧を測定した[37]。

2-3.統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。二元配置分散解析 (two-way ANOVA)を行った後に Bonferroni の *post-hoc* 検定を行い評価した。危険率 5%未満 ($P<0.05$)を有意差ありと判断した。

3. 実験結果

3-1. rChemerin-9 の急性脳室内投与がラット全身血圧に及ぼす影響

Wistar ラットにおいて rChemerin-9 (1-30 nmol/2 μ l/head) の急性脳室内投与は全身血圧(平均血圧)に影響を及ぼさなかった(図 7, n=4)。

3-2. mChemerin-9 の急性脳室内投与がラット全身血圧に及ぼす影響

Wistar ラットにおいて mChemerin-9 (1-10 nmol/2 μ l/head) の急性脳室内投与は全身血圧(平均血圧)に影響を及ぼさなかった(図 8A-C)。一方で、mChemerin-9 (30 nmol/2 μ l/head) の急性脳室内投与は 2-4 分後をピークとして平均血圧を有意に上昇させた(Δ mean blood pressure: 4.5 \pm 1.0 mmHg at 3 min, $P < 0.05$ vs. aCSF, Δ mean blood pressure: 4.1 \pm 0.8 mmHg at 4 min, $P < 0.05$ vs. aCSF、図 8D, n=4)。

3-3. mChemerin-8 の急性脳室内投与がラット全身血圧に及ぼす影響

次に、Wistar ラットにおいて mChemerin-8 の急性脳室内投与が全身血圧に及ぼす影響を検討した。mChemerin-8 (1-30 nmol/2 μ l/head) の急性脳室内投与は全身血圧(平均血圧)に影響を及ぼさなかった(図 9, n=4)。

3-4. mChemerin-7 の急性脳室内投与がラット全身血圧に及ぼす影響

最後に Wistar ラットにおいて mChemerin-7 の急性脳室内投与が全身血圧に及ぼす影響を検討した。mChemerin-7 (1, 10, 30 nmol/2 μ l/head) の急性脳室内投与は全身血圧(平均血圧)に影響を及ぼさなかった(図 10A, C, D)。一方で、mChemerin-7 (3 nmol/2 μ l/head) の急性脳室内投

与は溶媒である aCSF と比較して僅かではあるが有意な昇圧作用を示した (Δ mean blood pressure; 1.7 ± 1.6 mmHg at 2 min, $P < 0.05$ vs. aCSF, Δ mean blood pressure; 2.2 ± 1.5 mmHg at 3 min, $P < 0.01$ vs. aCSF、
図 10B, n=6)。これは溶媒 (aCSF) の投与でラット全身血圧 (平均血圧) が低下したためだと考えられた。

3-5. マウス chemerin 断片の濃度依存性の昇圧作用

mChemerin-9 (1-30 nmol/2 μ l/head) は濃度依存的に昇圧作用を示した (図 11, n=4) が、mChemerin-8 (n=4) 及び mChemerin-7 (n=6) は昇圧作用を示さなかった (図 11)。

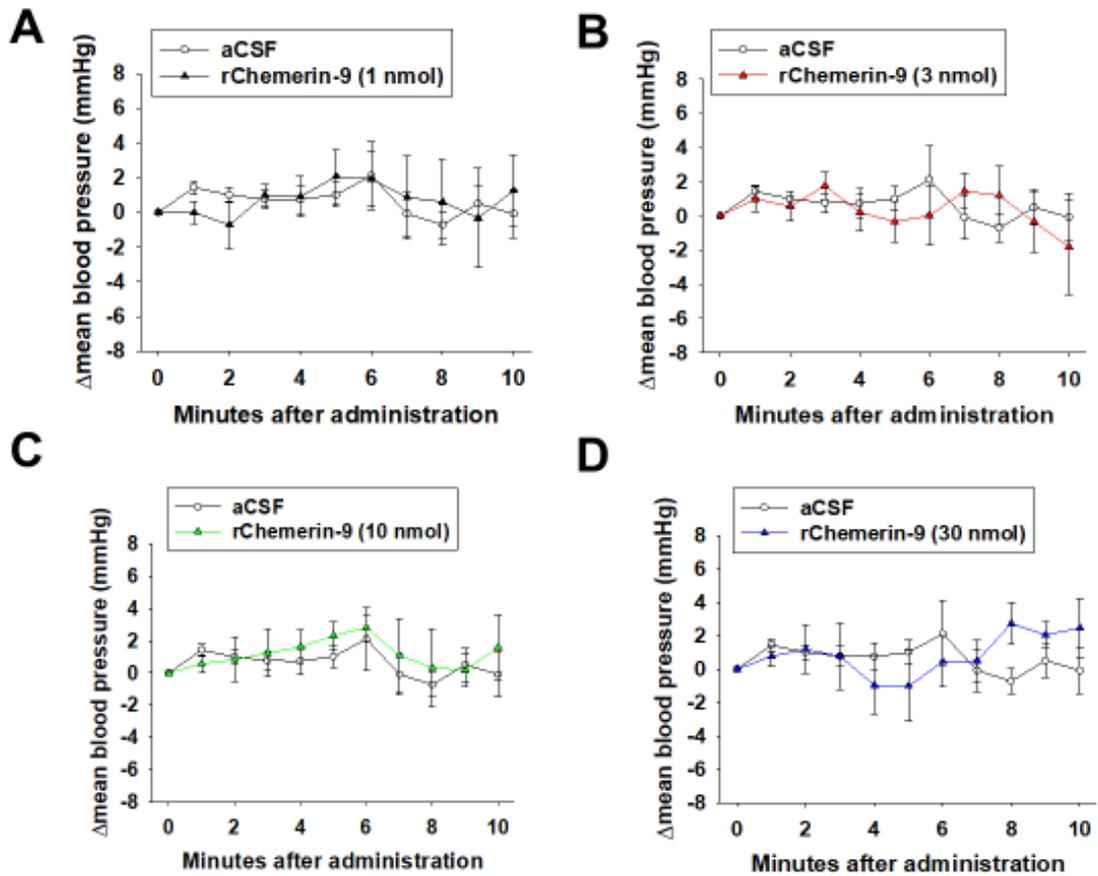


図 7.ラット chemerin-9 (rChemerin-9)の急性脳室内投与が Wistar ラット全身血圧に及ぼす影響

イソフルラン麻酔下で大腿動脈カニューレーション法により観血的に Wistar ラットの全身血圧(平均血圧)を測定した。aCSF または rChemerin-9 (1-30 nmol/2 μ l/head)を累積投与した(n=4)。(A-D)それぞれの投与点からの血圧変化(Δ) (A: 1 nmol/2 μ l/head, B: 3 nmol/2 μ l/head, C: 10 nmol/2 μ l/head, D: 30 nmol/2 μ l/head)をグラフで示した(平均値 \pm 標準誤差)。

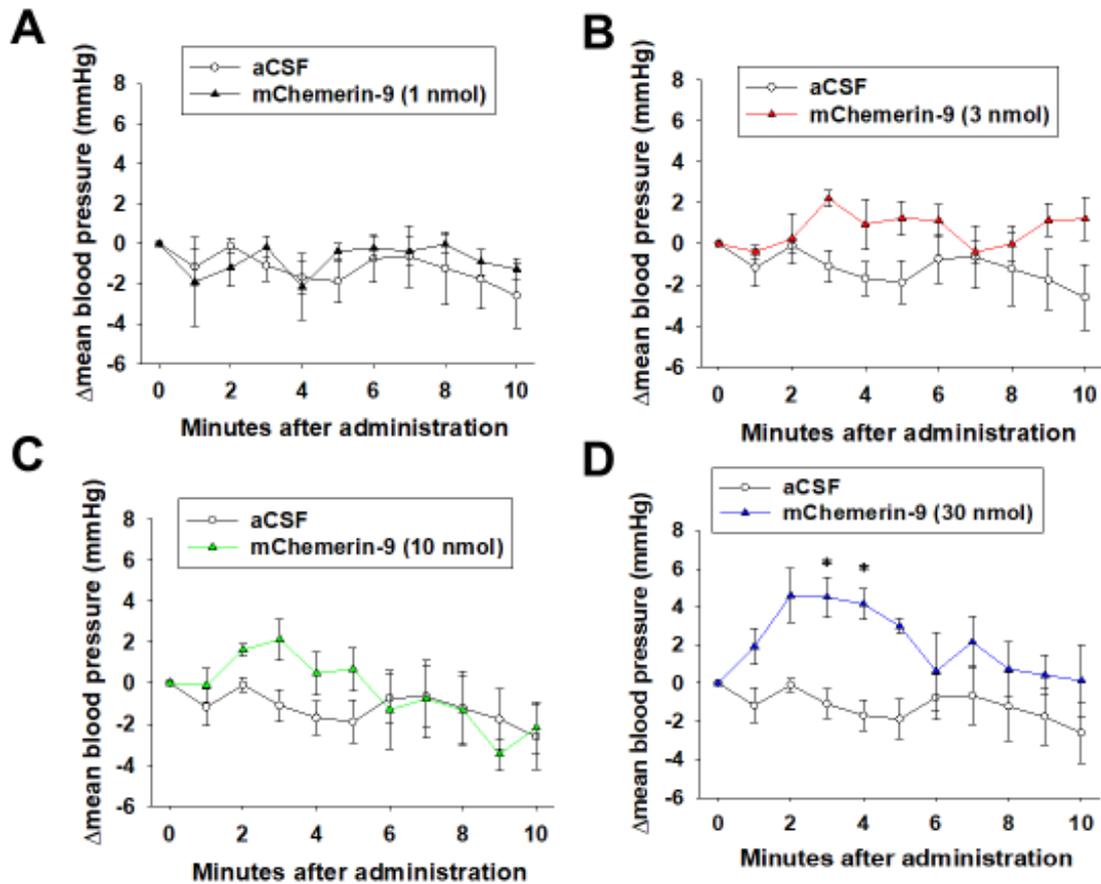


図 8. マウス chemerin-9 (mChemerin-9) の急性脳室内投与が Wistar ラット全身血圧に及ぼす影響

イソフルラン麻酔下で大腿動脈カニューレーション法により観血的に Wistar ラットの全身血圧(平均血圧)を測定した。aCSF または mChemerin-9 (1-30 nmol/2 μ l/head)を累積投与した(n=4)。(A-D)それぞれの投与点からの血圧変化(Δ) (A: 1 nmol/2 μ l/head, B: 3 nmol/2 μ l/head, C: 10 nmol/2 μ l/head, D: 30 nmol/2 μ l/head)をグラフで示した(平均値 \pm 標準誤差)。* $P < 0.05$ vs. aCSF。

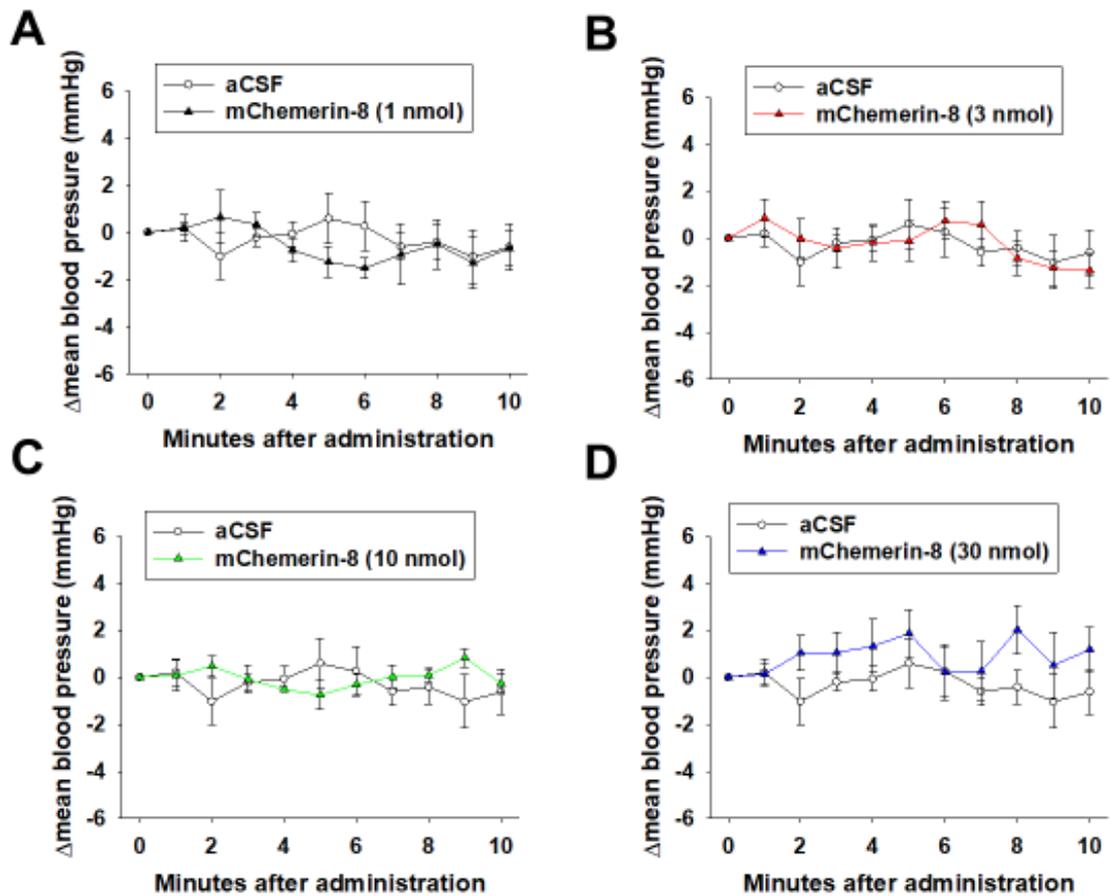


図 9.マウス chemerin-8 (mChemerin-8)の急性脳室内投与が Wistar ラット全身血圧に及ぼす影響

イソフルラン麻酔下で大腿動脈カニューレーション法により観血的に Wistar ラットの全身血圧(平均血圧)を測定した。aCSF または mChemerin-8 (1-30 nmol/2 μ l/head)を累積投与した(n=4)。(A-D)それぞれの投与点からの血圧変化(Δ) (A: 1 nmol/2 μ l/head, B: 3 nmol/2 μ l/head, C: 10 nmol/2 μ l/head, D: 30 nmol/2 μ l/head)をグラフで示した(平均値 \pm 標準誤差)。

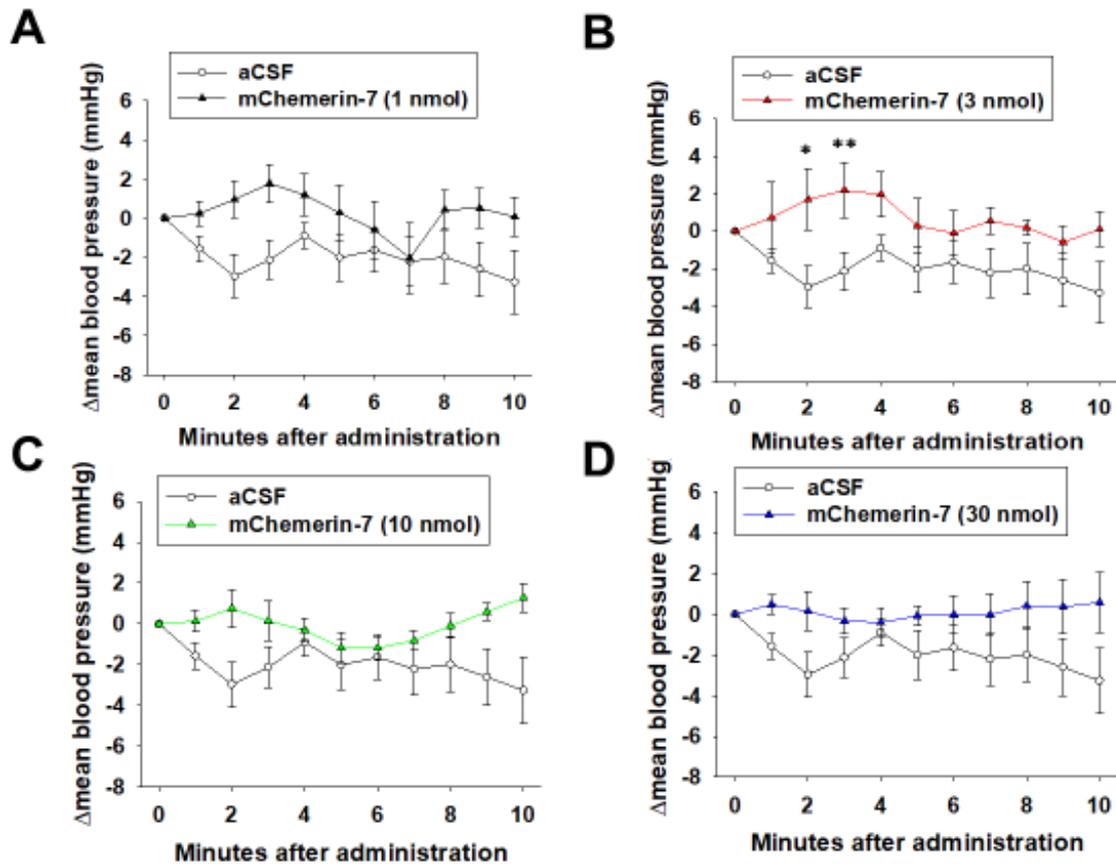


図 10. マウス chemerin-7 (mChemerin-7) の急性脳室内投与が Wistar ラット全身血圧に及ぼす影響

イソフルラン麻酔下で大腿動脈カニューレーション法により観血的に Wistar ラットの全身血圧(平均血圧)を測定した。aCSF または mChemerin-7 (1-30 nmol/2 μ l/head)を累積投与した(n=6)。(A-D)それぞれの投与点からの血圧変化(Δ) (A: 1 nmol/2 μ l/head, B: 3 nmol/2 μ l/head, C: 10 nmol/2 μ l/head, D: 30 nmol/2 μ l/head)をグラフで示した(平均値 \pm 標準誤差)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. aCSF。

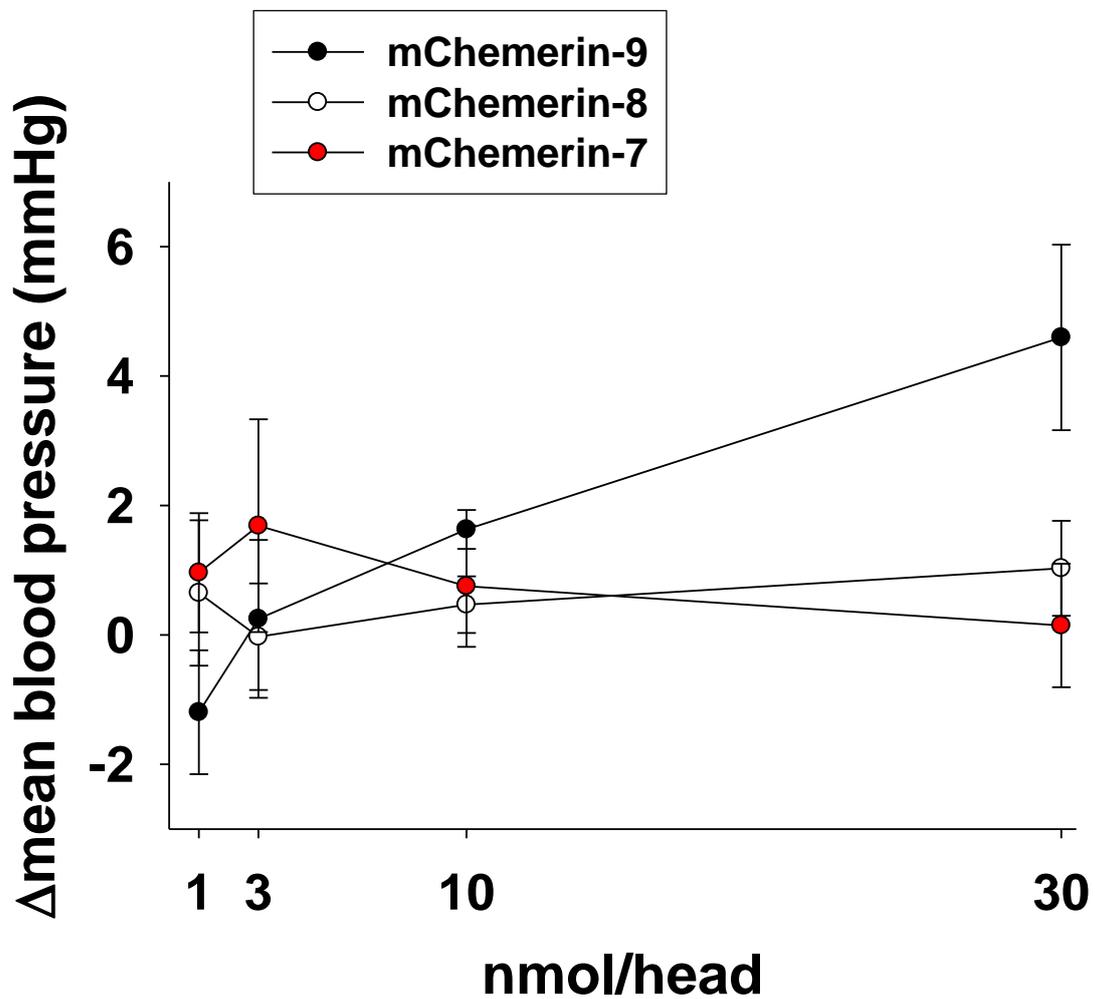


図 11. マウス chemerin 断片の濃度依存性の昇圧作用

イソフルラン麻酔下で大腿動脈カニューレーション法により観血的に Wistar ラットの全身血圧(平均血圧)を測定した。mChemerin-9, -8 及び-7 (1-30 nmol/2 μ l/head)を累積投与した(mChemerin-9: n=4, mChemerin-8: n=4, mChemerin-7: n=6)。各濃度において投与点から 2 分後の血圧変化(Δ)をグラフで示した(平均値 \pm 標準誤差)。

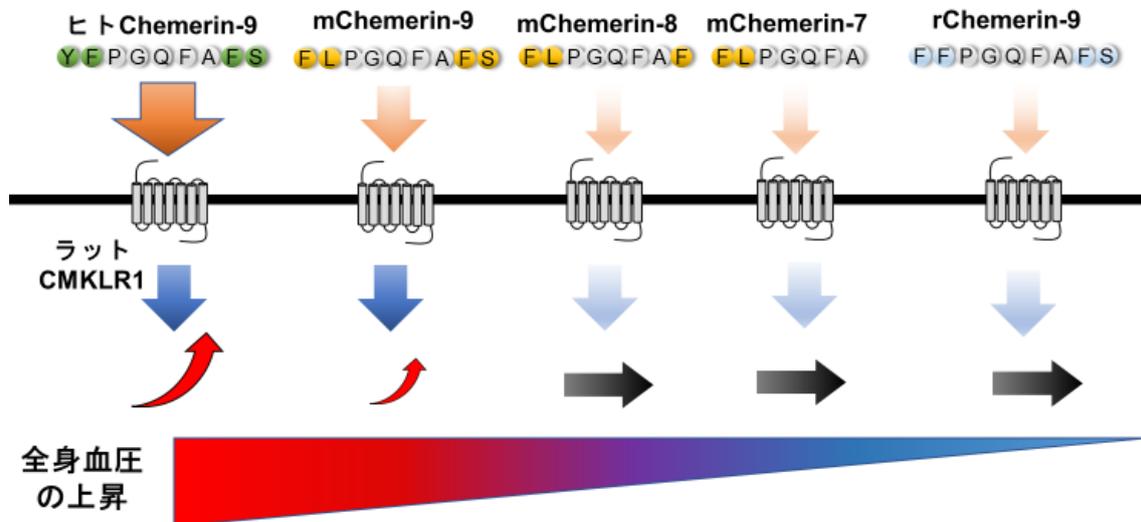


図 12. 第二章のまとめ

本章において、chemerin は C 末端の切断部位により全身血圧に及ぼす影響が異なり、マウス chemerin156S の C 末端断片 mChemerin-9 の急性脳室内投与は全身血圧(平均血圧)を上昇させるが、ラット chemerin157S の C 末端断片 rChemerin-9 とマウス chemerin155F 及び 154A の C 末端断片 mChemerin-8 及び-7 の急性脳室内投与は全身血圧(平均血圧)に影響を及ぼさないことが初めて明らかになった。また、ヒト chemerin-9 が最も強い昇圧作用を示したことから、chemerin 活性断片は C 末端の切断部位のみならず N 末端のアミノ酸配列も重要であることが示唆された[76]。

4. 考察

本章において、rChemerin-9 (FFPGQFAFS)、mChemerin-9 (FLPGQFAFS)、mChemerin-8 (FLPGQFAF) 及び mChemerin-7 (FLPGQFA)の急性脳室内投与がWistarラットの全身血圧(平均血圧)に及ぼす影響を検討し、以下のことを明らかにした。1) rChemerin-9はWistarラットの平均血圧に影響を及ぼさなかった。2) mChemerin-9は濃度依存性の昇圧作用を示し、30 nmolの投与はWistarラットの平均血圧を有意に上昇させた。3) mChemerin-8及び-7はWistarラットの平均血圧に影響を及ぼさなかった。以上より、chemerin断片はC末端の切断部位により全身血圧に及ぼす影響が異なり、mChemerin156SのC末端側9つのアミノ酸に相当するmChemerin-9が生体において活性を有することを初めて明らかにした(図12)。

ヒト chemerin の切断産物(hChemerin157S, 156F, 155A)の活性はこれまで *in vitro* で研究されてきたが、生体内での作用は不明であった[5, 74, 85]。さらにマウス chemerin の切断産物においても *in vitro* では活性が評価されており、mChemerin156SとmChemerin155Fの活性が最も高いことが報告されている[5, 85]。さらにマウス chemerin154A (aa17-154: mChemerin154A)の活性はmChemerin156Sと比較して低いことも報告されている[85]。本章ではmChemerin156S, 155F及び154AのC末端断片であるmChemerin-9, -8及び-7の急性脳室内投与がラットの全身血圧に及ぼす影響を検討した。結果、mChemerin154AのC末端断片であるmChemerin-7の急性脳室内投与は平均血圧に影響を及ぼさなかった[85]。よって、*in vitro* の実験結果と同様に、*in vivo* においてもmChemerin154Aの活性は高くないことが

示唆された。さらに、mChemerin156S の C 末端断片である mChemerin-9 の急性脳室内投与は平均血圧を有意に上昇させた[85]。以上より、in vitro だけでなく、生体内においても C 末端の切断部位により chemerin の活性が大きく異なることが示された。一方で、mChemerin155F の C 末端断片である mChemerin-8 の急性脳室内投与は平均血圧に影響を及ぼさなかった。[85]。よって、in vivo における mChemerin-8 の活性は in vitro における mChemerin155F の活性とは相関しないことも示された。

本章において、mChemerin-9 (30 nmol/2 μ l/head)の急性脳室内投与は平均血圧を有意に上昇させた。一方で、第一章において、ヒト chemerin-9 (10 nmol/2 μ l/head)の急性脳室内投与により平均血圧が有意に上昇したことから、mChemerin-9 はヒト chemerin-9 より活性が低いことが示唆された。これまで in vitro において、ヒト chemerin-9 の EC₅₀ は 26.4 nM で、mChemerin-9 の EC₅₀ は 42 nM であることが報告されており、本章の結果と一致する[66]。ヒト chemerin-9 の N 末端側のアミノ酸は Y¹⁴⁹F¹⁵⁰ で、mChemerin-9 の N 末端側のアミノ酸は F¹⁴⁸L¹⁴⁹ である。N 末端側のアミノ酸が F¹⁴⁹F¹⁵⁰ である rChemerin-9 の急性脳室内投与は平均血圧に影響を及ぼさなかった。以上より、本章の研究によって chemerin の活性には C 末端の切断部位が重要であることが確認されたと同時に、N 末端のアミノ酸配列も重要であることが示唆された。

結論として、本章では chemerin は C 末端の切断部位により全身血圧に及ぼす影響が異なり、mChemerin156S の C 末端断片である mChemerin-9 が Wistar ラットの全身血圧を上昇させることが初めて明らかになった。また、chemerin が全身血圧に及ぼす影響には C 末端の切断部位のみならず N 末端のアミノ酸配列も重要であることが示唆された(図 12)。

IV. 第三章 本態性高血圧症モデルラットの脳内における chemerin/CMKLR1 が全身血圧に及ぼす影響

1. 緒言

近年、中枢性血圧制御機構の破綻が高血圧症の病態と関連することが報告されている[39]。例えば、肥満ラットの PVN において AT1R のタンパク質発現が亢進し、交感神経活性の亢進により全身血圧が上昇することが報告されている[33]。また、本態性高血圧症の実験モデルである自然発症高血圧症ラット(SHR)の PVN における抑制性伝達物質 GABA の受容体 (GABA_A 受容体)発現低下が全身血圧の上昇に関与することも報告されている[13]。以上より、中枢性血圧制御機構において重要な役割を担う神経核の 1 つである PVN における受容体発現の変化が高血圧症の病態と関連することが示唆される。さらに、ヒトの肥満患者において血中濃度が上昇するアディポサイトカインの leptin は BBB を通過し、中枢に作用して交感神経活性の上昇による高血圧症を誘導することが報告されている[58, 65]。第一章において、ヒト chemerin の活性断片であるヒト chemerin-9 の急性脳室内投与は、正常血圧の Wistar ラットの PVN において CMKLR1 を介して全身血圧を上昇させることを明らかにした。しかしながら、SHR の脳内における chemerin/CMKLR1 が全身血圧に及ぼす影響は明らかになっていない為、本章において検討した。

2.材料及び方法

2-1.材料

2-1-1.動物実験

動物の飼育と取り扱いは北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 19-217, 19-227)、北里大学動物実験委員会が策定したガイドラインを遵守して行った。実験には雄性 SHR [10 週齢(脳室周囲のタンパク質発現解析に使用)及び 15-17 週齢(その他の実験に使用)、Hoshino laboratory animals, Ibaraki, Japan]または対照の雄性 Wistar Kyoto rat [WKY: 10 週齢(脳室周囲のタンパク質発現解析に使用)及び 15-17 週齢(その他の実験に使用)、Hoshino laboratory animals)]を使用し、本学部 5 号館または 9 号館の実験動物飼育室で固形飼料(CE2; CLEA)を給餌し、自由飲水で飼育した。

2-1-2.試薬

CMKLR1 siRNA (Nippon Gene Material)及び Cont siRNA (Nippon Gene Material) (配列は第一章に記載の通り)。

2-1-3.一次抗体

Anti-ChemR23 (CMKLR1: sc-398769, Santa Cruz Biotechnology), anti-chemerin (ab112520, Abcam, Cambridge, UK), anti-GAPDH (016-25523, Wako)及び anti-total actin (MAB1501, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。

2-1-4. 二次抗体

Anti-mouse IgG HRP-linked whole antibody (7076S, Cell Signaling Technology)。

2-2. 実験方法

2-2-1. siRNA の脳室内投与

WKY 及び SHR における siRNA の脳室内投与は第一章 2-2-4. siRNA 脳室内投与の項に準じて行った[67]。血圧測定(2-2-2. 非観血的血圧測定)は、Cont siRNA または CMKLR1 siRNA 脳室内投与の前と投与 1-3 日後に、PVN の採材(2-2-3. 脳組織の摘出)は、siRNA 投与 1 日後にそれぞれ行った。

2-2-2. 非観血的血圧測定

意識下における WKY 及び SHR の収縮期血圧及び心拍数の測定は第一章 2-2-2. 非観血的血圧測定の項に準じて行った[70]。

2-2-3. 脳組織の摘出

WKY 及び SHR をイソフルラン(5%)深麻酔により安楽殺した後、全脳を摘出した。氷上で脳を 1 mm 厚のスライスにした。作製したスライス(bregma から約 0.5-1.5 mm 及び約 1.5-2.5 mm)から脳室周囲組織(それぞれ第三脳室及び側脳室周囲)を摘出した。PVN の摘出は第一章 2-2-5. 脳組織の摘出の項に準じて行った[55]。

2-2-4. Western blot 法

摘出・採材した脳室周囲組織、PVN、脳脊髄液[大槽より採取した脳脊髄液を遠心分離(3000 rpm, 4 °C, 10 min)して得た]、血漿[ウレタン麻醉下(1.5 g/kg、腹腔内投与)で後大静脈より採取した全血を遠心分離(3000 rpm, 4 °C, 15 min)して得た]及び脂肪組織(腎臓周囲)の CMKLR1 または chemerin タンパク質発現を Western blot 法により検討した。Western blot 法は第一章 2-2-6. Western blot 法の項に準じて行った[54]。

2-3. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。2群間の比較は Mann-Whitney の U 法(図 13B, D、図 14、図 15、図 17B, D、図 19B, D, F)、4群間の比較は Kruskal-Wallis 法(図 16B)を行い評価した。危険率 5%未満($P<0.05$)を有意差ありと判断した。

3. 実験結果

3-1. WKY 及び SHR の脳室周囲における CMKLR1 タンパク質発現

脳室周囲における CMKLR1 タンパク質発現を正常血圧の WKY と SHR の間で比較した。脳室周囲組織の CMKLR1 タンパク質発現は、prehypertension (高血圧症前段階)とされる 10 週齢(収縮期血圧; 173.4 ± 2.9 mmHg, n=5)及び既に高血圧を発症しているとされる 15 週齢(収縮期血圧; 195.5 ± 9.2 mmHg, n=2)の SHR において同週齢の WKY (収縮期血圧; 10 週齢: 116.0 ± 4.5 mmHg, n=7、15 週齢: 129.0 ± 4.7 mmHg, n=3)と比較して亢進していた(図 13A, B: n=4、図 13C, D: WKY: n=5, SHR: n=4)。

3-2. WKY 及び SHR において CMKLR1 siRNA 脳室内投与(1 日間)が収縮期血圧及び心拍数に及ぼす影響

最初に、WKY 及び SHR に Cont siRNA (0.04 nmol/head)または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head)を脳室内投与し、投与 1 日後の収縮期血圧を測定した。CMKLR1 siRNA を投与した SHR の収縮期血圧は Cont siRNA を投与した SHR と比較して低下した[206.7 ± 6.0 mmHg, SHR (Cont siRNA) vs. 183.3 ± 4.4 mmHg, SHR (CMKLR1 siRNA)、図 14C, n=4]。一方で、CMKLR1 siRNA 投与は Cont siRNA 投与と比較して WKY の収縮期血圧には影響を及ぼさなかった[122.9 ± 5.6 mmHg, WKY (Cont siRNA) vs. 125.8 ± 4.1 mmHg, WKY (CMKLR1 siRNA)、図 14A, n=4]。CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head, 1 day)投与は WKY 及び SHR の心拍数に大きな影響を及ぼさなかった(図 14B, D, n=4)。

3-3. SHR において CMKLR1 siRNA 脳室内投与 (3 日間) が収縮期血圧及び心拍数に及ぼす影響

次に、SHR に Cont siRNA (0.04 nmol/head) または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head) を脳室内投与し、3 日間収縮期血圧を測定した。CMKLR1 siRNA を投与した SHR の収縮期血圧は Cont siRNA を投与した SHR と比較して有意に低下し、収縮期血圧の低下は 3 日間持続した [day 1: 192.8 ± 0.9 mmHg (Cont siRNA) vs. 178.6 ± 3.9 mmHg (CMKLR1 siRNA), day 2: 194.3 ± 1.2 mmHg (Cont siRNA) vs. 180.2 ± 0.7 mmHg (CMKLR1 siRNA), day 3: 199.3 ± 2.9 mmHg (Cont siRNA) vs. 181.4 ± 2.4 mmHg (CMKLR1 siRNA), $P < 0.05$ 、図 15A, Cont siRNA: n=4, CMKLR1 siRNA: n=5]。一方で、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head, 3 days) 投与は Cont siRNA (0.04 nmol/head, 3 days) 投与と比較して SHR の心拍数 (day 1-3) に影響を及ぼさなかった (図 15B, Cont siRNA: n=4, CMKLR1 siRNA: n=5)。

3-4. CMKLR1 siRNA 脳室内投与が WKY 及び SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現に及ぼす影響

PVN は交感神経を介して血圧を制御する重要な神経核である。そのため、WKY 及び SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現を検討した。Cont siRNA (0.04 nmol/head, 1 day) を脳室内投与した WKY と比較して、Cont siRNA (0.04 nmol/head, 1 day) を脳室内投与した SHR では、PVN における CMKLR1 タンパク質発現が高く、CMKLR1 タンパク質発現の亢進は CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head, 1 day) により抑制された (図 16,

n=4)。一方で、WKY の CMKLR1 タンパク質発現は、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head, 1 day)投与と Cont siRNA (0.04 nmol/head, 1 day)投与の間で差はなかった (図 16, n=4)。

3-5. WKY 及び SHR の脳室周囲における chemerin タンパク質発現

脳室周囲における chemerin タンパク質発現を WKY と SHR の間で比較した。脳室周囲における chemerin タンパク質発現は、10 週齢及び 15 週齢の SHR と WKY の間で差はなかった(図 17A, B: n=4、図 17C, D: WKY: n=5, SHR: n=4)。

3-6. WKY 及び SHR の中枢(PVN 及び脳脊髄液)における chemerin タンパク質発現

WKY 及び SHR の PVN 及び脳脊髄液中の chemerin タンパク質発現を検討した。PVN 及び脳脊髄液中の chemerin タンパク質発現は WKY と SHR の間で差はなかった(図 19A, B: WKY: n=3, SHR: n=4、図 19C, D: WKY: n=4, SHR: n=3)。

3-7. WKY 及び SHR の末梢(血漿及び脂肪組織)における chemerin タンパク質発現

WKY 及び SHR の血漿及び脂肪組織の chemerin タンパク質発現を検討した。血漿及び脂肪組織の chemerin タンパク質発現は WKY と SHR の間で差はなかった(図 20A, B: n=6、図 20C, D: WKY: n=3, SHR: n=4)。

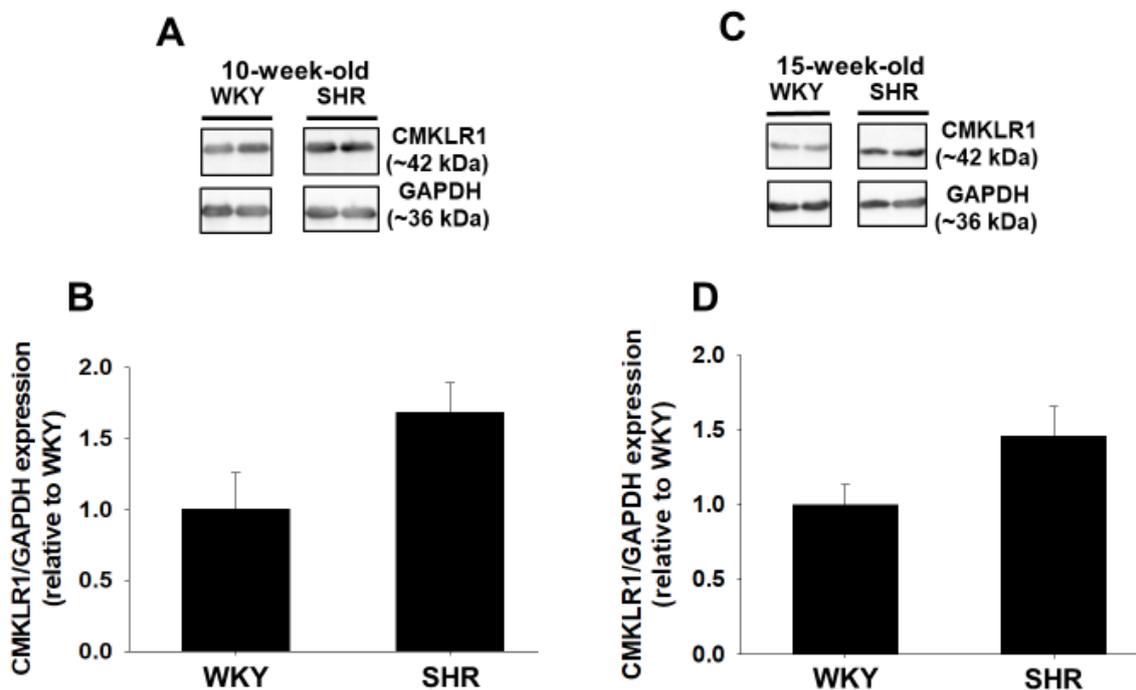


図 13. Wistar Kyoto rat (WKY)及び spontaneously hypertensive rat (SHR)の脳室周囲(第三脳室及び側脳室周囲)における CMKLR1 タンパク質発現

WKY 及び SHR の脳室周囲組織からタンパク質を抽出し、Western blot 法により CMKLR1 タンパク質発現を検討した。(A) 10 週齢と(C) 15 週齢の WKY 及び SHR の脳室周囲における典型的な CMKLR1 及び GAPDH のプロット像を示した。(B) 10 週齢及び(D) 15 週齢の WKY 及び SHR の脳室周囲における CMKLR1 発現を GAPDH 発現で補正し、WKY に対する比率で示した(平均値±標準誤差) (B: n=4, D: WKY: n=5, SHR: n=4)。

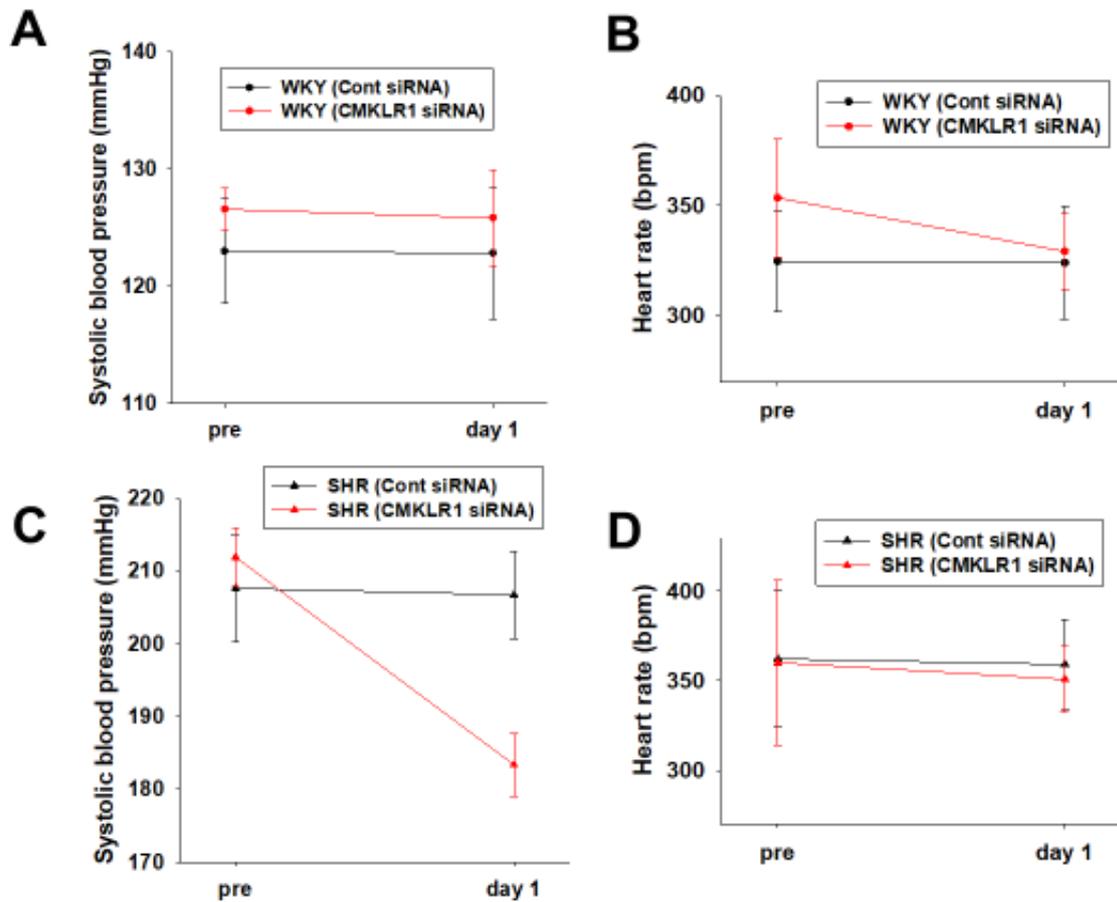


図 14. WKY 及び SHR において CMKLR1 siRNA 脳室内投与(1 日間)が収縮期血圧及び心拍数に及ぼす影響

WKY 及び SHR に Cont siRNA (0.04 nmol/head) または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head) を脳室内投与した。投与前(pre)と投与 1 日後(day 1)の WKY 及び SHR の収縮期血圧及び心拍数をテイルカフ法により測定し、結果をグラフで示した(平均値±標準誤差) (A: WKY 収縮期血圧、B: WKY 心拍数、C: SHR 収縮期血圧、D: SHR 心拍数、n=4)。bpm: beats per minute。

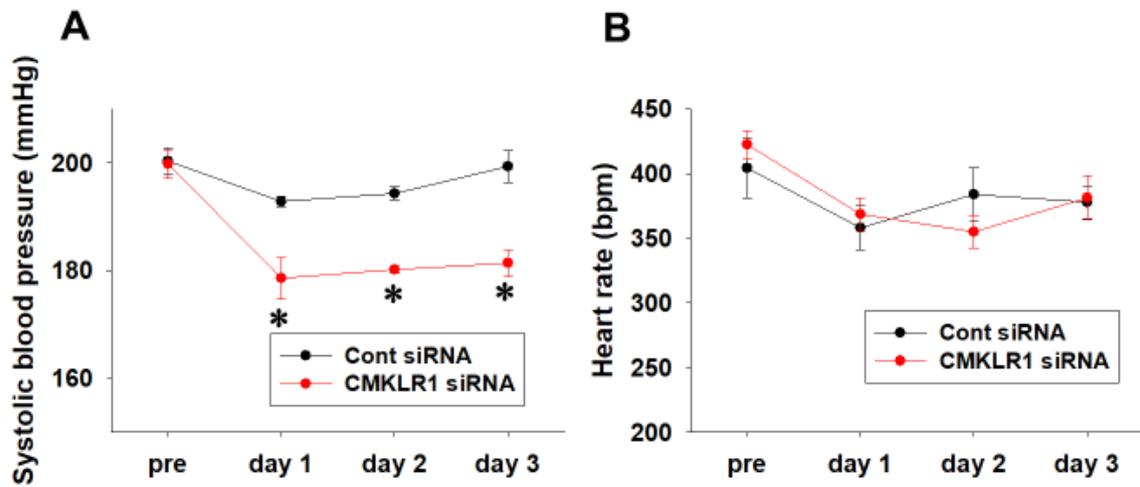


図 15. SHR において CMKLR1 siRNA 脳室内投与 (3 日間) が収縮期血圧及び心拍数に及ぼす影響

SHR に Cont siRNA (0.04 nmol/head) または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head) を脳室内投与した。投与前 (pre) と投与 1-3 日後 (day 1-3) の SHR の (A) 収縮期血圧及び (B) 心拍数をテイルカフ法により測定し、結果をグラフで示した (平均値 ± 標準誤差) (Cont siRNA: n=4, CMKLR1 siRNA: n=5)。* $P < 0.05$ vs. Cont siRNA。

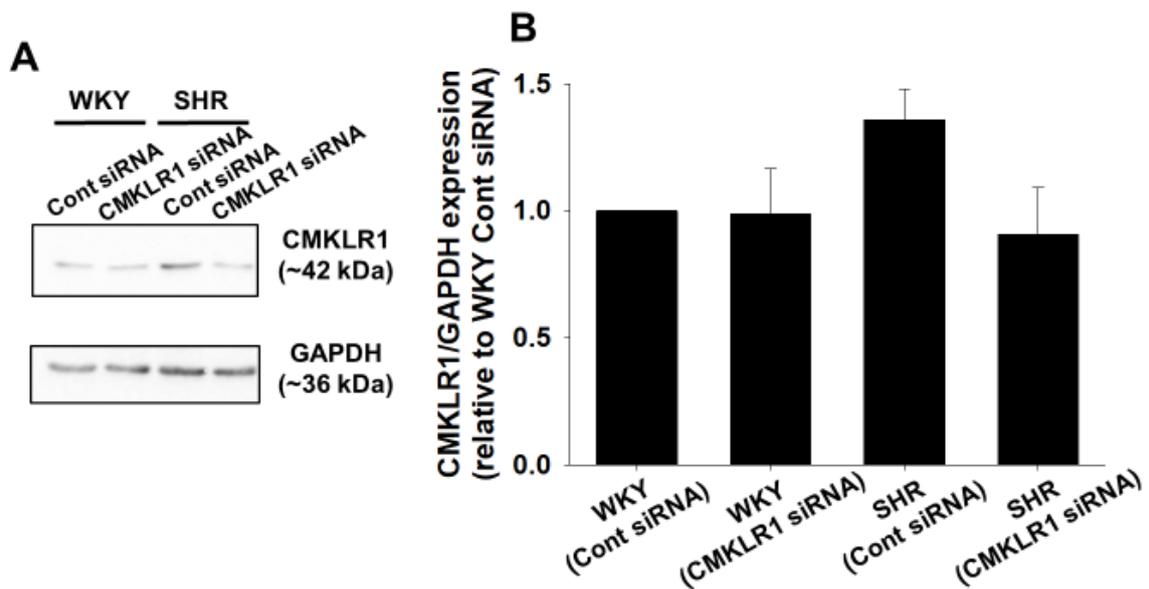


図 16. CMKLR1 siRNA 脳室内投与が WKY 及び SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現に及ぼす影響

WKY 及び SHR に Cont siRNA (0.04 nmol/head, 1 day) または CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head, 1 day) を脳室内投与した後、PVN を単離した。タンパク質を抽出し、Western blot 法により CMKLR1 タンパク質発現を検討した (n=4)。(A) 典型的な CMKLR1 及び GAPDH のブロット像を示した。(B) CMKLR1 発現を GAPDH 発現で補正し、WKY (Cont siRNA) に対する比率で示した (平均値 ± 標準誤差)。

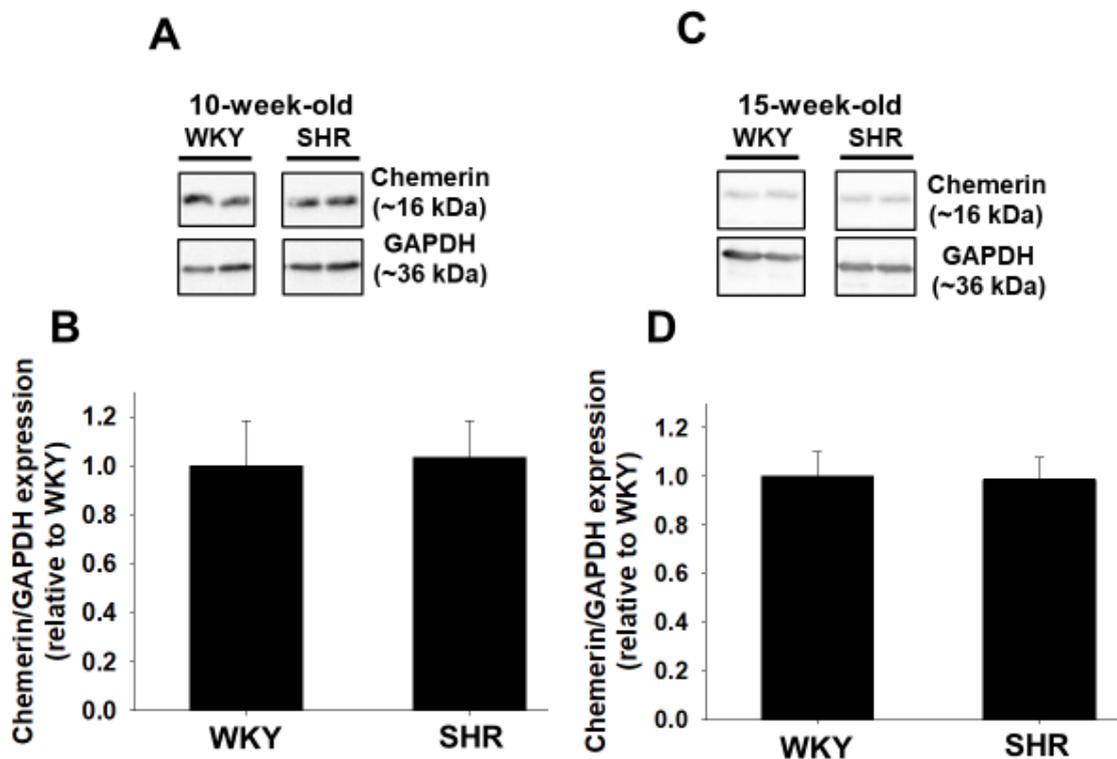


図 17. WKY 及び SHR の脳室周囲における chemerin タンパク質発現

WKY 及び SHR の脳室周囲組織からタンパク質を抽出し、Western blot 法により chemerin タンパク質発現を検討した。(A) 10 週齢と(C) 15 週齢の WKY 及び SHR の脳室周囲における典型的な chemerin 及び GAPDH のプロット像を示した。(B) 10 週齢及び(D) 15 週齢の WKY 及び SHR の脳室周囲における chemerin 発現を GAPDH 発現で補正し、WKY に対する比率で示した(平均値 ± 標準誤差) (B: n=4, D: WKY: n=5, SHR: n=4)。

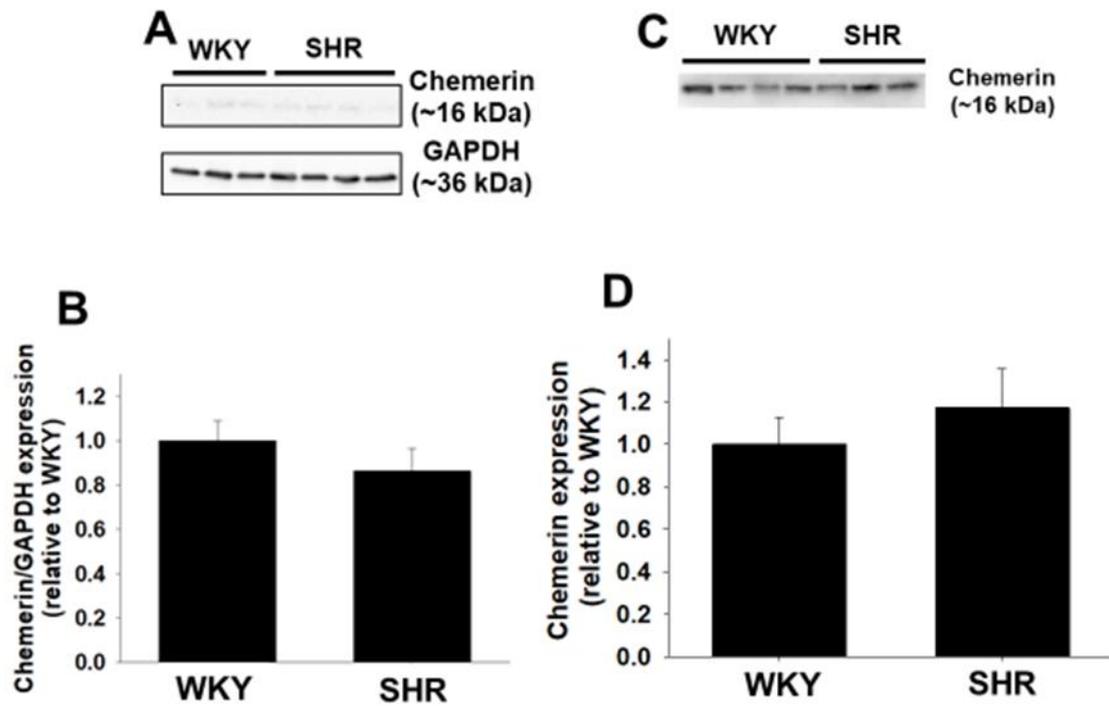


図 18. WKY 及び SHR の中枢 (PVN 及び脳脊髄液) における chemerin タンパク質発現

WKY 及び SHR の PVN 及び脳脊髄液における chemerin タンパク質発現を Western blot 法により検討した。(A) PVN における典型的な chemerin 及び GAPDH のブロット像及び (C) 脳脊髄液における典型的な chemerin のブロット像を示した。(B) PVN における chemerin 発現を GAPDH 発現で補正し、WKY に対する比率で示した (平均値 ± 標準誤差) (WKY: n=3, SHR: n=4)。(D) 脳脊髄液における chemerin 発現は WKY に対する比率で示した (平均値 ± 標準誤差) (WKY: n=4, SHR: n=3)。

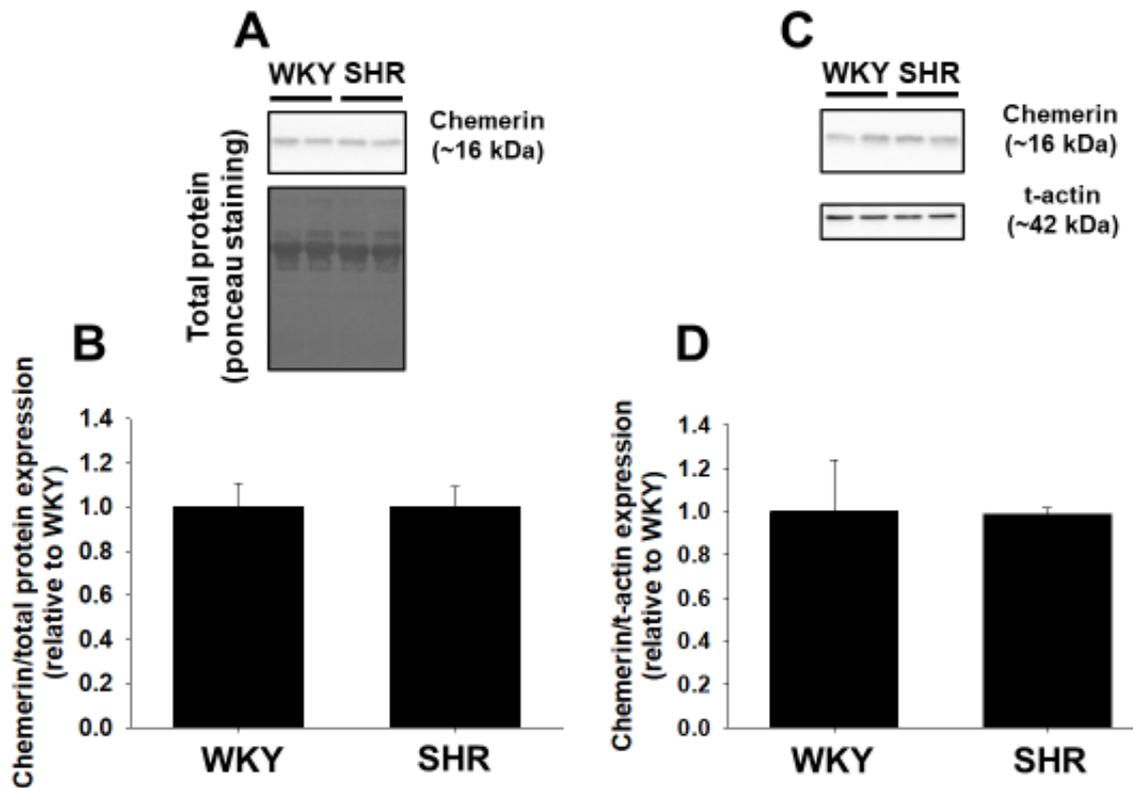


図 19. WKY 及び SHR の末梢(血漿及び脂肪組織)における chemerin タンパク質発現

WKY 及び SHR の血漿及び脂肪組織(腎臓周囲)における chemerin タンパク質発現を Western blot 法により検討した。(A)血漿における典型的な chemerin のブロット像とポンソー染色像(total protein 量の指標)及び(C)脂肪組織における典型的な chemerin 及び total-actin (t-actin)のブロット像を示した。(B)血漿における chemerin 発現を total protein 量で補正し、WKY に対する比率で示した(平均値±標準誤差) (n=6)。(D)脂肪組織における chemerin 発現を t-actin 発現で補正し、WKY に対する比率で示した(平均値±標準誤差) (WKY: n=3, SHR: n=4)。

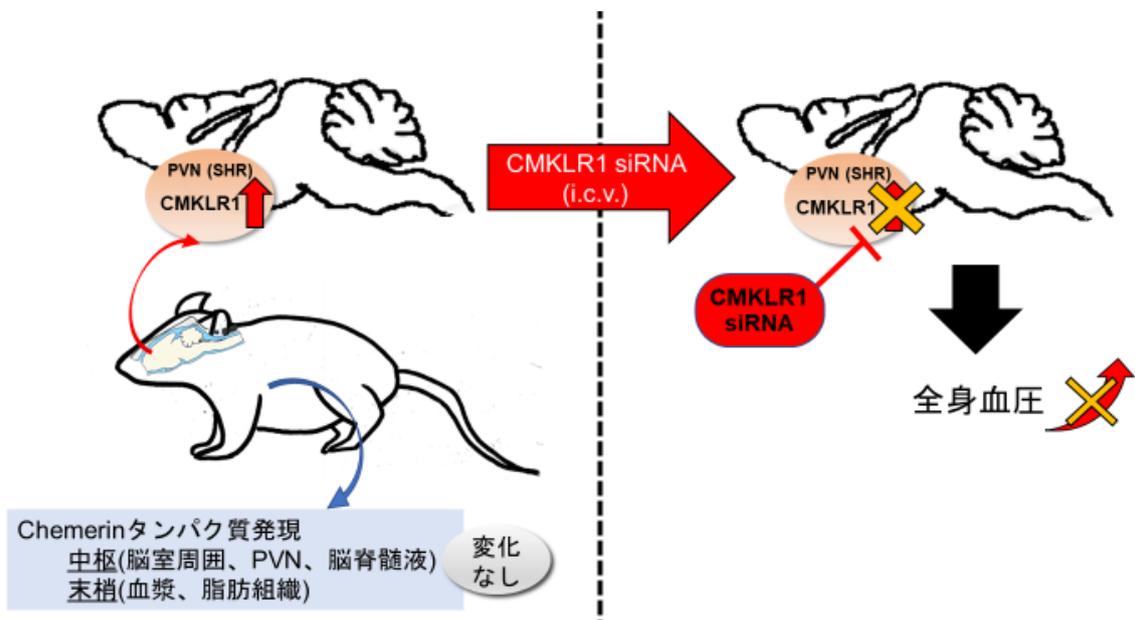


図 20. 第三章まとめ

本章では、SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現の亢進が全身血圧の上昇に関与する可能性が初めて示された。一方、中枢(脳室周囲、PVN 及び脳脊髄液)及び末梢(血漿及び脂肪組織)において chemerin タンパク質発現は WKY と SHR の間で差がなかった[78]。

3. 考察

本章において、SHR の脳内における chemerin/CMKLR1 が全身血圧に及ぼす影響を検討し、以下のことを明らかにした。1) 脳室周囲組織の CMKLR1 タンパク質発現は 10 週齢及び 15 週齢の SHR において同週齢の WKY と比較して亢進していた。2) CMKLR1 siRNA (0.04 nmol, 1 day) の脳室内投与は SHR の収縮期血圧を低下させたが、WKY の収縮期血圧には影響を及ぼさなかった。3) CMKLR1 siRNA (0.04 nmol) の脳室内投与による SHR の収縮期血圧の低下は 3 日間持続した。4) PVN における CMKLR1 タンパク質発現は WKY と比較して SHR で高く、CMKLR1 タンパク質発現の亢進は CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head, 1 day) により抑制された。5) 脳室周囲組織の chemerin タンパク質発現は 10 週齢及び 15 週齢の SHR と WKY の間で差はなかった。6) 中枢 (PVN 及び脳脊髄液) 及び末梢 (血漿及び脂肪組織) における chemerin タンパク質発現は SHR と WKY の間で差はなかった。以上より、SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現の亢進が全身血圧の上昇に少なくとも部分的に関与することが初めて明らかになった(図 20)。

SHR において交感神経活性の亢進により全身血圧が上昇することが報告されている。この交感神経活性の亢進の原因の 1 つとして、SHR の PVN における抑制性神経伝達物質 GABA の受容体 (GABA_A 受容体) の発現低下による交感神経の活性化が挙げられる[13]。さらに、SHR の PVN において AT1R mRNA 発現の亢進により protein kinase C (PKC) の活性化を介して、興奮性神経伝達物質 (グルタミン酸) の受容体である N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体がリン酸化されることで交感神経活性が亢

進することが報告されている[45]。第一章において、正常血圧の Wistar ラットにおいてヒト chemerin-9 の急性脳室内投与は PVN に発現する CMKLR1 を介して交感神経活性の亢進による全身血圧の上昇を誘導することを明らかにした。本章において、PVN における CMKLR1 タンパク質発現は SHR において WKY と比較して亢進しており、siRNA 脳室内投与による CMKLR1 タンパク質発現の抑制は SHR の収縮期血圧を低下させることを明らかにした。以上より、SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現の亢進は、交感神経の活性化を介して全身血圧上昇の原因となる可能性が考えられた。

脂肪組織で産生された leptin は中枢に作用し食欲の調整を行う[58]。また、ニワトリ chemerin の末梢(腹腔内)投与によりニワトリの中枢における食欲促進因子(AgRP)の発現に影響を及ぼすことが報告されている[17]。さらに、全身血圧(収縮期血圧)と血中 chemerin 濃度の間には正の相関関係があることが報告されている[11]。よって、SHR において末梢で産生された chemerin が中枢に作用し、昇圧作用を誘導する可能性が考えられた。しかしながら予想に反して、末梢(血漿及び脂肪組織)における chemerin タンパク質発現は WKY と SHR の間に差はなかった。さらに、中枢で産生された chemerin が PVN に作用することも考えられたが、中枢(PVN 及び脳脊髄液)における chemerin タンパク質発現も WKY と SHR の間で差はなかった。しかしながら、本実験で使用した抗 chemerin 抗体は全長 chemerin のアミノ酸配列(aa23-157)を認識する抗体であり、複数ある chemerin 切断産物(chemerin157S, chemerin156F, chemerin155A など)のなかで活性が高い chemerin157S を特異的に認識する抗体ではない。よって、それぞれの chemerin 切断産物に特異的な抗体を作製して、WKY と SHR の末梢(血漿及び脂肪組織)や中枢(PVN 及び脳脊髄液)における chemerin タンパク

質発現を今後さらに詳細に検討する必要がある。

間葉系間質細胞において chemerin/CMKLR1 は PKC を介して遊走能を亢進させることが報告されている[40]。PKC は神経細胞の NMDA 受容体のリン酸化を介して、神経細胞の興奮を引き起こす[8, 75]。SHR の PVN においても、PKC により NMDA 受容体のリン酸化が亢進し、PKC の阻害は NMDA 受容体活性を低下させることが報告されている[45]。さらに PKC は電位依存性カルシウムチャネルの補助サブユニットである $\alpha 2\delta 1$ タンパク質及び NMDA 受容体と複合体を形成することにより、NMDA 受容体の膜移行を促進しシナプス可塑性に関与することも報告されている[86]。よって、SHR の PVN (神経細胞)における CMKLR1 タンパク質発現の亢進は、PKC による NMDA 受容体の活性化や膜移行の促進を介して交感神経を活性化する可能性が考えられる。

グリア細胞の 1 つであるアストロサイトがシナプスにおいて神経伝達物質(グルタミン酸や ATP)の放出や取り込みを介して神経細胞の興奮に影響を及ぼすことが報告されている[64]。このメカニズムの 1 つとしてアストロサイトにおける L 型カルシウムチャネルを介したカルシウムイオンの流入がある[24, 49]。さらに、大動脈平滑筋細胞において chemerin/CMKLR1 が L 型カルシウムチャネルの活性化を介したカルシウムイオンの流入を誘導することが報告されている[18]。よって、PVN に存在するアストロサイトにおいて、chemerin/CMKLR1 による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を介して、グルタミン酸放出が亢進することで NMDA 受容体が活性化し交感神経の活性化に寄与する可能性も考えられる。

結論として、本章では SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現の上昇が全身血圧の上昇に関与する可能性が初めて示された。一方で、中

枢(脳室周囲、PVN 及び脳脊髄液)及び末梢(血漿及び脂肪組織)において chemerin タンパク質発現は WKY と SHR の間で差はなかった(図 20)。

V.総括

【背景】

ヒトの本態性高血圧症は腎機能障害や心疾患(心筋梗塞や心不全)などの重要なリスク因子となる[1, 47]。本態性高血圧症の原因として遺伝的素因や環境的要因(過剰な塩分摂取、肥満や喫煙習慣など)が挙げられる。環境的要因に含まれる肥満では交感神経活性が亢進する。交感神経活性亢進の原因として中枢における AT1R 発現の亢進や肥満に伴い血中濃度が増加するインスリンが中枢に作用することなどが挙げられる[12, 33]。さらに、2010年時点で世界の18歳以上の成人(45億人)のうち14億人近くが高血圧症であると推定されているが、今後、平均年齢の上昇や肥満患者の増加により本態性高血圧症の患者はさらに増えることが予想される[47]。本態性高血圧症の治療には様々な降圧薬が使用されているが、血圧を完全にコントロールするには至っておらず、新たな視点に立った降圧薬の開発が今なお求められている[1]。

Chemerin は主に WAT に高発現する分泌タンパク質である[20]。ヒト chemerin は非活性型の prochemerin (aa21-163)として分泌された後、C末端がプロテアーゼにより切断されることで、活性型 chemerin となる[81]。Chemerin の役割として樹状細胞やマクロファージの走化作用、脂肪細胞の分化及び脂質代謝の調節作用などが知られていた[59, 73]。加えて、当研究室はこれまでに、マウス全長 chemerin (aa17-156)が CMKLR1 を介して血管平滑筋細胞の増殖・遊走能を促進すること、またマウス全長 chemerin の長期間腹腔内投与がマウスの収縮期血圧を上昇させることを初めて明らかにした[41]。よって、末梢における chemerin/CMKLR1 は高血圧の発症・進

展に重要な役割を果たすことが示唆される。

脳内には心拍出量や心血管収縮の調節を介して血圧を制御する心血管運動中枢が存在する[29]。心血管運動中枢はRVLMに存在し、全身血圧制御に重要な他の神経核としてSFOやPVNなどがある。これらの神経核から端を発する神経伝導は交感神経を介して全身血圧を制御する[29, 39]。また、これら中枢性血圧制御機構の異常は高血圧症の病態に關与する[39]。例えば、PVNにおけるAT1Rの発現増加やGABA受容体発現の低下などは交感神経活性の亢進を介して全身血圧の上昇に寄与することが報告されている[13, 33]。

近年、中枢におけるchemerinの役割がいくつか報告されている。例えば、ヒト全長chemerinのラット視床下部弓状核への投与により視床下部において食欲抑制性(POMC)と促進性(AgRP)の遺伝子発現が亢進する[4]。さらに、ヒト全長chemerinは新生仔ラットの脳室内出血による炎症から神経を保護する働きを有する[84]。以上より、chemerinは中枢において様々な役割を持つことが示唆される。しかしながら、chemerinが中枢性血圧制御を介して全身血圧に及ぼす影響とそのメカニズムはこれまで全く検討されていない。そこで、本研究では脳内のchemerin/CMKLR1がラット全身血圧及び高血圧症の病態に及ぼす影響とメカニズムを検討した。

【方法及び結果】

(第一章)

最初に、CMKLR1 siRNAの脳室内投与が正常血圧のWistarラットの意識下における収縮期血圧に及ぼす影響をテイルカフ法により検討したところ、Cont siRNA (0.04 nmol/head、3 days)投与ラットとCMKLR1 siRNA (0.04

nmol/head、3 days)投与ラットの間で収縮期血圧(3日間: day1-3)に差はなかった。次にヒト chemerin-9 (10 nmol/2 μ l/head)急性脳室内投与による全身血圧の変化と CMKLR1 siRNA 脳室内投与が及ぼす影響を頸動脈カニキュレーション法を用いてイソフルラン麻酔下で検討した。Cont siRNA (0.04 nmol/head、3 days)投与ラットにおいて、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は平均血圧を有意に上昇させた。一方で、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days)投与ラットにおいて、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は平均血圧に影響を及ぼさなかった。次に、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days)脳室内投与が脳室周囲における CMKLR1 タンパク質発現に及ぼす影響を Western blot 法を用いて検討したところ、Cont siRNA 投与ラットと比較して、CMKLR1 siRNA 投与ラットの PVN における CMKLR1 タンパク質発現の減少が確認された。さらにヒト chemerin-9 急性脳室内投与が交感神経活性に及ぼす影響を検討するため、ヒト chemerin-9 (10 nmol/2 μ l/head)急性脳室内投与前と投与 2.5 分後の血清中 adrenaline 濃度を HPLC 法により測定した。Cont siRNA (0.04 nmol/head、3 days)脳室内投与ラットにおいて、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は血清中 adrenaline 濃度を上昇させた。一方で、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head、3 days)脳室内投与ラットにおいては、ヒト chemerin-9 急性脳室内投与は血清中 adrenaline 濃度に影響を及ぼさなかった。最後にヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用が交感神経活性の亢進によるものか検討するため、 α_1 adrenaline 受容体ブロッカーである prazosin 前処置(静脈内投与)がヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用に及ぼす影響を検討した。Prazosin 前処置はヒト chemerin-9 急性脳室内投与による昇圧作用を有意に抑制した。以上の結果から、第一章では、Wistar ラットにおいて chemerin は主に PVN に発現す

る CMKLR1 を介して交感神経活性を亢進させることで、昇圧作用を示すことが初めて明らかになった[77]。

(第二章)

第一章においてヒト chemerin-9 の急性脳室内投与が全身血圧を上昇させることが明らかになったため、第二章では、ヒト chemerin-9 以外の chemerin の C 末端断片(ラット及びマウス chemerin 断片)が正常血圧の Wistar ラットの全身血圧に及ぼす影響を大腿動脈カニューレーション法を用いて検討した。rChemerin-9 (FFPGQFAFS, 1-30 nmol/2 µl/head)の急性脳室内投与は平均血圧に影響を及ぼさなかった。一方で、mChemerin-9 (FLPGQFAFS, 30 nmol/2 µl/head)の急性脳室内投与は平均血圧を有意に上昇させた。さらに、mChemerin-8 (mChemerin-8: FLPGQFAF), mChemerin-7 (FLPGQFA)の急性脳室内投与(1-30 nmol/2 µl/head)は平均血圧に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、第二章において、chemerin は C 末端の切断部位により全身血圧に及ぼす影響が異なり、mChemerin156S の C 末端断片である mChemerin-9 (FLPGQFAFS)の急性脳室内投与は Wistar ラットにおいて全身血圧を上昇させることが初めて明らかになった。また、rChemerin-9 (FFPGQFAFS)の急性脳室内投与は平均血圧に影響を及ぼさなかったことから、chemerin 断片の活性には C 末端の切断部位のみならず N 末端のアミノ酸配列も重要であることが示唆された[76]。

(第三章)

第一章において、ヒト chemerin-9 の脳室内投与は、正常血圧の Wistar

ラットの PVN に発現する CMKLR1 を介して全身血圧を上昇させることを明らかにしたが、本態性高血圧症モデルラット SHR の脳内における chemerin/CMKLR1 が全身血圧に及ぼす影響は明らかでない為、検討した。最初に WKY 及び SHR の脳室周囲における CMKLR1 タンパク質発現を Western blot 法を用いて検討した。10 週齢及び 15 週齢の SHR の脳室周囲組織の CMKLR1 タンパク質発現は同週齢の WKY と比較して亢進していた。そこで CMKLR1 siRNA の脳室内投与が SHR の収縮期血圧に及ぼす影響をテイルカフ法により検討したところ、CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head) の脳室内投与による SHR の収縮期血圧の低下が 3 日間持続することが明らかになった。CMKLR1 siRNA の脳室内投与が PVN における CMKLR1 タンパク質発現に及ぼす影響を Western blot 法を用いて検討した。PVN における CMKLR1 タンパク質発現は WKY と比較して SHR で高く、CMKLR1 タンパク質発現の亢進は CMKLR1 siRNA (0.04 nmol/head, 1 day) の脳室内投与により抑制された。次に、WKY 及び SHR の脳室周囲における chemerin タンパク質発現を Western blot 法を用いて検討した。脳室周囲組織の chemerin タンパク質発現は 10 週齢及び 15 週齢の SHR と WKY の間で差はなかった。最後に中枢 (PVN 及び脳脊髄液) 及び末梢 (血漿及び脂肪組織) における chemerin タンパク質発現を Western blot 法を用いて検討したが、SHR と WKY の間で差はなかった。以上の結果から、第三章では、SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現の亢進により全身血圧が上昇する可能性が初めて示された[78]。

【考察及び結論】

本研究の第一章において、chemerin は正常血圧の Wistar ラットの PVN

に発現する CMKLR1 に作用し交感神経を活性化することで全身血圧を上昇させることが明らかになった。第二章では、chemerin 断片の急性脳室内投与による Wistar ラット全身血圧の上昇には C 末端のアミノ酸配列と共に N 末端のアミノ酸配列が重要であることが示唆された。第三章では、SHR において PVN における CMKLR1 タンパク質発現の亢進により全身血圧が上昇することが示唆された。以上より、中枢において chemerin は PVN に発現する CMKLR1 に作用し交感神経活性の亢進を介して全身血圧を上昇させ、本態性高血圧症の病態メカニズムにも関与することが示唆された(図 21)。

本研究において chemerin/CMKLR1 が全身血圧を上昇させる詳細なメカニズムを解明するには至らなかった。最近、正常血圧の Sprague-Dawley ラットにおいてヒト chemerin-9 の PVN へのマイクロインジェクションにより PVN における ROS 産生の増加を介して交感神経が活性化することが報告された[71]。さらに、対照の WKY と比較して SHR の PVN において ROS 産生が増加し、全身血圧の上昇に関与するという報告もある[19]。加えて、当研究室は以前に、ラット血管平滑筋及び心線維芽細胞において chemerin/CMKLR1 が ROS 産生を亢進することを明らかにしている[41, 79]。よって、本研究で明らかにした SHR の PVN における CMKLR1 発現の亢進は ROS 産生の増加を介した交感神経の活性化により全身血圧を上昇させる可能性が考えられた。

本研究において SHR の PVN において CMKLR1 タンパク質発現が亢進することを明らかにした。しかしながら、chemerin の受容体には CMKLR1 (chemerin の C 末端を認識する)の他に CCRL2 がある[60]。CCRL2 は chemerin の N 末端を認識し、CMKLR1 に chemerin の C 末端を提示する働きがあることが示唆されている[15]。よって、SHR の PVN において CCRL2

タンパク質発現が亢進することで、CMKLR1 がより多くの chemerin C 末端を認識することを介して、chemerin/CMKLR1 によるシグナル活性が亢進する可能性が考えられた。しかしながら、データには示していないが PVN における CCRL2 タンパク質発現は SHR と WKY と間で差がなかった(data not shown, n=4)ことから、SHR の PVN においては、CCRL2 発現の変化は全身血圧の上昇には寄与しない可能性が考えられた。

本研究においてヒト chemerin-9 の急性脳室内投与は Wistar ラットの PVN に発現する CMKLR1 を介して全身血圧を上昇させることを明らかにした。一方で、CMKLR1 に結合する他のアゴニストが全身血圧に及ぼす影響は検討していない。Chemerin 以外に CMKLR1 に結合するアゴニストとしてレゾルビン E1 がある[36]。レゾルビン E1 はエイコサペンタエン酸から生成され、歯周組織炎において ROS 産生の抑制などを介して抗炎症作用を示す[2]。さらに、レゾルビン E1 はミクログリアにおいて抗炎症作用を示すことも報告されている[57]。中枢における ROS 産生や炎症は交感神経の活性化を介した全身血圧の上昇に寄与することから[19]、レゾルビン E1/CMKLR1 は中枢において抗炎症作用を介して全身血圧制御(低下)に関与する可能性が考えられる。今後更なる検討により、レゾルビン E1/CMKLR1 が本態性高血圧症に対する治療薬のターゲットとなり得るかを明らかにすることも興味深い。

本研究の第二章では、mChemerin-9 (FLPGQFAFS)の急性脳室内投与が Wistar ラットの全身血圧を上昇させることを明らかにした。一方で、rChemerin-9 (FFPGQFAFS)の急性脳室内投与は全身血圧に影響を及ぼさなかった。mChemerin-9 と rChemerin-9 の全身血圧に及ぼす影響の違いは N 末端側のアミノ酸配列の違いにより生じたと考えられる。これまで、ヒト chemerin-9 (YFPGQFAFS)の N 末端のアミノ酸(Y)をアラニン(A)に置換した

組換えペプチド(Δ FPGQFAFS)は活性が低下することが報告されている[74]。よって、mChemerin-9 と rChemerin-9 の N 末端のアミノ酸配列の違いにより CMKLR1 に対する親和性が変化し、全身血圧に及ぼす影響が異なる可能性が考えられた。今後、ラット chemerin がラットの血圧に及ぼす影響を詳細に検討するために、全長ラット chemerin (aa21-157)や他のラット chemerin 断片の急性脳室内投与を行う必要がある。

結論として、本研究により中枢において chemerin は PVN に発現する CMKLR1 に作用し交感神経活性の亢進を介して全身血圧を上昇させ、本態性高血圧症の病態にも少なくとも部分的には関与するという新たな機構を提示した。しかしながら、中枢において chemerin/CMKLR1 が全身血圧を上昇させる詳細なメカニズムや交感神経活性が亢進している肥満モデル動物の中枢(PVN)における chemerin/CMKLR1 の役割など不明な点も多く残されている。更なる研究の継続により、中枢の chemerin/CMKLR1 をターゲットとした本態性高血圧症に対する創薬・新規治療法の開発につながる事が期待される。

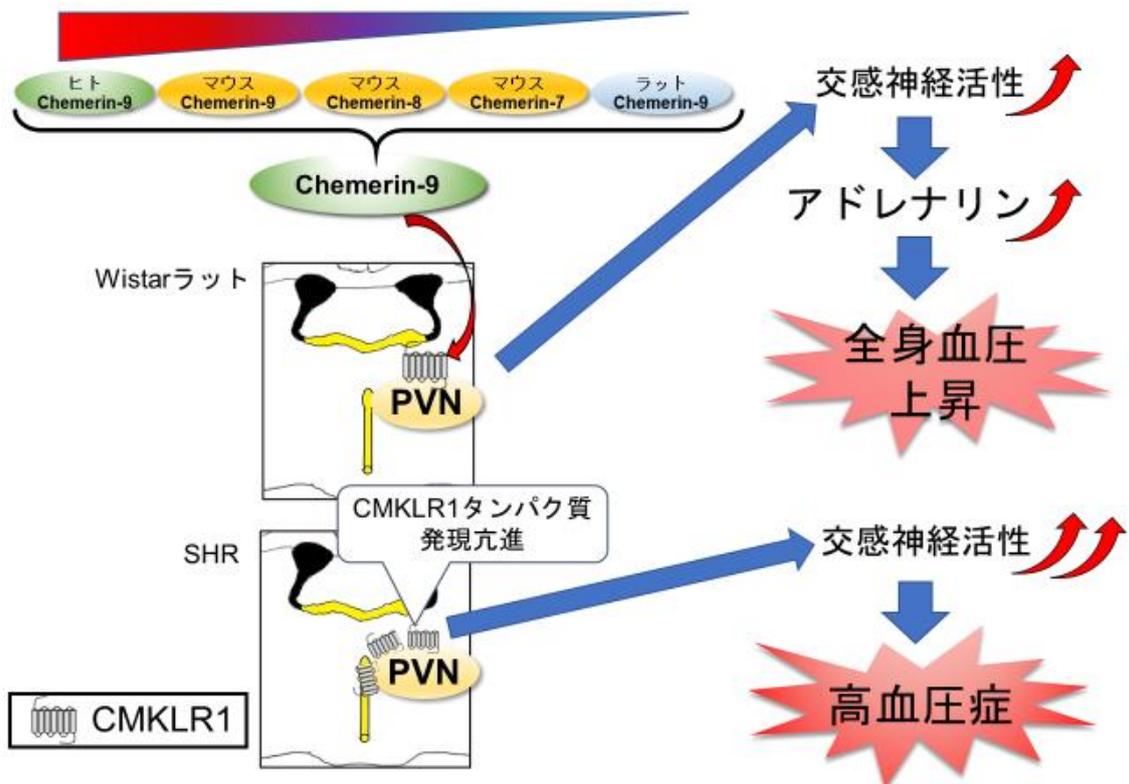


図 21.本研究の総括

ヒト chemerin-9 は Wistar ラットの PVN に発現する CMKLR1 に作用し交感神経を活性化することで全身血圧を上昇させることが初めて明らかになった。さらに、chemerin 断片の急性脳室内投与による Wistar ラット全身血圧の上昇には C 末端のアミノ酸配列と共に N 末端側のアミノ酸配列が重要であることが示唆された。加えて、SHR の PVN における CMKLR1 タンパク質発現の亢進により全身血圧が上昇することも初めて明らかになった[76-78]。

VI. 謝辞

本研究の計画、遂行及び博士論文の執筆にあたり、北里大学獣医薬理学研究室の山脇英之教授、岡田宗善准教授、大谷紘資助教及び兒玉朋子特任助手には親身なご指導・ご教授を賜りました。ご厚意に深く感謝申し上げます。

また、愛知医科大学医学部薬理学講座の岡田尚志郎教授及び山口奈緒子准教授には HPLC 法による血清中 adrenaline 測定を行っていただき、心から感謝申し上げます。

さらに、実験にご協力頂きました北里大学小動物第1内科学研究室・亀島聡講師、コトー動物病院・堀貴子氏及びアニコム損害保険株式会社・松本拳悟氏に深く御礼申し上げます。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金(特別研究員 DC1 研究奨励費)(JSPS KAKENHI Grant Number: 21J21614)により遂行されたものです。この場を借りて深く感謝の意を表します。

VII.引用文献

1. Azizi, M., Rossignol, P. and Hulot, J. S. 2019. Emerging drug classes and their potential use in hypertension. *Hypertension*. **74**: 1075-7083
2. Balta, M. G., Loos, B. G. and Nicu, E. A. 2017 Emerging concepts in the resolution of periodontal inflammation: A role for resolvin E1. *Front Immunol*. **14**: 1682
3. Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., Walder, K. and Segal, D. 2007. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*. **148**: 4687-4694.
4. Brunetti, L., di Nisio, C., Recinella, L., Chiavaroli, A., Leone, S., Ferrante, C., Orlando, G. and Vacca, M. 2011. Effects of vaspin, chemerin and omentin-1 on feeding behavior and hypothalamic peptide gene expression in the rat. *Peptides*. **32**: 1866-1871.
5. Buechler, C., Feder, S., Haberl, E. M. and Aslanidis, C. 2019. Chemerin isoforms and activity in obesity. *Int J Mol Sci*. **20**: 1-16.
6. Caron A, Lee S, Elmquist JK, G. L. 2016. Leptin and brain-adipose crosstalks Alexandre. *Physiol Behav*. **176**: 139-148.

7. Çelik, M. N. and Ünlü Söğüt, M. 2019. Probiotics improve chemerin levels and metabolic syndrome parameters in obese rats. *Balkan Med J.* **36**: 270–275.
8. Chen, B. S. and Roche, K. W. 2007. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology.* **53**: 362–368.
9. Chen, S. and Gouaux, E. 2019. Structure and mechanism of AMPA receptor — auxiliary protein complexes. *Curr Opin Struct Biol.* **54**: 104–111.
10. Chiu, C., Miller, M. C., Caralopoulos, I. N., Worden, M. S., Brinker, T., Gordon, Z. N., Johanson, C. E. and Silverberg, G. D. 2012. Temporal course of cerebrospinal fluid dynamics and amyloid accumulation in the aging rat brain from three to thirty months. *Fluids Barriers CNS.* **9**: 1–8.
11. Chou, H. H., Teng, M. S., Hsu, L. A., Er, L. K., Wu, S. and Ko, Y. L. 2021. Circulating chemerin level is associated with metabolic, biochemical and haematological parameters—A population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf).* **94**: 927–939.
12. Corry, D. B. and Tuck, M. L. 1999. Obesity, Hypertension, and Sympathetic Nervous System Activity. *Curr Hypertens Rep.* **1**:119-126
13. Dampney, R. A., Michelini, L. C., Li, D. P. and Pan,

- H. L. 2018. Regulation of sympathetic vasomotor activity by the hypothalamic paraventricular nucleus in normotensive and hypertensive states. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **315**: H1200–H1214.
14. Darios, E. S., Winner, B. M., Charvat, T., Krasinksi, A., Punna, S. and Watts, S. W. 2016. The adipokine chemerin amplifies electrical field-stimulated contraction in the isolated rat superior mesenteric artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **311**: H498–H507.
15. David J. Ferland and Stephanie W. Watts 2015. Chemerin: A Comprehensive Review Elucidating the Need for Cardiovascular Research. *Pharmacol Res.* **99**: 351–361.
16. El-Werfali, W., Toomasian, C., Maliszewska-Scislo, M., Li, C. and Rossi, N. F. 2015. Haemodynamic and renal sympathetic responses to V1b vasopressin receptor activation within the paraventricular nucleus. *Exp Physiol.* **100**: 553–565.
17. Estienne, A., Ramé, C., Ganier, P., Chahnamian, M., Barbe, A., Grandhaye, J., Dubois, J. P., Batailler, M., Migaud, M., Lecompte, F., Adriaensen, H., Froment, P. and Dupont, J. 2021. Chemerin impairs food intake and body weight in chicken: Focus on hypothalamic

- neuropeptides gene expression and AMPK signaling pathway. *Gen Comp Endocrinol.* **304**:.
18. Ferland, D. J., Darios, E. S., Neubig, R. R., Sjögren, B., Truong, N., Torres, R., Dexheimer, T. S., Thompson, J. M. and Watts, S. W. 2018. Chemerin-induced arterial contraction is Gi - and calcium-dependent. *Vascul Pharmacol.* **88**: 30–41.
 19. Gao, H. L., Yu, X. J., Hu, H. B., Yang, Q. W., Liu, K. L., Chen, Y. M., Zhang, Y., Zhang, D. D., Tian, H., Zhu, G. Q., Qi, J. and Kang, Y. M. 2021. Apigenin Improves Hypertension and Cardiac Hypertrophy Through Modulating NADPH Oxidase-Dependent ROS Generation and Cytokines in Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Cardiovasc Toxicol.* **21**: 721–736.
 20. Goralski, K. B., McCarthy, T. C., Hanniman, E. A., Zabel, B. A., Butcher, E. C., Parlee, S. D., Muruganandan, S. and Sinal, C. J. 2007. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem.* **282**: 28175–28188.
 21. Halaas, J. L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D. A. and Friedman, J. M. 1997. Physiological response to long-term peripheral and

- central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:8878-8883
22. Hallbeck, M. and Blomqvist, A. 1999. Spinal cord-projecting vasopressinergic neurons in the rat paraventricular hypothalamus. *J Comp Neurol*. **411**: 201–211.
23. Harland, D., Gardiner, S. M. and Bennett, T. 1989. Differential cardiovascular effects of centrally administered vasopressin in conscious Long Evans and Brattleboro rats. *Circ Res*. **65**: 925–933.
24. He, L., Hu, X. T., Lai, Y. J., Long, Y., Liu, L., Zhu, B. lin and Chen, G. J. 2016. Regulation and the Mechanism of Estrogen on Cav1.2 Gene in Rat-Cultured Cortical Astrocytes. *J Mol Neurosci*. **60**: 205–213.
25. Helfer, G., Ross, A. W., Thomson, L. M., Mayer, C. D., Stoney, P. N., McCaffery, P. J. and Morgan, P. J. 2016. A neuroendocrine role for chemerin in hypothalamic remodelling and photoperiodic control of energy balance. *Sci Rep*. **6**: 1–12.
26. Helfer, G. and Wu, Q. F. 2018. Chemerin: A multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. *J Endocrinol*. **238**: R79–R94.
27. de Henau, O., Degroot, G. N., Imbault, V., Robert,

- V., de Poorter, C., McHeik, S., Galés, C., Parmentier, M. and Springael, J. Y. 2016. Signaling properties of chemerin receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2. *PLoS One*. **11**: 1–20.
28. Hernandez, M. S. and Troncone, L. R. P. 2009. Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: A short review. *J Neural Transm*. **116**: 1551–1560.
29. Hirooka, Y. and Sunagawa, K. 2010. [Hypertension, heart failure, and the sympathetic nervous system: from the regulatory abnormality as the pathophysiology to novel therapeutic aspects]. *Fukuoka Igaku Zasshi*. **101**: 190–197.
30. Hiyama, T. Y. and Noda, M. 2016. Sodium sensing in the subfornical organ and body-fluid homeostasis. *Neurosci Res*. **113**: 1–11.
31. Huber, G., Schuster, F. and Raasch, W. 2017. Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*. **125**: 72–90.
32. Judge, P. K. and Haynes, R. 2021. Nephprilysin and Nephprilysin inhibition in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **30**: 123–130
33. Kang, Y., Ding, L., Dai, H., Wang, F., Zhou, H., Gao, Q., Xiong, X., Zhang, F., Song, T., Yuan, Y., Zhu, G. and Zhou, Y. 2019. Intermedin in paraventricular

- nucleus attenuates ang ii-induced sympathoexcitation through the inhibition of nadph oxidase-dependent ros generation in obese rats with hypertension. *Int J Mol Sci.* **20**: 1–17.
34. Kaur, J., Adya, R., Tan, B. K., Chen, J. and Randeva, H. S. 2010. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: Chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **391**: 1762–1768.
35. Kc, P. and Dick, T. 2010. Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. *Respir Physiol Neurobiol.* **174**: 55–64.
36. Kennedy, A. J. and Davenport, A. P. 2018. International union of basic and clinical pharmacology CIII: Chemerin receptors CMKLR1 (Chemerin1) and GPR1 (Chemerin2) nomenclature, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev.* **70**: 174–196.
37. Kodama, T., Okada, M. and Yamawaki, H. 2020. Eukaryotic elongation factor 2 kinase inhibitor, A484954 lowered blood pressure in spontaneously hypertensive rats via inducing vasorelaxation. *J Pharmacol Sci.* **144**: 165–171.

38. Kostopoulos, C. G., Spiroglou, S. G., Varakis, J. N., Apostolakis, E. and Papadaki, H. H. 2014. Chemerin and CMKLR1 expression in human arteries and periadventitial fat: A possible role for local chemerin in atherosclerosis? *BMC Cardiovasc Disord.* **14**: 1–9.
39. Kubo, T. 2006. Mechanisms of hypertension in the central nervous system. *Yakugaku Zasshi.* **126**: 695–709.
40. Kumar, J. D., Holmberg, C., Kandola, S., Steele, I., Hegyi, P., Tiszlavicz, L., Jenkins, R., Beynon, R. J., Peeney, D., Giger, O. T., Alqahtani, A., Wang, T. C., Charvat, T. T., Penfold, M., Dockray, G. J. and Varro, A. 2014. Increased expression of chemerin in squamous esophageal cancer myofibroblasts and role in recruitment of mesenchymal stromal cells. *PLoS One.* **9**: e104877.
41. Kunimoto, H., Kazama, K., Takai, M., Oda, M., Okada, M. and Yamawaki, H. 2015. Chemerin promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle and increases mouse blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **309**: H1017–H1028.
42. Lee, B. and Shao, J. 2014. Adiponectin and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord.* **15**: 149–156.

43. Levine, G. N., Al-Khatib, S. M., Beckman, J. A., Birtcher, K. K., Bozkurt, B., Brindis, R. G., Cigarroa, J. E., Curtis, L. H., Deswal, A., Fleisher, L. A., Gentile, F., Gidding, S., Goldberger, Z. D., Hlatky, M. A., Ikonomidis, J., Joglar, J. A., Mauri, L., Pressler, S. J., Riegel, B., Wijeyesundera, D. N., Aronow, W. S., Casey, D. E., Collins, K. J., Dennison Himmelfarb, C., DePalma, S. M., Jamerson, K. A., Jones, D. W., MacLaughlin, E. J., Muntner, P., Ovbiagele, B., Smith, S. C., Spencer, C. C., Stafford, R. S., Taler, S. J., Thomas, R. J., Williams, K. A., Williamson, J. D. and Wright, J. T. 2018. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. *Hypertension*. **71**: 13–115.
44. Lozić, M., Šarenac, O., Murphy, D. and Japundžić-Žigon, N. 2018. Vasopressin, Central Autonomic Control and Blood Pressure Regulation. *Curr Hypertens Rep*. **20**: 1–7.
45. Ma, H., Chen, S.-R., Chen, H. and Pan, H.-L. 2019. Endogenous AT1 Receptor–Protein Kinase C Activity in the Hypothalamus Augments Glutamatergic Input and Sympathetic Outflow in Hypertension Huijie. *J*

- Physiol.* **597**: 4325–4340.
46. Malinow, R. 2003. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci.* **358**: 707–714.
47. Manosroi, W. and Williams, G. H. 2019 Genetics of Human Primary Hypertension: Focus on Hormonal Mechanisms. *Endocr Rev.* **40**: 825-856
48. Migeotte, I., Franssen, J. D., Goriely, S., Willems, F. and Parmentier, M. 2002. Distribution and regulation of expression of the putative human chemokine receptor HCR in leukocyte populations. *Eur J Immunol.* **32**: 494–501.
49. Min, R., Santello, M. and Nevian, T. 2012. The computational power of astrocyte mediated synaptic plasticity. *Front Comput Neurosci.* **6**: 1–15.
50. Nomura, K., Hiyama, T. Y., Sakuta, H., Matsuda, T., Lin, C. H., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Kuwaki, T., Takahashi, K., Matsui, S. and Noda, M. 2019. [Na⁺] Increases in Body Fluids Sensed by Central Na⁺ x Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H⁺-Dependent Activation of ASIC1a. *Neuron.* **101**: 60-75.e6.
51. Okada, S., Murakami, Y., Nakamura, K. and Yokotani, K. 2002. Vasopressin V1 receptor-mediated

- activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in rats. *Eur J Pharmacol.* **457**: 29–35.
52. Okada, S. and Yamaguchi, N. 2010. α 1-Adrenoceptor activation is involved in the central N-methyl-D-aspartate-induced adrenomedullary outflow in rats. *Eur J Pharmacol.* **640**: 55–62.
53. Omori, A., Goshima, M., Kakuda, C., Kodama, T., Otani, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2020. Chemerin-9-induced contraction was enhanced through the upregulation of smooth muscle chemokine-like receptor 1 in isolated pulmonary artery of pulmonary arterial hypertensive rats. *Pflugers Arch.* **472**: 335–342.
54. Otani, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. Diverse distribution of tyrosine receptor kinase b isoforms in rat multiple tissues. *J Vet Med Sci.* **79**: 1516–1523.
55. Paxinos, G. and Watson, C. 2014. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition, Elsevier.
56. Peters, A. E. and DeVore, A. D. 2022. Pharmacologic Therapy for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Cardiol Clin.* **40**: 473-489
57. Rey, C., Nadjar, A., Buaud, B., Vaysse, C., Aubert, A., Pallet, V., Layé, S. and Joffre, C. 2016. Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in

- microglial cells in vitro. *Brain Behav Immun.* **55**: 249–259.
58. Rhea, E. M., Salameh, T. S., Logsdon, A. F., Hanson, A. J., Erickson, M. A. and Banks, W. A. 2017. Blood-Brain Barriers in Obesity. *AAPS Journal.* **19**: 921–930.
59. Roh, S. gun, Song, S. H., Choi, K. C., Katoh, K., Wittamer, V., Parmentier, M. and Sasaki, S. ichi 2007. Chemerin-A new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* **362**: 1013–1018.
60. Rourke, J. L., Dranse, H. J. and Sinal, C. J. 2013. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obes Rev.* **14**: 245–262.
61. Rourke, J. L., Dranse, H. J. and Sinal, C. J. 2015. CMKLR1 and GPR1 mediate chemerin signaling through the RhoA/ROCK pathway. *Mol Cell Endocrinol.* **417**: 36–51.
62. Rourke, J. L., Muruganandan, S., Dranse, H. J., McMullen, N. M. and Sinal, C. J. 2014. Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. *J Endocrinol.* **222**: 201–215.

63. Sell, H., Divoux, A., Poitou, C., Basdevant, A., Bouilliot, J. L., Bedossa, P., Tordjman, J., Eckel, J. and Clément, K. 2010. Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**: 2892–2896.
64. Sherwood, M. W., Oliet, S. H. R. and Panatier, A. 2021. NMDARs, coincidence detectors of astrocytic and neuronal activities. *Int J Mol Sci.* **22**: 1–23.
65. Shi, Z., Wong, J. and Brooks, V. L. 2020. Obesity: Sex and sympathetics. *Biol Sex Differ.* **11**: 1–13.
66. Shimamura, K., Matsuda, M., Miyamoto, Y., Yoshimoto, R., Seo, T. and Tokita, S. 2009. Identification of a stable chemerin analog with potent activity toward ChemR23. *Peptides.* **30**: 1529–1538.
67. Shimizu, T., Shimizu, S., Higashi, Y., Nakamura, K., Yoshimura, N. and Saito, M. 2016. A stress-related peptide bombesin centrally induces frequent urination through brain bombesin receptor types 1 and 2 in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* **356**: 693–701.
68. Suzuki, H., Otsuka, T., Hitora-Imamura, N., Ishimura,

- K., Fukuda, H., Fujiwara, K., Shuto, S., Deyama, S. and Minami, M. 2021. Resolvin E1 attenuates chronic pain-induced depression-like behavior in mice: Possible involvement of Chemerin Receptor ChemR23. *Biol Pharm Bull.* **44**: 1548–1550.
69. Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A. and Montezano, A. C. 2018. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Rev.* **15**:529-539
70. Usui, T., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2012. Death-associated protein kinase 3 mediates vascular inflammation and development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* **60**: 1031–1039.
71. Wang, J. X., Wang, X. L., Xu, Z. Q., Zhang, Y., Xue, D., Zhu, R., Chen, Q., Li, Y. H., Zhu, G. Q. and Tan, X. 2022. Chemerin-9 in paraventricular nucleus increases sympathetic outflow and blood pressure via glutamate receptor-mediated ROS generation. *Eur J Pharmacol.* **936**:.
72. Weng, C., Shen, Z., Li, X., Jiang, W., Peng, L., Yuan, H., Yang, K. and Wang, J. 2017. Effects of chemerin/CMKLR1 in obesity-induced hypertension and potential mechanism. *Am J Transl Res.* **9**: 3096–

- 3104.
73. Wittamer, V., Franssen, J. D., Vulcano, M., Mirjolet, J. F., le Poul, E., Migeotte, I., Brézillon, S., Tyldesley, R., Blanpain, C., Detheux, M., Mantovani, A., Sozzani, S., Vassart, G., Parmentier, M. and Communi, D. 2003. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med.* **198**: 977–985.
74. Wittamer, V., Grégoire, F., Robberecht, P., Vassart, G., Communi, D. and Parmentier, M. 2004. The C-terminal Nonapeptide of Mature Chemerin Activates the Chemerin Receptor with Low Nanomolar Potency. *J Biol Chem.* **279**: 9956–9962.
75. Yabuki, Y., Wu, L. and Fukunaga, K. 2019. Cognitive enhancer ST101 improves schizophrenia-like behaviors in neonatal ventral hippocampus-lesioned rats in association with improved CaMKII/PKC pathway. *J Pharmacol Sci.* **140**: 263–272.
76. Yamamoto, A., Kodama, T., Otani, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2022. Chemerin fragments show different effects on systemic blood pressure dependent on carboxyl-terminal cleavage site. *J Vet Med Sci.* **84**: 1352–1357.

77. Yamamoto, A., Matsumoto, K., Hori, K., Kameshima, S., Yamaguchi, N., Okada, S., Okada, M. and Yamawaki, H. 2020. Acute intracerebroventricular injection of chemerin-9 increases systemic blood pressure through activating sympathetic nerves via CMKLR1 in brain. *Pflugers Arch.* **472**: 673–681.
78. Yamamoto, A., Otani, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2021. Chemokine-like receptor 1 in brain of spontaneously hypertensive rats mediates systemic hypertension. *Int J Mol Sci.* **22**::.
79. Yamamoto, A., Sagara, A., Otani, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2021. Chemerin-9 stimulates migration in rat cardiac fibroblasts in vitro. *Eur J Pharmacol.* **912**::.
80. Yamawaki, H. 2011. Vascular effects of novel adipocytokines: Focus on vascular contractility and inflammatory responses. *Biol Pharm Bull.* **34**: 307–310.
81. Zabel, B. A., Allen, S. J., Kulig, P., Allen, J. A., Cichy, J., Handel, T. M. and Butcher, E. C. 2005. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J Biol Chem.* **280**: 34661–34666.
82. Zabel, B. A., Nakae, S., Zúñiga, L., Kim, J. Y.,

- Ohyama, T., Alt, C., Pan, J., Suto, H., Soler, D., Allen, S. J., Handel, T. M., Song, C. H., Galli, S. J. and Butcher, E. C. 2008. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J Exp Med.* **205**: 2207–2220.
83. Zhang, H., Lin, A., Gong, P., Chen, Y., Ye, R. D., Qian, F., Zhang, Y. and Yu, Y. 2020. The chemokine-like receptor 1 deficiency improves cognitive deficits of AD mice and attenuates tau hyperphosphorylation via regulating tau seeding. *J Neurosci.* **40**: 6991–7007.
84. Zhang, Y., Xu, N., Ding, Y., Zhang, Y., Li, Q., Flores, J., Haghighiabyaneh, M., Doycheva, D., Tang, J. and Zhang, J. H. 2018. Chemerin suppresses neuroinflammation and improves neurological recovery via CaMKK2/AMPK/Nrf2 pathway after germinal matrix hemorrhage in neonatal rats. *Brain Behav Immun.* **70**: 179–193.
85. Zhao, L., Yamaguchi, Y., Shen, W. J., Morser, J. and Leung, L. L. K. 2018. Dynamic and tissue-specific proteolytic processing of chemerin in obese mice. *PLoS One.* **13**: 1–22.
86. Zhou, M. H., Chen, S. R., Wang, L., Huang, Y., Deng,

M., Zhang, J., Zhang, J., Chen, H., Yan, J. and Pan, H. L. 2021. Protein kinase C-mediated phosphorylation and a2d-1 interdependently regulate NMDA receptor trafficking and activity. *Journal of Neuroscience*. **41**: 6415–6429.