

原 著

ヒト副腎におけるアンジオテンシンII受容体サブタイプの
病態生理学的意義に関する研究

(岡本系枝研究奨励金研究報告)

東京女子医科大学 内分泌疾患総合医療センター 内科 (主任: 出村 博教授)

*北京協和医院 内分泌研究中心

タナベ	アキヨ	ナルセ	ミツヒデ	ナルセ	キヨコ
田辺	晶代	成瀬	光栄	成瀬	清子
ヨシモト	タカノブ	セキ	トシロウ	ミシナ	ナオコ
吉本	貴宣	関	敏郎	三品	直子
イマキ	トシヒロ	ツン	バイツエン	デムラ	ヒロシ
今城	俊浩	曾	正陪*	出村	博

(受付 平成10年2月6日)

**Pathophysiological Significance of Angiotensin II Receptor
Subtype in Human Adrenals****Akiyo TANABE, Mitsuhide NARUSE, Kiyoko NARUSE,
Takanobu YOSHIMOTO, Toshiro SEKI, Naoko MISHINA,
Toshihiro IMAKI, Zheng-Pei ZENG* and Hiroshi DEMURA**Department of Medicine (Director: Prof. Hiroshi DEMURA), Institute of Clinical Endocrinology,
Tokyo Women's Medical College

*Department of Endocrinology, Peking Union Medical College Hospital

The adrenal gland is one of the major target organs of angiotensin II (Ang II). However, the pathophysiological significance of the Ang II receptor subtypes, AT1 and AT2, in human adrenals has not been elucidated. We investigated the mRNA expression of each receptor subtype and their role in steroid secretion in human adrenals. Expression levels of AT1 and AT2 receptor mRNA were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction followed by Southern blot analysis of normal adrenocortical tissues (n=6) and several adrenal tumor tissues: aldosterone-producing adrenocortical adenoma (n=6), Cushing's syndrome (n=6), and pheochromocytoma (n=6). Steroid secretion was examined *in vitro* by incubating tissue with Ang II (1 μ M) or the selective AT2 agonist CGP-42112 (1 μ M) in the presence or absence of the selective AT1 antagonist CV-11974 (1 μ M). mRNA expression of both receptor subtypes was demonstrated in all human adrenal tissues examined. The expression levels of AT1 and AT2 mRNA tended to be higher in tumor tissues compared to normal tissues. Ang II-induced aldosterone secretion was suppressed 50% by the addition of CV-11974. CGP-42112 increased aldosterone secretion by 55% over the control, which was not suppressed by CV-11974. Incubation of adrenal tissues with Ang II or CGP-42112 did not affect cortisol secretion. These results suggest that AT2, as well as AT1, may be involved in the stimulation of aldosterone secretion and tumorigenesis of the human adrenals.

緒 言

アンジオテンシン II (Ang II) は特異的な膜受容体を介して、水・電解質代謝、血圧のホメオスターシス維持に重要な役割を担う。現在までに特異的拮抗薬を用いた薬理学的研究¹⁾²⁾により、AT1とAT2の二つのサブタイプの存在が明らかにされ、更に、各々のcDNAもクローニングされた^{3)~8)}。AT1受容体は主に心血管系に発現しており、血管収縮や細胞増殖の促進など Ang II の主要な作用を担うとされている⁹⁾¹⁰⁾。一方、AT2受容体は胎児の多様な間葉系組織に一過性に発現¹¹⁾するが、成熟した個体では脳¹²⁾、子宮⁸⁾、肺⁷⁾、心筋細胞¹³⁾および治癒過程にある創傷部位⁹⁾などの極めて限局した発現を示すことから、細胞の分化、増殖その他の細胞機能の調節における役割が示唆されている。一般にAT2受容体は昇圧¹⁴⁾や細胞増殖¹⁵⁾などAT1を介する Ang II の生物作用に拮抗的に作用することが示唆されているが、一方で、心臓線維芽細胞におけるコラーゲン合成¹⁶⁾や *in vivo* における血管肥厚、線維化¹⁷⁾の促進など、AT2がAT1受容体と協調的に作用するとの報告もみられる。

Ang II の主要な標的器官である副腎においてもAT1とAT2両受容体の存在が知られている¹⁸⁾が、ヒト副腎におけるその遺伝子発現と病態生理学的意義の詳細は不明である。そこで本研究では reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いてヒト副腎組織中のAT1、AT2受容体の mRNA 発現を検討するとともに、ステロイド分泌における受容体サブタイプの役割を *in vitro* で検討したので報告する。

対象および方法

1. ヒト副腎組織における AT1, AT2受容体 mRNA の発現

腎細胞癌の手術に際して術前に患者の同意を得て治療目的で摘出された正常副腎皮質組織 (n=6)、副腎腫瘍摘出術で得られたアルドステロン産生腺腫 (n=6)、クッシング症候群の副腎腺腫 (n=6)、褐色細胞腫 (n=6) の各組織を用いた。組織から AGPC 法¹⁹⁾で total RNA (tRNA) を抽出後、DNAase (Takara Biomedicals, Kyoto, Japan)

処理を行った。この tRNA (2 μ g) を template とし、oligo dT primer および MnLV reverse transcriptase (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) を用いて cDNA を合成し、AT1受容体、AT2受容体および内部標準としてのヒト glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を各々 sense primer (AT1: 5'-GCTG-GCCCTTTGGCAATTAC-3', AT2: 5'-TCAA-GGATGTCCTAGCTCTG-3', GAPDH: 5'-TC-GTGAAGGACTCATG-3') と anti-sense primer (AT1: 5'-GCTTCTTGGTGGATGAG-CTT-3', AT2: 5'-GGCATATTTCTCAGGTG-GGA-3', GAPDH: 5'-AGTGTAGCCCAGGAT-GCC-3') を用いて RT-PCR を施行した。各 primer (20 pmol) と 2.5U Taq DNA polymerase (Perkin Elmer/Cetus, Norfolk, CT) 含有反応液 (50 μ l) を一定のプログラム (denaturation: 94°C 30 sec, annealing: 58°C 30 sec, polymerization: 72°C 45 sec) で反応させた。AT1受容体、AT2受容体および GAPDH mRNA の PCR 産物は各々予想された 777, 706, 324bp のサイズを示した。

PCR 産物の同定は 1% アガロースによる電気泳動後、サザンプロット解析により行った。すなわち、0.75 M NaCl, 2.5 mM EDTA, 100 \times Denhardt's solution および 50 mg/ml denatured salmon sperm DNA 含有 0.02 M Tris buffer (pH 8.0) 中で、AT1受容体、AT2受容体および GAPDH mRNA の ³²P 標識 oligonucleotide probe を用いて 65°C でハイブリダイゼーション、0.2 \times SSC と 0.1% SDS で洗浄後、オートラジオグラフィーを行った。

RT-PCR におけるサイクル依存性および tRNA の用量依存性はサイクル数 25, 30, 40, template tRNA 量 0.5, 1, 2, 4 μ g の条件下で RT-PCR を施行して検討した。

2. ステロイドホルモン分泌における副腎 AT1, AT2受容体の役割

手術で得られた 6 例のアルドステロン産生腺腫と 1 例のクッシング症候群の副腎腺腫組織を用いた。副腎組織の *in vitro* でのインキュベーション

実験は既報の方法²⁰⁾で行った。すなわち、組織(約25~100mg)を細切後、0.2% glucose, 0.1% BSAを含むDMEM (pH7.4) 1ml中で95%O₂/5% CO₂通気下、37°C30分間プレインキュベーションした。遠心後上清を新鮮なDMEM 3 mlに置換し、Ang II (1 μM, ペプチド研究所, 大阪) または選択的AT2受容体アゴニストCGP-42112 (1 μM, ペプチド研究所)²¹⁾の単独あるいはこれらと選択的AT1受容体拮抗薬CV-11974 (1 μM, 武田薬品工業, 大阪)²²⁾の組み合わせで添加し、さらに90分間インキュベーションした。遠心後、上清中のアルドステロン、コルチゾール濃度を各々市販のRIAキット(アルドステロン:ダイナボットRI, 東京; コルチゾール: 榮研イムノケミカル研究所, 東京)で測定した。

3. 統計処理

結果はm±SEMで表現した。*In vitro*のインキュベーション実験は各プロトコールn=3で実施した。アルドステロン産生腺腫では6例の結果からm±SEMを算出した。クッシング症候群では各プロトコールn=3で実施し、そのm±SEMを算出した。2群間の平均値の差の検定はStudent's t testあるいはMann-Whitney U testで行った。p<0.05を統計学的に有意とした。

結 果

図1にAT1受容体, AT2受容体, GAPDHの各mRNAのRT-PCRにおけるtRNA量依存性とサイクル依存性を示す。25, 30, 40サイクルのいずれにおいてもtRNA量に平行したシグナルの増加を認めたが、特に30サイクルにおいて最も良好な直線性が得られた。また、0.5, 1, 2, 4 μgのtRNA量の内、2, 4 μgでより良好なサイクル依存性を認めた。それ故、以下の実験はtRNA 2 μg, 30サイクルの条件で行った。

図2にAT1, AT2 mRNAのRT-PCR/サザンプロット解析の典型的オートラジオグラムを示した。検討したヒト正常副腎組織と副腎腫瘍組織のすべてにおいて、予想された部位に一致したAT1, AT2 mRNAのバンドを認めた。各副腎組織におけるAT1, AT2受容体mRNA発現量をGAPDH mRNAで補正し、6例での結果をまとめて半定量的に比較した(図3a, b)。アルドステロン産生腺腫, クッシング症候群, 褐色細胞腫いずれの腫瘍組織においてもAT1受容体, AT2受容体mRNAの発現は正常副腎組織に比較して増加している傾向がみられた。しかしながら、各腫瘍間ではこれらAng II受容体mRNA発現には明らかな差を認めなかった。

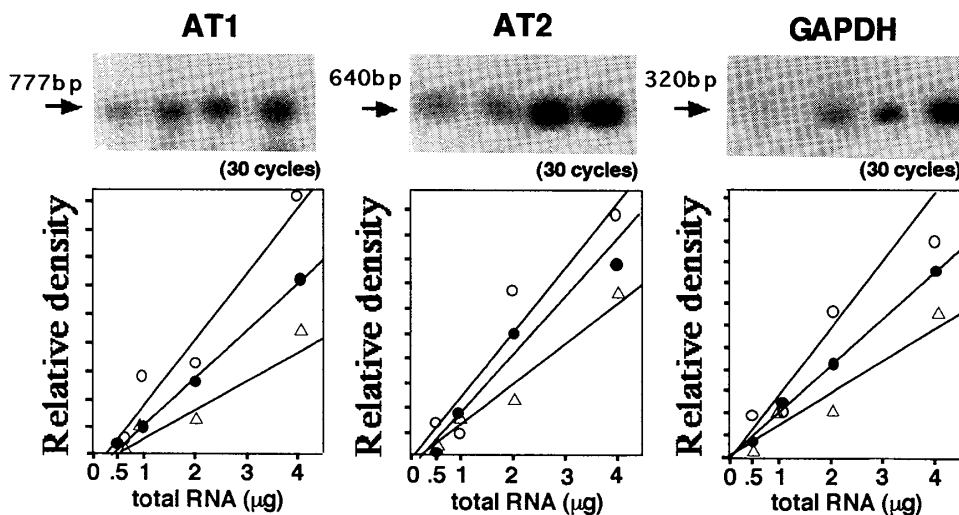


図1 ヒト副腎組織中AT1 mRNA, AT2 mRNA, GAPDH mRNAのRT-PCRにおけるtRNA量依存性とサイクル依存性の検討

上段には30サイクルにおける典型的なオートラジオグラムを、下段には0.5, 1, 2, 4 μgのtRNA量を用い、25 (△), 30 (●), 40 (○)サイクルのPCRを施行した際のrelative optical densityを示す。

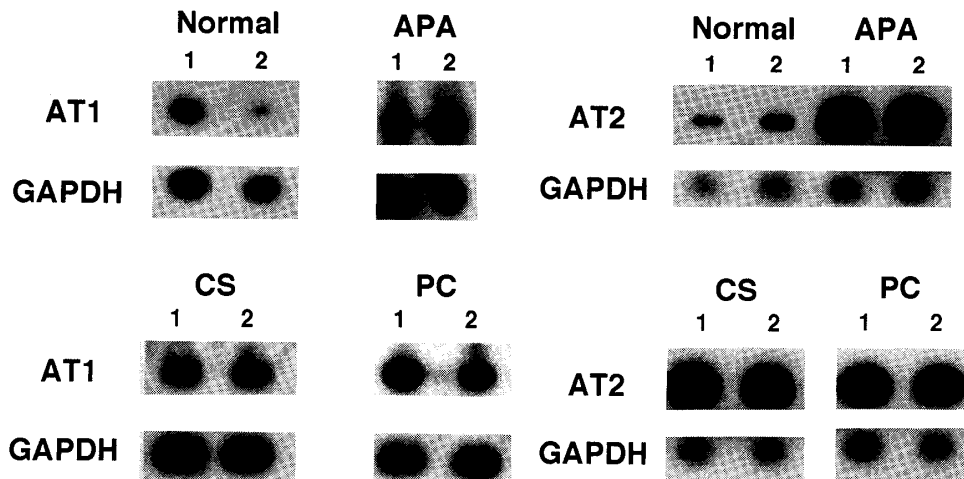


図2 RT-PCR/サザンブロット解析によるヒト副腎組織中 AT1, AT2 mRNA の典型的オートラジオグラム

正常副腎皮質(Normal), アルドステロン産生腺腫(APA), クッシング症候群の腺腫 (CS), 褐色細胞腫 (PC) の各 2 例における結果を示す.

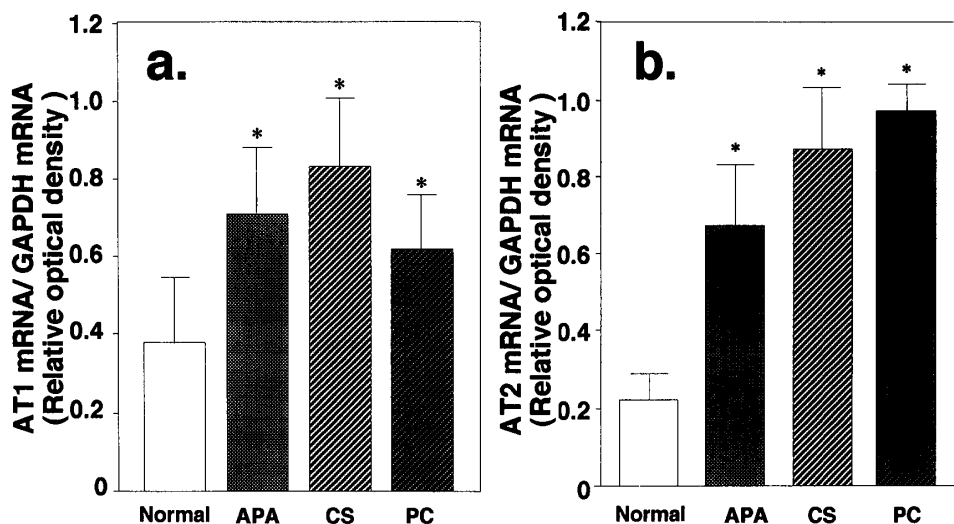


図3 正常副腎皮質(Normal), アルドステロン産生腺腫(APA), クッシング症候群の腺腫 (CS), 褐色細胞腫 (PC) の組織中 AT1 mRNA (a), AT2 mRNA (b)の発現

数値は各 6 例から得られた結果の $m \pm SEM$, * : $p < 0.05$ vs 正常副腎皮質.

次に、ヒト副腎組織における AT1, AT2受容体のステロイド分泌における役割をアルドステロン産生腺腫とクッシング症候群の腺腫を用いた *in vitro* の実験で検討した. アルドステロンの基礎分泌 (アルドステロン産生腺腫: 181.2 ± 13.7 , 243.3 ± 24.6 , 375.0 ± 33.2 , 390.8 ± 58.8 , 475.5 ± 60.8 , 550.4 ± 26.8 pg/mg tissue/90 min), コルチゾールの基礎分泌 (アルドステロン産生腺腫: 1.2 ± 0.8 , 1.8 ± 0.5 , 2.0 ± 0.6 , 2.4 ± 0.4 , $2.9 \pm$

0.6 , 2.9 ± 0.8 ng/mg tissue/90 min; クッシング症候群: 12.8 ± 1.8 ng/mg tissue/90 min) に症例ごとの差を認めため、各例ごとにこれらの基礎分泌を100%として結果を%で計算し、更にアルドステロン産生腺腫では 6 例での結果を $m \pm SEM$ にて表現した. その結果、図 4a に示したごとく、Ang IIにより約 2 倍に増加したアルドステロン分泌は AT1受容体の特異的拮抗薬である CV-11974で有意に阻害されたが、その程度は約

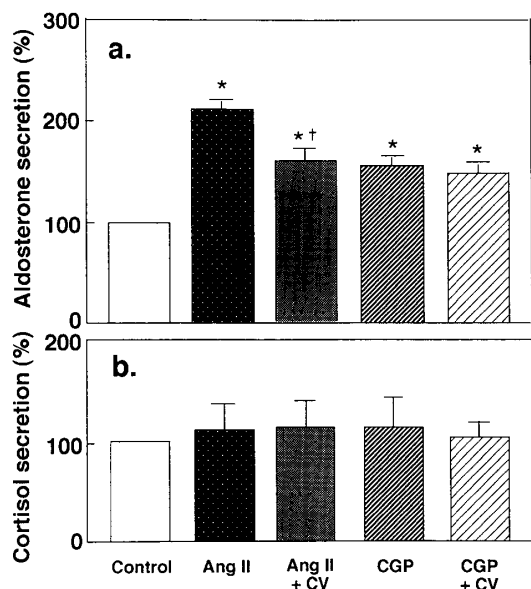


図4 アルドステロン産生腺腫組織からのアルドステロン (a) およびコルチゾール (b) 分泌に及ぼす Ang II, 選択的 AT2 アゴニスト CGP-42112 (CGP), 選択的 AT1 拮抗薬 CV-11974 (CV) の影響
 数値は 6 例から得られた結果の $m \pm SEM$, * : $p < 0.05$ vs control, + : $p < 0.05$ vs Ang II.

50%で完全には阻害されなかった。一方, AT2 受容体の選択的アゴニストである CGP-42112 によりアルドステロン分泌は約1.5倍に増加し,それは CV-11974では全く阻害されなかった。更に, Ang II, CGP-42112はいずれもアルドステロン産生腺腫 (図4b) およびクッシング症候群腺腫 (図5) からのコルチゾール分泌には有意な影響を与えなかった。

考 案

ヒト副腎における Ang II 受容体サブタイプに関する報告は極めて少ない。Takayanagi et al⁵⁾が各1例のクッシング症候群とアルドステロン産生腺腫における AT1 mRNA の発現, Naville et al²³⁾が培養ヒト副腎束状層/網状層細胞における AT1 結合部位とその mRNA の発現, Tsuzuki et al⁸⁾が1例の褐色細胞腫における AT2 mRNA の発現を報告しているのみである。本研究では RT-PCR とサザンブロット解析により, 正常副腎皮質組織および各種の機能性副腎腫瘍組織に共通して, AT1 と AT2 mRNA が発現していることを明らかにした。特に, AT2 受容体 mRNA がアルドステロン産生腺腫とクッシング症候群の腺腫に発現

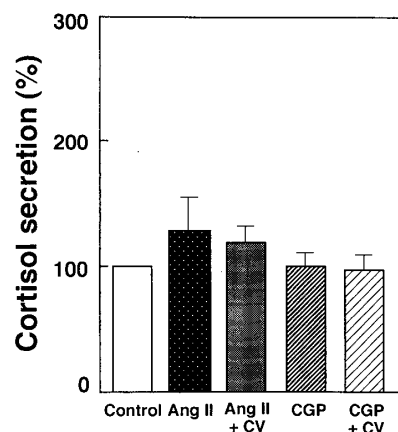


図5 クッシング症候群の副腎腺腫組織からのコルチゾール分泌に及ぼす Ang II, 選択的 AT2 アゴニスト CGP-42112 (CGP), 選択的 AT1 拮抗薬 CV-11974 (CV) の影響

数値は 1 例から得られた組織を用いて各プロトコール $n = 3$ で実施した結果の $m \pm SEM$, * : $p < 0.05$ vs control.

していることを示したのは本研究が初めてである。Opocher et al²⁴⁾は結合実験により正常副腎および腫瘍組織において AT1, AT2 両受容体の存在を報告しており, 今回の結果と合わせて, ヒト副腎における二つの受容体サブタイプの存在が蛋白, mRNA いずれのレベルでも証明されたことになる。

更に, Opocher et al²⁴⁾は原発性アルドステロン症の腺腫においては AT1, AT2 両受容体が増加していることを蛋白レベルで示している。今回の我々の検討は RT-PCR を用いており正確な定量的比較はできないが, 副腎腫瘍組織における両受容体 mRNA の発現は正常副腎皮質組織に比較して増加傾向を認めた。この AT1, AT2 の平行した動態はラットの肥大心²⁵⁾や心筋梗塞モデル¹³⁾における結果とも一致しており, その転写調節において共通の因子が関与していることが示唆される。しかしながら, Ang II, 各種の細胞増殖因子, グルココルチコイド, cAMP はいずれも AT1 をアップレギュレーション²⁶⁾²⁷⁾, AT2 をダウンレギュレーション²⁸⁾することが報告されており, 両受容体の発現には逆方向に作用することから, 副腎組織における両受容体の平行した変化はこれらの因子のみでは単純に説明できない。更に, アル

ドステロン産生腺腫ではレニン・アンジオテンシン系が抑制されていることから、腺腫における Ang II 受容体の増加に Ang II が関与しているとは考えにくい。Ang II 受容体、特に AT2 の発現調節機構はいまだ不明な点が多く、また動物の種差、組織特異性、*in vivo* と *in vitro* の差などが報告されており、今後の検討を待たねばならない。

副腎組織における AT2 受容体の役割は明らかではない。アルドステロン分泌は Ang II の主な副腎作用であることから、*in vitro* で AT1 拮抗薬あるいは AT2 アゴニストを用いてアルドステロンとコルチゾール分泌における両受容体の役割を検討した。その結果、Ang II 刺激によるアルドステロン分泌は AT1 拮抗薬で約 50% しか抑制されなかったのに対して、AT2 アゴニストで約 1.5 倍に増加し、それは AT1 拮抗薬では全く阻害されなかった。このことから、ヒト副腎においては、AT1 のみならず AT2 受容体も Ang II によるアルドステロン分泌に促進的に関与することが示唆された。

ラット心筋梗塞モデルの梗塞巣¹³⁾や傷害血管内皮²⁹⁾における AT2 受容体の発現亢進が報告されており、また AT2 受容体遺伝子のバルーン傷害血管への導入が新生内膜の形成を抑制すること²⁹⁾も報告されている。更に、AT2 ノックアウトマウスでは血圧の上昇が示されている³⁰⁾。これらの結果は心血管系において AT2 受容体が AT1 受容体の作用に拮抗的に作用することを示しており、それ故、今回示したヒト副腎における AT2 受容体の機能は心血管系のそれと対照的で極めて興味深い。もちろん、今回は正常副腎組織における検討を行っていないことから、アルドステロン産生腺腫での結果が疾患に特異的である可能性も否定できないが、正常副腎皮質組織にも AT1, AT2 両受容体の mRNA 発現を認めたことから、これら受容体サブタイプは正常副腎でも基本的に同様の機能を担っていると考えられる。

このアルドステロン産生腺腫に存在する AT1, AT2 両受容体が、アルドステロンの自律性過剰分泌に関与するか否かは明らかではない。アルドステロン産生腺腫ではアルドステロン分泌は

Ang II よりも ACTH に対する依存性が大³¹⁾で、しかも通常、血中 Ang II 濃度は低下しているため、Ang II 受容体の動態がアルドステロンの過剰分泌に関与する可能性は少ないと考えられる。しかしながら、ホルモン受容体の遺伝子変異が下垂体や甲状腺などの機能亢進をきたすことが報告されている。現在まで AT1 遺伝子の翻訳領域には変異はみつかっていないが³²⁾、AT2 受容体遺伝子の解析は報告がなく、腫瘍の Ang II 受容体の異常がアルドステロン過剰分泌に関与する可能性は否定できない。一方、クッシング症候群と褐色細胞腫の腫瘍組織中 Ang II 受容体が、各々におけるコルチゾール分泌とカテコールアミン分泌に関与していることも考えられる。しかしながら、Ang II あるいは選択的 AT2 アゴニストはアルドステロン産生腺腫とクッシング症候群の腺腫からのコルチゾール分泌には影響しなかった。また Ang II はカテコールアミン分泌を刺激³³⁾し、褐色細胞腫ではしばしば血中レニン・アンジオテンシン系の亢進を伴うが、褐色細胞腫では Ang II 受容体密度と Ang II に対する親和性が正常組織よりもむしろ低下しているとの報告⁵⁾²⁴⁾もあり、腫瘍組織の Ang II 受容体のカテコールアミン産生における役割は明らかではない。

Ang II は副腎細胞の増殖を促進すること³⁴⁾が報告されており、また近年になり Ang II が主に AT1 受容体を介して血管平滑筋細胞の増殖を促進する¹⁰⁾とも報告されていることから、副腎においても AT1 受容体が腫瘍発生に関与することが示唆される。AT1, AT2 受容体が、異なる内分泌活性を呈する副腎腫瘍に共通してその発現の増加傾向を示したこともその仮説を支持している。AT2 受容体は種々の胎児組織⁶⁾¹¹⁾や治癒過程の創傷部位⁹⁾に一過性に強い発現を示すこと、ラット卵巣顆粒膜細胞³⁵⁾やラット褐色細胞腫細胞⁸⁾のアポトーシスに関与することなどから、AT2 受容体が AT1 を介する細胞増殖や脱分化に拮抗的に作用することが示唆されている。一方、心血管系の肥大と線維化などにおいて AT1 受容体と同様の作用を発現することも報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。それ故、ヒト副腎の AT2 受容体が副腎細胞の増殖にお

いて、アルドステロン分泌と同様、AT1作用と協調的に作用するのか、あるいは拮抗的に作用するのかは極めて興味ある課題といえる。今後、ヒト副腎におけるAng II受容体サブタイプの病態生理学的意義を解明するため、副腎細胞増殖におけるAT2受容体の役割と副腎腫瘍における情報伝達機構の検討が必要であると考えられる。

結 論

ヒト副腎組織におけるAng II受容体のサブタイプAT1, AT2のmRNA発現をreverse transcription-polymerase chain reaction/ザンブロット解析により、またステロイド分泌における役割を*in vitro*のインキュベーション実験で検討し、以下の結果を得た。

1. 正常副腎組織、アルドステロン産生腺腫、クッシング症候群腺腫、褐色細胞腫の腫瘍組織のいずれにおいても、AT1, AT2受容体mRNAの発現を認めた。

2. 腫瘍組織でのAT1, AT2 mRNA発現は正常副腎組織に比べて大である傾向を認めた。

3. Ang IIにより副腎組織からのアルドステロン分泌は約2倍に増加したが、選択的AT1拮抗薬CV-11974ではその約50%が阻害されたのみで、一方、選択的AT2アゴニストCGP-42112ではアルドステロン分泌は約55%増加し、それはCV-11974では阻害されなかった。

4. Ang II, CGP-42112はいずれもアルドステロン産生腺腫、クッシング症候群腺腫からのコルチゾール分泌には影響しなかった。

以上から、AT1, AT2いずれの受容体サブタイプもヒト副腎におけるアルドステロン分泌に促進的に作用すること、更に副腎腫瘍発生において病態生理学的意義を有する可能性が示唆された。

本研究の一部は岡本系枝研究奨励金、文部省科学研究費、更に厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班研究費により行った。またAT1拮抗薬CV-11974を提供して戴いた武田薬品工業株式会社(大阪)に感謝致します。

文 献

1) Chiu AT, Herblin WF, McCall DE et al:

- Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165 : 196-203, 1989
- 2) Whitebread SE, Mele M, Kamber B et al: Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 163 : 284-291, 1989
- 3) Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK et al: Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351 : 233-236, 1991
- 4) Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S et al: Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351 : 230-236, 1991
- 5) Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y et al: Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding human type I angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 183 : 910-916, 1992
- 6) Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K et al: Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 268 : 24543-24546, 1993
- 7) Koike G, Horiuchi M, Yamada T et al: Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun* 203 : 1842-1850, 1994
- 8) Tsuzuki S, Ichiki T, Nakakubo H et al: Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 200 : 1449-1454, 1994
- 9) Viswanathan M, Saavedra JM: Expression of angiotensin II AT2 receptors in rat skin during experimental wound healing. *Peptides* 13 : 783-786, 1992
- 10) Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A et al: Angiotensin receptors regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor- β 1 expression. *Hypertension* 23 : 587-592, 1994
- 11) Grady EF, Sechi LA, Griffin CA et al: Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88 : 921-933, 1991
- 12) Chang PSL, Lotti VJ, Chrzn TB et al: Two angiotensin II binding sites in rat brain revealed using [125 I]Sar 1 , Ile 8 -angiotensin II and selective nonpeptide antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* 171 : 813-817, 1990

- 13) **Nio Y, Matsubara H, Murasawa S et al:** Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* 95 : 46-54, 1995
- 14) **Scheuer DA, Perrone MH:** Angiotensin type 2 receptor mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *Am J Physiol* 264 : R917-R923, 1993
- 15) **Stoll M, Steckelings UM, Paul M et al:** The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cell. *J Clin Invest* 95 : 651-657, 1995
- 16) **Brilla CG, Zhou G, Matsubara L et al:** Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 26 : 809-820, 1994
- 17) **Levy BI, Benessiano J, Henrion D et al:** Chronic blockade of AT₂-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest* 98 : 418-425, 1996
- 18) **Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT et al:** Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 12 : 55-62, 1991
- 19) **Chomczynski P, Sacchi N:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156-159, 1987
- 20) **Naruse M, Obana K, Naruse K et al:** Atrial natriuretic polypeptide inhibits cortisol secretion as well as aldosterone secretion in vitro from human adrenal tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 64 : 10-16, 1987
- 21) **Buisson B, Bottary SP, De Gasparo M et al:** The angiotensin AT₂ receptor modulates T-type calcium current in non-differentiated NG 108-15 cells. *FEBS Lett* 309 : 161-164, 1992
- 22) **Shibouta Y, Inada Y, Ojima M et al:** Pharmacological profile of a highly potent and long-acting angiotensin II receptor antagonist, 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylic acid (CV-11974), and its prodrug, (+/-)-1-(cyclohexyloxy carbonyloxy)-ethyl-2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylate (TCV-116). *J Pharmacol Exp Ther* 266 : 114-120, 1993
- 23) **Naville D, Lebrethon MC, Kermabon AY et al:** Characterization and regulation of the angiotensin II type-1 receptor (binding and mRNA) in human adrenal fasciculata-reticularis cells. *FEBS Lett* 321 : 184-188, 1993
- 24) **Opocher G, Rocco S, Cimolato M et al:** Angiotensin II receptors in cortical and medullary adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82 : 865-869, 1997
- 25) **Suzuki J, Matsubara H, Urakami M et al:** Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res* 73 : 439-447, 1993
- 26) **Iwai N, Inagami T:** Regulation of the expression of the rat angiotensin II receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 182 : 1094-1099, 1992
- 27) **Guo IF, Inagami T:** Epidermal growth factor-enhanced human angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 23(Part 2) : 1032-1035, 1994
- 28) **Ichiki T, Inagami T:** Transcriptional regulation of the mouse antigens II type 2 receptor gene. *Hypertension* 25(Part 2) : 720-725, 1995
- 29) **Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M et al:** The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 10663-10667, 1995
- 30) **Ichiki T, Labosky PA, Shiota C et al:** Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377 : 748-750, 1995
- 31) **Fontes RG, Kater CE, Biglieri EG et al:** Reassessment of the predictive value of the postural stimulation test in primary aldosteronism. *Am J Hypertens* 4 : 786-791, 1991
- 32) **Nawata H, Takayanagi R, Ohnaka K et al:** Type 1 angiotensin II receptors of adrenal tumors. *Steroids* 60 : 28-34, 1995
- 33) **Unger A, Phillips JH:** Regulation of the adrenal medulla. *Physiol Rev* 63 : 787-843, 1983
- 34) **Gill GN, III CR, Simonian MH:** Angiotensin stimulation of bovine adrenocortical cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 5569-5573, 1977
- 35) **Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y et al:** Characterization of angiotensin II type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207 : 593-598, 1995