

原 著

マウス褐色および白色脂肪細胞におけるレプチン分泌とレプチン
mRNA 発現に及ぼすアンジオテンシン II の作用

東京女子医科大学 医学部 第二内科学 (主任: 高野加寿恵教授)

*同 薬理学 (主任: 村木 篁教授)

ミシナ ナオコ ウチダ ヨウコ ナルセ ミツヒデ
三品 直子・内田 庸子*・成瀬 光栄ムラキ タカムラ タカノ カズエ
村木 篁*・高野加寿恵

(受付 平成 11年 10月 21日)

**Differential Effects of Angiotensin II on the Secretion and mRNA Expression of
Leptin in Mouse Cultured Brown and White Adipocytes****Naoko MISHINA, Yoko UCHIDA, Mitsuhide NARUSE,
Takamura MURAKI and Kazue TAKANO**

Department of Medicine, Institute of Clinical Endocrinology (Director: Prof. Kazue TAKANO) and

*Department of Pharmacology (Director: Prof. Takamura MURAKI),

Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

Although it has been implied that the renin/angiotensin system is deeply involved in the regulation of adipocyte function, the details of the role of the system remain to be elucidated. In the present study, we investigated the effects of angiotensin II (Ang II) on leptin secretion and leptin mRNA expression in the adipocytes of brown adipose tissues (BAT) and white adipose tissues (WAT) of mice. Mature adipocytes were prepared by collagenase treatment and culture in DMEM containing 10% fetal bovine serum and 4 nM insulin. Cultured adipocytes were incubated in the medium containing Ang II (10^{-9} ~ 10^{-11} M), the AT1-selective antagonist Losartan (10^{-6} ~ 10^{-8} M), or the AT2-selective antagonist PD 123319 (10^{-6} ~ 10^{-8} M) alone, or a combination of Ang II and antagonist. After incubation for 24 hr, the leptin concentration in the medium was determined by radioimmunoassay. Leptin mRNA expression in the cells was determined by RT-PCR. Ang II increased and decreased leptin secretion by BAT and WAT, respectively, in a dose-dependent manner. Ang II did not affect leptin mRNA expression in BAT, but it significantly decreased leptin mRNA expression in WAT. The effect of Ang II on leptin secretion by BAT was significantly suppressed by PD123319 and the effect of Ang II on leptin secretion and leptin mRNA expression in WAT was suppressed by Losartan. These results suggested that Ang II is involved in the regulation of adipose tissue function through its effects on leptin synthesis and/or secretion. In addition, since the effects in BAT and WAT were mediated through different Ang II receptor subtypes, AT2 in BAT and AT1 in WAT, it is suggested that

the receptor subtype is of great biological significance in the action of Ang II on adipocytes as well as on the cardiovascular system.

緒 言

アンジオテンシン II (Ang II) は水・電解質、血圧の恒常性維持や細胞増殖の調節などの多様な機能を有する。その作用は細胞膜に存在する特異的受容体を介して発現するが、近年、薬理学的手法により AT1, AT2 の少なくとも二つの受容体サブタイプの存在が明らかにされ¹⁾²⁾、各々の cDNA がクローニングされた^{3)~6)}。AT1 受容体は主に心血管系に発現しており血管収縮、アルドステロン分泌、心血管系の細胞増殖など Ang II の主要な作用にかかわることが示されている。AT2 受容体は心血管系では昇圧⁷⁾、細胞増殖⁸⁾などの AT1 受容体を介する作用に拮抗的に作用することが報告されている一方、心血管系組織における線維化⁹⁾¹⁰⁾やアルドステロン分泌¹¹⁾など AT1 と同様の作用を示すことも報告されており、両受容体サブタイプの機能的役割分担は組織によって異なる。

ところで近年になり従来は脂肪の貯蔵部位と考えられてきた脂肪細胞が種々の生理活性物質を産生することが明らかにされている¹²⁾。特に、アンジオテンシノーゲン、レニン、アンジオテンシン変換酵素、Ang II、その特異的な受容体など、レニン・アンジオテンシン系のすべての構成因子の存在¹³⁾¹⁴⁾が明らかにされ、また、Ang II が脂肪細胞における PGI₂ 産生¹⁵⁾、脂肪細胞の肥大、増殖、脂肪合成¹⁵⁾、脂肪前駆細胞からの分化¹⁶⁾などを促進することが報告されていることから、脂肪細胞の機能の調節におけるレニン・アンジオテンシン系の役割が注目される。

更に最近、脂肪細胞からは視床下部からのニューロペプチド Y 分泌を抑制し、摂食、体重を減少させるホルモン、レプチンが分泌されることが明らかにされた¹⁷⁾。レプチンはインスリン、コルチゾールなど種々の内分泌因子によりその合成、分泌が増加すること¹⁸⁾、血中レプチンとレニン・アンジオテンシン系とは密接に関連することが報告¹⁹⁾²⁰⁾されているが、Ang II がレプチン分泌

に及ぼす影響は不明である。

本研究ではマウス褐色脂肪組織 (brown adipose tissue: BAT) および白色脂肪組織 (white adipose tissue: WAT) の細胞培養系において、Ang II が脂肪細胞からのレプチン分泌およびレプチン mRNA 発現に及ぼす影響を検討するとともに、特異的な受容体拮抗薬を用いて、Ang II 受容体サブタイプの役割を検討したので報告する。

対象および方法

1. 脂肪細胞の単離と初代培養

4 週齢の雄性 ICR 系マウスの肩甲骨間から褐色脂肪組織を、副精巣周囲から白色脂肪組織を採取し、Rehmark の方法²¹⁾に準じて各々から脂肪細胞を単離、培養した。すなわち、細切した組織を 0.2% type 2 コラゲナーゼ含有 HEPES 緩衝液 (pH 7.4) で 5 分毎に攪拌しながら 37°C、30 分間インキュベートした。終了後、残存組織を 250 μm のナイロンメッシュで除去後、細胞懸濁液を静置し成熟脂肪細胞と脂肪滴を除去した。間質・血管成分を含有する濾過液を採取し、2,400 rpm で 10 分間遠心し細胞を培養液に懸濁した。脂肪前駆細胞は 6 ウエルマルチプレートを用いて 10% ウシ胎仔血清、4 nM インスリン、25 μg/ml Na アスコルビン酸、10 mM HEPES、4 mM グルタミン、50 IU/ml ペニシリン、50 μg/ml ストレプトマイシン含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma Chemical Co. Ltd., St. Louis, MO) 中、5% CO₂ 通気下で培養した。

2. 培養脂肪細胞からのレプチン分泌の検討

培養 10 日目の成熟脂肪細胞の上清を新鮮な 0.1% ウシ血清アルブミン含有 DMEM に置換し、Ang II (ペプチド研究所、大阪; 10⁻⁸~10⁻¹¹M)、AT1 受容体拮抗薬 Losartan (萬有製薬、東京; 10⁻⁶~10⁻⁸M) あるいは AT2 受容体拮抗薬 PD 123319 (Warner-Lambert-Park, Davis, Ann Arbor, MI; 10⁻⁶~10⁻⁸M) を単独あるいは Ang II とこれら拮抗薬とを組み合わせる培養液に添加し、更に 24 時間インキュベート後、遠心で上清を

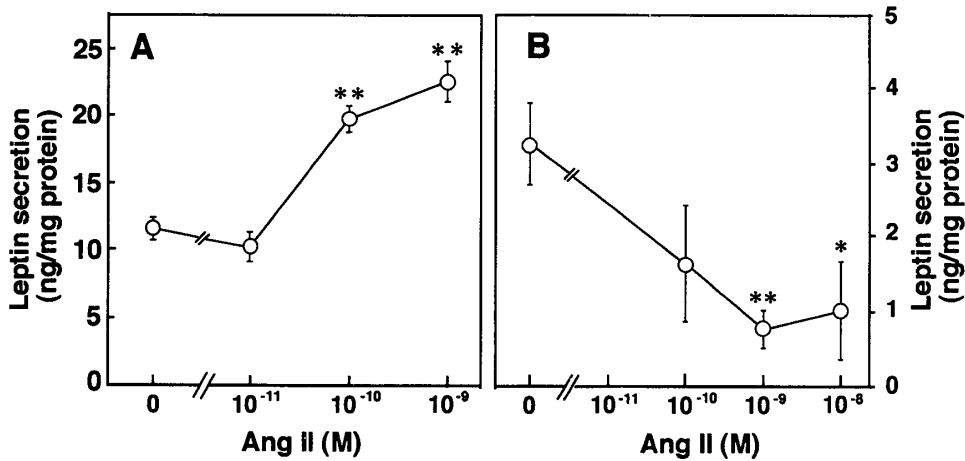


図1 Ang IIがBAT (A) およびWAT (B) からのレプチン分泌に及ぼす用量依存性の変化

結果は24時間培養液の培地中のレプチン量を $m \pm SE$ (BAT: $n=8$, WAT: $n=6$) で表した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Ang II (0 M).

採取し、 -20°C に保存した。上清中のレプチン濃度は市販のラジオイムノアッセイキット (Linco Research, Inc., St. Charles, MO) で測定した。分泌量は培養細胞のmg 蛋白当りで表現した。

3. RT-PCRによるマウスレプチン mRNA 発現の検討

培養細胞から total RNA を市販のキット (Isogen, Nippongene, 富山) を用いて acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method²²⁾ で抽出した。

一本鎖 cDNA は 2 mg の total RNA を鋳型として oligo dT プライマーと SuperscriptTM II 逆転写酵素 (Gibco BRL, Grand Island, NY) を用いて合成した。

PCR は cDNA 合成液 1 μl , Taq DNA ポリメラーゼ (PerkinElmer/Cetus, Norfolk, CT) 2.5 U, マウス ob 遺伝子 cDNA 配列²³⁾ からデザインしたセンスプライマー (5'-TGCCTATCCAGA-AAGTCCAG-3') 20 pmol, アンチセンスプライマー (5'-CAGCATTCAGGGCTAACATC-3') 20 pmol を 1 \times の反応液 20 μl 中で, ob 遺伝子は 30 サイクル, β -アクチンは 24 サイクル, 所定のプログラム (denaturation: 94°C 60 秒, annealing: 54°C 60 秒, polymerization: 72°C 60 秒) で実施した。また同じく二つのプライマー (センス: 5'-

ACCGTGAAAAGATGACCAG-3', アンチセンス: 5'-TACGGATGTCAACGTCACAC-3') を用いてマウス β -アクチンを増幅し内部コントロールとした。増幅されたレプチン mRNA と β -アクチンのサイズは各々 439 bp と 528 bp であった。

PCR 産物を 2% アガロースゲルを用いた電気泳動後, 各バンドをデンストメトリー (Fluor-STM multiImager, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) により測定した。

4. 統計学的解析

各プロトコール $n=6\sim 8$ で実施し, 結果は平均値 \pm 標準誤差で表現した。2 群間の平均値の差の検定は Student t-test あるいは Mann-Whitney U 試験で行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結果

BAT および WAT からのレプチンの 24 時間培養中への基礎分泌は各々 11.8 ± 0.8 ng/mg 蛋白, 3.4 ± 0.5 ng/mg 蛋白であった。図 1 に Ang II が培養細胞からのレプチン分泌に及ぼす影響を示す。Ang II は BAT からのレプチン分泌, WAT からのレプチン分泌を各々用量依存性に増加あるいは減少した (図 1 A, B)。これらの作用はいずれも培養 24 時間まで時間依存性であった (図 2 A, B)。

RT-PCR により BAT と WAT のいずれにおい

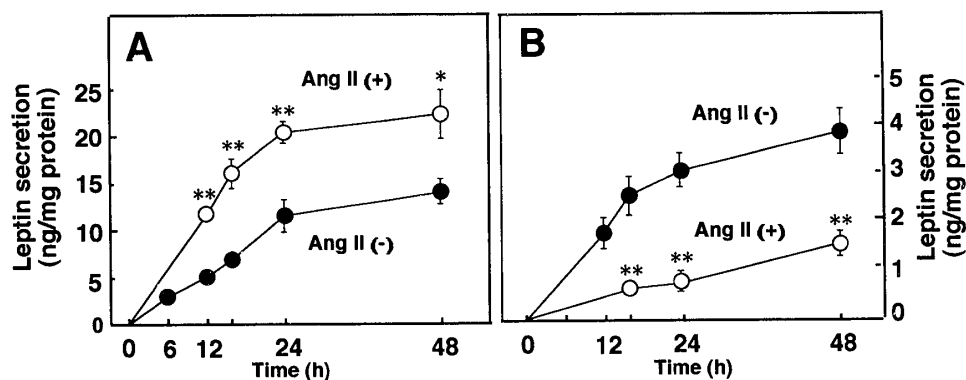


図2 Ang II (10^{-9} M) がBAT (A) および WAT (B) からのレプチン分泌に及ぼす時間依存性の変化
結果は $m \pm SE$ (BAT: $n=8$, WAT: $n=8$) で表した。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Time (0).

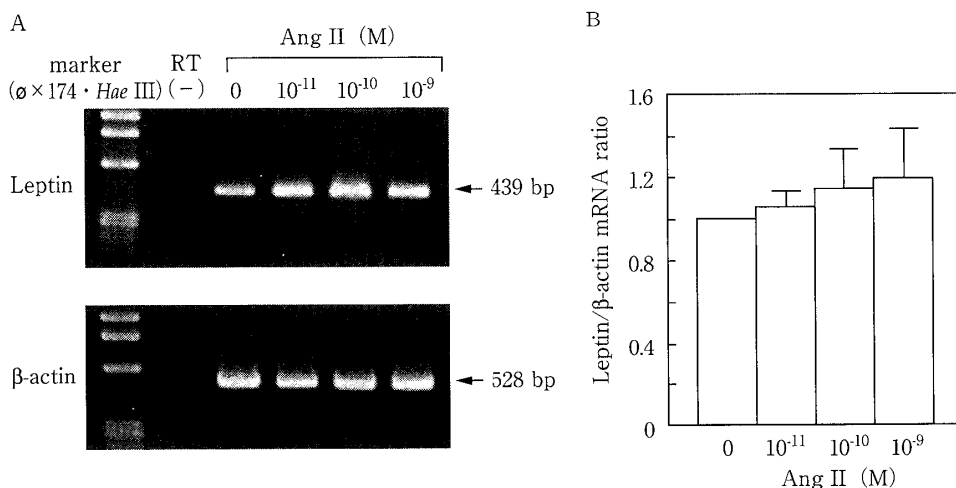


図3 Ang II がBATにおけるレプチン mRNA 発現に及ぼす影響
A: 典型的なポリアクリルアミド電気泳動のパターン, B: RT-PCRによるレプチン mRNA 発現量の半定量的比較 (Ang II 無添加時の結果を 1.0 として表現), 薬物は 24 時間作用させ, 結果は $m \pm SE$ ($n=8$) で表現.

でもレプチン mRNA の発現を認めたが, BAT では Ang II の添加により増加傾向を示したが有意な変化ではなかった (図 3). 一方, WAT では Ang II の添加によりレプチン mRNA は有意な減少を示した (図 4).

図 5 に AT1 受容体拮抗薬である Losartan あるいは AT2 受容体拮抗薬である PD123319 がレプチン分泌に及ぼす影響を示した. その結果, いずれも単独ではレプチンの基礎分泌には影響しなかったが, BAT においては Ang II (10^{-9} M) によるレプチン分泌の増加は PD123319 で有意に阻害されたが, Losartan では影響されなかった (図 5

A). 一方, WAT においても Losartan と PD123319 単独ではレプチンの基礎分泌に影響を与えなかったが, Ang II によるレプチン分泌の減少は Losartan で有意に回復し, PD123319 では影響されなかった (図 5 B).

図 6 に Losartan と PD123319 が BAT と WAT におけるレプチン mRNA の発現に及ぼす影響を示した. BAT におけるレプチン mRNA は Losartan あるいは PD123319 では影響されなかった (図 6 A). 一方, WAT において Losartan あるいは PD123319 単独ではレプチン mRNA 発現に影響しなかったが, Ang II によるレプチン mRNA

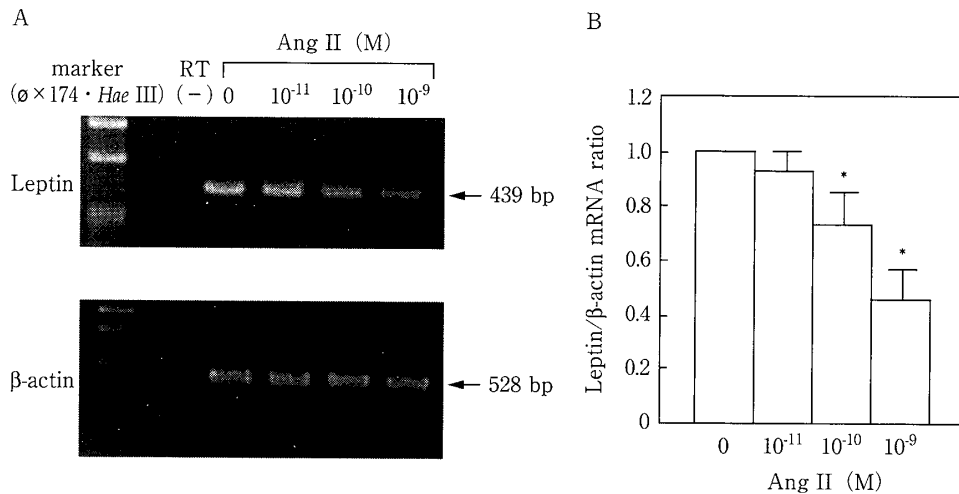


図4 Ang IIがWATにおけるレプチン mRNA 発現に及ぼす影響
A: 典型的なポリアクリルアミド電気泳動のパターン, B: RT-PCRによるレプチン mRNA 発現量の半定量的比較 (Ang II 無添加時の結果を1.0として表現), 薬物は24時間作用させ, 結果は $m \pm SE$ ($n=8$) で表現, * $p<0.05$ vs Ang II (0 M).

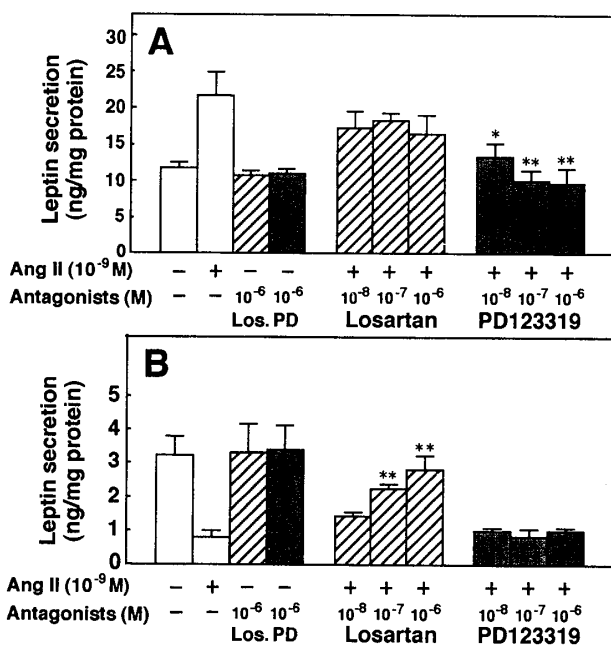


図5 AT1拮抗薬 Losartan (10^{-7} M) および AT2拮抗薬 PD123319 (10^{-7} M) のBAT (A) および WAT (B) におけるレプチン分泌に及ぼす影響
薬物は24時間作用させ, 結果は $m \pm SE$ (BAT: $n=7$, WAT: $n=6$) で表現, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs Ang II (10^{-9} M) 単独添加時.

発現の減少は Losartan により回復した(図6B).

考 察

Ang IIは脂肪細胞の肥大, 増殖, 脂質合成, 分化などの機能に影響することが報告⁽⁵⁾⁽¹⁶⁾されてい

る. 今回, 著者らはマウス培養脂肪細胞において Ang IIがレプチン分泌に影響することを明らかにした. レプチンは視床下部に作用しニューロペプチド Yの分泌の抑制, 摂食や交感神経活性の変化を介して体重の調節にかかわる重要なホルモンである⁽⁷⁾. レニン・アンジオテンシン系は血圧調節, 高血圧の病態に主要な役割を担うことが知られているが, 今回明らかにした Ang IIのレプチン分泌への影響は, レニン・アンジオテンシン系が肥満の病態にも関与する可能性を示唆しており, 肥満と高血圧とが密接に関連するとの観点から興味深い.

脂肪細胞には褐色脂肪組織 (BAT) と白色脂肪組織 (WAT) がある. 前者は肩甲骨間, 腋窩部, 腎周囲組織など極めて限局した部位に局在しており, 脂肪の消費とエネルギーの産生にかかわる⁽²⁴⁾. 後者は皮下組織や種々の臓器の周囲に広範に存在し, エネルギーを中性脂肪として貯蔵する⁽²⁵⁾. 今回の検討から Ang IIはBATでのレプチン分泌を増加したのに対して, WATではレプチン分泌を減少するとの対照的な作用が示された. Cassisら⁽²⁶⁾は同じくラットのWATにおいて, アンジオテンシンIIがWATのmassとレプチン分泌を減少するとの報告をしており, 今回の結果もそれと一致しているが, BATにおける作用は報

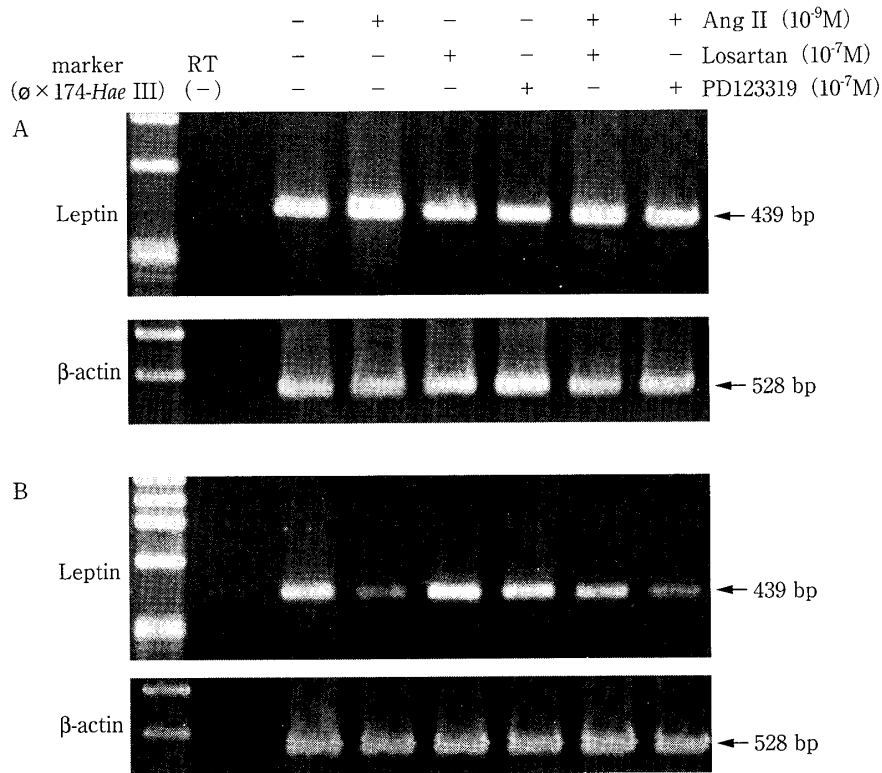


図6 AT1拮抗薬 Losartan (10⁻⁷M) と AT2拮抗薬 PD123319 (10⁻⁷M) が BAT (A) および WAT (B) におけるレプチン mRNA 発現に及ぼす影響

告がない。この BAT と WAT における対照的な Ang II の作用は、エネルギー代謝に関して BAT と WAT が拮抗的な役割を担うことと関連していると考えられる。

最近、レプチンは中枢作用に加えて脂肪細胞に対する直接作用を有することが報告されており、BAT では糖利用を促進し、WAT では脂肪分解を促進する²⁷⁾²⁸⁾。それゆえ、Ang II は BAT においてレプチン分泌を増加しその中枢性および局所作用を介して体脂肪量、体重を減少する方向に作用する一方、WAT においてレプチン分泌を減少し体脂肪量、体重を増加する方向に作用すると考えられ、各々、BAT と WAT に特有な機能の一端を担う意義があると考えられる。事実、Ang II は WAT の総脂肪量と脂肪合成を増加することも報告されている¹⁵⁾。

本研究により BAT と WAT からのレプチン分泌に及ぼす Ang II の作用機序は各々で異なることが示された。すなわち、Ang II による BAT からのレプチン分泌の増加はレプチン mRNA の発現

の変化を伴わなかったのに対して、WAT からのレプチン分泌の減少はレプチン mRNA 発現の減少を伴っていた。すなわち、Ang II は BAT では転写以後の段階に作用するのに対して、WAT では転写レベルに作用することが示唆された。この Ang II の作用機序の相違は後述する Ang II 受容体サブタイプを介する細胞内情報伝達機構の差とも関連することが示唆されるが、詳細は不明である。

Ang II の受容体には AT1 と AT2 の少なくとも 2 種のサブタイプが存在する¹⁾²⁾。脂肪細胞においてもヒト、ラットで AT1 の存在^{13)~15)16)29)}、ヒト、ラット、マウスで AT2 の存在が報告¹⁵⁾されているが、動物種、報告により異なり詳細は明らかではない。今回の検討により Ang II は BAT では AT2 を、WAT では AT1 と、各々異なる受容体サブタイプを介してレプチン分泌に作用することが示された。BAT は胎生期に発現が著明で生後成熟するにつれて減少する一方、WAT は成熟動物でより顕著に存在²⁵⁾するが、この脂肪細胞の変化は

AT1 と AT2 の二つの受容体サブタイプの発達、成長に伴う変化と類似⁴⁾⁵⁾しており、BAT に AT2 が WAT に AT1 が存在することを示した今回の結果は、脂肪細胞においてもレニン・アンジオテンシン系の役割が加齢に伴い変化することを示唆していると言える。

また心血管系では AT2 は AT1 による平滑筋細胞の収縮、増殖作用に拮抗的に作用することが報告³⁰⁾³¹⁾されている一方、著者らは副腎ではこれらのサブタイプが協調的に作用してアルドステロン分泌を調節することを報告¹¹⁾しており、受容体サブタイプの機能は組織により異なる。今回の検討から脂肪細胞においても Ang II 受容体サブタイプは心血管系と同様に拮抗的に作用することが示唆された。

本研究で示した Ang II がレプチン分泌に影響するとの結果は、レプチンとレニン・アンジオテンシン系との密接な関連を示す近年の報告¹⁹⁾²⁰⁾とも一致している。その病態生理学的意義の詳細は今後の検討を要するが、生体内脂肪細胞の大部分は WAT であることから Ang II は主にレプチンの産生、分泌を減少させることにより、脂肪貯蔵、脂肪組織の増加を来し、肥満と高血圧の病態に関与することが示唆される。

結 論

1. レニン・アンジオテンシン系は脂肪細胞の機能調節に重要な役割を担うことが示唆されているが詳細は不明である。本研究はエネルギー代謝において対照的な役割を担う褐色脂肪細胞 (BAT) と白色脂肪細胞 (WAT) において、Ang II がレプチン分泌と mRNA 発現に及ぼす影響、更にそれに関与する Ang II 受容体サブタイプの役割を検討した。

2. ICR 系雄性マウス (4 週齢) の BAT および WAT からコラゲナーゼ処理で得られた脂肪前駆細胞を 10% ウシ胎仔血清、4 nM インスリン含有 DMEM 中で 9 日間培養し、成熟脂肪細胞に分化させた初代培養系を用いた。AngII (10^{-8} ~ 10^{-11} M), AT1 受容体拮抗薬 Losartan (10^{-6} ~ 10^{-8} M), AT2 受容体拮抗薬 PD123319 (10^{-6} ~ 10^{-8} M) を単独あるいは AngII と拮抗薬を組み合わせて添加

後、培養液中のレプチン濃度を RIA で測定した。Ang II がレプチン mRNA 発現に及ぼす影響は RT-PCR で検討した。

3. Ang II は BAT と WAT からのレプチン分泌を各々用量依存性に増加あるいは減少させた。Ang II は BAT におけるレプチン mRNA には影響しなかったが、WAT におけるレプチン mRNA 発現を減少させた。Ang II による BAT からのレプチン分泌増加は PD123319 により阻害され、WAT におけるレプチン分泌とレプチン mRNA 発現の減少は Losartan により各々特異的に阻害された。

4. 以上の結果から、Ang II はレプチン分泌動態の変化を介して脂肪細胞の機能調節に関与することが示唆された。さらに Ang II は BAT と WAT では異なる Ang II 受容体のサブタイプを介して対照的な作用を示したことから、脂肪細胞においても受容体のサブタイプが Ang II の生物作用発現に重要な意義を有することが示唆された。

本研究をご指導戴いた第二内科学教室出村 博前教授、実験にご協力戴いた田部井由実さんに深謝致します。また、AT1 拮抗薬 Losartan を御提供戴いた萬有製薬株式会社(東京)、AT2 拮抗薬 PD123319 をご提供戴いた Warner-Lambert-Park, Davis 社 (米国) に感謝致します。

本論文の要旨は第 2 回日本心血管内分泌代謝学会 (1998 年 11 月、京都) において発表した。

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 S, 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-I angiotensin II receptor. *Nature* **351**: 233-236, 1991
- 4) Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S et al: Cloning and expression of a complementary DNA encod-

- ing a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* **351**: 230–236, 1991
- 5) **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
 - 6) **Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M et al**: Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* **268**: 24539–24542, 1993
 - 7) **Scheuer DA, Perrone MH**: Angiotensin type 2 receptor mediates depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *Am J Physiol* **264**: R917-R923, 1993
 - 8) **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
 - 9) **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
 - 10) **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
 - 11) **Tanabe A, Naruse M, Arai K et al**: Gene expression and roles of angiotensin II type 1 and type 2 receptors in human adrenals. *Horm Metab Res* **30**: 490–495, 1998
 - 12) **Richelsen B, Kristensen K, Jensen JD**: The auto- and endocrine function of the adipose tissue. Significance for metabolic complications in obesity. *Ugeskr Laeger* **160**: 7246–7250, 1998
 - 13) **Engeli S, Gorzelniak K, Kreutz R et al**: Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens* **17**: 555–560, 1999
 - 14) **Schling P, Mallow H, Trindl A et al**: Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23**: 336–341, 1999
 - 15) **Zorad S, Fickova M, Zelezna B et al**: The role of angiotensin II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity. *Gen Physiol Biophys* **14**: 383–391, 1995
 - 16) **Crandall DL, Armellino DC, Busler DE et al**: Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology* **140**: 154–158, 1999
 - 17) **Fruhbeck G, Jebb SA, Prentice AM**: Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* **18**: 399–419, 1998
 - 18) **Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL et al**: The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* **76**: 1405–1420, 1998
 - 19) **Schorr U, Blaschke K, Turan S et al**: Relationship between angiotensinogen, leptin and blood pressure levels in young normotensive men. *J Hypertens* **16**: 1475–1480, 1998
 - 20) **Uckaya G, Ozata M, Sonmez A et al**: Plasma leptin levels strongly correlate with plasma renin activity in patients with essential hypertension. *Horm Metab Res* **31**: 435–438, 1999
 - 21) **Rehmark S, Nechad M, Herron D et al**: Alpha- and beta-adrenergic induction of the expression of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes differentiated in culture. *J Biol Chem* **265**: 16464–16471, 1990
 - 22) **Chomczynski P, Sacchi N**: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem* **162**: 156–159, 1987
 - 23) **He Y, Chen H, Quon MJ et al**: The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* **270**: 28887–28891, 1995
 - 24) **Cannon B, Houstek J, Nedergaard J**: Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis? *Ann NY Acad Sci* **856**: 171–187, 1998
 - 25) **Jequier E, Tappy L**: Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* **79**: 451–480, 1999
 - 26) **Cassis LA, Marshall DE, Fettingner MJ et al**: Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. *Am J Physiol* **274** (5 Pt 1) : E867-E876, 1998
 - 27) **Fruhbeck G, Aguado M, Martinez JA**: In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 590–594, 1997
 - 28) **Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE et al**: Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* **100**: 2858–2864, 1997
 - 29) **Crandall DL, Herzlinger HE, Saunders BD et al**: Identification and characterization of angiotensin II receptors in rat epididymal adipocyte membranes. *Metabolism* **42**: 511–515, 1993
 - 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) **Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M et al:** gain-of-function study using gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA **92**: 10663–10667, 1995
The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor:
-