

原 著

エストロゲンはアンジオテンシン変換酵素の発現を制御する

山内 康弘

Estrogen is Involved in Expression of Angiotensin Converting Enzyme

Yasuhiro Yamanouchi (Department of Nephrology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Estrogen (E_2) regulates the components of the renin-angiotensin system (RAS). Regulation of angiotensinogen (ATG) gene expression by estrogen is well known, however, the effects of estrogen on angiotensin converting enzyme (ACE) remains unclear. **Methods:** (Study 1); Thirty female spontaneously hypertensive rats (SHR) at the age of 14 weeks were divided into 3 groups. C group: control group, OVX group: ovariectomy group, OVE group: ovariectomy group with supplementation of E_2 (transplant of a 1.5 mg/pellet/90 days subcutaneously). Systolic blood pressure was measured every 2 weeks until the end of the experiment (22 weeks of age). At the end of the experiment, blood was taken for measurements of angiotensin I (AngI), angiotensin II (AngII), plasma renin activity (PRA), angiotensin converting enzyme (ACE) activity and 17 beta estradiol (E_2). Expression of mRNA of ACE in the kidney was examined by using RNase protection assay (RPA). (Study 2); Incubation with E_2 (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M) or Ang II (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M) in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) was carried out, and expression of ACE mRNA in HUVEC was measured by RPA method. In addition, incubation with both E_2 (10^{-7} M) and tamoxifen (10^{-6} M) in HUVEC was carried out, and expression of ACE mRNA in HUVEC was measured in a similar way. **Results:** (Study 1); In rats in the OVX group, Ang II and ACE activity were increased significantly compared to those in the C group. In contrast, in rats in the OVE group, Ang II and ACE activity were decreased significantly compared to those in the OVX group. Expression of ACE mRNA in kidneys was increased in the OVX group, and was reduced in OVE group. (Study 2); In HUVEC treated with E_2 , expression of ACE mRNA was decreased dose-dependently and maximally suppressed at 12 h. In HUVEC treated with E_2 , the suppression of the expression of ACE mRNA was completely protected by the combined administration of Tamoxifen. In HUVEC treated with Ang II, expression of ACE mRNA was increased dose-dependently and maximally increased at 3 h. **Conclusion:** E_2 suppresses expression of ACE mRNA, and inhibits ACE activity in vivo and in vitro. In contrast, AngII promotes production of ACE in vitro. We conclude that E_2 is an important regulator of ACE mRNA expression, resulting in the role of the master of the renin-angiotensin system in women.

Keywords: renin-angiotensin system, hypertension, female.

J Saitama Med School 2001;29:149-159

(Received December 21, 2001)

緒 言

エストロゲンはレニン-アンジオテンシン系の各要素の発現に関与するといわれている。レニン-アンジオテンシン系の基質であるアンジオテンシノーゲンは、主に肝臓で産生される^{1,2)}。肝にはエストロゲンレセ

プターが存在しており^{3,5)}、またアンジオテンシノーゲン遺伝子上流には、エストロゲンレセプター結合部位が確認されている⁶⁾。ピル服用時のように経口的にエストロゲンを投与すると、腸で吸収されたエストロゲンは門脈を経て直接肝臓へ流入し、アンジオテンシノーゲンの産生を増加させる⁷⁾。

基質の変換酵素であるレニンは、腎臓の傍糸球体装置で産生される。その遺伝子上流にエストロゲンレセ

プター結合部位の存在が報告されており⁸⁾、エストロゲンの関与が示唆されるが、エストロゲンの作用によるその活性は増加^{9,10)}、減少¹¹⁾または変化しない¹²⁾との報告があり一致した見解は得られていない。

もう一つの重要な調節因子であるアンジオテンシン変換酵素は、主に血管内皮細胞で産生される。これまでのところ、アンジオテンシン変換酵素の遺伝子上流にはエストロゲンレセプター結合部位は認められておらず¹³⁻¹⁵⁾、その遺伝子発現への直接的な作用についても明らかでない。エストロゲンによるその発現の変化に関する報告は少なく¹⁶⁾、またエストロゲンによるその生理活性の変化に関する報告も減少^{9,10)}または変化を認めない¹¹⁾などの報告があり、エストロゲンがアンジオテンシン変換酵素の発現に関与しているかは依然不明のままである。

またアンジオテンシンII受容体に対してもエストロゲンはその発現を抑制して血管の収縮や平滑筋細胞の増殖を抑制することが報告されている^{17,18)}。

このようにエストロゲンはアンジオテンシノーゲンの産生を増加させ、アンジオテンシンII受容体の発現を抑制するとの見解は得られてきているが、レニンおよびアンジオテンシン変換酵素の産生に関しては見解が一定でなく、特にアンジオテンシン変換酵素に関しては、エストロゲンがその発現に関与しているかは未だ明らかとなっていない。

今回我々は、エストロゲンがアンジオテンシン変換酵素の発現を制御するかを自然発症高血圧ラットとヒト臍帯静脈内皮細胞を用い検討した。

対象ならびに方法

実験 1. 卵巣摘出した自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rat : SHR) におけるエストロゲン (17beta-estradiol : E₂) 補充療法

対象

14週齢のSHR (SHR等疾患モデル共同研究会, 千葉県船橋市) の雌 (30匹) を対象とした。

方法

14週齢のSHR雌 (30匹) をC群: 対照群 (n=10), OVX群: 卵巣摘出群 (n=10) およびOVE群: 卵巣摘出後E₂補充群 (n=10) の3群に分けた。各操作は、pentobarbital sodium (大日本製薬(株), 大阪) を腹腔内に50 mg/kg投与し麻酔下で行った。C群は、腰背部および頸背部を切開後、縫合した。OVX群は、左右の腰背部より開腹し左右の卵巣を摘出、さらに頸背部を切開し皮下に1.5 mg/pellet/90 daysの

placebo pellet (Innovative Research of America, FL, USA) を移植した。OVE群は、左右の腰背部より開腹し左右の卵巣を摘出、さらに頸背部を切開し皮下に1.5 mg/pellet/90 daysのE₂を含有するpellet (E₂-pellet, Innovative Research of America, FL, USA) を移植^{19,21)}した。E₂の投与量はBrosnihanらの方法を参考^{19,21)}に決定した。その後8週間にわたって経過観察し、2週間毎に血圧測定を行った。実験終了時 (22週齢時) に断頭採血し、Angiotensin I (AngI), Angiotensin II (AngII), plasma renin activity (PRA), Angiotensin converting enzyme (ACE) およびE₂の濃度を測定した。その後、腎臓を摘出し液体窒素を用いて急速凍結し、-80°Cで保存後RNAを抽出しACEのmessenger RNA (mRNA) をRNase protection assay (RPA) を用いて定量した。

SHRの血圧測定方法

血圧を2週毎に測定した。収縮期血圧はtail cuff法 (ソフトロン非観血式自動血圧測定装置, BP-98A 株式会社ソフトロン, 東京) を用いて5回連続して測定し、その最高ならびに最低血圧を除いた3回の平均血圧を用いた。

血液生化学的検討

血漿AngI, AngII, PRA, ACEおよびE₂を測定した。採血した血液は、氷冷したEDTA・2Na入り採血管に注入し、それぞれの検体は直ちに遠心分離し上清を採取し、測定するまで-20°Cで凍結保存した。

AngI および AngII の測定は、RIA2 抗体法 (トレーサー溶液: ¹²⁵I-Angiotensin I および ¹²⁵I-Angiotensin II 試薬, 第1抗体液: 抗AngI および抗AngII 抗体ウサギ血清, 第2抗体液: 抗ウサギ抗体ヤギ血清) により測定した^{22,23)}。PRAはガンマー・コートTMレニンキット (デイドベーリング株式会社, 東京) を用いて、RIA2抗体法により測定した。ACEはP-ヒドロキシベンゾイル-グリシル-L-ヒスチジル-L-ロイシンを基質とするACEカラーキット (富士レビオ(株), 東京) を用いて、505 nmで比色定量した。E₂はDPC・エストラジオール二抗体キット (Diagnostic Products Corporation, LA, USA) を用いて、RIA2抗体法により測定した。なおACE活性の測定限界値は1.0 IU/L/37°Cであり、それ以下となったものは統計処理上0として処理をした。(intra-assay: 9.6%, inter-assay variation: 10.8%)

実験 2. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell : HUVEC) でのACE発現に関する実験

対象

E_2 の作用を確認するためにHUVEC (Clonetics, MD, USA)を用いACE mRNAの発現を検討した。

方法

5回目の継代の時にphenol-red freeのendothelial cell basal medium (EBM) (Clonetics, MD, USA)を用い細胞培養を行った。その後18時間後(70~80%コンフルエント)に E_2 (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M)を添加し培養細胞を0, 6, 12および24時間後に採取, またAngII (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M)添加後, 0, 1, 2, 3および4時間後に採取した。また E_2 (10^{-7} M)とtamoxifen (10^{-6} M)添加12時間後に培養細胞を採取した。培養細胞の採取は, dish内の液体培地を吸引除去しPBSで洗浄後, TRISOL (Gibco BRL, MD, USA)を加えて攪拌した後チューブに回収し, mRNAを抽出するときまで -80°C で保存した。

HUVECの培養条件

HUVECの培養には, 添加因子セットEGM2(Clonetics, MD, USA)と 60°C , 30分で非動化したCharcoal/Dextran treated FBS (Hyclone, UT, USA) (最終濃度: 0.2%)を添加したEBM2液体培地 (Clonetics, MD, USA)を用いてHUVECの培養をおこなった。培養は付属のプロトコールに準じて行った。5回目の継代の時にphenol-red freeのEBM (Clonetics, MD, USA)を用い同様に細胞培養を行い実験に用いた。

RNAの抽出

SHRの腎臓およびHUVECの培養細胞にTRISOLを加え, ホモジナイザーおよびテフロンコッターを用いて均質化した後, TRISOLのプロトコールに準じてtotal RNAの抽出を行い実験に用いるまで -20°C で保存した。

Probeの作成

ヒトおよびラットのACE cDNAのシーケンス^{24,25)}からprimerを設計した。

ヒト: 5' primer-CTGCTGCTCTTCCTGGGCATCGC
3' primer-ACCAGTGTCCCATCGCAGTCTCTGG

ラット: 5' primer-TCGCGTCAACTTCCTGGGTATGTACC
3' primer-AGGGTCACCTCAGGAGTGTCTGAGC

またinternal controlとして, Gallagherらの報告¹⁶⁾を参考に, Elongation factor 1 alpha (EF1 α)を用いた。

ヒト: 5' primer-GTTGATATGGTTCCTGGCAAGCC
3' primer-AGACTTGGTGACCTTGCCAGCTCC

ラット: 5' primer-ACAAGAAGGCTGCAGGAGCTGGC
3' primer-TTCTTCCCACTGATTAAGAGTG

各primer setを用いて, HUVECおよびSHRの腎のtotal RNA (0.5 μg)をtemplateとし, high fidelity RNA PCR kit (takara, 東京)を用い, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (以下RT-PCRと略す)を行った。RT-PCRは, high fidelity RNA PCR kitのプロトコールに準じて行った。なお, PCRの条件は 94°C 30秒, 62°C 30秒, 72°C 1分を30 cycleとした。このPCR反応液を1.5%アガロースゲルを用い110 V 60分間泳動し, その後エチジウムブロマイドで染色した。染色したアガロースゲルを長波長のUVランプ (BLAK-RAY LAMP (LONGWAVE UV-365NM): ULTRAVIOLET, UVL-21, CA, USA) 下で, 目的のサイズのバンドを切り出し, チューブ (Non-Sterile ULTRAFREE-MC: 0.22 μm filter unit, MILLIPORE, MA, USA)に回収した。このチューブを用いゲルからDNAを抽出し, フェノール/クロロフォルム処理およびエタノール沈殿を行い精製した。DEP処理水を加え溶解しTAクローニングに使用するまで 4°C で保存した。

TAクローニングは, TOPO TA cloning kit (invitrogen, CA, USA)を用い, kitのプロトコールに準じて行った。その後, この反応液をcompetent cell (dH5 α) (invitrogen, CA, USA)に加え, 氷中に2分, 37°C で3分, 氷中に5分でトランスフォーメーションさせた。このトランスフォーメーションさせたcompetent cell (dH5 α)をampicillin (ABPC, 和光, 東京)を含む10 cm dishのLA培地 (Tryptone peptone (BECTON DICKINSON, MD, USA), Dried Yeast Extract-S (日本製薬(株), 東京), NaCl (和光, 東京), BACTO-AGAR (精未寒天, 松栄寒天(有), 東京))に移し, IS42 incubator (IS42, Yamato, 東京)で 37°C 15時間培養した。培地上に形成されたコロニーからのダイレクト PCR法によりligation checkを行った。なおPCRの条件は 94°C 20秒, 62°C 20秒, 72°C 1分を30 cycleで行った。またプラスミドの調整は, アルカリ-SDS法および塩化セシウム平衡密度勾配遠心法に準じて行った。この精製したプラスミドを制限酵素のPvu II (40 units/ μl , 和光, 東京)を用い切断し, probeのlinearized templateとして用いた。インサートの配列と方向は, CEQ2000 sequencer (BECHMAN COULTER, CA, USA)を用いて確認した。

RNase protection assay (RPA)

Riboprobeは, SP 6 polymerase (Roche, IN, USA)および $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (400 Ci/mmol, 室町化学, 東京)を用い, SP 6 polymeraseに付属のプロトコールに準

じてラベルした。ラットおよびヒトのriboprobeは、ACE cDNA断片を含む pCR II TOPO プラスミド (pCR II TOPO, invitrogen, CA, USA) を Pvu II (TAKARA, 東京) によって切断して、ラットの直鎖 ACE riboprobe は 447 塩基で、予想される protect band は 210 bp (3764–3973 塩基)、またヒトの直鎖 ACE riboprobe は 503 塩基で、予想される protect band は 268 bp (3740–4008 塩基) とした。今回、internal control として EF1 α の断片を用いた。同様に EF1 α cDNA断片を含む pCR II TOPO プラスミドを Pvu II によって切断した。予想されるラットの protect band は 125 bp (1373–1499 塩基) で、また予想されるヒトの protect band は 135bp (1235–1400 塩基) とした。またリボプローブの活性は、液体シンチレーション (LSC-3500, アロカ (株), 東京) を用いて測定した。サンプルの total RNA : 10 μ g と、ACE : 5 \times 10⁵ cpm および EF1 α : 5 \times 10⁵ cpm の riboprobe をハイブリバッファー (40 mM PIPES (pH6.4) (和光, 東京), 4 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH8.0), 80% formamide (和光, 東京)) に加え 45°C, 15 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションしなかった一本鎖の RNA 処理に、RNase A (Roche, IN, USA) と RNase T1 (Roche, IN, USA) を加えた digestion buffer (10 mM Tris (pH7.5) (Trizma-base, SIGMA-ALDRICH, MU, USA), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH8.0)) を加え 30°C, 60 分間で処理し、その後 SDS-proteinase K 液 (8% SDS, proteinase K (TAKARA, 東京)) を加え 37°C, 30 分で RNase を不活化した。その後フェノール:クロロフォルム抽出を行い、キャリアとして tRNA を加え、エタノール沈殿を行った後、Gel-loading buffer (95% Formamide, 5 mM EDTA (pH8.0), 0.025% BPB, 0.025% XC, 0.025% SDS) を加えペレットを溶解し、95°C 5 分で denature を行い氷冷した後、8M の尿素 (SIGMA-ALDRICH, MU, USA) を含む 5% ポリアクリルアミドゲルにアプライし 300V, 70 分間、電気泳動を行った。その後ゲルドライヤー (Gel dryer : 583, BIO-RAD, Ca, USA) を用いて 200°C, 1 時間乾燥させ、Mac Bas 1500 イメージリーダー (FUJIFILM, 東京) に 1 時間感光させ、バイオイメージングアナライザー BAS 1500 (FUJIFILM, 東京) を用いて画像を読み込み、さらにバイオイメージングアナライザー Mac BAS (Ver.2.3, FUJIFILM, 東京) を用いて画像を取り込み、バンドを確認し定量を行った。その後、フィルムに当て -80°C で 10 時間感光させ現像し、Scion Image (Beta 4.0.2, Scion Corporation, MD, USA) にて再度定量を行った。

統計

測定値はすべて平均値 \pm 標準誤差で表し、統計解析は、血圧については Two-way analysis of variance を用いて群間比較を行った後、Scheffe's F test を行った。また血中ホルモンの変化、ACE mRNA の変化については One-way analysis of variance を用いた後、Scheffe's F test を行った。p < 0.05 を統計学的に有意差ありとした。実験 2 の HUVEC における ACE mRNA の発現についてはそれぞれの実験を 5 回行い、その発現を定量化したのち One way analysis of variance を用いて群間比較を行った後、Scheffe's F test を行った。p < 0.05 を統計学的に有意差ありとした。なお、ACE の発現量の測定値は、EF1 α の測定値で除して算出した。統計解析のソフトに Statview Ver.IV を用いた。

結果

実験 1. SHR の血圧上昇機序における E₂ の役割

血圧の変化

SHR の血圧は 16 週齢、18 週齢では 3 群間で有意な差を認めなかったが、20 週齢から OVX 群で C 群と比較して有意に増加した (20 週齢 : Control vs. OVX : 167 \pm 3 vs. 175 \pm 3 mmHg, p < 0.05), (22 週齢 : Control vs. OVX : 171 \pm 4 vs. 181 \pm 5 mmHg, p < 0.05)。また OVE 群では血圧の増加はほぼ C 群と同レベルであり、E₂ の補充により血圧の上昇が抑制された (20 週齢 : OVX vs. OVE : 175 \pm 3 vs. 166 \pm 3.5 mmHg, p < 0.05), (22 週齢 : OVX vs. OVE : 181 \pm 5 vs. 168 \pm 3.5 mmHg, p < 0.05)。 (Fig. 1)

血中生理活性物質の変化

20 週齢時の断頭採血による E₂ 濃度は対照群 (n=10, 20.75 \pm 1.8 pg/ml), OVX 群 (n=10, 5.2 \pm 0.7 pg/ml, p < 0.01 vs. C 群), OVE 群 (n=10, 41.5 \pm 4.4 pg/ml, p < 0.01 vs. C 群) で卵巣摘出による E₂ の低下と、E₂-pellet による E₂ の補充を確認した。PRA の変化は C 群, OVX 群および OVE 群の 3 群間で明らかな差を認めなかった (C 群 (n=10) : 6.23 \pm 1.62, OVX 群 (N=10) : 7.45 \pm 1.29, and OVE 群 (n=10) : 8.65 \pm 3.21 ng/ml/hr)。ACE 活性の変化は C 群と比較して OVX 群で有意に上昇し (C 群 (n=8) vs. OVX 群 (n=8) : 9.3 \pm 3.3 vs. 24.7 \pm 3.4 IU/l/37°C, p < 0.01), さらに E₂ 補充により、その上昇は有意に抑制された (OVX 群 (n=8) vs. OVE 群 (n=5) : 24.7 \pm 3.4 vs. 3.7 \pm 3.3 IU/l/37°C, p < 0.01)。AngI の変化は C 群と OVX 群の 2 群間では有意な差を認めなかったが (C 群 (n=10) vs. OVX 群 (n=10) : 4480 \pm 1636 pg/ml, vs. 4200 \pm 673 pg/ml), OVE 群では C 群と比較して有意な上昇を認めた (n=10, 8066 \pm 901 pg/ml, p < 0.01)。AngII の変化は、C 群と比較して OVX 群で有

意に上昇したが (C群 (n=7) vs. OVX群 (n=8) : 424 ± 45, vs. 620 ± 51 pg/ml, p < 0.05), E₂補充により有意に減少した (OVX群 (n=8) vs. OVE群 (n=8) : 620 ± 51 vs. 384 ± 64 pg/ml, p < 0.01). (Table 1)

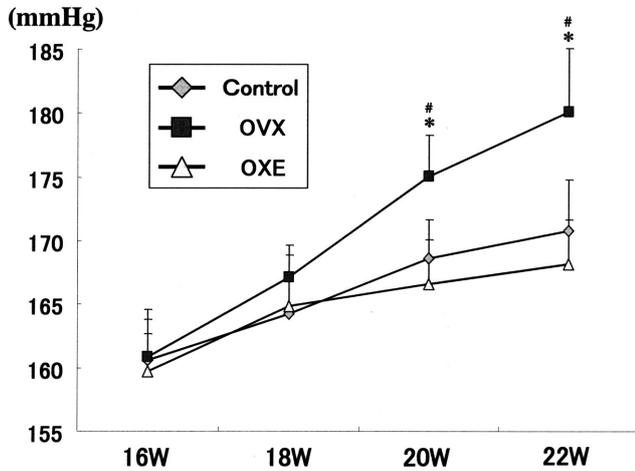


Fig. 1. Effect of ovariectomy (OVX) and OVX + 17 β -estradiol (OVE) on systolic blood pressure in SHR. Values are shown as the means \pm S.E.M. except highest and lowest SBP. Light rhombic: control group, closed squares: OVX group, high light triangles: OVE group. (* p < 0.05 vs. control, # p < 0.05 vs. OVE)

Table 1. Effect of ovariectomy (OVX) and OVX + 17 β -estradiol (OVE) on plasma 17 β -estradiol, plasma renin activity (PRA), angiotensin converting enzyme (ACE), angiotensin I (Ang I) and angiotensin II (Ang II) in SHR at 22 weeks of age. (No.) indicates the number of samples. Values are shown as the means \pm S.E.M.. (* p < 0.01 vs. control, # p < 0.01 vs. OVX)

Group	Control (No.)	OVX (No.)	OVE (No.)
E ₂ (pg/ml)	20.75 \pm 1.8 (10)	5.2 \pm 0.7* (10)	41.5 \pm 4.4* (10)
PRA (ng/ml/hr)	6.23 \pm 1.62 (10)	7.45 \pm 1.29 (10)	8.65 \pm 3.21 (10)
ACE (IU/l/37°C)	9.3 \pm 3.3 (8)	24.7 \pm 3.4* (8)	3.7 \pm 3.3* (5)
Ang I (pg/ml)	4480 \pm 1636 (10)	4200 \pm 673 (10)	8066 \pm 901* (10)
Ang II (pg/ml)	424 \pm 45 (7)	620 \pm 51* (8)	384 \pm 64# (8)

腎臓におけるACE mRNAの発現変化

SHRの腎臓でのACE mRNAの発現の変化を比較したところ, C群と比較してOVX群で有意に増加し (Control vs. OVX : 0.91 \pm 0.33 vs. 1.00, p < 0.05), さらにE₂補充により, その上昇は著明に抑制された (OVX vs. OVE : 1.00 vs. 0.853 \pm 0.38, p < 0.05). (Fig. 2)

実験 2. HUVECでのACE発現に関する実験

HUVECでのACE mRNAの発現は, E₂添加後, 徐々に減少し添加前に比し, 6時間後: 0.757 \pm 0.065, 12時間後: 0.343 \pm 0.107, 18時間後: 0.732 \pm 0.047, 24時間後: 0.864

\pm 0.088 と12時間をピークに著明な発現の減少を示した (Fig. 3).

E₂添加12時間後のHUVECでのACE mRNA発現の抑制は, コントロール (1 ACE/EF1 α index) と比較して, 10⁻⁹Mで0.83 \pm 0.07, 10⁻⁸Mで0.49 \pm 0.05, 10⁻⁷Mで0.22 \pm 0.09とE₂濃度依存性にその発現を抑制した (Fig. 4).

E₂ (10⁻⁷M) 投与によるHUVECでのACE mRNAの発現の抑制は, 選択的エストロゲン受容体モジュレーター (selective estrogen receptor modulator : SERM) であるtamoxifen (10⁻⁶M) を投与することで, コントロール (1 ACE/EF1 α index) と比較し, E₂添加によりACE mRNAの発現は0.445 \pm 0.135まで抑制されたが, tamoxifenを添加により0.89 \pm 0.029までその

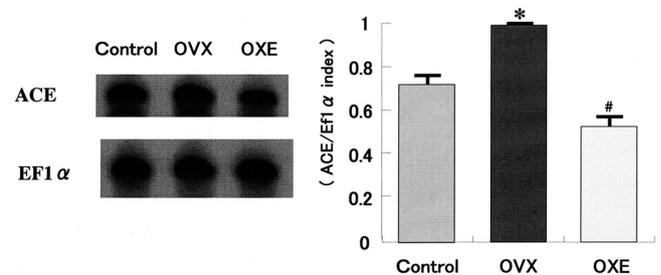


Fig. 2. Effect of ovariectomy (OVX) and OVX + 17 β -estradiol (OVE) on the expression of ACE mRNA in SHR. Values are shown as the means \pm S.E.M.. Light bar: control group, closed bar: OVX group, high light bar: OVE group. (* p < 0.05 vs. control, # p < 0.01 vs. OVX)

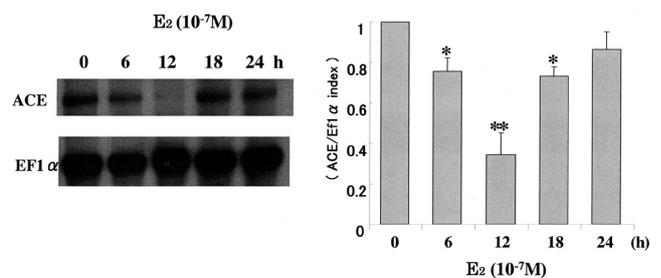


Fig. 3. Effect of 17 β -estradiol on the expression of ACE mRNA in HUVEC. Values are shown as the means \pm S.E.M. for 5 times examinations. (* p < 0.05, ** p < 0.01 vs. pretreatment value)

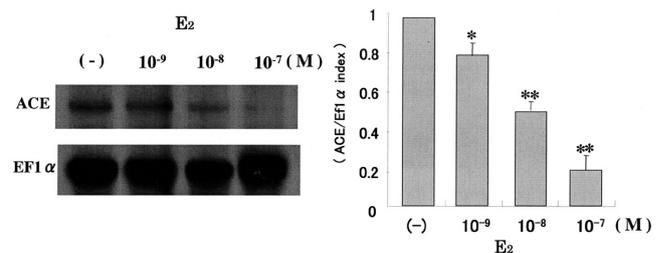


Fig. 4. Effect of 17 β -estradiol on the expression of ACE mRNA in HUVEC. Values are shown as the means \pm S.E.M. for 5 times examinations. (* p < 0.05, ** p < 0.01 vs. pretreatment value)

発現が増加した (Fig. 5).

さらに, HUVECにAngII (10^{-6} M) を添加した結果, ACE mRNAの発現は, コントロール (1 ACE/EF1 α index) と比較して, 1時間後に 1.081 ± 0.177 , 2時間後に 1.36477 ± 0.269 , 3時間後に 1.553 ± 0.497 , 4時間後に 1.212 ± 0.358 とE₂の作用とは反対に, AngII添加によってACE mRNAの発現は3時間をピークに増加した (Fig. 6).

またAngII添加3時間後のHUVECでのACE mRNA発現の増加は, コントロール (1 ACE/EF1 α index) と比較して, 10^{-8} Mでは 1.169 ± 0.067 , 10^{-7} Mでは 1.294 ± 0.08 , 10^{-6} Mでは 1.496 ± 0.083 とAngII濃度依存性にHUVECでのACE mRNAの発現を増加させた (Fig. 7).

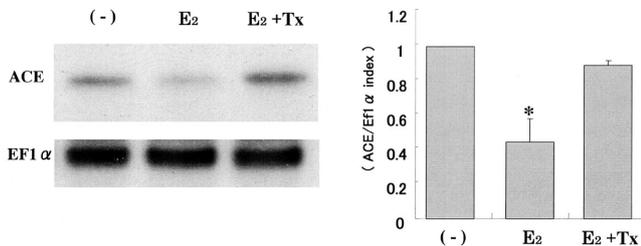


Fig. 5. Effect of 17 β -estradiol and Tamoxifen on the expression of ACE mRNA in HUVEC. Values are shown as the means \pm S.E.M. for 5 times examinations. (* $p < 0.05$ vs. pretreatment value)

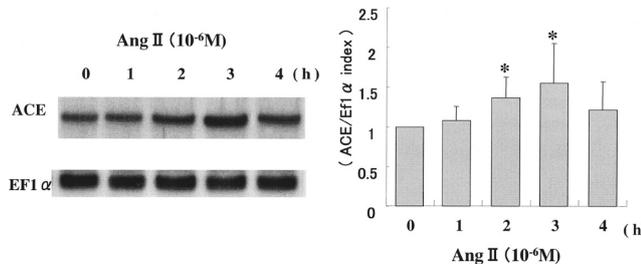


Fig. 6. Effect of Angiotensin II on the expression of ACE mRNA in HUVEC. Values are shown as the means \pm S.E.M. for 5 times examinations. (* $p < 0.05$ vs. pretreatment value)

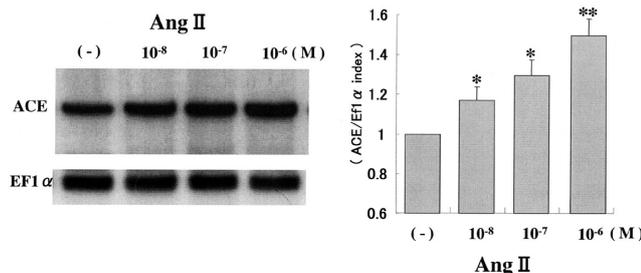


Fig. 7. Effect of Angiotensin II on the expression of ACE mRNA in. Values are shown as the means \pm S.E.M. for 5 times examinations. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. pretreatment value)

考 察

今回の我々の検討では, SHRにおいてOVXに伴い血圧が上昇し, OVEでは血圧は上昇しないことを認めた. この変化は血中E₂レベルの変化に呼応していた. 検索したRAS系の各成分で, PRAはOVXおよびOVEによる影響を示さなかったが, ACE活性はOVXにより上昇し, 逆にOVEにより低下を認めた. AngIIは, ACEの変化を反映してOVX群で増加し, OVE群では抑制された. 腎でのACEの発現も, OVX群で減少を認め, OVEで増加を認めた.

HUVECを用いた実験で, E₂添加12時間後にACEの発現の抑制を認め, E₂濃度依存性に抑制された. このE₂添加によるACEの発現の抑制は, tamoxifenを同時に投与することで回復させることができた. またAngIIを添加したHUVECでは, 添加1時間後からACEの発現の増加を認めた. その発現の増加は3時間後まで認められ, AngII濃度依存性に増加することを認めた.

E₂は, 女性ホルモンとして内外性器の発育のみならず, 乳房, 中枢神経, 代謝系などに対する性器外作用も有しており, とくに閉経後の骨粗鬆症の改善²⁶⁾, 抗高脂血症作用²⁷⁻³²⁾ および抗酸化作用³³⁻³⁹⁾ による抗動脈硬化作用または心血管系疾患の予防などの効果が期待されている. しかしホルモン補充療法 (HRT) の効果⁴⁰⁻⁴⁴⁾ については, 1998年の無作為介入試験のHeart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS)⁴⁵⁻⁴⁸⁾ で, その副作用である子宮内膜癌, 乳癌および静脈血栓症などの合併症のリスクが明らかになり^{47,49,50)}, その是非については様々な意見が報告され, 長期のホルモン補充療法の有効性については現在まだ結論は出ていない.

E₂は高血圧に対し抑制的に作用するといわれており^{41,42)}, 血管拡張作用, 一酸化窒素 (NO)⁵¹⁻⁵⁶⁾ およびプロスタグランジンの増強作用^{12,52,55-58)} などが報告されている. しかし, RASへの影響に関しては, ATGの肝での産生については増加することでいくつかの報告は一致しているが, その他reninおよびACEへの影響については未だ一定の結論には達していない.

ATGに関しては, The Stanford Five City ProjectにおいてATGの基質となるApo A-I値が男性と比較し女性で有意に増加しており, また閉経前後でのE₂補充療法によりApo A-I値の有意な増加を認めたことを報告している³⁰⁾. Klettらは, SDラット肝でのATGを血清およびmRNAレベルで比較検討したところE₂はATGの発現を増加させ, アンドロゲンはATGに変化を与えず, またhepatocyteやhepatoma cellでも同様に

E_2 で増加し、アンドロゲン投与では変化を認めなかったと報告している⁷⁾。またATGの発現は組織特異性があり発現量や時間経過は各臓器で異なると報告されている⁵⁹⁾。肝には E_2 受容体(ER)が存在しており^{3,5)}、またFeldmerらはATG遺伝子上流には、ER結合部位(ERE)が存在することを報告している⁶⁾。従って、過剰の E_2 服用時には血圧の上昇が認められることが報告されており、ピル服用時の血圧上昇の機序はATG産生亢進によるものと考えられている。

今回の我々の実験では、ATGを直接的には測定していないが、PRAのレベルがOVXおよびOVEによって影響を受けなかったにもかかわらず、PRAの作用により変換されたAngIのレベルがOVE群でのみ増加を認めており、 E_2 の作用によりその基質であるATGの産生が増加していたことを、間接的ではあるが、支持することができた。

PRAに対する影響については一定の見解は得られていない。その遺伝子上流に(ERE)の存在が報告されており⁸⁾、 E_2 の関与が示唆される。しかしBrosnihanらは、cynomolgus monkeyで、OVX後の E_2 補充によりPRAの上昇を認めたと報告している^{9,10)}が、反対にSharkeyらは、SHRを用いた実験でOVX後の血圧の上昇を経皮 E_2 投与により抑制できたが、これと相関関係が認められたのはACE活性だけであり、ATGおよびPRAには影響を与えなかったと報告している¹²⁾。またSchunkertらは、ヒトでの閉経後のHRTはATGを増加させたが、反対にPRAを減少させたと報告している¹¹⁾。今回の我々のSHRを用いた実験の結果では、OVXによるPRAの増加は認められなかったが、PRAが亢進しているSHRの場合では、その活性に対する E_2 の影響が少ない可能性が推測された。

ACE活性に及ぼす E_2 の作用として、Proudlarらは、ヒトでのHRTはACE活性を抑制させることができると報告している⁶⁰⁾。動物モデルでも E_2 が血清および各臓器のmRNAレベルでのACE活性を抑制し、AngIIの産生を抑制させるとの報告があり、 E_2 によりATGやPRAが亢進した状態でも、ACE活性の抑制と血管拡張作用物質であるAng-(1-7)を増加させることで、血圧の上昇を抑制していることが報告されている^{9,10,16,61)}。しかし、Schunkertらは、ヒトでの閉経後のHRTによって、ATGの増加およびPRAの抑制は認めるが、ACEの活性には影響を与えなかったと報告しており¹¹⁾、ACEに対する E_2 の作用については未だ一定の見解が得られていない。HubertらのヒトACEの上流解析の結果から、少なくとも-1484までの間には典型的なEREは確認されておらず¹³⁻¹⁵⁾、遺伝子レベルでの E_2 の関与についても明らかとなっ

ていない。しかし E_2 と結合したERは、AP-1を介してAP-1 response elementに結合し、ERがER α の場合は遺伝子の発現を亢進させ、反対にER β の場合では発現を抑制することが報告されている⁶²⁾。さらにACEの遺伝子上流にはAP-1 site^{63,64)}に類似した結合部位の存在を認めているため¹³⁾、ACEプロモーター領域へのERの結合性について直接には確認されていないが、 E_2 がACE発現を抑制する仮説として、 E_2 がER β を介し、さらにAP-1を介した機序によってACEの発現を抑制している可能性が考えられた。

今回の我々のSHRを用いた実験で、OVXによりACE活性の上昇をOVEによりその抑制を認めており、従来報告されているACE抑制作用と同様の結果となった。HUVECを用いた実験では、 E_2 によるACE mRNAの発現の抑制をtamoxifenにより回復させることができたことから、 E_2 はERを介し直接ACE mRNAの発現を抑制することで、ACE活性を抑制させる作用があることを示唆した。

E_2 のAngII受容体(AT1)に対する影響としては、 E_2 はラットの下垂体前葉でのAT1受容体発現を抑制したり¹⁷⁾、また血管内皮細胞や平滑筋細胞でのAT1受容体発現を抑制することが報告されているが⁶⁵⁾、まだ明確には解明されてはいない。

またAngIIによるフィードバック機構として、AT1受容体を介しPRAを抑制するとの報告があるが⁶⁶⁾、ACEに関しての報告はほとんど認められていない。今回の我々の実験ではAngIIがACE mRNAの発現を増加させることを認め、AngIIとACE間でのpositive feedbackが存在する可能性を示した。

これまでの報告によれば、腎臓はACEが多く存在する組織であり、ACEは全身ならびに腎臓の血行動態の調節を行っていることが知られている。腎臓のACEは血管内皮、さらに近位尿細管に発現することが報告されており^{67,68)}、特に血管内皮のACEについては重要な全身のレニン-アンジオテンシン系の調節因子であることが報告されている⁶⁷⁾。一方尿細管におけるACEについては、腎臓のキニン-カリクレイン系の調節を行っているとの報告もあるが、現在のところその役割については明らかでない。今回の我々の検討では、腎臓全体でのACE mRNAの発現を検討した。この変化は、血中ACE活性ならびにAngiotensin II濃度と一致したことから、血管内皮におけるACE活性を反映しているものと考えられる。しかし、尿細管におけるACE活性の発現に関しても影響している可能性はあり、今後酵素抗体法やin site hybridization法を用いたACEの発現部位、さらにその活性変化についても検討してゆくことが必要と思われる。

今回の我々のSHRを用いた実験で、OVXによりACE活性の上昇をOVEによりその抑制を認めており、従来報告されているACE抑制作用と同様の結果となった。HUVECを用いた実験では、E₂によるACE mRNAの発現の抑制をtamoxifenにより回復させることができたことから、E₂はERを介し直接ACE mRNAの発現を抑制することで、ACE活性を抑制させる作用があることを示唆した。

まとめ

1. SHRでは、卵巣摘出により血圧は有意に上昇(OVX群)したが、E₂の補充により血圧上昇は抑制された(OVE群)。
2. SHRでは、卵巣摘出によりACE活性は有意に上昇(OVX群)したが、E₂の補充によりACE活性上昇は抑制された(OVE群)。
3. SHRでは、卵巣摘出によりAngIIは有意に上昇(OVX群)したが、E₂の補充によりAngII上昇は抑制された(OVE群)。
4. SHRでは、卵巣摘出により腎臓でのACE mRNAは有意に上昇(OVX群)したが、E₂の補充により腎臓でのACE mRNA上昇は抑制された(OVE群)。
5. HUVECでのACE mRNAの発現は、E₂添加12時間後に減少を認めた。
6. HUVECでのACE mRNA発現は、E₂濃度依存性に抑制された。
7. E₂投与によるHUVECでのACE mRNAの発現の抑制は、tamoxifenを同時に添加することで回復させることができた。
8. HUVECでのACE mRNAの発現は、AngII添加後3時間をピークに増加した。
9. HUVECでのACE mRNAの発現は、AngII濃度依存性に増加した。

おわりに

今回我々は、SHRの血圧上昇機序におけるE₂の作用を*in vivo*および*in vitro*の系から検討を行った。OVXはSHRのACE活性を亢進させ、血圧を有意に上昇させた。一方E₂の補充は、ACE活性を抑制し血圧低下をもたらした。次いでE₂の直接的なACE活性に及ぼす作用を明らかにするために、HUVECを用いた実験を行った。その結果、ACE mRNAの発現はE₂添加12時間後に抑制され、濃度依存性に抑制された。またこの発現の抑制は、tamoxifenを同時に添加することで回復させることができた。従ってエストロゲンは内皮細胞に直接作用してACE mRNAの発現を抑制し、RASを抑制することで血圧の上昇を抑制していることが明

らかとなった。以上の結果から、E₂はACE活性を減少させ、それに伴いRASの抑制をもたらすことにより血圧の低下をもたらしていることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました埼玉医科大学腎臓内科鈴木洋通教授、中元秀友助教授ならびに教室員各位、同大学分子生物学教室禾奏寿教授、久武幸司助教授、折茂彰講師に深謝いたします。この研究の一部は第2回日本心血管内分泌代謝学会(1998京都)、第72回日本内分泌学会総会(1999横浜)、第23回日本高血圧学会総会(2000福岡)において発表した。

References

- 1) Kalinyak JE, Perlman AJ. Tissue-specific regulation of angiotensinogen mRNA accumulation by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987;262:460-4.
- 2) Kunapuli SP, Benedict CR, Kumar A. Tissue specific hormonal regulation of the rat angiotensinogen gene expression. *Arch Biochem Biophys* 1987;254:642-6.
- 3) Marschke KB, Koritnik DR. Estrogen and androgen receptors in the liver of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Steroid Biochem* 1987;26:443-50.
- 4) Porter LE, Elm MS, Van Thiel DH, Eagon PK. Hepatic estrogen receptor in human liver disease. *Gastroenterology* 1987;92:735-45.
- 5) Rogerson BJ, Eagon PK. A male specific hepatic estrogen binding protein: characteristics and binding properties. *Arch Biochem Biophys* 1986;250:70-85.
- 6) Feldmer M, Kaling M, Takahashi S, Mullins JJ, Ganten D. Glucocorticoid- and estrogen-responsive elements in the 5'-flanking region of the rat angiotensinogen gene. *J Hypertens* 1991;9:1005-12.
- 7) Klett C, Ganten D, Hellmann W, Kaling M, Ryffel GU, Weimar-Ehl T, Hackenthal E. Regulation of hepatic angiotensinogen synthesis and secretion by steroid hormones. *Endocrinology* 1992;130:3660-8.
- 8) Fukamizu A, Nishi K, Cho T, Saitoh M, Nakayama K, Ohkubo H, Nakanishi S, Murakami K. Structure of the rat renin gene. *J Mol Biol* 1988;201:443-50.
- 9) Brosnihan KB, Senanayake PS, Li P, Ferrario CM. Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:373-81.

- 10) Brosnihan KB, Weddle D, Anthony MS, Heise C, Li P, Ferrario CM. Effects of chronic hormone replacement on the renin-angiotensin system in cynomolgus monkeys. *J Hypertens* 1997;15:719-26.
- 11) Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derkx FH, Kurzinger S, Riegger GA. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 1997;95:39-45.
- 12) Sharkey LC, Holycross BJ, Park S, Shiry LJ, Hoepf TM, McCune SA, Radin MJ. Effect of ovariectomy and estrogen replacement on cardiovascular disease in heart failure-prone SHHF/Mcc-fa cp rats. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1527-37.
- 13) Goraya TY, Kessler SP, Kumar RS, Douglas J, Sen GC. Identification of positive and negative transcriptional regulatory elements of the rabbit angiotensin-converting enzyme gene. *Nucleic Acids Res* 1994;22:1194-201.
- 14) Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991;266:15377-83.
- 15) Testut P, Soubrier F, Corvol P, Hubert C. Functional analysis of the human somatic angiotensin I-converting enzyme gene promoter. *Biochem J* 1993;293 (Pt 3):843-8.
- 16) Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 1999;33:323-8.
- 17) Seltzer A, Pinto JE, Viglione PN, Correa FM, Libertun C, Tsutsumi K, Steele MK, Saavedra JM. Estrogens regulate angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptors in female rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 1992;55:460-7.
- 18) Chen FP, Lee N, Soong YK, Huang KE. Comparison of transdermal and oral estrogen-progestin replacement therapy: effects on cardiovascular risk factors. *Menopause* 2001;8:347-52.
- 19) Brosnihan KB, Moriguchi A, Nakamoto H, Dean RH, Ganten D, Ferrario CM. Estrogen augments the contribution of nitric oxide to blood pressure regulation in transgenic hypertensive rats expressing the mouse Ren-2 gene. *Am J Hypertens* 1994;7:576-82.
- 20) Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K⁺ channels. *Circ Res* 1996;79:1024-30.
- 21) Li P, Ferrario CM, Ganten D, Brosnihan KB. Chronic estrogen treatment in female transgenic (mRen2)²⁷ hypertensive rats augments endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Hypertens* 1997;10:662-70.
- 22) Iwasawa M, Tokumoto M, Makiishi N, Takatori O. Fundamental evaluation-extraction of angiotensin I and angiotensin II by radioimmunoassay. *医学と薬学* 1996;36:297-333.
- 23) 森本 妙子, 青山 正明, 後藤 英司, 塩 之 入 洋, フロリジル法による plasma angiotensin II の radioimmunoassay の開発と検討. *日本内分泌会誌 (Follaendocrinol jap)* 1983;59:215-29.
- 24) Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:9386-90.
- 25) Koike G, Krieger JE, Jacob HJ, Mukoyama M, Pratt RE, Dzau VJ. Angiotensin converting enzyme and genetic hypertension: cloning of rat cDNAs and characterization of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:380-6.
- 26) Phillipov G, Mos E, Scinto S, Phillips PJ. Initiation of hormone replacement therapy after diagnosis of osteoporosis by bone densitometry. *Osteoporos Int* 1997;7:162-4.
- 27) Welty FK. Cardiovascular disease and dyslipidemia in women. *Arch Intern Med* 2001;161:514-22.
- 28) Tikkanen MJ, Kuusi T, Vartiainen E, Nikkila EA. Treatment of post-menopausal hypercholesterolaemia with estradiol. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1979;88:83-8.
- 29) Blumenfeld Z, Aviram M, Brook GJ, Brandes JM. Changes in lipoproteins and subfractions following oophorectomy and oestrogen replacement in perimenopausal women. *Maturitas* 1983;5:77-83.
- 30) Gardner CD, Tribble DL, Young DR, Ahn D, Fortmann SP. Population frequency distributions of HDL, HDL(2), and HDL(3) cholesterol and apolipoproteins A-I and B in healthy men and women and associations with age, gender, hormonal status, and sex hormone use: the Stanford Five City

- Project. *Prev Med* 2000;31:335-45.
- 31) Urabe M, Yamamoto T, Kashiwagi T, Okubo T, Tsuchiya H, Iwasa K, Kikuchi N, Yokota K, Hosokawa K, Honjo H. Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein lipase and lipids including apolipoprotein E in climacteric and elderly women. *Endocr J* 1996; 43:737-42.
- 32) Staels B, Jansen H, van Tol A, Stahnke G, Will H, Verhoeven G, Auwerx J. Development, food intake, and ethinylestradiol influence hepatic triglyceride lipase and LDL-receptor mRNA levels in rats. *J Lipid Res* 1990;31:1211-8.
- 33) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- 34) Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T, Aviram M. Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1464-9.
- 35) Keidar S, Kaplan M, Aviram M. Angiotensin II-modified LDL is taken up by macrophages via the scavenger receptor, leading to cellular cholesterol accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:97-105.
- 36) Kita T, Yokode M, Ishii K, Kume N, Nagano Y, Arai H, Otani H, Ueda Y, Hara S. The role of oxidized lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1992;20:37-42.
- 37) Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6457-61.
- 38) Jenkins DJ, Kendall CW, Garsetti M, Rosenberg-Zand RS, Jackson CJ, Agarwal S, Rao AV, Diamandis EP, Parker T, Faulkner D, Vuksan V, Vidgen E. Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity—a controlled crossover trial. *Metabolism* 2000;49: 537-43.
- 39) Hoogerbrugge N, Zillikens MC, Jansen H, Meeter K, Deckers JW, Birkenhager JC. Estrogen replacement decreases the level of antibodies against oxidized low-density lipoprotein in postmenopausal women with coronary heart disease. *Metabolism* 1998;47:675-80.
- 40) Hoeg JM, Willis LR, Weinberger MH. Estrogen attenuation of the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1977;233:H369-73.
- 41) Harrison-Bernard LM, Raji L. Postmenopausal hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2000;2:202-7.
- 42) Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med* 1991;325:756-62.
- 43) Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* 1991;20:47-63.
- 44) Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, Ernster VL, Cummings SR. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1992;117: 1016-37.
- 45) Grady D, Applegate W, Bush T, Furberg C, Riggs B, Hulley SB. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. *Control Clin Trials* 1998; 19:314-35.
- 46) Oger E, Scarabin PY. [Hormone replacement therapy in menopause and the risk of cerebrovascular accident]. *Ann Endocrinol(Paris)* 1999;60:232-41.
- 47) Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998;280:605-13.
- 48) Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, Furberg CD, Kowalchuk GJ, Stuckey TD, Rogers WJ, Givens DH, Waters D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:522-9.
- 49) Archer DF. The effect of the duration of progestin use on the occurrence of endometrial cancer in postmenopausal women. *Menopause* 2001;8:245-51.
- 50) La Vecchia C, Brinton LA, McTiernan A. Menopause, hormone replacement therapy and cancer. *Maturitas* 2001;39(2):97-115.
- 51) McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN, Kontos HA. Chronic estrogen treatment increases

- levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke* 1999;30:2186-90.
- 52) Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2788-93.
- 53) Goetz RM, Holtz J. Enhanced angiotensin-converting enzyme activity and impaired endothelium-dependent vasodilation in aortae from hypertensive rats: evidence for a causal link. *Clin Sci (Colch)* 1999;97:165-74.
- 54) Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:3459-67.
- 55) Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:257-62.
- 56) Neugarten J, Ding Q, Friedman A, Lei J, Silbiger S. Sex hormones and renal nitric oxide synthases. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1240-6.
- 57) Obayashi S, Beppu M, Aso T, Goto M, Azuma H. 17Beta-estradiol increases nitric oxide and prostaglandin I₂ production by cultured human uterine arteries only in histologically normal specimens. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:240-9.
- 58) Pavan B, Biondi C, Ferretti ME, Lunghi L, Paganetto G. 17beta-estradiol modulates prostaglandin E₂ release from human amnion-derived wish cells. *Biol Reprod* 2001;64:1677-81.
- 59) Klett C, Hellmann W, Hackenthal E, Ganten D. Modulation of tissue angiotensinogen gene expression by glucocorticoids, estrogens, and androgens in SHR and WKY rats. *Clin Exp Hypertens* 1993;15:683-708.
- 60) Proudler AJ, Ahmed AI, Crook D, Fogelman I, Rymer JM, Stevenson JC. Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet* 1995;346:89-90.
- 61) Tanaka M, Nakaya S, Watanabe M, Kumai T, Tateishi T, Kobayashi S. Effects of ovariectomy and estrogen replacement on aorta angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Jpn J Pharmacol* 1997;73:361-3.
- 62) Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997;277:1508-10.
- 63) Uht RM, Anderson CM, Webb P, Kushner PJ. Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element. *Endocrinology* 1997;138:2900-8.
- 64) Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 1990; 63:1267-76.
- 65) Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Bohm M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 1998;97:2197-201.
- 66) Kurtz A, Wagner C. Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 1999;10 Suppl 11:S162-8.
- 67) Alhenc-Gelas F, Baussant T, Hubert C, Soubrier F, Corvol P. The angiotensin converting enzyme in the kidney. *J Hypertens Suppl* 1989;7:S9-13; discussion S14.
- 68) Danilov SM, Allikmets Eyu, Sakharov Iyu, Dukhanina EA, Trakht IN. Monoclonal antibody to human lung angiotensin-converting enzyme. *Biotechnol Appl Biochem* 1987;9(4):319-22.