

ハムスター心臓線維芽細胞における アンジオテンシン II 刺激に対するキマーゼと アンジオテンシン変換酵素 (ACE) の発現について

黒岡京浩

近畿大学医学部第1内科学教室

抄 録

キマーゼはアンジオテンシン変換酵素 (ACE) と同様にアンジオテンシン II (AII) 産生酵素であることが明らかになっている。本実験は心臓線維芽細胞におけるキマーゼと ACE 遺伝子の発現及び AII に対する発現調節を調べ心臓の間質における AII に対する自己調節機能 (auto-regulation) を明らかにするために行った。3週令雄のシリアンハムスターの心臓を摘出し explant 法で心臓線維芽細胞を分離培養した。初代培養から第4継代までの細胞より acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法を用いて total RNA を抽出し reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法でキマーゼと ACE messenger-RNA (m-RNA) の存在を確認した。キマーゼと ACE m-RNA は第4継代の心臓線維芽細胞までほぼ同程度の発現が見られた。次に第3-4継代の細胞を用いて AII 刺激を行い、competitive RT-PCR 法でキマーゼと ACE m-RNA の変化を見た。また1型アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (AT₁ 受容体拮抗薬) である CV11974 で前処置後 AII 刺激を行いキマーゼと ACE m-RNA の変化を見た。AII 刺激及び CV11974 の前処置ではキマーゼ m-RNA の発現量は変化が見られなかった。ACE m-RNA の発現量は AII 刺激により濃度依存性に抑制され、CV11974 の前処置により濃度依存性に抑制が改善された。この事よりキマーゼが心臓線維芽細胞で発現していることが明らかになり AII 刺激により ACE は発現抑制を受けキマーゼは受けず、キマーゼと ACE は AII 刺激下のハムスター心臓線維芽細胞において発現調節が異なることが示唆された。

Key words : chymase, fibroblasts, angiotensin-converting enzyme (ACE), competitive RT-PCR, angiotensin II

緒 言

レニン-アンジオテンシン (RA) 系はアンジオテンシン II (AII) を最終生理活性物質とし血管の収縮や心血管系の構成細胞の肥大や増殖に作用し、また心不全や心筋梗塞などの心血管系の病態に関与していることが明らかになっている^{1,2}。また RA 系は血中だけでなく腎臓・脳・心臓血管等の組織においても存在しており、各組織内でそれぞれ独立した組織 RA 系の存在が示唆されている^{3,4,5,6,7}。また心筋梗塞の病態モデルや心筋梗塞後の心室リモデリングの病態モデルにおいても組織 RA 系の各コンポーネントの発現が変化していることが messenger-RNA (m-RNA) レベルや蛋白レベルで証明されており、

各病態への組織 RA 系の関与が示唆されている^{8,9}。さらにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 以外の AII 産生酵素が報告されている。キマーゼはそのうちの1つでアンジオテンシン I (AI) を AII に変換する¹⁰ことが報告されている。心臓においても多量の AII 産生キマーゼの存在が示され¹¹、ヒト心臓の in situ hybridization からキマーゼの主な発現は間質系に存在すると報告されている¹²。しかしその発現細胞は明らかではない。また培養細胞での検討及び発現調節に関しても明らかになっていない。そこでまず我々はヒト型キマーゼを持つハムスターにおいて、心臓の間質系の大部分を占める心臓線維芽細胞を培養しキマーゼが発現しているかどうかを調べた。その結果キマーゼの発現が確認された。次にそ

の発現調節の1つとしてAII刺激による調節を調べ、AII刺激下の心臓線維芽細胞におけるACEとの発現調節の違いを明らかにしたので報告する。

方 法

心臓線維芽細胞 (fibroblasts) の初代培養と継代培養

3週令雄のシリアンハムスターから心臓を摘出し Dulbecco's phosphate buffer saline (PBS (-), Nissui, Tokyo, JAPAN) を入れた滅菌シャーレに取り出した。PBS (-) で無菌的に5回洗浄した後、メスで1-2 mm 角の細片にし培養シャーレ (100 mm tissue culture dish, Corning Glass Works, New York, USA) に均等にまいた (1シャーレにつき心臓1個分)。37°C, 5% CO₂+95% air の条件下に30分間置き、細片を培養シャーレの底に接着させた後10%の牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, Gibco Laboratories, New York, USA), ペニシリン-ストレプトマイシン (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 g/ml, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) 入りの培養液 EAGLE-MEN (Nikken BioMedical Laboratory, Kyoto, JAPAN) を10 ml 加え培養した。37°C, 5% CO₂+95% air の条件下で培養し3-4日に1回培養液を交換した。組織片から増殖した心臓線維芽細胞は培養開始2週で培養シャーレの底面に増殖し継代培養を行った。培養シャーレからの細胞の遊離には0.25%トリプシンを用い、1:2の割合で細胞を新しい培養シャーレに播種した。第3-4継代まで同様に培養を行った¹³。

AII の添加

第3-4継代の細胞を用いて実験を行った。細胞が培養シャーレの底面に増殖した時点で0.5% FBS 入りの EAGLE-MEN に交換し48時間培養後に培養液を AII 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M (Sigma, Missouri, USA) を含む0.5% FBS 入りの EAGLE-MEN に交換し24時間培養を行った。1つの濃度につき培養シャーレを2-3枚使用した。

AT₁ 受容体拮抗薬, CV11974 の添加

第3-4継代の細胞を用いて実験を行った。細胞が培養シャーレの底面に増殖した時点で0.5% FBS 入りの EAGLE-MEN に交換し48時間培養後に培養液を AT₁ 受容体拮抗薬である CV11974 を10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁹ M (Takeda Chemical Industries, Ltd, Tokyo, JAPAN) の濃度で30分間前処置をした。その後それぞれのシャーレに AII を10⁻⁵ M とするように加え、24時間培養を行った。

心筋細胞 (myocytes) の分離, 培養

3週令雄のシリアンハムスターから心臓を摘出し

PBS(-)を入れた滅菌シャーレに取り出した。PBS (-) で無菌的に5回洗浄した後、メスで1-2 mm 角の細片にし、0.25%トリプシンを添加し37°C下で10分間スターラー回転により心筋細胞を単離し、10% FBS 入りの培養液 EAGLE-MEN を加えてトリプシン反応を止め、この酵素処理を5-6回繰り返して組織を消化し400 G で遠心して細胞を集めた。その後再び培養液に浮遊させ培養シャーレに均等にまき37°C, 5% CO₂+95% air の条件下に2時間置いた。この方法により心筋組織中に含まれる心臓線維芽細胞を培養シャーレに付着させ、なおも浮遊する細胞を集めスウィネックスフィルターで濾過して細胞塊を除き、細胞を培養シャーレに播種した。心臓線維芽細胞の過剰な増殖を防ぎ、血清中の成長因子の影響を除外するために、翌日に培養液を0.5% FBS 入りの EAGLE-MEN に交換し細胞を維持した¹⁴。

培養細胞からの RNA の抽出

RNA 抽出は acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法に準じた方法で行った¹⁵。培養液を吸引後 PBS (-) で2回洗浄し ISOGEN (Nippon Gene Industries, Ltd, Toyama, JAPAN) を1 ml 加えラバーポリスマンで細胞をはがし1.5 ml のエッペンに移した。約5分間室温に放置し0.2 ml のクロロホルム (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, JAPAN) を加え、15秒間攪拌し数分間室温に放置、その後4°C, 12000 G で15分間遠心した。上清を別の遠心管に移し等量のイソプロパノール (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, JAPAN) を加え攪拌した。約5-10分間室温に放置し、4°C, 12000 G で10分間遠心した。析出した RNA ペレットを残し1 ml の75%エタノール (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, JAPAN) を加え攪拌し4°C, 12000 G で5分間遠心した。エタノールを除去し2分間真空乾燥してエタノールが蒸発したことを確認した。適量の DEPC 処理蒸留水で RNA を溶解し260 nm での吸光度から濃度を算出し1 g/μl になるように濃度を調節した。

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法と competitive RT-PCR 法 RT-PCR 法と competitive RT-PCR 法には TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (TaKaRa Biomedicals, Tokyo, JAPAN) を用いた。得られた RNA (1 μg) 1 μl に 10×RNA PCR buffer (100 mM Tris-HCL (pH 8.3), 500 mM KCL) 2 μl, MgCl₂ (25 mM) 4 μl, RNase Free H₂O 8.5 μl, Random Primer 1 μl, dNTP Mixture (10 mM) 2 μl, RNase Inhibitor 0.5 μl, AMV Reverse Transcriptase (5 U/μl) 1 μl を加え全量20 μl として

30°Cにて10分間、その後42°Cにて30分間反応させ cDNA を合成しその後99°Cにて5分間加熱することにより逆転写酵素を不活化したのち、5°Cにて冷却を行った。合成した cDNA 溶液20 µl に dH₂O 62.5 µl, 10×RNA PCR buffer 8 µl, MgCl₂ (25 mM) 8 µl, 上流 PCR プライマー (20 pmol/l) 1 µl, 下流 PCR プライマー (20 pmol/l) 1 µl, TaKaRa taq (5 U/l) 0.5 µl を加え全量100 µl として熱変性 (denature) を94°Cにて1分間行った。その後熱変性 (denature) を94°Cにて1分間、アニーリング (annealing) を67°Cにて1分間、伸長反応 (extension) を72°Cにて1分間行いこれを1サイクルとしてキマーゼは計35サイクル、ACE は計30サイクルの PCR を行い最後に伸長反応 (extension) を72°Cにて1分間行なった。

キマーゼと ACE のプライマー

キマーゼの上流プライマーは ACG GGA AAA TGC TGC CCC TAC (position=874-894) で下流プライマーは GGC TGC CTC TTC AAC TGC TTG (position=3223-3203) とした¹⁶。ACE の上流プライマーは GCT TGC CCA ACA AGA CTG CCA (position=492-512) で下流プライマーは CCA CAT GTC TCC CAG CAG ATG (position=880-860) とした¹⁷。またコンペティターのプラスミド (pBlue script KS (+)) は大阪医科大学薬理学教室より提供を受けた。キマーゼのコンペティターのプラスミド (pBlue script KS (+)) は HindIII から EcoO109 までの270 bp の DNA を削除して作成されたもの、また ACE のコンペティターのプラスミド (pBlue script KS (+)) は外部より360 bp (T/A cloning キットの PCR II ベクターの PVU II フラグメント) の DNA を ACE の Sac I site に挿入して作成されたものを使用した¹⁶。

PCR 産物の定量

PCR 産物は Mupid-2 電気泳動システム (Cosumo Bio Industries. Ltd, Tokyo, JAPAN) を使用し、1×TAE(40 mol/ml Tris-acetae,1 mol/ml EDTA) を泳動バッファーとし、1.4%アガロースゲル (Agarose LO3 TAKARA, TaKaRa Biomedicals, Kyoto, JAPAN) 中で100 V で約30分間電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線で発色その後ゲルの写真を撮影し、画像解析ソフト NIH image Ver.1.57 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) を使用してデンストグラムを作成し各バンドの定量を行った。

統計学的処理

成績は平均値±標準誤差 (mean±S. E.) で表示した。解析は対応のない t 検定で検定し、p<0.05以下

を有意差ありとした。

結 果

キマーゼ及び ACE 遺伝子の発現の確認

今回用いた PCR プライマーはキマーゼ762 bp, ACE 382 bp に増幅される様にデザインされており図1上図に示すようにキマーゼは全心臓 (whole heart), 心筋細胞 (myocytes), 心臓線維芽細胞 (fibroblasts) それぞれにおいて m-RNA の発現が確認できた。また ACE も図1下図に示すように全心臓 (whole heart), 心筋細胞 (myocytes), 心臓線維芽細胞 (fibroblasts) において m-RNA の発現が確認できた。

コンペティターに対するキマーゼと ACE m-RNA の変化

キマーゼ m-RNA は RT-PCR 後、ターゲット (762 bp) とコンペティター (492 bp) の間において増幅は正の相関関係が見られた。(r=0.97, p<0.05) (図2) 以後の実験におけるコンペティターは1/2×

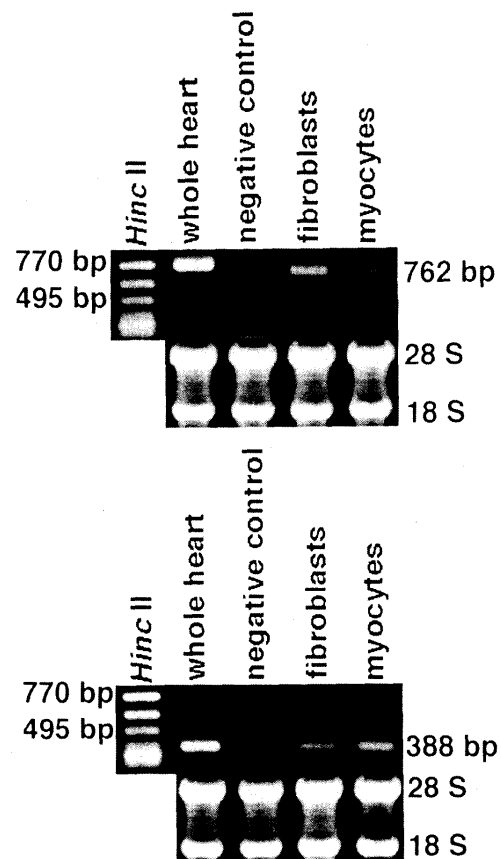


図1 (上図) 心臓線維芽細胞におけるキマーゼ m-RNA の確認 (下図) 心臓線維芽細胞における ACE m-RNA の確認

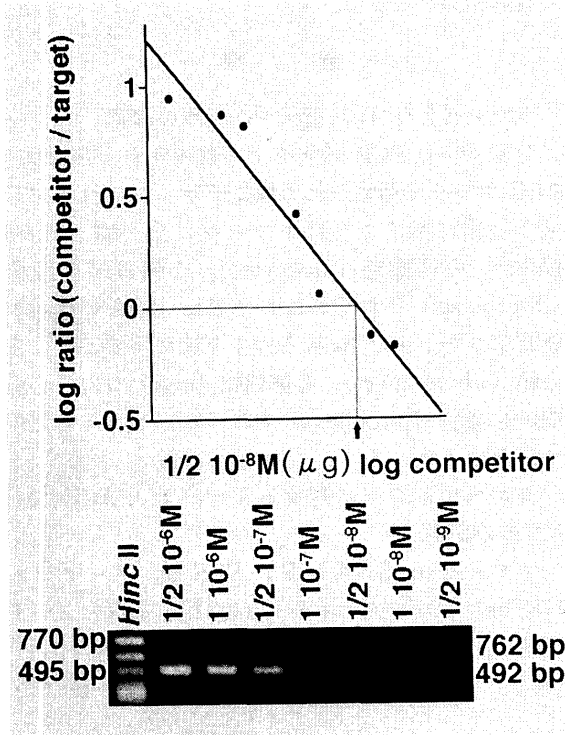


図2 コンペティターに対するキマーゼ m-RNA の PCR products の変化

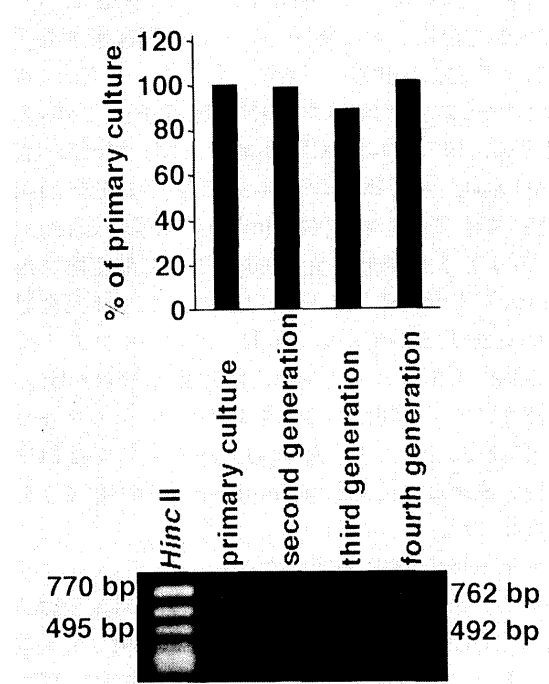


図4 各継代におけるキマーゼ m-RNA の変化

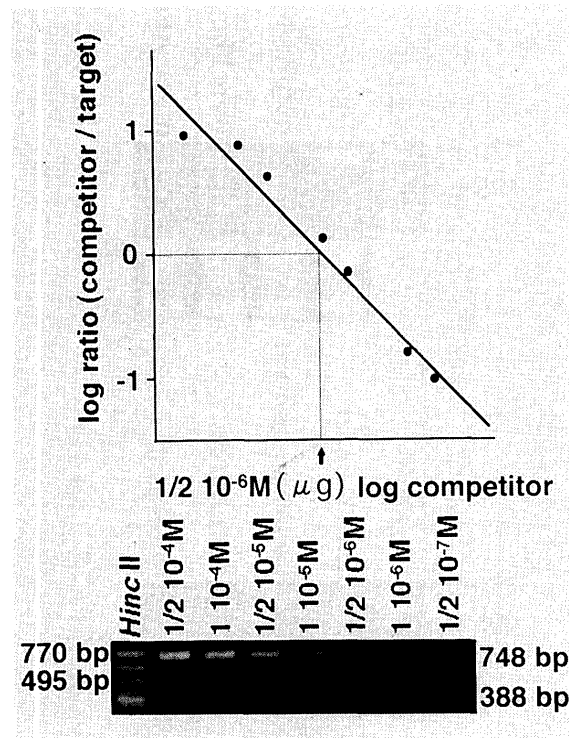


図3 コンペティターに対する ACE m-RNA の PCR products の変化

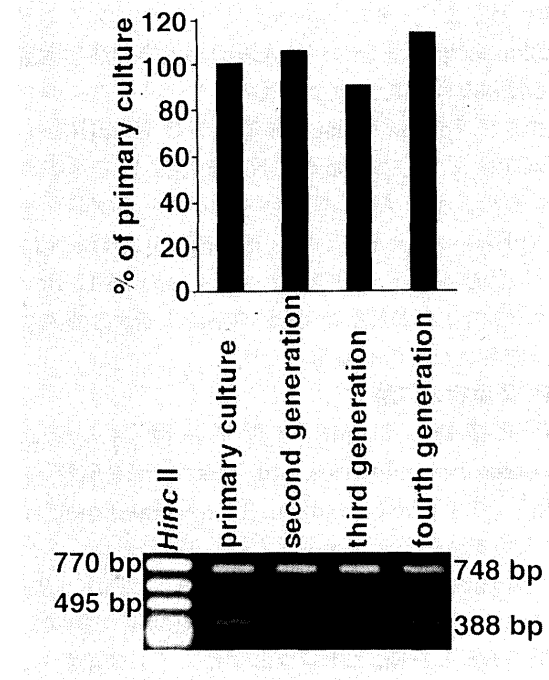


図5 各継代における ACE m-RNA の変化

10⁻⁸ M の濃度を使用した。ACE m-RNA は RT-PCR 後、ターゲット (388 bp) とコンペティター

(748 bp) の間において増幅は正の相関関係が見られた。(r=0.98, p<0.05) (図3) 以後の実験におけるコンペティターは1/2×10⁻⁶ M の濃度を使用した。

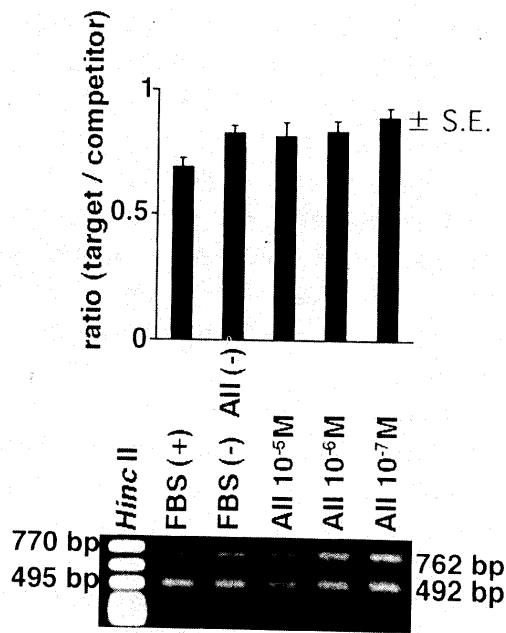


図6 アンジオテンシン II 刺激下のキマーゼ m-RNA の変化, n=5
FBS: 10% fetal bovine serum
AII: アンジオテンシン II

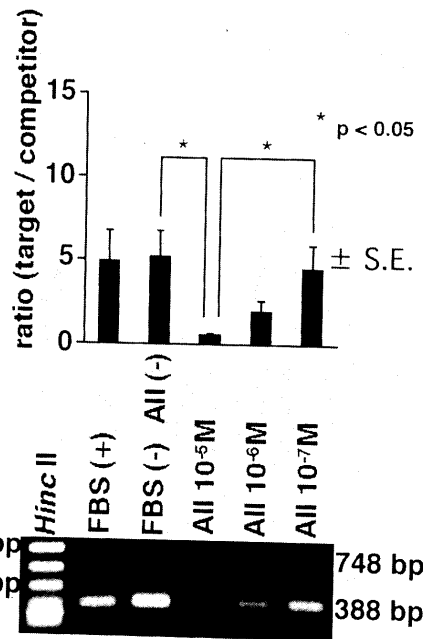


図7 アンジオテンシン II 刺激下の ACE m-RNA の変化, n=5
FBS: 10% fetal bovine serum
AII: アンジオテンシン II
*: p < 0.05

心臓線維芽細胞の継代におけるキマーゼと ACE m-RNA の発現の確認

キマーゼは第1世代から第4世代まで m-RNA の発現が確認できた。第1世代を100%とする比率で示すと第2世代は105%, 第3世代は90%, 第4世代は113%とほぼ同程度の発現が見られていた。(図4)

また ACE においても第1世代から第4世代まで m-RNA の発現が確認できた。第1世代を100%とする比率で示すと第2世代は98%, 第3世代は89%, 第4世代は101%とほぼ同程度の発現が見られていた。(図5)

AII 刺激によるキマーゼと ACE m-RNA の発現調節

キマーゼと ACE m-RNA の発現はコンペティターに対するターゲットの比率で示した。キマーゼ m-RNA は無刺激のもの (AII (-)) が 0.82 ± 0.03 で 10% FBS で刺激したもの (FBS (+)) が 0.68 ± 0.04 , AII 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M で刺激したものはそれぞれ 0.82 ± 0.05 , 0.83 ± 0.04 , 0.89 ± 0.04 であり (n=5), AII 刺激により発現に変化が見られなかった。(図6)

ACE m-RNA の発現は無刺激のもの (AII (-)) は 5.15 ± 1.63 で 10% FBS で刺激したもの (FBS (+)) は 4.92 ± 1.86 , AII 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M 刺激でそれぞれ 0.58 ± 0.09 , 1.99 ± 0.61 , 4.55 ± 1.41

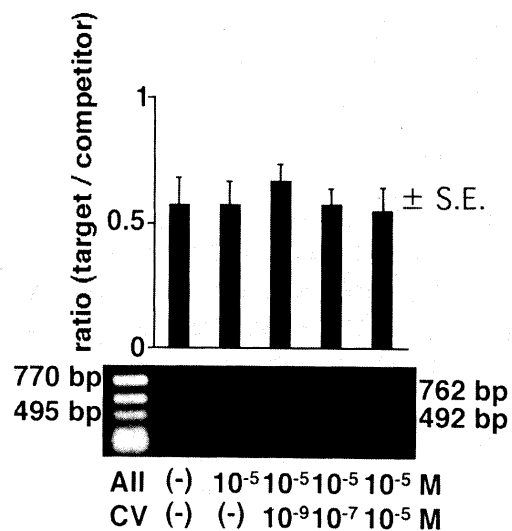


図8 CV11974 作用下でアンジオテンシン II 刺激を行った時のキマーゼ m-RNA の変化, n=4
AII: アンジオテンシン II
CV: CV11974

であり (n=5), AII 刺激により発現は濃度依存性に抑制されていた。(図7)

CV11974 で前処置を行い AII 刺激を行った時の

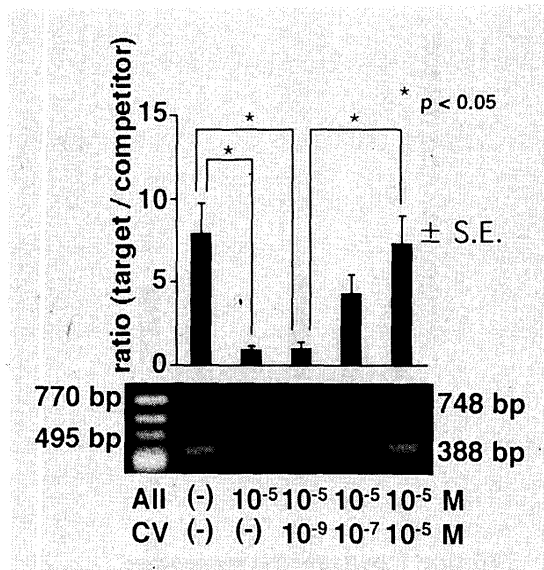


図9 CV11974 作用下でアンジオテンシン II 刺激を行った時の ACE m-RNA の変化, n=4
AII: アンジオテンシン II
CV: CV11974
*: p<0.05

キマーゼと ACE m-RNA の発現調節

AT₁ 受容体拮抗薬である CV11974 で前処置を行った後, AII 10⁻⁵ M 刺激を行った時のキマーゼ m-RNA の発現には変化が見られなかった。キマーゼ m-RNA の発現は無刺激のもの (AII (-)) が 0.57 ± 0.11 で AII 10⁻⁵ M 刺激では 0.57 ± 0.09, CV11974 を 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁵ M の濃度の前処置でそれぞれ 0.66 ± 0.07, 0.57 ± 0.07, 0.55 ± 0.10 であった。(n=4) (図 8)

AII 刺激を行った時の ACE m-RNA の発現抑制は CV11974 の前処置により濃度依存性に抑制改善が見られた。ACE m-RNA の発現は無刺激のもの (AII (-)) が 7.89 ± 1.87, AII 10⁻⁵ M 刺激では 0.90 ± 0.28, CV11974 を 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁵ M の濃度の前処置でそれぞれ 1.03 ± 0.39, 4.25 ± 1.19, 7.32 ± 1.67 であった。(n=4) (図 9)

考 察

今回の実験でキマーゼがハムスター心臓線維芽細胞で発現していることが明らかになった。また ACE と比較して AII に対する発現調節の違いを初めて明らかにすることができた。

実験使用動物及び培養細胞

現在 RA 系において ACE 非依存性の AII 産生経路が明らかにされている。その 1 つに肥満細胞顆粒のセリンプロテアーゼであるキマーゼがある。キマーゼ依存性 AII 産生経路には種差がありヒト, サ

ル, ハムスター¹⁸ では存在し AI の Phe⁸-His⁹ の間を切断し AII を産生する¹⁹。しかしウサギやラットではそのほとんどが ACE 依存性産生経路であり²⁰, AI の Tyr⁴-Ile⁵ の間を切断し不活性断片に分解するだけで AII は産生されない¹⁹ と報告されている。この事よりキマーゼに関する実験にはハムスターが有用な実験動物と考えられた。また今回の実験には心臓の間質の大部分を占める心臓線維芽細胞を用いた。これは心臓でのキマーゼの局在が主に間質系に存在すること¹² や継代培養が容易であるという理由から使用した。

Competitive RT-PCR 法

今回の実験に使用した competitive RT-PCR 法は m-RNA の定量化を図る方法であり^{21,22,23,24}, キマーゼと ACE はそれぞれコンペティターとターゲットの間で正の相関関係を示した。同一プライマーを用いた既存の文献でもキマーゼと ACE はコンペティターとターゲットの間で相関関係を示しており¹⁶, この結果は competitive RT-PCR 法の定量性の妥当性を示すものである。

心臓線維芽細胞におけるキマーゼと ACE の発現

今回の実験において心臓線維芽細胞でキマーゼの発現が ACE と共に確認できた。心臓線維芽細胞における ACE の局在発現は免疫学的に報告されている²⁵。キマーゼについては in situ hybridization での検討で心臓の間質系に主にその局在のあることが示唆されている¹²。しかし, 心臓線維芽細胞におけるキマーゼの発現の確認は我々の知る限り報告がない。また培養細胞における検討はキマーゼの発現調節を知る上で重要な位置を占めると考える。

心筋細胞における発現

今回の実験において心筋細胞においても ACE m-RNA の発現が確認できた。心筋細胞においての局在発現は免疫学的に報告されている²⁵。また今回の実験ではキマーゼに関しても心筋細胞でわずかに確認された。しかし in situ hybridization での検討ではキマーゼの発現は確認されていない¹²。この違いの理由としては RT-PCR 法は微量の m-RNA の検出が可能とされており²⁶, 初代心筋細胞の培養においては心臓線維芽細胞を完全に除去することはできず, この心臓線維芽細胞に含まれる m-RNA を RT-PCR 法により増幅していることが考えられ, 今回の心筋細胞でのキマーゼの発現は心臓線維芽細胞のコンタミネーションによる可能性が高いと考えられた。

AII 刺激に対する発現調節

今回の実験において AII 刺激により ACE m-RNA の発現量は濃度依存性に抑制され, キマーゼ

m-RNA の発現量は変化が見られなかった。また ACE m-RNA の発現量は AT₁ 受容体拮抗薬である CV11974 の前処置により濃度依存性に抑制が改善された。ところで正常ハムスターの心臓線維芽細胞の培養においてはほとんど 2 型アンジオテンシン II 受容体 (AT₂ 受容体) は存在していないという報告があり²⁷, AT₂ 受容体を介する発現調節については言及できないが, ACE は AT₁ 受容体を介して発現抑制を受けているものと考えられる。キマーゼに関しては AII 刺激により m-RNA の発現に変化は見られず, さらに CV11974 の添加においても変化は見られなかった。このことは心臓線維芽細胞におけるキマーゼは少なくとも AT₁ 受容体を介しては発現調節を受けていない可能性が示唆される。

病態における検討

心肥大モデルラットの心臓では ACE m-RNA だけが発現が亢進していたという報告や²⁸, ヒト心不全心臓では ACE m-RNA は発現が亢進していたが, キマーゼ m-RNA は有意な変化は見られなかったという報告がある²⁹。ところが心筋症ハムスターでは心不全になる前の心筋線維化と心筋壊死の出現する時期にキマーゼ m-RNA 及び活性が亢進し, ACE m-RNA 及び活性は変化が見られなかったという報告や¹⁶, 2K1C 高血圧モデルハムスターの心臓では線維化やアポトーシスが認められる時期にキマーゼ活性が亢進し, ACE 活性は変化が見られなかったという報告がある³⁰。これらの事はキマーゼと ACE の発現調節は病態や病期により異なることを示唆している。このような発現調節の違いは心臓だけでなく腎性高血圧モデルの 2K1C ハムスターの血管壁³¹ や PTCA 後再狭窄モデルのイヌ頸動脈バルーン傷害後の内膜肥厚³² などの心臓以外の病態モデルにおいても報告されている。今回の結果も細胞レベルにおいてはああるが, AII という単一因子に対しても ACE とキマーゼが異なる発現調節を受けることを示した初めての結果であると考え。今後各病態によるキマーゼと ACE の優位性を解明することが必要と考えられる。

以上, 本研究では心臓線維芽細胞において AII 産生酵素の 1 つであるキマーゼを ACE と共に m-RNA レベルで確認した。そのことによりキマーゼが間質系で AII 産生に関与していることが想定され, また AII 刺激により ACE は発現抑制を受けキマーゼは受けないことより, キマーゼと ACE は AII 刺激下の心臓線維芽細胞においては発現調節が異なることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御検閲を賜りました石川欽司教授に深謝致します。また直接の御指導, 御助言をいただいた島田誠二郎先生及び近畿大学第 1 内科学教室の諸先生の協力に感謝します。さらに本研究の御指導, 御協力を賜りました大阪医科大学薬理学教室の宮崎瑞夫教授ならびに塩田直孝先生に深く感謝いたします。本論文の要旨は第 35 回日本臨床代謝学会学術総会 (平成 10 年 3 月, 東京), 第 13 回米国高血圧学会総会 (平成 10 年 5 月, アメリカ), などで発表した。

文 献

1. Baker KM, Aceto JF (1990) Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 259: H610-H618
2. Miyata S, Haneda T (1994) Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by type I angiotensin II receptor. *Am J Physiol* 266: H2443-H2451
3. Dzau VJ, Re RN (1987) Evidence for the existence of renin in the heart. *Circulation* 75 (suppl 1): 134-136
4. Pieruzzi F, Abassi ZA, Keiser HR. (1995) Expression of renin-angiotensin system components in the heart, kidney, and lungs of rats with experimental heart failure. *Circulation* 92: 3105-3112
5. Campbell DJ, Habener JF (1986) Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 78: 31-39
6. Paul M, Wagner J, Dzau VJ (1993) Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 91: 2058-2064
7. Kunapuli SP, Kumar A (1987) Molecular cloning of human angiotensinogen cDNA and evidence for the presence of its mRNA in rat heart. *Circ Res* 60: 786-790
8. Lindpaintner K, Lu W, Niedermajer N, Schieffer B, Just H, Ganten D, Drexler H (1993) Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 25: 133-143
9. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M (1995) Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* 95: 46-54
10. Reilly CF, Tewksbury DA, Schechter NM, Travis J (1982) Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem* 257: 8619-8622
11. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A (1990) Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 265: 22348-22357
12. Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A (1993) Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest* 91: 1269-1281

13. Kruse PF JR, Patterson MK JR (1973) Tissue culture, In: Martin GM: Human skin fibroblasts, Harcourt BJ, Academic Press, pp39-43
14. Simpson P, Savion S (1982) Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circ Res* 50: 101-116
15. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem* 162: 156-159
16. Shiota N, Fukamizu A, Takai S, Okunishi H, Murakami K, Miyazaki M (1997) Activation of angiotensin II-forming chymase in the cardiomyopathic hamster heart. *J Hypertens* 15: 431-440
17. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allengrini J, John M, Tregear G, Corvol P (1988) Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9386-9390
18. Takai S, Shiota N, Yamamoto D, Okunishi H, Miyazaki M (1996) Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. *Life Sci* 58: 591-597
19. Trong HL, Neurath H, Woodbury RG (1987) Substrate specificity of the chymotrypsin-like protease in secretory granules isolated from rat mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 364-367
20. Okunishi H, Oka Y, Shiota N, Kawamoto T, Song K, Miyazaki M (1993) Marked species-difference in the vascular angiotensin II-forming pathways: humans versus rodents. *Jpn J Pharmacol* 62: 207-210
21. Siebert PD, Larrick JW (1992) Competitive PCR. *Nature* 359: 557-558
22. Bagnarelli P, Menzo S, Valenza A, Manzin A, Giacca M, Ancarani F, Scalise G, Varaldo PE, Clementi M (1992) Molecular profile of human immunodeficiency virus type 1 infection in symptomless patients and in patients with AIDS. *J Virol* 66: 7328-7335
23. Menzo S, Bagnarelli P, Giacca M, Manzin A, Varaldo PE, Clementi M (1992) Absolute quantitation of viremia in human immunodeficiency virus infection by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 1752-1757
24. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunin HF (1990) Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2725-2729
25. Dostal DE, Rothblum KN, Conrad KM, Cooper GR, Baker KM (1992) Detection of angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 263: C851-C863
26. Wang AM, Doyle MV, Mark DF (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9717-9721
27. Matsubara H, Kanasaki M, Murasawa S, Tsukaguchi Y, Nio Y, Inada M (1994) Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J Clin Invest* 93: 1592-1601
28. Iwai N, Shimoike H, Kinoshita M (1994) Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation* 92: 2690-2696
29. Studer R, Reinecke H, Miller B, Holtz J, Just H, Drexler H (1994) Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in the failing human heart. *J Clin Invest* 94: 301-310
30. Shiota N, Jin D, Takai S, Kawamura T, Koyama M, Nakamura N, Miyazaki M (1997) Chymase is activated in the hamster heart following ventricular fibrosis during the chronic stage of hypertension. *FEBS* 406: 301-304
31. Jin D, Takai S, Shiota N, Miyazaki M (1998) Roles of vascular angiotensin converting enzymes and chymase in two-kidney, one clip hypertensive hamsters. *J Hypertens* 16: 657-664
32. Shiota N, Okunishi H, Fukamizu A, Sakonjo H, Kikumori M, Nishimura T, Nakagawa T, Murakami K, Miyazaki M (1993) Activation of two angiotensin-generating systems in the balloon-injured artery. *FEBS* 323: 239-242