

内向き整流性カリウムチャネルを基盤にした 食塩感受性高血圧の病態解明と新規降圧治療法の開発

沖 健司¹, 河野 修興², Celso E. Gomez-Sanchez³

¹広島大学病院, ²広島大学大学院医歯薬保健学研究院, ³ミシシッピ大学メディカルセンター

概要 【目的】 副腎皮質球状帯やアルドステロン産生腺腫で合成されるアルドステロンは、腎臓の遠位尿細管でナトリウム (Na) の再吸収を促進し、食塩感受性高血圧の成因に深く関与している。アルドステロンを自律過剰分泌する原発性アルドステロン症はアルドステロン産生腺腫 (APA) と特発性アルドステロン症に大別される。APA の成因として内向き整流性カリウムチャネル (KCNJ5) の体細胞変異が報告され、KCNJ5 は G 蛋白共役受容体 (GPCR) により調節されている。そこで、本研究では KCNJ5 の遺伝子異常をもつ APA (APA-KCNJ5) と遺伝子変異をもたない APA (APA-NM) を対象に KCNJ5 と関連したアルドステロン合成機構を解明することを目的とした。

【方法】 APA-NM (8 標本) と APA-KCNJ5 (6 標本) を用いて、GPCR を対象に網羅的遺伝子発現解析を行った。APA-NM において、GNRHR が高発現していたため、GnRH 負荷試験を実施した。KCNJ5 遺伝子異常が GNRHR に与える影響を検討するため、ヒト副腎皮質癌細胞株 (HAC15) に KCNJ5-T158A をレンチウイルスで導入した。

【結果】 APA-NM と APA-KCNJ5 で 2 倍以上発現量が異なる遺伝子群を抽出したところ、APA-KCNJ5 で上昇している遺伝子を 2 個と APA-NM で上昇している遺伝子を 12 個同定した。GNRHR は APA-NM で 2 番目に高発現しており、過去にも APA で高値を示すことが報告されていることから、GNRHR を介したアルドステロン合成を検討することとした。そして、GnRH 刺激によるアルドステロン上昇率と GNRHR 発現量に強い正の相関がみられた ($r = 0.726, P < 0.001$)。両群における GNRHR 発現を qPCR で確認したところ、APA-NM で有意に高値であった ($P < 0.05$)。また、APA-NM において、GnRH によるアルドステロン上昇率は有意に高かった ($P < 0.05$)。APA-NM の 55.6%、APA-KCNJ5 の 0% が positive response であり、APA-NM の 22.2% と APA-KCNJ5 の 23.1% が partial response であった。次に、HAC15 にレンチウイルスを用いて KCNJ5 T158A を導入し、*in vitro* において KCNJ5 の遺伝子異常が GNRHR に与える影響を検討したところ、GNRHR 発現量はコントロールに比較し 0.64 倍と有意に低下していた ($P < 0.05$)。

【結語】 本研究において、GNRHR がアルドステロン合成に関与する新規機序を同定した。特に、遺伝子変異を認めないアルドステロン産生腺腫における新たな分子機序であり、異所性受容体発現を標的にした新たな分子機序の解明や創薬につながる可能性がある。

1. 緒言

副腎皮質球状帯やアルドステロン産生腺腫で合成されるアルドステロンは、腎臓の遠位尿細管でナトリウム (Na) の再吸収を促進し、食塩感受性高血圧の成因に深く関与している。高血圧症は、40 歳以上の人口の約 40% が罹患し、さらに、高血圧症の 5-10% 程度は原発性アルドステロン症が原因とされ、全世界で非常に高い有病率を呈する

^[1-4]。また、原発性アルドステロン症の患者は、高率に心血管疾患を合併し、本態性高血圧患者に比較し、極めて予後が不良であることが報告されている^[1-4]。したがって、原発性アルドステロン症の病態解明と新規治療法の確立は極めて重要である。

原発性アルドステロン症は、アルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症に大別され^[1]、本疾患の病因は、

近年まで全く明らかにされていなかった。近年、内向き整流性カリウムチャネル(Kir3.4)をコードするKCNJ5の体細胞変異がアルドステロン産生腺腫の原因になっている可能性が報告され^[5]、アルドステロン産生腺腫の30-60%にKCNJ5の遺伝子異常を認めることがわかった^[5-8]。我々は、KCNJ5の遺伝子異常が、アルドステロン産生腺腫においてCYP11B2発現とアルドステロン合成を促進する詳細な機序を明らかにし^[9]、Kir3.4を介したアンギオテンシンIIがアルドステロンを合成する機序も解明した^[10]。さらに、2013年にATP感受性Na/Kチャネル(ATP1A1, ATP2B3)や電位依存性カルシウムチャネル(CACNA1D)の体細胞変異がアルドステロン合成に関与していることが報告された^[11-13]。つまり、これらの報告をまとめると、約半数のアルドステロン産生腺腫の原因およびアルドステロン合成機序は、全く解明されていない。

アルドステロン合成は、レニン・アンギオテンシン系により制御され、複数のステロイド合成酵素発現が必要不可欠である。CYP11B2はアルドステロン合成酵素と呼ばれ、コレステロールからアルドステロンが合成される際の最終酵素であり、アルドステロン合成における律速酵素である^[14]。CYP11B2の評価がアルドステロン合成を標的にした基礎研究で極めて重要であるが、CYP11B2はコレチゾール合成に関わるCYP11B1とアミノ酸配列で93%のホモロジーを有するため、CYP11B2抗体の作製は極めて困難であった。よって、CYP11B2を標的にした基礎研究に限界があり、今日までアルドステロン合成機構の明確な解明に至ることができなかった。しかし、近年、我々の共同研究者であるDr. Gomez-Sanchezが世界で初めてヒトCYP11B2のモノクローナル抗体の作製に成功した^[15]。アルドステロン産生腺腫におけるCYP11B2モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学評価では、遺伝子異常を認めないアルドステロン産生腺腫におけるCYP11B2発現は腫瘍内で一様ではないことを同定しており^[15]、CYP11B2を介したアルドステロン合成に関わる因子を探索する際、適切な標本の選択が重要であることがわかった。

Kir3.4は内向き整流性カリウムチャネルを構成するサブタイプのひとつであり、Kir3.1~Kir3.4の4つのサブタイプからホモまたはヘテロ4量体で構成される^[16, 17]。また、Kir3はG蛋白共役受容体(GPCR)による調節を受けており、Kir3を調節するGPCRについては全く明らかにされて

いない。異所性GPCR発現がアルドステロン合成に関与することが過去に報告されており、luteinizing hormone受容体、serotonin4受容体、gonadotropin releasing hormone受容体(GNRHR)、glutamate receptor metabotropic 3、endothelin receptor type B-like protein、ACTH受容体などがアルドステロン産生腺腫で同定されている^[18-21]。しかし、異所性GPCR発現とKir3チャネルの関連を報告した研究は全くない。

本研究では、KCNJ5の遺伝子異常をもつアルドステロン産生腺腫と他の遺伝子異常を認めないアルドステロン産生腺腫を対象に、CYP11B2発現の有無に焦点をあてたアルドステロン合成因子の探索研究を行い、新規アルドステロン合成因子の同定および機序の解明を行う。さらに、アルドステロン産生腺腫における新規分子標的アルドステロン合成阻害薬やアルドステロン合成をターゲットにした降圧薬の開発につなげることを目的とする。

2. 方法

2.1 患者および腫瘍標本

原発性アルドステロン症の診断は、日本内分泌学会から報告された診断基準に基づき診断した^[22]。また、手術を施行した全例で副腎静脈サンプリングを施行し、同診断基準に基づき局在診断を行った。さらに、腫瘍におけるCYP11B2発現を免疫組織化学により確認した。

広島大学病院でアルドステロン産生腺腫を手術した腫瘍標本11例(遺伝子異常を認めない腫瘍6例とKCNJ5遺伝子異常を認める腫瘍5例)を対象に網羅的遺伝子発現解析(マイクロアレイ解析)を行った。いずれのアルドステロン産生腺腫においても、免疫組織化学によるCYP11B2が強く染色されることを確認した。

2.2 RNA抽出とmRNA発現解析

総RNAをRNeasy Mini Kit(Qiagen社)を用いて行い、逆転写PCRは総RNA300ngを用い、Takara PrimeScript RT Master Mixにより行った。CYP11B2発現解析はTaqman法(Applied Biosystems社)で実施し、GNRHRの発現解析はSYBR green法により行った。

2.3 マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K v2(Agilent社)により実施した。データ解析のためのGPCR遺伝子群の抽出は、Gene Set

Enrichment Analysis の Web サイトより行い、R ソフトウェアを用いて解析した。

2. 4 内分泌検査

GNRHR の影響を検討する際、ACTH による刺激を避けるため、検査前日の 23 時に 1mg デキサメサゾンの内服し、GnRH 刺激試験を行った。GnRH 刺激試験は、7 時 30 分前に静脈確保し、8 時に GnRH 投与を行った。GnRH 投与の前、15 分後、30 分後、60 分後、90 分後、120 分後に点滴ルートより採血を実施し、アルドステロン濃度測定を行った。アルドステロン値 50% 以上の上昇で、positive response と判定し、25-50% の上昇で partial response と判断した。

2. 5 副腎皮質癌細胞株 (HAC15) 培養

HAC15 は Dr. Rainey (Michigan University) から提供を受け、DMEM/F12 と 10% Calf serum (Cosmic 社) を用いて培養した。アンギオテンシン II (A-II) の反応を検討する場合、細胞内シグナル伝達を抑制するため、A-II 投与 24 時間前に 0.1% serum により serum starvation によるシグナル抑制をはかった。また、A-II 投与時も、0.1% serum による培養を行った。

2. 6 レンチウイルスによる遺伝子導入

クローニングした Kir3.4 (KCNJ5) をもとに、KCNJ5 遺伝子変異をもつ cDNA (KCNJ5 T158A) を作製した^[9]。KCNJ5 T158A を pLX303 ベクター (addgene 社) に LR

reaction method (Invitrogen 社) にて導入した。

また、レンチウイルスの作製に、293TN 細胞株 (System Biosciences 社) を用い、上記のベクター、psPAX、cCMV-VSV-G を 12 : 14 : 8 の比率で PEI25 によりトランスフェクションを行った。トランスフェクション 12 時間後に培地交換を行い、48 時間培養後に上清を回収した。

レンチウイルスを用いて、HAC15 に KCNJ5 T158A を導入し、アルドステロン合成や GNRHR 発現に与える影響を検討した。

2. 7 アルドステロン測定における ELISA 法

我々はアルドステロンの一次抗体を作成しており、以前に報告した方法を用いて上清中のアルドステロン濃度を測定した^[23]。

3. 結果

3.1 マイクロアレイ解析

GPCR および GPCR 関連遺伝子を含んだ遺伝子群を対象に、マイクロアレイ解析を行った (Figure 1A)。KCNJ5 の遺伝子異常を認める腺腫 (APA-KCNJ5) と KCNJ5 の遺伝子異常を認めない腺腫 (APA-NM) で、2 倍以上発現量が異なる遺伝子群を抽出したところ、APA-KCNJ5 で上昇している遺伝子を 2 個と APA-NM で上昇している遺伝子を 12 個同定した (Figure 1B)。

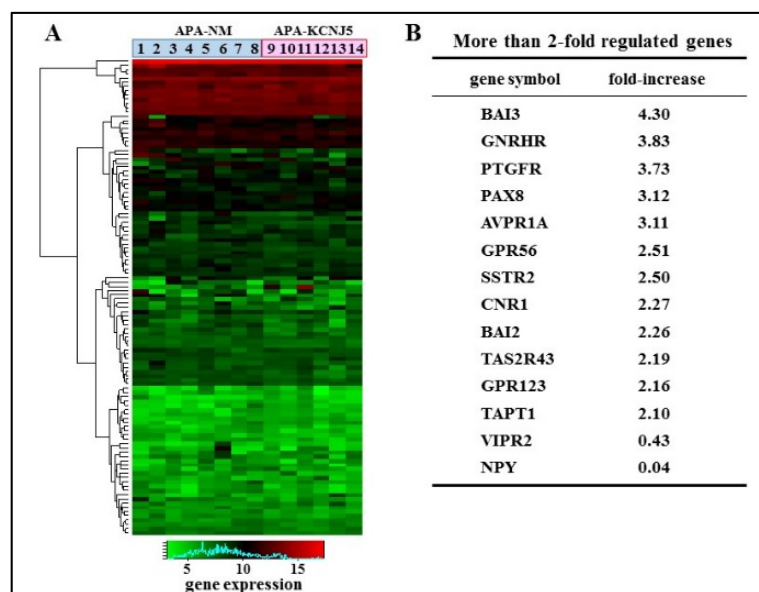


Fig.1. マイクロアレイ解析結果。A. マイクロアレイ解析によるヒートマップ。B. APA-NMとAPA-KCNJ5の両群で2倍以上発現量が異なる遺伝子。

3. 2 GnRH 刺激によるアルドステロン上昇率と GNRHR 発現の関連

Figure 1B をもとに、過去の報告を検索すると、アルドステロン産生腺腫に GNRHR が発現していることがわかった [18, 20, 24]。したがって、GnRH 刺激によるアルドステロン上昇率と GNRHR 発現量の関連を検討したところ、両者に強い正の相関がみられた (Figure 2)。さらに、両者の関連は、性、年齢、血清 K 値、腫瘍径、生理周期で調整後も有意であった ($\beta=0.242$, $P < 0.01$)。

3. 3 遺伝子タイプ別の患者背景と GNRHR 発現

APA-NM と APA-KCNJ5 の患者背景を Table 1 に示

す。APA-KCNJ5 において、女性の頻度が有意に高かった ($P < 0.05$)。

両群での GNRHR 発現を qPCR で確認したところ、APA-NM で有意に高値であった (Figure 3A)。また、APA-NM において、GnRH によるアルドステロン上昇率は有意に高く (Figure 3B)、この結果は GNRHR と GnRH 刺激によるアルドステロン上昇率に相関がみられた Figure 2 の結果に合致していた。APA-NM の 55.6%、APA-KCNJ5 の 0%が positive response であり、APA-NM の 22.2%と APA-KCNJ5 の 23.1%が partial response であった。

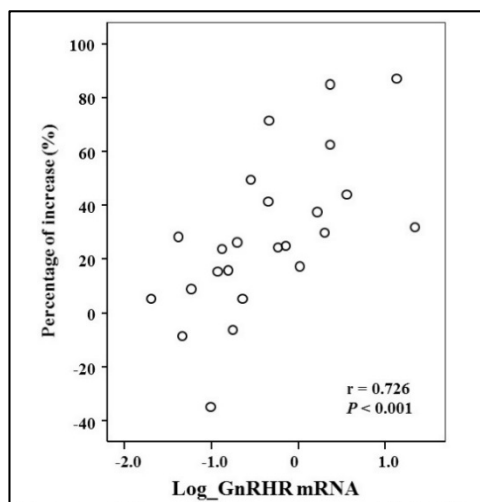


Fig. 2. GNRHR 発現と GnRH 刺激によるアルドステロン上昇率の関連

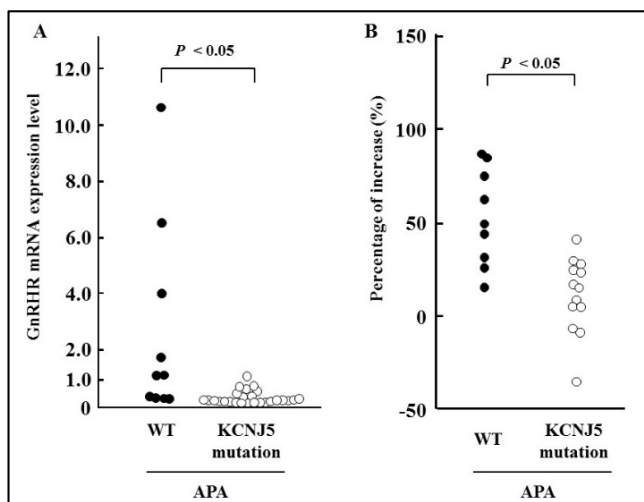


Fig. 3. 遺伝子タイプ別にみた GNRHR 発現 (A) と GnRH 刺激によるアルドステロン上昇率 (B)。

Table 1. 患者背景

	Wild type (n = 10)	KCNJ5 mutation (n = 26)	P value
gender (women / men)	2 / 8	17 / 9	0.025
age	56.0 (43.0 – 61.3)	47.5 (40.3 – 57.5)	0.349
mutation type (G151R / L168G)		13 / 13	
serum K levels (mEq/L)	3.3 (2.8 – 3.6)	3.0 (2.7 – 3.6)	0.929
number of menopause	2	2	
adenoma diameter (mm)	12.2 (9.6 – 18.8)	13.7 (11.2 – 17.4)	0.448
plasma aldosterone concentration (PAC, pg/ml)	385.5 (232.5 – 517.3)	442.0 (220.8 – 739.5)	0.502
plasma renin activity (PRA, ng/ml/hr)	0.25 (0.10 – 0.40)	0.30 (0.18 – 0.40)	0.405
aldosterone renin ratio (ARR)	1200.4 (590.0 – 3595.0)	1547.5 (984.8 – 2572.5)	0.872
ARR after captopril test	510.0 (271.2 – 1024.2)	1122.0 (642.5 – 2970.0)	0.035
PRA after upright furosemide loading test	0.45 (0.23 – 0.88)	0.50 (0.30 – 0.80)	0.922
PAC after saline loading test	201.0 (144.0 – 504.0)	222.5 (130.0 – 509.0)	0.956

3. 4 KCNJ5 遺伝子異常が GNRHR に与える影響

重回帰分析を用いて、GNRHR 発現に与える臨床的な影響を検討した。Figure 4 に示すように、KCNJ5 の遺伝子異常のみ有意な説明因子であり、KCNJ5 の遺伝子異常が GNRHR 発現に影響することがわかった。さらに、HAC15 にレンチウイルスを用いて KCNJ5 T158A を導入し、*in vitro* において KCNJ5 の遺伝子異常が GNRHR に与える影響を検討した。まず、KCNJ5 T158A を導入した HAC15 では、CYP11B2 mRNA 発現量は 17.7 倍に上昇していた。さらに、GNRHR 発現量はコントロールに比較し 0.64 倍と有意に低下していた (Figure 5)。

4. 考 察

本研究において、遺伝子変異を認めないアルドステロン産生腺腫では、GPCR の中で GNRHR は最も高発現している遺伝子のひとつであり、GNRHR 発現が高値である症例ほど GnRH によるアルドステロン上昇率が高いことがわかった。また、遺伝子変異を認めないアルドステロン産生腺腫において、特にアルドステロン上昇率が高かった。さらに、KCNJ5 の遺伝子異常が GNRHR に与える影響を臨床的に基礎的に検討したところ、KCNJ5 の遺伝子異常は GNRHR の発現を負に調節することがわかった。

過去の報告からはいくらかのアルドステロン産生腺腫で GNRHR が発現していることが報告されていたが^[18, 20, 24]、本研究において、APA-NM において、GNRHR 発現を認め、アルドステロン合成を調節している可能性が示唆され

た。過去の報告では、GNRHR が発現している率は全アルドステロン産生腺腫のうち 26.7~39.3%であり^[18, 20, 24]、本研究でも同程度の GNRHR 発現率であった。遺伝子変異別に比較検討は過去に報告がなく、我々の結果が初めての結果と考える。

次に重要な点として、GNRHR 発現量と GnRH 刺激によるアルドステロンの上昇率に強い正相関がみられたことである。Nakamura らは、H295R (ヒト副腎皮質癌細胞株) に GnRH を投与すると、CYP11B2 発現が増え、アルドステロン合成が増加することを報告している^[25]。GNRHR の下流シグナルは cAMP であることがわかっている^[26, 27]。cAMP

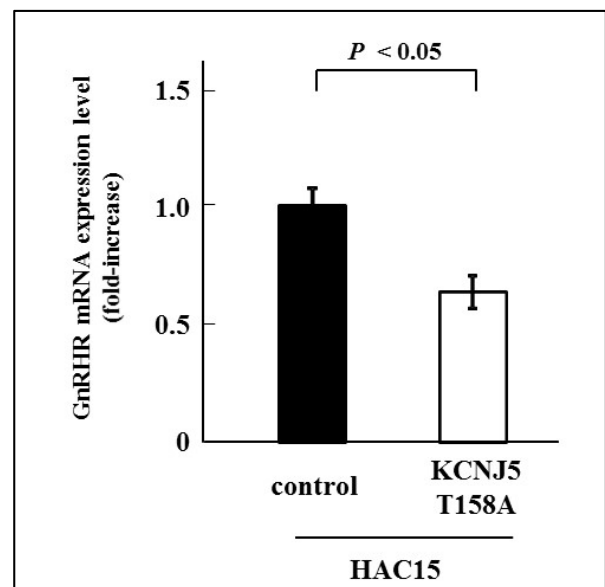


Fig. 5. KCNJ5 遺伝子異常が GNRHR 発現に与える影響

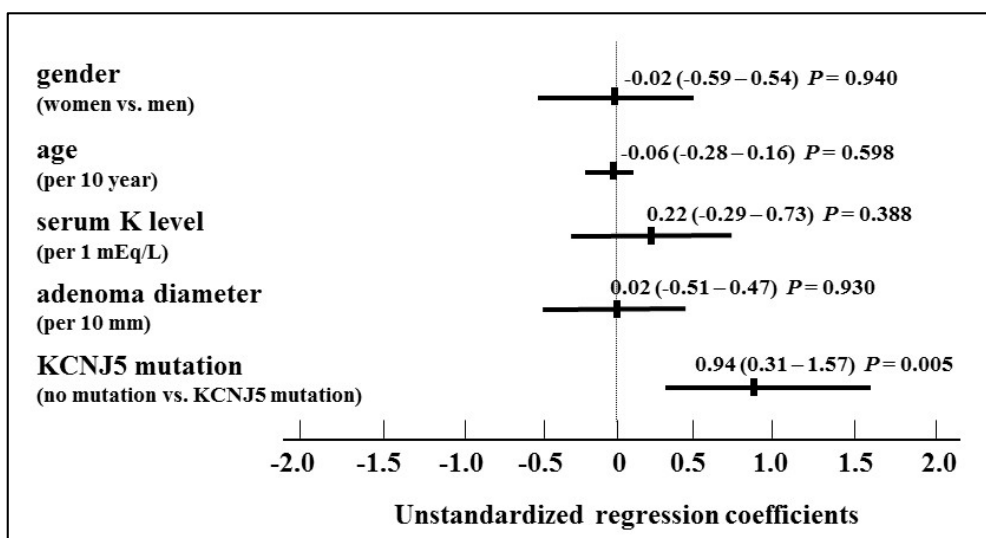


Fig. 4. GNRHR 発現に影響する因子の相対危険度

はアルドステロン合成における 2nd メッセンジャーとしても重要であり^[14]、GNRHR が cAMP を介しアルドステロン合成を促進していると考えられる。

本研究において、GNRHR がアルドステロン合成に関与する新規機序を同定した。特に、遺伝子変異を認めないアルドステロン産生腺腫における新たな分子機序であり、異所性受容体発現を標的にした新たな分子機序の解明や創薬につながる可能性がある。

5. 今後の課題

本研究において、GNRHR とアルドステロン合成の関連について示すことができた。しかし、GNRHR を介した Kir チャンネルとの関連を示すことができておらず、今後 Kir チャンネルとの関連について検討を行っていく必要がある。

6. 参考文献

- [1] Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, et al. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:3266-81.
- [2] Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *Journal of the American College of Cardiology.* 2005;45:1243-8.
- [3] Reincke M, Fischer E, Gerum S, Merkle K, Schulz S, Pallauf A, et al. Observational study mortality in treated primary aldosteronism: the German Conn's registry. *Hypertension.* 2012;60:618-24.
- [4] Savard S, Amar L, Plouin PF, Steichen O. Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. *Hypertension.* 2013;62:331-6.
- [5] Choi M, Scholl UI, Yue P, Björklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, et al. K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science.* 2011;331:768-72.
- [6] Azizan EA, Murthy M, Stowasser M, Gordon R, Kowalski B, Xu S, et al. Somatic mutations affecting the selectivity filter of KCNJ5 are frequent in 2 large unselected collections of adrenal aldosteronomas. *Hypertension.* 2012;59:587-91.
- [7] Taguchi R, Yamada M, Nakajima Y, Satoh T, Hashimoto K, Shibusawa N, et al. Expression and mutations of KCNJ5 mRNA in Japanese patients with aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:1311-9.
- [8] Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, Steichen O, Beuschlein F, Boulkroun S, et al. Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. *Hypertension.* 2014;64:354-61.
- [9] Oki K, Plonczynski MW, Luis Lam M, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. Potassium channel mutant KCNJ5 T158A expression in HAC-15 cells increases aldosterone synthesis. *Endocrinology.* 2012;153:1774-82.
- [10] Oki K, Plonczynski MW, Lam ML, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. The potassium channel, Kir3.4 participates in angiotensin II-stimulated aldosterone production by a human adrenocortical cell line. *Endocrinology.* 2012;153:4328-35.
- [11] Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, Lichtenauer UD, et al. Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet.* 2013;45:440-4, 4e1-2.
- [12] Scholl UI, Goh G, Stölting G, de Oliveira RC, Choi M, Overton JD, et al. Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet.* 2013;45:1050-4.
- [13] Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MV, Lieb A, et al. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet.* 2013;45:1055-60.
- [14] Nogueira EF, Vargas CA, Otis M, Gallo-Payet N, Bollag WB, Rainey WE. Angiotensin-II acute regulation of rapid response genes in human, bovine,

- and rat adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol.* 2007;39:365-74.
- [15] Gomez-Sanchez CE, Qi X, Velarde-Miranda C, Plonczynski MW, Parker CR, Rainey W, et al. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;383:111-7.
- [16] Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 2010;90:291-366.
- [17] Lüscher C, Slesinger PA. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:301-15.
- [18] Zwermann O, Suttman Y, Bidlingmaier M, Beuschlein F, Reincke M. Screening for membrane hormone receptor expression in primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol.* 2009;160:443-51.
- [19] Perraudin V, Delarue C, Lefebvre H, Do Rego JL, Vaudry H, Kuhn JM. Evidence for a role of vasopressin in the control of aldosterone secretion in primary aldosteronism: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:1566-72.
- [20] Ye P, Mariniello B, Mantero F, Shibata H, Rainey WE. G-protein-coupled receptors in aldosterone-producing adenomas: a potential cause of hyperaldosteronism. *J Endocrinol.* 2007;195:39-48.
- [21] Duparc C, Moreau L, Felipe Golib Dzib J, Boyer HG, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, et al. Mast Cell Hyperplasia is Associated with Aldosterone Hypersecretion in a subset of Aldosterone-Producing Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;jc20143660.
- [22] Nishikawa T, Omura M, Satoh F, Shibata H, Takahashi K, Tamura N, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary aldosteronism--the Japan Endocrine Society 2009. *Endocr J.* 2011;58:711-21.
- [23] Oki K, Kopf PG, Campbell WB, Luis Lam M, Yamazaki T, Gomez-Sanchez CE, et al. Angiotensin II and III metabolism and effects on steroid production in the HAC15 human adrenocortical cell line. *Endocrinology.* 2013;154:214-21.
- [24] Albiger NM, Sartorato P, Mariniello B, Iacobone M, Finco I, Fassina A, et al. A case of primary aldosteronism in pregnancy: do LH and GNRH receptors have a potential role in regulating aldosterone secretion? *Eur J Endocrinol.* 2011;164:405-12.
- [25] Nakamura Y, Hattangady NG, Ye P, Satoh F, Morimoto R, Ito-Saito T, et al. Aberrant gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) expression and its regulation of CYP11B2 expression and aldosterone production in adrenal aldosterone-producing adenoma (APA). *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 384:102-8.
- [26] Liu F, Usui I, Evans LG, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, et al. Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. *J Biol Chem.* 2002;277:32099-108.
- [27] Arora KK, Krsmanovic LZ, Mores N, O'Farrell H, Catt KJ. Mediation of cyclic AMP signaling by the first intracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem.* 1998;273:25581-6.

The Pathophysiological Clarification Based on Inwardly Rectifying K Channel and the Development of Newly Antihypertensive Treatment in Salt Sensitive Hypertension

Kenji Oki¹, Nobuoki Kouno², Celso E, Gomez-Sanchez³

¹Hiroshima University Hospital, ²Hiroshima University, ³University of Mississippi Medical Center

Summary

Objectives: Some aldosterone-producing adenoma (APA) has somatic mutation in *KCNJ5* coding for inwardly rectifying K channel (Kir3) which is mediated by G protein-coupled receptors (GPCRs). We aimed to detect novel genes associated with GPCRs in APA, and elucidate the mechanisms underlying aldosterone production.

Methods: Microarray analysis targeting GPCR-associated genes was conducted using APA without known mutations (APA-NM) samples ($n = 8$) and APA samples with the *KCNJ5* mutation (APA-*KCNJ5*; $n = 6$). Since gonadotropin-releasing hormone receptor (*GNRHR*) was one of the highest expression in APA-NM by microarray analysis, we investigated the effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulation on aldosterone production.

Results: Expression levels of mRNAs encoding *GNRHR* were highest in APA-NM samples according to our microarray analysis. The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay results revealed higher *GNRHR* expression levels in APA-NM samples than in APA-*KCNJ5* samples ($P < 0.05$). There was a significant and positive correlation between *GNRHR* expression and aldosterone increase via GnRH stimulation according to univariate and multivariate analyses. Consistent with the correlation, patients with APA-NM ($n = 9$), which showed *GNRHR* mRNA levels, had significantly higher GnRH-stimulated aldosterone response than those with APA-*KCNJ5* ($n = 13$) ($P < 0.05$). We observed an aldosterone response in 55.6% (5/9) of patients with APA-NM, while none of the APA-*KCNJ5* patients exhibited an aldosterone response. A partial aldosterone response was seen in 22.2% (2/9) and 23.1% (3/13) of APA-NM and APA-*KCNJ5* patients, respectively. Multiple regression analysis revealed that the presence of the *KCNJ5* mutation was linked to *GNRHR* mRNA expression ($\beta = 0.94$ and $P < 0.01$). HAC15 cells with *KCNJ5* gene carrying T158A mutation exhibited a 0.64-fold increase in *GNRHR* expression than that in control cells ($P < 0.05$).

Conclusions: We clarified increased expression of *GNRHR* in APA-NM, and the expression positively correlated with aldosterone production mediated by GnRH stimulation. Aberrant *GNRHR* expression in APA-NM could be one of the mechanisms by which aldosterone production is modulated.