

犬におけるインクレチン作用と
インクレチン製剤の糖代謝へおよぼす影響

(Incretin action and effect of the incretin preparation for glucose metabolism in dogs)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科獣医保健看護学専攻博士後期課程 平成 23 年入学

小田 民美

(指導教員：左向 敏紀)

インクレチンは、グルコース恒常性の維持に関わる消化管ホルモンである。健常人では、グルコースを経口投与した場合、同程度の血糖上昇をきたすように経静脈投与した場合と比較して、インスリン分泌反応は大きくなる。これは、摂食に伴い主に小腸より分泌されるインクレチンが膵臓に作用し、血糖依存的にインスリン分泌を促進させる働きを持つからである。インクレチンにはグルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチド (GIP) とグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の2種類があるが、これらはともに血糖依存的インスリン分泌促進作用を持つほか、各臓器で様々な作用を示す。

本研究では、犬におけるインクレチン作用とインクレチン製剤の糖代謝へおよぼす影響について明らかにし、犬におけるインクレチンの有用性について検討した。

第2章:犬のインクレチン作用とインクレチン分泌細胞のRNA発現解析

始めに、ヒトでいわれるインクレチン作用が犬においても存在するのかを検討するため、リアルタイムで血糖値を確認できる人工膵臓装置を用い、経口糖負荷試験 (OGTT) の血糖変動を記録後、静脈内糖負荷試験により OGTT と同等の血糖変動を再現し、OGTT と IVGTT のインスリン分泌量を比較した。結果として、OGTTの方がインスリン分泌量が多くなり、また、インクレチン濃度を測定した所、OGTTでは糖負荷後有意なインクレチン濃度上昇を認めた。以上より、犬においてもインクレチン作用が存在することが確認された。しかしながら、グルコース刺激によるインクレチン分泌およびインスリン分泌はヒトでの同様の報告に比べ、犬ではその反応が小さいことが示唆された。これは、GIP および GLP-1 分泌細胞である K 細胞や L 細胞の分布状態に違いがあるものと考えられた。

哺乳動物のインクレチン分泌細胞のRNA発現解析について、これまでいくつかの研究が行われているが、ブタ、ラット、ヒトを比較した研究によると、これら3つの動物種におけるインクレチン分泌細胞の分布は異なると報告されている。そのため、犬小腸におけるインクレチン分泌細胞の分布解析を行うことにした。リアルタイムPCR法を用いて、健常犬の小腸上部、中部、下部(十二指腸、空腸、回腸)の3部位におけるGIP、GLP-1のRNA発現量の定量を行った所、GIPは小腸上部で最も発現しており、次いで中部、そして小腸下部ではほとんど発現していないことがわかった。GLP-1は上部ではほとんど発現していないが、中部、下部となるにつれて発現が高くなっており、いくつかの哺乳動物での報告と異なることが分かった。グルコース刺激によるインクレチン分泌が犬で小さいのは、GLP-1分泌細胞が小腸上部ではほとんどないことから、グ

ルコースのように吸収の早い栄養素では小腸下部まで届かないためと考えられた。

以上より、ヒトと同様健常犬においても、経静脈投与するより経口投与した方がインスリンの分泌量が多くなることが示された。また、OGTTでは糖負荷前値と比較して糖負荷後において血中 GIP 濃度、GLP-1 濃度が共に有意に上昇していた。よって、ヒトと同様にイヌでもインクレチン作用が確認できた。しかし、今回の成績から、健常犬はヒトに比べてインスリン分泌量が小さく、またインクレチン分泌も小さいことが示唆された。これは、①グルコース刺激による GIP、GLP-1 分泌がヒトより小さい、②ヒトと比べて犬はインスリンによる血糖降下作用が強い、つまりはインスリンの効きがよいことから、インスリン分泌がそれほど上昇しなくとも血糖値が降下したためであると考えた。さらに、インクレチン分泌細胞の RNA 発現解析により、③インクレチン分泌細胞の分布の違いがインクレチン分泌に影響を及ぼす可能性が示唆された。

第3章:犬のインクレチン日内変動と栄養組成の違いがインクレチン分泌に与える影響

次に第3章では、インクレチンの日内変動と栄養組成の違いがインクレチン分泌におよぼす影響を検討するため、様々なフードを給与してインクレチン濃度を測定した。まず始めに、供試犬に普段給与しているフードを給与し、インクレチンの日内変動を検討した所、血中 GIP、GLP-1 濃度は食事摂取にともない急激に上昇していき、食後 1.5-3 時間に最高値を迎え、その後緩やかに下降していく日内変動をとることがわかった。朝 7 時からの 12 時間と夜 7 時間の 12 時間を比較すると、血中 GIP 濃度は朝でやや高値を示す傾向にあり、血中 GLP-1 濃度は夜において上昇スピードが遅く、そして最高値はやや高値を示した。以上より、1 日 2 回、12 時間ごとに同じ食事を同じ量給与した場合でも、インクレチン変動は昼夜で異なることが示された。また、その他の糖代謝関連項目（血糖値、インスリン、遊離脂肪酸）変動の違いを検討した所、夜に比べ朝の遊離脂肪酸濃度が食後、時間経過とともに上昇していった。これは、朝は活動エネルギーに対して摂取エネルギーが不足していることを示しており、一方、夜は活動エネルギーによるエネルギー消費が小さいことが示唆された。また、夜は睡眠している時間が多く消化管通過時間が遅延しているため、食物吸収が緩やかとなり、夜間の血中 GLP-1 濃度が上昇したと考える。そして、夜は朝に比べるとインスリン分泌が若干大きく、朝よりも肥満しやすい傾向にあることが示唆された。次に、栄養組成の違いが犬のインクレチン分泌のおよぼす影響について検討するため、異なる栄養組成を持つ 5 種のフード（通常食（普段給与

しているフード) vs 高炭水化物食 vs 高脂肪食 vs 高繊維高タンパク食 vs 高繊維高脂肪食) を給与し、インクレチン濃度を測定した。結果として、犬の GLP-1 分泌には栄養組成の違いはそれほど影響せず、むしろ繊維の量によって差が認められた。これは犬の GLP-1 分泌細胞が小腸下部に非常に多く、小腸上部にはほとんど発現していないためであることが示唆された。また、GIP 分泌は他動物種の報告と同様、フード中の脂肪含量の増加で上昇し、繊維を添加すると低下することがわかった。

第 4 章:インクレチン製剤が犬の糖代謝へおよぼす影響

最後に第 4 章では、現在ヒトの糖尿病患者に使用されているインクレチン製剤であるリラグルチドを用いて、犬での効果を検討した。リラグルチドは GLP-1 受容体作動薬であり、GLP-1 のアミノ酸構造の一部を人工的に変化させることで GLP-1 分解酵素である dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) に対して抵抗性を持ち、GLP-1 特異的受容体に結合して特異的かつ強力な GLP-1 作用を示す薬剤である。血中半減期が比較的長いため、1 日 1 回の投与であることが多く、また、生理的効果をはるかに超えた GLP-1 作用を維持することができる。血糖降下に対する効果としては、インスリン分泌促進、グルカゴン分泌抑制、消化管運動低下による食後高血糖の防止などがある。2 型糖尿病患者で障害されているグルコース応答性のインスリン分泌は健常人とほぼ同等まで回復することが報告されている。また、リラグルチド投与により、食後高血糖改善とともに、グルカゴン分泌の有意な抑制、体重減少効果、インスリン分泌能の欠如した 1 型糖尿病患者においても食後高血糖の抑制など、血糖コントロールの改善が報告されている。

健常犬におけるリラグルチド投与において、血糖変動は OGTT 下でも空腹時の値からほとんど上下せず、顕著な血糖降下作用が認められた。しかし、インスリン分泌がそれほど上昇していないにも関わらず、十分な血糖降下作用が認められたのは、①犬はインスリンによる血糖降下作用が強い (インスリンの効きが良い) ために、インスリン分泌反応は小さくとも充分血糖降下作用を示した、②GLP-1 の消化管運動低下、グルカゴン分泌抑制作用が血糖降下に働いたことが考えられた。しかし、犬の血中グルカゴン濃度は本研究においては測定できていなく、今後の検討課題である。

健常犬によるリラグルチド投与の結果より、インスリン自己分泌がない糖尿病犬においても血糖降下作用が期待されたため、糖尿病犬に対してインスリンとリラグルチドの併用療法が血糖変動におよぼす影響について検討した。インスリンとリラグルチドの併用療法によって、全ての糖尿病犬で食後高血糖の抑制、血糖変動幅の顕著な減少が認められ、GLP-1 によるグルカゴン分泌抑制作

用や消化管運動抑制作用が血糖降下に寄与していることがわかった。インスリン・リラグルチド併用療法により明らかな低血糖症状を呈した症例はいなかったが、血糖値が 50 mg/dL 程度を示した時間もあり、リラグルチド単剤に比べるとインスリン・リラグルチド併用療法は低血糖リスクが高いことが考えられるため、血糖値の細かなモニタリングが必須となることが考えられた。リラグルチド投与により血糖コントロール改善に加えて、インスリン投与量の減量などのメリットなど、インスリン補助療法としての有用性が期待されたが、今後は供試犬数の増加検討や継続投与、用法のさらなる検討が必要であることが示唆された。

現在、ヒトの糖尿病患者に対する薬剤治療や食事療法にて、インクレチンに焦点を当てた研究が数多く行われている。その中でインクレチンは、血糖正常化のみならず肥満、生活習慣病予防や糖代謝改善の重要な因子とされており、今後、小動物臨床においてもその有用性は大きく期待できる。また、本研究結果が糖尿病や糖代謝改善、肥満予防に対するより効果的なフードの開発や栄養指導へと繋がると考える。

Incretin action and effect of the incretin preparation for glucose metabolism in dogs.

Hitomi Oda

Incretin was shown to exert their insulinotropic effects through a variety of mechanisms, including increasing the rates of insulin synthesis, granule docking, and exocytosis. In the presence of matched glucose concentrations, insulin secretion is greater following ingestion of glucose than following infusion of glucose. This was referred to as "the incretin effect" and is believed to be modulated at least in part by intestinally secreted hormones such as glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and glucagon like peptide-1 (GLP-1). These incretins have various effects besides stimulating insulin secretion. These effects include delaying gastric emptying and suppressing glucagon secretion in patients with diabetes mellitus (DM).

The aims of this study were to investigate the effect of incretin and incretin preparation for glucose and insulin metabolism in dogs.

Chapter 2: Confirmation of the “incretin effect” in healthy dogs and investigate distribution of tissue genetic expressions of GIP and GLP-1 in intestine

In order to confirm whether dog have “the incretin effect”, we performed the oral glucose tolerance test (OGTT) and intravenous glucose tolerance test (IVGTT) under similar blood glucose variation using artificial pancreas apparatus. No significant difference was observed in temporal serum glucose concentrations between OGTT and IVGTT, since we adjust the intravenous glucose infusion to reproduce similar blood glucose variation as the OGTT. However, insulin, GIP and GLP-1 concentration in OGTT were significantly higher than those in IVGTT. Overall, our insulin and incretin results confirm the existence of the “incretin effect” in healthy dogs. However, this effect was weaker than similar human study.

GIP produced by K-cells have commonly identified in the upper small intestine, whereas GLP-1 is produced by the L-cells primarily located in the distal small intestine and colon in human study. Therefore, the aim of this study was to examine distribution of tissue genetic expressions of GIP and GLP-1 in canine intestine. GIP genetic expression was highest in the duodenum as compared to other small intestine (jejunum, ileum). However, genetic expression of GLP-1 was the highest in ileum as compared to duodenum and jejunum. This result was not consistent with other mammals, thereby the incretin effect might be decreased in dogs.

Chapter 3: The circadian incretin concentration and effect of diet with different nutritional composition in healthy dogs.

In order to determine the circadian incretin concentration and effect of different nutritional composition, different diets were fed in 5 healthy dogs.

The incretin concentrations were different between day and night-time. For data analyses, day-time was defined as 7:00 am-7:00 pm and night-time as 7:00 pm-7:00 am. We measured GIP, GLP-1, glucose, insulin, and non-esterified free fatty acid concentration (NEFA). GIP and GLP-1 concentrations were increased in a few hours after ingestion, and followed by slowly decreased. However, different percentage of rise and peak values were observed between the day-time (7:00 am to 7:00 pm) and the night-time(7:00 pm to 7:00 am) when fed the same amount of diets twice a day

(semidiurnal). In addition, NEFA concentration of the day-time was gradually increased as compared to the night-time. These results suggested that feeding dogs in night time cannot be consumed all energy from food intake.

Then, the impact of 5 commercially available prescription diet regimens on postprandial glucose, insulin, GIP, and GLP-1 concentrations were investigated with five healthy dogs. The diet regimens used were as follows: Select Skin Care dry (general use: moderate protein, moderate fat, moderate carbohydrate and low fiber), Gastro Intestinal (Low fat) dry (moderate protein, low fat, high carbohydrate and moderate fiber), Renal dry (low protein, high fat, moderate carbohydrate and moderate fiber), Obesity dry (high protein, moderate fat, low carbohydrate and high fiber), and Fibre Response dry (moderate protein, high fat, low carbohydrate and high fiber). In two high-fiber diets (Obesity and Fibre Response dry), GLP-1 concentration was significantly increased compared to other diets. Meanwhile, GIP secretion was increased in high-fat diet (Renal dry) and this result was similar to the previously reports in other mammals. In addition, GIP concentration was decreased in two high-fiber diets. These results might be related to chapter 2 results, GIP expression was the highest in the duodenum and decreased gradually in the jejunum. Therefore, feeding the high-fiber diet induce absorption lag, thereby GIP concentration might be decreased.

Chapter 4: Effect of liraglutide on glucose metabolism in healthy and T1DM dogs.

Recently, enhanced incretin preparations, such as liraglutide have emerged, with clinical data indicating that enhanced preparations can improve glycemic control by stimulating insulin secretion in patients suffering from Type 2 diabetes mellitus (T2DM). Liraglutide is a long-acting acylated human GLP-1 receptor agonist developed for the treatment of T2DM. The prolonged action of liraglutide is achieved by attaching a fatty acid molecule at one position of the GLP-1 molecule, binding with albumin results in slower degradation. Recent study suggested liraglutide improved control of blood glucose and reduced meal related hyperglycemia by increasing insulin secretion, delaying gastric emptying, and suppressing glucagon secretion. Recent human study has shown that liraglutide administration with insulin preparation in patients with well controlled T1DM reduces mean and standard deviation of daily blood glucose. Therefore, liraglutide might suppress glucagon and induce lowering blood glucose concentrations as in dogs.

In order to determine the effect of incretin preparations on serum glucose and insulin concentrations, dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) resistant GLP-1 analog, liraglutide was administered in 5 healthy dogs. Liraglutide was dispensed medication before starting OGTT. Significant decrease was observed in temporal serum glucose concentrations in liraglutide group as compared to control group. Since these dogs are healthy, insulin regulation is properly functioning and regulated. Therefore only a minimal amount of additional insulin was likely secreted, since it was not required. Insulin stimulation and glucagon inhibition contribute equally for the effect of GLP-1 in human study. Furthermore, it is known that liraglutide is capable of increasing insulin secretion and suppressing prandial glucagon secretion in a glucose-dependent manner. Hence, we speculate that stabilized glucose concentrations, after the OGTT, due to liraglutide treatment, may have been principally attributed to reduced glucagon secretion, instead of insulin secretion in healthy animals. Liraglutide's prandial glucagon suppressive

ability appears to play a key role in its glucose-lowering capability. Since a liraglutide associated glucose lowering effect was observed in healthy dogs, and we suspect that this was principally resulting from liraglutide's ability to suppress prandial glucagon release into the blood, we tested whether T1DM dogs would respond favorably to liraglutide treatment. T1DM dogs responded favorably to liraglutide treatment, which lead to a significant reduction of 46.0% in glucose AUC_{0-12h} (total area under the curve for 0-12h), and a significant reduction of 66.5% in serum glucose as compared to baseline controls (insulin treatment only).

In conclusion, this study demonstrated that healthy dogs have the incretin effect and the incretin secretion was affected by different nutritional composition. Moreover, incretin preparations affect glucose and insulin metabolism in healthy and DM dogs. This study confirms the potential use of GLP-1 as an attractive candidate for therapy and management in DM dogs.