

機関番号：32669

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21880044

研究課題名（和文） 糖尿病犬の厳格な血糖コントロールがインスリンシグナリング遺伝子に及ぼす影響の検討

研究課題名（英文） Evaluation of insulin signaling gene in diabetic dogs with intensive glycemic control.

研究代表者

森 昭博 (AKIHIRO MORI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：60549559

研究成果の概要（和文）：正常および糖尿病犬において新たなるインスリン製剤である、インスリンデテミルの効果の検討を行った。その知見を用いてインスリンデテミルを使用して、糖尿病犬を用いて厳格な血糖コントロールを行い、組織でのインスリンシグナリング遺伝子の発現解析を行った。その結果厳格な血糖コントロールを行うと組織におけるインスリンシグナリング遺伝子の発現が上昇し、インスリン抵抗性が改善することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Time-action profiles of insulin detemir was evaluated in healthy and diabetic dogs. Insulin detemir could achieve intensive glycemic control in diabetic dogs. Then, we have evaluated the insulin signaling gene expression of insulin sensitive tissue in diabetic dogs with intensive glycemic control. Intensive glycemic control increased insulin signalin gene expressions in insulin sensitive tissue, which suggests amelioration of insulin resistance in diabetic dogs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：糖尿病、犬、インスリン

1. 研究開始当初の背景

近年、伴侶動物においても糖尿病をはじめとする代謝性疾患の発生は増加する傾向にある。犬における一般的な糖尿病のタイプは膵臓β細胞からのインスリン分泌が欠如している1型糖尿病であるので、インスリン製剤の投与は長期の血糖コントロールにおいて

最も有効な治療法である。ここ数年の我々の研究から、いくつかの血液代謝産物やホルモン濃度、白血球酵素活性、さらに組織のインスリンシグナリング遺伝子の発現量が肥満や糖尿病の初期の診断マーカーとして有用であることが明らかになってきた。特に糖尿病犬における白血球のインスリンシグナ

リング遺伝子発現量が、インスリン治療による厳格な血糖コントロールによって上昇することを報告し、今後細胞の代謝を反映するマーカーとして、早期の糖尿病の診断や血糖コントロールマーカーとして用いることができると考えられている。

インスリンの主作用は、蛋白質、グリコーゲンおよび脂肪酸合成の代謝経路の調節である。インスリンが受容体に結合すると、受容体自身のチロシン残基のリン酸化が生じる。活性化したインスリン受容体は、インスリンレセプター基質をリン酸化する。チロシンリン酸化したインスリンレセプター基質には、ホスファチジルイノシトール 3'-キナーゼの調整サブユニットである p85 が結合し、その後、触媒サブユニット p110 と結合する。その後、様々なインスリンシグナリングカスケードを介してインスリンの作用であるグルコーストランスポーター4 の細胞膜への誘導による糖の取り込みやグリコーゲン合成、アミノ酸取り込み、蛋白質合成促進、脂肪分解抑制、脂肪酸合成および解糖系や糖新生酵素活性の調節に関与すると考えられている。特に、インスリンレセプター基質-1、インスリンレセプター基質-2 とホスファチジルイノシトール 3'-キナーゼ P-85 α は、インスリンシグナリングカスケードの下流への伝達に重要な蛋白質であり、インスリン抵抗性患者や糖尿病患者の組織発現に変動が認められ、細胞内でのインスリン代謝や抵抗性を評価するマーカーとなると考えられている。しかしながら、獣医学領域において厳格な血糖コントロールを行った際の、インスリン感受性組織におけるインスリンシグナリングの変化についてはほとんど報告がない。

また、犬の糖尿病はインスリン治療が主たるものであるが、2007年12月に日本で発売

された、インスリンデテミルは犬において使用された報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

本研究ではまず正常犬において、様々なインスリン製剤の作用プロファイルを検討する。その結果を用いて糖尿病犬にインスリン治療を行い、厳格な血糖コントロールを試みる。従来測定されている血糖コントロールマーカーの指標となる血漿代謝産物(グルコース、糖化アルブミンなど)に加えて、細胞内のインスリンシグナリング遺伝子発現量をリアルタイムPCR法で測定し、新たに肝臓、骨格筋および脂肪組織において細胞のインスリン代謝を反映するマーカーとなるかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 正常犬における人工膵臓を用いたインスリン作用プロファイルの検討

インスリンデテミルが犬において使用された報告がないため、正常犬を用いて作用プロファイルの検討を行い、従来使用されてきた他のインスリン製剤(NPH インスリン、インスリングルルギン)との比較を行った。3頭の正常ビーグル犬を用いた。

正常犬は一晩絶食の後に実験に供した。血液を持続的に採取するため留置針を片方の橈側皮静脈に設置し、Nikkisio STG-22 人工膵臓装置(日機装株式会社、東京、日本)と専用のチューブを用いて接続した。血中グルコース濃度はグルコースオキシダーゼ法によりリアルタイムに測定した。その後、グルコースと生理食塩水を注入するため留置針をもう片方の橈側皮静脈に設置し、専用のチューブを用いて人工膵臓装置と接続した。インスリン投与後に血中グルコース濃度が正常範囲内(68-90 mg/dl)になるよう人工膵臓装置を

設定した。

その後それぞれの犬に正常血糖クランプ状態で体重当たり 0.5 単位の NPH インスリン、インスリングルラルギンもしくはインスリンデテミルを単独皮下投与した。グルコース注入率の変化を測定し、それぞれのインスリンの作用時間プロファイルを検討した。

(2) インスリン依存性糖尿病犬におけるインスリンデテミルによる厳格な血糖コントロール

本研究では持続作用型インスリン製剤であるインスリンデテミルの単独投与による厳格な血糖コントロールを行った。食後インスリンを投与し、2時間おきに採血を行い、低血糖(60mg/dL 以下)ならびに高血糖(250 mg/dL 以上)の起こらない理想的なインスリン投与量を決定した。2週間一定の食餌とインスリンを投与し、安定した時点で2時間おきの採血を12時間まで行い、それぞれの糖尿病犬における厳格な血糖コントロールを試みた。

厳格な血糖コントロールが可能となった後に、5頭の糖尿病犬において、2週間の厳格な血糖コントロールが可能となるインスリン投与量の半量を投与し、意図的に血糖コントロールを悪化させた。この過程は以前に我々が報告した方法と同様の方法で行うため、倫理的にも糖尿病犬の状態も著しく障害するものではないと考えられた。その後インスリン投与量を戻し、厳格な血糖コントロールを1ヶ月間(長期間投与の検討)行った。2日毎に空腹時血液を採血し下記の血漿代謝産物を測定した。さらに1週間おきに食後12時間までの2時間毎の採血を行い、実際の血糖コントロール状態を評価した。血糖コントロールが悪化した状態および厳格な血糖コントロールを実施してから、1ヶ月後に肝臓、

骨格筋および脂肪組織からバイオプシーを行いインスリン感受性組織における、インスリンシグナリング遺伝子の発現を検討した。

① 血漿代謝産物、酵素活性およびサイトカインの定量

従来測定されている代謝性疾患のマーカーであるグルコース、遊離脂肪酸、トリグリセライドに加えコレステロール量およびその分画(HDL,LDL,VLDLコレステロール)、グルコース以外のヘキソースとしてマンノース、フルクトースおよびアディポサイトカインとしてレプチン、アディポネクチン濃度また血糖コントロールマーカーとして近年我々のグループで確立した糖化アルブミンを測定した。

② インスリンシグナリング遺伝子のmRNA発現量の解析

インスリンシグナリング遺伝子のmRNAの発現量をリアルタイムPCR法で測定した。候補遺伝子として我々が実験を行ってきた代謝状態を鋭敏に反映すると考えられるインスリンシグナリング遺伝子を測定した。

4. 研究成果

平成21年度の研究では、インスリンデテミルが犬において使用された報告がないため、正常犬を用いて作用プロファイルの検討を行い、従来使用されてきた他のインスリン製剤(NPH インスリン、インスリングルラルギン)との比較を行った。3頭の正常ビーグル犬を用いた。この方法にはヒトにおいてゴールドスタンダード法とされている人工膵臓装置を用いた方法で行った。それぞれの犬に正常血糖クランプ状態で体重当たり 0.5 単位の NPH インスリン、インスリングルラルギンもしくはインスリンデテミルを単独皮下投与した。グルコース注入率を検討したところ

同じ単位数の投与にもかかわらず、犬においてインスリンデテミルはNPHインスリンの約4倍、インスリングルルギンの約2倍の血糖降下作用があることが証明された。またNPHインスリンの作用ピークは投与後約4-6時間、インスリングルルギンは約6時間、インスリンデテミルは約6-8時間であることが証明された。さらにこのデータをもとに実際の糖尿病犬においてもそれぞれのインスリン製剤を皮下投与したところ、同様の血糖降下作用が、糖尿病犬においても証明された。またインスリンデテミルの単独投与で糖尿病犬における厳格な血糖コントロールが可能であった。これらの研究成果は、Res Vet Sciに投稿し、受理された。

平成22年度の研究では、インスリンデテミルを用いて、2週間の厳格な血糖コントロールが可能となるインスリン投与量の半量を糖尿病犬に投与し、意図的に血糖コントロールを悪化させた。その後インスリン投与量に戻し、厳格な血糖コントロールを1ヶ月間(長期間投与の検討)行った。血糖コントロールが悪化した状態および厳格な血糖コントロールを実施してから、1ヶ月後に肝臓、骨格筋および脂肪組織からバイオプシーを行いインスリン感受性組織における、インスリンシグナリング遺伝子の発現を検討した。その結果、厳格な血糖コントロール後の組織において、インスリンシグナリング遺伝子発現の上昇が認められ、インスリン感受性が良好していることが示唆された。本研究結果は学術論文へ投稿するため、現在論文を執筆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Sako T, Mori A, Lee P (他 10, 2 番目)

Time-action profiles of insulin detemir in normal and diabetic dogs. Research in Veterinary Science 90, 396-403 (2011)

(査読あり)

2. Sako T, Mori A, Lee P (他 11, 2 番目)
Age-specific plasma biochemistry reference ranges in <1 year old dogs in Japan. Veterinary Research Communications 35, 201-209 (2011) (査読あり)

3. Sako T, Mori A, Lee P, (他 11, 2 番目)
Supplementing transglucosidase with a high-fiber diet for prevention of postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic dogs. Veterinary Research Communications 34, 161-172 (2010) (査読あり)

[学会発表] (計2件)

森 昭博 糖尿病犬における糖化アルブミン(GA)測定の有用性 2010/9/17 第150回日本獣医学会 (帯広)

森 昭博 糖尿病犬においてインスリンデテミルはNPHインスリンやインスリングルルギンよりもより強い血糖降下作用をもつ 第148回日本獣医学会 2009/9/26 (鳥取)

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 昭博 (AKIHIRO MORI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教
研究者番号：60549559

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし