

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592340

研究課題名(和文) GLP-1の薬理活性を利用した新しい周術期血糖管理法の検討

研究課題名(英文) A study of the perioperative glyceic control method using pharmacological activity of GLP-1

研究代表者

河野 崇 (KAWANO, Takashi)

高知大学・教育研究部・医学系・講師

研究者番号：40380076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新しい糖尿病治療薬であるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 関連薬剤は、低血糖を生じることなく優れた血糖降下作用が期待できる。本研究課題では、麻酔薬とGLP-1の相互作用について検討し、以下の研究成果を得た。1) イソフルランの吸入は、GLP-1の基礎分泌量を減少させた。2) デクスメドミジンは、インスリン分泌を濃度依存性に抑制した。3) GLP-1はインスリンの分泌を増強したが、この効果にはイソフルランは影響を与えなかった。4) GLP-1はイソフルランによって生じた膵臓細胞の過分極作用を拮抗した。5) プロポフォールは培養L細胞からのGLP-1の放出を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is known to increase insulin secretion and play a crucial role in maintaining glucose homeostasis. In this study, we performed both in vivo and in vitro experiments to evaluate the interaction between GLP-1 and general anesthetics in rats. Our findings can be summarized as follows: 1) Inhalation of isoflurane led to a decrease in the basal levels of GLP-1. 2) Isoflurane attenuated the glucose-evoked increase in the levels of GLP-1 and insulin and increased the plasma glucose levels. 3) During oral glucose tolerance test, dexmedetomidine inhibited glucose-induced insulin secretion in dose-dependent manner. 3) In perfusion experiments, isoflurane inhibited glucose-induced insulin release, whereas exogenous GLP-1 enhanced it. 4) Whole-cell patches showed that GLP-1 could restore the glucose-stimulated depolarization suppressed by isoflurane. 5) Propofol has no effect on the GLP-1 release from intestinal L cells.

研究分野：周術期管理学

キーワード：グルカゴン様ペプチド-1 インスリン 全身麻酔薬 血糖管理 周術期

## 1. 研究開始当初の背景

入院時や ICU 入室時の高血糖は、死亡及び重症合併症の独立した因子とされている。また、周術期の高血糖は、炎症の増悪、ミトコンドリア機能の低下、虚血プレコンディショニング効果の消失等の悪影響を及ぼす。実際、適切な血糖管理は、合併症の発生率を低下させ、患者の予後を改善する可能性がある。しかし、インスリン強化療法による周術期厳格血糖管理は、一貫した効果は認められておらず、低血糖の発生頻度を増すため、現時点では推奨されていない。このことから、低血糖のリスクが低く、血糖値変動も少ない血糖管理法の確立が望まれている。

グルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) は、糖質を含む食事をした後に、小腸から血中に分泌される消化管ホルモンで、膵臓細胞の GLP-1 受容体に作用し、高血糖に対するインスリン分泌を増幅する。

周術期の高血糖は、外科侵襲に伴うインスリン拮抗ホルモンやサイトカイン等、種々の誘因が関与する。また、使用する麻酔薬・鎮静薬自体にもブドウ糖代謝に影響を与える可能性がある。我々は、イソフルランは膵臓細胞の  $K_{ATP}$  チャンネルを介してインスリン分泌を低下させる作用があり、そのためブドウ糖の体内利用に変化が生ずることを報告した。一方、臨床使用濃度のプロポフォールは、インスリン分泌に影響を与えないことも報告してきた。

そこで本研究課題では、各種麻酔・鎮静中の内因性 GLP-1 の生物活性変化および外因性 GLP-1 の薬理活性を明らかとし、GLP-1 活性を利用した新しい周術期血糖管理法を検討することを計画した。

## 2. 研究の目的

- (1) GLP-1 とイソフルランの相互作用について実験動物を用いて検討する。
- (2) GLP-1 とプロポフォールの相互作用について実験動物を用いて検討する。
- (3) インスリン分泌に及ぼすデクスメトミジンの影響を検討する。

## 3. 研究の方法

対象動物として雄性 SD 系ラットを用いた。本実験は高知大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### (1) *in vivo* GLP-1 濃度測定

雄性 SD ラット (8-10 週齢) を用いる。測定 1 週間前、ketamine/xylazine 麻酔下に門脈 (採血用) および胃内 (糖負荷用) にシリコンカテーテルを留置する。測定は、絶食時の基礎値およびブドウ糖負荷時の誘発値に対して、全身麻酔 (イソフルラン、プロポフォール) 群および Vehicle 投与 (コントロール) 群に振り分けた。GLP-1 濃度および DPP-4 活性は、ELISA 法 (LINCO Research 社)、インスリン濃度は、Sandwich ELISA 法 (Morinaga Institute 社)、血糖値は Glucose meter (Horib Ltd 社) を用いて測定した。

### (2) 膵島灌流試験

酵素法を用いて摘出したラットの膵臓から膵島を分離する。顕微鏡下に正常な膵島 10 個を 1 セットとして測定チャンバー内に挿入し、グルコースを 2.8 16.6 2.8 mM と変化させた時のインスリン分泌を Sandwich ELISA 法 (Morinaga Institute 社) で測定する。

### (3) 膵臓細胞の膜電位測定

酵素法で単離したマウス膵臓細胞をパッチクランプの whole-cell (current clamp) 法で膜電位を記録し、各薬剤の影響を検討した。

### (4) GLP-1 分泌試験

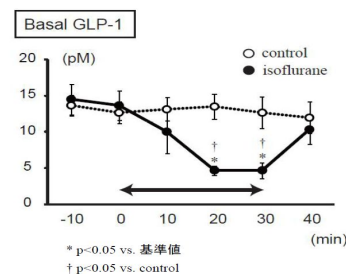
Human enteroendocrine NCI-H716 細胞を用いた。測定日、培養液を 1 mM  $CaCl_2$ , DPP-4 抑制剤を含んだリン酸緩衝液に交換した。グルコース (5.6, 11.1, or 16.7 mM) に対する GLP-1 分泌反応に対するプロポフォール (1.0-100  $\mu$ M) の影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) *in vivo* GLP-1 濃度測定

イソフルラン (1%) 吸入麻酔中の血液中 GLP-1 濃度の変化を記録した。イソフルラン麻酔中に有意な血圧、心拍数、動脈血酸素飽和度の変化はなかった。イソフルランの吸入 10 分後から基準値 (吸入開始直前; 81.6 pmol/L, n=5) および無麻酔ラット (n=3) と比較して有意な動脈血 GLP-1 濃度の低下 (30 分後; 24.3 pmol/L) が認められた (図 1)。

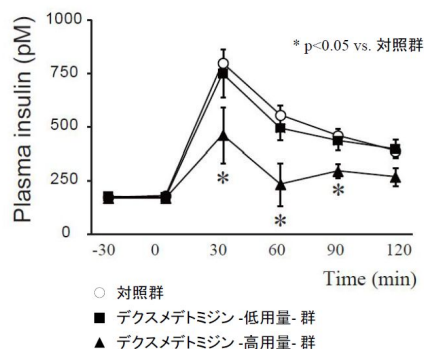
図 1. GLP-1 基礎分泌に及ぼすイソフルランの影響



また、インスリン分泌量は減少し、血糖値は軽度増加した。これらの結果は、イソフルランのインスリン分泌抑制、インスリン抵抗性増加に、GLP-1 の基礎分泌量抑制作用が関与している可能性が示唆された。

高用量のデクスメトミジン (1.5 µg/kg for bolus injection, and then at 10.8 µg/kg/h for continuous infusion) はインスリン分泌を抑制したが、低用量 (0.5 µg/kg for bolus injection, and then at 3.6 µg/kg/h for continuous infusion) では変化がなかった (図2)。

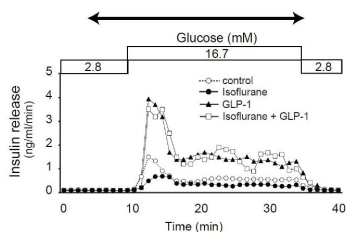
図2. インスリン分泌に及ぼすデクスメトミジンの影響



### (2) 膵島灌流試験

膵島灌流実験では、GLP-1 投与により一過性のインスリン分泌上昇(最大 1.2pmol/L)が認められたが、この作用はイソフルランにより阻害されなかった (n=5)。また、GLP-1 存在下では、イソフルランの高血糖 (16.7mM) 負荷に対するインスリン分泌抑制作用は生じなかった (n=5, 図3)。

図3. インスリン分泌に及ぼすイソフルランとGLP-1の相互作用



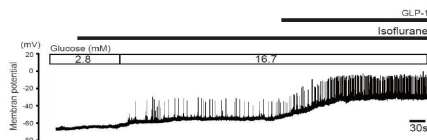
### (3) 膵臓 細胞の膜電位測定

イソフルランによる膵臓 細胞膜電位の過分極作用は GLP-1 によりほぼ完全に抑制された (n=7, 図4)。

### (4) GLP-1 分泌試験

プロポフォールは濃度依存性に GLP-1 分泌を抑制した。

図4. 膵臓β細胞膜電位に及ぼすイソフルランとGLP-1の相互作用



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Takahashi T, Kawano T, Eguchi S, Chi H, Iwata H, Yokoyama M. Effects of dexmedetomidine on insulin secretion from rat pancreatic cells. J Anesth. 2015. [Epub ahead of print] 査読有 DOI:10.1007/s00540-014-1943-2

T Kawano, K Tanaka, H Chi, S Eguchi, F Yamazaki, S Kitamura, N Kumagai, M Yokoyama. Biophysical and Pharmacological Properties of Glucagon-like peptide-1 in Rats under Isoflurane. Anesthesia. Anesth Analg. 2012;115:62-9. 査読有 DOI:10.1213/ANE.0b013e318253cbf0

〔学会発表〕(計 2件)

D Yamanaka, T Kawano, H Chi, K Yamamoto, Y Inoue, T Eri, M Fukuta, R Ihara, M Yokoyama, S Eguchi. Effects of Propofol on Secretion and Insulinotropic Efficiency of Glucagon-Like Peptide-1: An In Vitro Study. American Society of Anesthesiologists 2013 Annual meeting San Francisco (USA) 10.15. 2013

D Yamanaka, T Kawano, S Eguchi, H Chi, H Iwata, F Yamazaki, M Yokoyama. Effects of Dexmedetomidine on Insulin Secretion from Rat Pancreatic Cells. Anesthesiology 2012 2012.10.13-17 Washington (USA)

〔図書〕(計 2件)

Kawano T. Peripheral Neuropathy: Chapter 5: A Current Overview of Diabetic Neuropathy - Mechanisms, Symptoms, Diagnosis, and Treatment. pp. 89-105. (ISBN 978-953-51-1451-2) Edited by Paulo Armada-Da-Silva, In Tech, 2014

Kawano Takashi: Patch Clamp Technique (Edited by Fatima Shad Kaneez), Chapter 4; Single-channel properties, pp 73-90, In Tech, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jimu.kochi-u.ac.jp/~soran/sansyo.asp?ID=2094>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

河野 崇 (KAWANO, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：40380076

### (2)研究分担者

横山 正尚 (YOKOYAMA, Masataka)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：20158380