

論文内容の要旨

2型糖尿病のリスクファクターとしての歯周病原細菌 DPP4
(岩手医科大学歯学雑誌 第 43 巻 第 1 号 平成 30 年 4 月掲載予定)

なかさと まなみ
中里 茉那美

I. 研究目的

歯周炎は2型糖尿病のリスクファクターとなることが示唆されているものの、その分子機構についてはいまだ明らかにはされていない。インクレチン [GLP-1 (glucagon-like peptide-1) および GIP (gastric inhibitory polypeptide/glucose dependent insulinotropic polypeptide)] は食物摂取後のインスリン分泌を促進する生理活性ペプチドであるが、その後速やかにジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP4) により N 末端から 2 番目のアラニンと 3 番目のグルタミン酸の間が切断され、不活性型となる。最近の研究で、ヒトの慢性歯周炎の主要原因細菌である *Porphyromonas gingivalis* が DPP4 を保有していることが明らかにされた。歯周病原細菌の DPP4 はヒトの DPP4 と相同性を持つことから、歯周病原細菌の感染により、ヒト DPP4 同様にインクレチン切断作用を介して 2 型糖尿病の病態形成/進行につながる可能性が推察される。

そこで本研究では、歯周病原細菌の DPP4 の発現とその GLP-1 切断能について検討した。

II. 研究方法

歯周病原細菌である *P. gingivalis* ATCC 33277 株, *Tannerella. forsythia* ATCC 43037 株, *Treponema denticola* ATCC 33520 株, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 株, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384 株, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株 の菌体結合型 DPP4 の存在を抗 PgDPP4 抗体を用いた Western blotting 法により検出した。*T. forsythia* DPP4 (TfDPP4) 組み換え体の発現は *Escherichia coli* XL-1 Blue を形質転換し TALON アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。細菌懸濁液およびリコンビナント体の DPP4 活性を蛍光ペプチド基質 Gly-Pro-4-methylcoumaryl-7-amide (Gly-Pro-MCA) を用いて測定し 37°C, 30 分間反応後 DPP4 活性を測定した。同様に、DPP4 活性阻害剤である P32/98 による阻害作用も検討を加えた。さらに細菌懸濁液による活性型 GLP-1 切断効率を ELISA 法を用いて rPgDPP4 と比較検討した。同様に、DPP4 活性阻害実験においても GLP-1 切断効率の阻害作用も検討した。

III. 研究成績

今回調べた 6 菌種の歯周病原細菌のうち、*P. gingivalis*, *T. forsythia* および *Prevo. intermedia* が菌体結合型 DPP4 を発現しており、その活性は *P. gingivalis* で最も高く、次いで *T. forsythia* であった。それらは GLP-1 切断能を示すこと、またその作用は DPP4 阻害剤 P32/98 の添加により抑制されることが明らかとなった。P32/98 添加による歯周病原細菌 DPP4 活性への影響は、いずれにおいても P32/98 の濃度依存的に活性が阻害されることが明らかとなった。

さらに、リコンビナント体を用いた *T. forsythia* DPP4 (TfDPP4) の検討から、TfDPP4 は *P. gingivalis* DPP4 (PgDPP4) と相同性が高く、分子量、等電点、至適 pH、塩濃度依存性といった分子プロフィールが類似することが明らかとなった。

IV. 考察及び結論

以上の結果から、*P. gingivalis* を含む複数の歯周病原細菌が菌体結合型に DPP4 を発現しており、その DPP4 は、ヒトの DPP4 同様、インクレチンの切断・不活化に機能し得ることが明らかとなった。このことから歯周病原細菌の感染が持続した場合、歯周病原細菌の組織侵入および血液を介した全身循環への侵入を介して歯周病原細菌がその DPP4 により糖尿病の病態形成に関与する可能性が強く推察される。よって、歯周病原細菌感染である歯周炎は2型糖尿病の重要なリスクファクターとなることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 岸 光男 (口腔医学講座 予防歯科学分野)
副査 教授 八重柏 隆 (歯科保存学講座 歯周療法学分野)
副査 教授 佐々木 実 (微生物学講座 分子微生物学分野)

歯周炎は2型糖尿病のリスクファクターとなることが示唆されているものの、その分子機構についてはいまだ明らかにはされていない。インクレチン [GLP-1 (glucagon-like peptide-1) および GIP (gastric inhibitory polypeptide/glucose dependent insulinotropic polypeptide)] は食物摂取後のインスリン分泌を促進する生理活性ペプチドであるが、その後速やかにジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP4) により N 末端から2番目のアラニンと3番目のグルタミン酸の間が切断され、不活性型となることから、近年 DPP4 阻害剤が糖尿病の治療薬として用いられている。ヒトの慢性歯周炎の主な原因細菌である *Porphyromonas gingivalis* は DPP4 を保有していることから、歯周病原細菌 DPP4 がヒト DPP4 同様にインクレチンを切断し、2型糖尿病の病態形成/進行につながることを推察される。そこで本研究では、*P. gingivalis* をはじめとする歯周病原細菌の DPP4 の発現とその GLP-1 切断能について検討した。

歯周病原細菌のうち、*P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* および *Prevotella intermedia* は菌体結合型に DPP4 を発現していたが、*Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* および *Fusobacterium nucleatum* では有意な発現は認められなかった。また、それらの DPP4 活性は *P. gingivalis* で最も高く、次いで *T. forsythia* および *Prev. intermedia* であり、いずれも DPP4 阻害剤で有意に活性が抑制された。次に *T. forsythia* DPP4 (TfDPP4) の酵素学的特性について組換え体を用いて *P. gingivalis* DPP4 (PgDPP4) と比較検討したところ、両者は高い相同性を有し、分子量、等電点、至適 pH、塩濃度依存性といった分子プロフィールが類似していた。活性型 GLP-1 切断能について ELISA 法を用いて検討した結果、*P. gingivalis*, *T. forsythia* および *Prev. intermedia* は GLP-1 を切断し、その作用は DPP4 阻害剤添加により抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、複数の歯周病原細菌が DPP4 活性を示し、ヒト DPP4 同様に活性型 GLP-1 を切断すること、またそれは DPP4 阻害剤により抑制されることが本論文で新規に明らかとなった。これらのことから歯周局所において歯周病原細菌が持続感染し、組織侵入および血液を介して全身循環へ侵入した場合、それら歯周病原細菌の DPP4 がヒトインクレチンを切断、不活化することで糖尿病の病態形成に関与するリスクファクターとして作用する可能性が強く示唆された。

試験・試問結果の要旨

本論文の概要について研究経過とともに説明がなされた。研究背景、方法、結果の解釈ならびに本論文で新たに示された内容の臨床的意義、今後必要とされる研究の具体的方向性について試問した結果、

いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また歯周病と2型糖尿病との関係を踏まえ、今後の研究の展望も積極的に述べており、研究に対する十分な意欲が感じられたことから、学位に値する学識と研究能力を有するものと判定した。

参考論文

1. Degradation of Incretins and Modulation of Blood Glucose Levels by Periodontopathic Bacterial Dipeptidyl Peptidase 4. (Ohara-Nemoto Yuko 他9名と共著) Infection and Immunity 平成29年9月 第85巻, 第9号 1頁~14頁