

原 著

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

中里 茉那美¹⁾, 下山 佑²⁾, 根本 優子³⁾, 佐々木 大輔¹⁾,
根本 孝幸³⁾, 佐々木 実²⁾, 八重柏 隆¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学歯学部歯科保存学講座歯周療法学分野

(主任：八重柏 隆 教授)

²⁾ 岩手医科大学微生物学講座分子微生物学分野

(主任：佐々木 実 教授)

³⁾ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔分子生化学分野

(主任：根本 孝幸 教授)

(受付：2017年12月11日)

(受理：2018年1月5日)

和 文 抄 録

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 insulintropic 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。最近の研究から、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ている。原核細胞である細菌の DPP4 は真核細胞であるヒトの DPP4 と相同性を持つことから、歯周病原細菌の感染は、その保有する DPP4 の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。

Periodontopathic bacterial DPP4 as a risk factor for type 2 diabetes mellitus
Manami NAKASATO¹⁾, Yu SHIMOYAMA²⁾, Yuko OHARA-NEMOTO³⁾, Daisuke SASAKI¹⁾,
Takayuki K. NEMOTO³⁾, Minoru SASAKI²⁾, Takashi YAEGASHI¹⁾

¹⁾ Division of Periodontology, Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Takashi YAEGASHI)

²⁾ Division of Molecular Microbiology, Department of Microbiology, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Minoru SASAKI)

³⁾ Department of Oral Molecular Biology, Course of Medical and Dental Science, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Science

(Chief: Prof. Takayuki K. NEMOTO)

¹⁾ 1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan.

²⁾ 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, Japan.

³⁾ 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8588, Japan.

¹⁾ 岩手県盛岡市中央通 1-3-27 (〒 020-8505)

²⁾ 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1 (〒 028-3694)

³⁾ 長崎県長崎市坂本 1-7-1 (〒 852-8588)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 43 : 48-60, 2018

そこで本研究では、歯周病原細菌の菌体結合型 DPP4 の発現とその GLP-1 切断能について検討した。その結果、今回調べた 6 菌種の歯周病原細菌のうち、*P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* および *Prevotella intermedia* が菌体結合型 DPP4 を発現しており、それらは GLP-1 切断・不活性化能を示すことが明らかとなった。また、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ァイルが類似することが明らかとなった。

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の 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。それゆえ、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。

緒 言

歯周炎は歯周病原細菌に起因する炎症性疾患であるが、歯周病原細菌の一方的な侵襲により発症するのではなく、宿主の防御機構との相互作用により発症・進行する¹⁵⁾。このことは宿主の防御能が低下するような全身疾患がある場合、歯周炎が発症あるいは悪化しやすい状態にあるということで、全身疾患が歯周炎の発症／進行に深く関わっているということを意味する。実際、白血病、糖尿病、AIDS や好中球機能不全疾患のような全身疾患では重度歯周炎を併発する場合が多いことが報告^{6,9)}されており、このような歯周炎は「全身疾患関連歯周炎」と名付けられている¹⁰⁾。

糖尿病と歯周炎との関連については、「糖尿病の第 6 の合併症」として歯周炎があげられるほど密接に関連することが示されている¹¹⁾。2273 人の 2 型糖尿病患者を調査した Nelson らの報告⁷⁾でも、非糖尿病患者に比べ歯周炎発症率が 2.6 倍高かったと報告されている。しかし Grossi ら¹²⁾は、歯周炎かつ 2 型糖尿病の患者を対象に、糖尿病治療は行わず歯周治療のみを行ったところ、その血糖値 (HbA1c 値) が改善したと報告した。このことは、糖尿病の合併症として歯周炎が発症／進行するというよりは、少なくとも 2 型糖尿病に関しては歯周炎が全身疾患である糖尿病のリスクファクターとなる可能性を示唆する。

2 型糖尿病の病態形成機序の 1 つとしてインクレチン [GLP-1 (glucagon-like peptide-1) およ

び GIP (gastric inhibitory polypeptide/glucose dependent insulinotropic polypeptide)] の不活性化が報告されている^{13, 14)}。インクレチンは、食物が消化管に到達するとブドウ糖や脂質等の刺激により十二指腸細胞あるいは小腸下部から分泌される生理活性ペプチドで、膵β細胞からのインスリン分泌を促進し、血糖値を低下させる¹⁵⁾。その後ジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP4: dipeptidyl peptidase 4) が分泌される。DPP4 は N 末端から 2 番目のアミノ酸がプロリンとアラニンの場合に作用するジペプチジルペプチダーゼである。そのため DPP4 により血中インクレチンの 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・不活性化されることにより生体のホメオスタシスが維持されると考えられている¹⁶⁾。このため、インスリン分泌を間接的に促進し、低血糖副作用を呈しない糖尿病治療薬として DPP4 阻害剤が用いられている¹⁷⁾。

一方、ヒト慢性歯周炎の主要な原因細菌である *Porphyromonas gingivalis* は複数の新規のエキソペプチダーゼを産生することが明らかされた^{18,21)}。これらは糖発酵を行わない *P. gingivalis* にとっては栄養源の獲得に関わる因子であるが、その病原性については未だ明らかではない。このうち *P. gingivalis* の DPP4 (PgDPP4) は真核生物の DPP4 との相同性は 32% と高くはないものの、ヒトの DPP4 (hDPP4) と同じく高い Gly-Pro-MCA 分解活性を示す^{22,24)} ことから、生体 DPP4 と同様にインクレチンを切断・不活化し、糖尿病の病態形成に関与することが推察

される。我々はデータベース (KEGG Orthology Database, Human Oral Database²⁵⁾) から歯周病原細菌における DPP4 遺伝子の分布について解析し, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* は *P. gingivalis* DPP4 オルソログを有し, これら 3 菌種の DPP4 がインクレチンを切断することを質量分析で明らかにした²⁶⁾。そこで本研究では, 歯周病原細菌感染による 2 型糖尿病の病態形成機序の分子基盤を明らかにする目的で, 3 菌種に加えて, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* の 6 菌種の歯周病原細菌を対象に, 菌体結合型 DPP4 の存在と DPP4 活性について, また, これらの活性に対するヒト DPP4 阻害剤の効果を比較検討した。さらに, 活性型インクレチンの切断・不活化能を測定し, 機能的な DPP4 の発現および特異性について検討した。

材料と方法

1. 歯周病原細菌の培養と調製

歯周病原細菌は実験室株を用い, 既報²⁶⁻²⁹⁾に従い培養し, 細菌懸濁液を調製した。すなわち, *P. gingivalis* ATCC 33277 株, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 株および *F. nucleatum* ATCC 25586 株を, 5 µg/ml hemin (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), 0.5 µg/ml menadione (SIGMA-ALDRICH) 含有の Anaerobic bacteria culture media (コンプリートメディウム) (栄研化学, 東京) を用いて 37°C, 嫌気条件下 (80%N₂, 10%CO₂, 10%H₂) で early stationary phase まで培養した。 *T. forsythia* ATCC 43037 株および *Prev. intermedia* ATCC 25611 株の培養にはコンプリートメディウムに 10 µg/ml N-acetylmuramic acid (SIGMA-ALDRICH) および 0.1%L-cysteine (SIGMA-ALDRICH) を添加した培地を用い, *Trep. denticola* ATCC 33520 株の培養は上記培地にさらに 5%ウサギ血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添

加した培地を用いて 37°C, 嫌気条件下 (80%N₂, 10%CO₂, 10%H₂) で early stationary phase まで培養した。培養終了後, 遠心分離 (2,400 g, 10 分間, 4°C) により菌を回収し, リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) にて洗浄, 再懸濁した。細菌懸濁液は OD₆₀₀ = 0.2 または 1.0 に調整した。

2. Western blotting 法を用いた DPP4 の検出

6 菌種の歯周病原細菌の菌体結合型 DPP4 の存在を抗 DPP4 抗体を用いた Western blotting 法により検出した²⁷⁾。すなわち, 各菌体をサンプルバッファー (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 5%SDS, 50%Glycerol, 0.2 M DTT, 0.05%BPB) に懸濁後, 100°C, 3 分間加熱し SDS 化した後, 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。PVDF 膜に転写後にウサギポリクローナル抗 PgDPP4 抗体を用いた酵素標識により検出した。

3. リコンビナント TfDPP4 (rTfDPP4) の発現と精製

T. forsythia DPP4 (TfDPP4) 組み換え体の発現は既報¹⁸⁾に準じた。すなわち, *T. forsythia* ATCC 43037 株の S9A/B/C family に分類されている遺伝子配列 (BFO_1659, KEGG) のうち, コード配列である Val¹⁸-Leu⁷²² を対象として設計したプライマー (5'-GTTGTAAGCGCTCAG CAGCGGGTGGGA-3' および 5'-GAGATTTTCC AGTACAAAATTCGTCA-3') を用いて KOD-Plus-Neo (東洋紡, 大阪) により増幅した。PCR フラグメントは pTricHis2-TOPO (Invitrogen) に TA クローニングし, *Escherichia coli* XL1-Blue を形質転換した。大腸菌を 37°C, 75 µg/ml アンピシリン添加 Lurai-Bertani (LB) 培地で培養し, 組換えタンパク質は 0.2 mM isopropyl-thiogalactopyranoside (IPTG) (SIGMA-ALDRICH) を添加後, 30°C, 4 時間培養して発現誘導を行った。既報²⁰⁾に従い, 大腸菌を集菌し, 溶菌後, 大腸菌ライセートよりリコンビナント体 (rTfDPP4 Val¹⁸-Leu⁷²²,

rPgDPP4 Asp²³-Leu⁷²³) を TALON アフィニティークロマトグラフィー (タカラバイオ, 滋賀) を用いて精製した。

4. DPP4 活性の測定

細菌懸濁液およびリコンビナント体の DPP4 活性を既報¹⁸⁾ に準じて, 蛍光ペプチド基質 Gly-Pro-4-methylcoumaryl-7-amide (Gly-Pro-MCA) (ペプチド研, 大阪) を用いて測定した。反応液 (200 μl) にリコンビナント DPP4 (1 ng) あるいは細菌懸濁液 (5 μl), 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (NaPi, pH 7.5), 5 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) および 20 μM GP-MCA を混合した。37°C, 30 分間反応後, 励起波長 380 nm, 発光波長 460 nm の条件で分光蛍光光度計 F-2500 (HITACHI, 東京) を用いて測定した。また, DPP4 活性阻害剤である P32/98 (イソロイシンチアゾリジドヘミフマル酸: C₉H₁₈N₂O₅ 1/2C₄H₄O₄, フナコシ, 東京) による阻害作用については Pederson らの方法³⁰⁾ に準じて検討を加えた。

5. 菌体結合型 DPP4 のインクレチン (GLP-1) 切断能

GLP-1 の Active form Assay Kit (免疫生物研究所, 群馬) を用いた ELISA 法³¹⁾ により, *P. gingivalis*, *T. forsythia* および *Prev. intermedia* の細菌懸濁液による活性型 GLP-1 切断効率を rPgDPP4 のそれと比較検討した。すなわち, 細菌懸濁液 (OD₆₀₀ = 1.0, 5 μl) に, 50 mM NaPi (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 μM TLCK (Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride, Abcam, Cambridge, UK) および 0.3 μM E-64 (N- [N- (L-3-Trans-carboxirane-2-carbonyl) -L-leucyl] -agmatine, Roche Diagnostics K.K., Basel, Schweiz) を混合して 10 分間, 0°C で反応させた。その後, 20 pM 活性型 GLP-1 を添加後 37°C, 30 分間反応させ, その切断効率を波長 450 nm の吸光度から測定した。DPP4 活性阻害実験においては, 上記の混合液に 0.2 mM P32/98 を添加し, 反応終了後, Protease

Inhibitor Cocktail (SIGMA-ALDRICH) を添加した系で, 同様に活性型 GLP-1 切断効率を測定した。

6. 統計解析

本研究における統計解析はすべてスチューデントの *t* 検定を用いて行い, すべての結果において有意水準は 0.05 未満とした。

結 果

1. 歯周病原細菌の菌体結合型 DPP4

歯周病原細菌の DPP4 活性は細菌懸濁液の蛍光ペプチド基質 Gly-Pro-MCA 加水分解能から検討した (図 1)。その結果, 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 *Prev. intermedia* の細菌懸濁液で DPP4 活性が確認された。その活性は *P. gingivalis* で最も高く, 次いで *T. forsythia* であった (それぞれ 900 および 759 pmol/min/ml)。しかしレッドコンプレックスを構成する残りの 1 菌種である *Trep. denticola* の DPP4 の活性 (Gly-Pro-MCA 分解活性) は極めて低かった。さらに, *A. actinomycetemcomitans* および *F. nucleatum* では有意の活性は認められなかった。また, いずれの菌種においても培養上清には Gly-Pro-MCA 分解活性を認めなかった。

菌体結合型 DPP4 の存在については, 抗

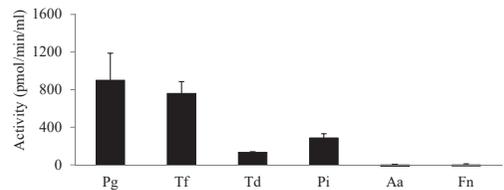


図 1 : 歯周病原細菌の菌体結合型 DPP4 活性
歯周病原細菌の菌体結合型 DPP4 の活性は細菌懸濁液の蛍光ペプチド基質 Gly-Pro-MCA 加水分解能から検討した (n ≥ 3, 平均値 ± 標準誤差)。Pg: *P. gingivalis*, Tf: *T. forsythia*, Td: *Trep. denticola*, Pi: *Prev. intermedia*, Aa: *A. actinomycetemcomitans*, Fn: *F. nucleatum*。

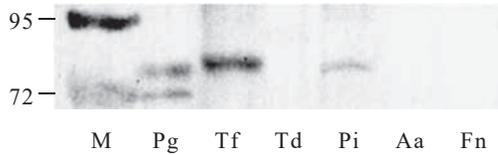


図2 : 歯周病原細菌の菌体結合型 DPP4 の検出
 歯周病原細菌 DPP4 の存在は, 抗 PgDPP4 抗体を用いた Western blotting 法で検討した。Pg : *P. gingivalis*, Tf : *T. forsythia*, Td : *Trep. denticola*, Pi : *Prev. intermedia*, Aa : *A. actinomycetemcomitans*, Fn : *F. nucleatum*, M : molecular weight marker.

PgDPP4 抗体を用いた Western blotting 法から検討した (図2)。その結果, *P. gingivalis*, *T. forsythia* および *Prev. intermedia* で 80 kDa 付近に抗体と反応するバンドが認められた。*P. gingivalis* では部分分解を受けたと考えられる 71 kDa の分子も観察された。一方, これら3菌種以外では, 活性の程度に一致して抗 PgDPP4 抗体で検出される分子は確認されなかった。

PgDPP4	1'	MKRPVILLGLIVTMCAMAQTGDKPVDLKEITSGMFYARSAGRGIRSMPPDGEHYTEMNR
TfDPP4	1"	MGKETGIALLLLLLT--AGVVSÄQQRVELRGVTDGKYRQSTTDGGLRMTDGVHYTAMNR
PgDPP4	60'	ERTAIVRNYASGKAVDTLFSIERARECPFKQIQNYEVSSTGHILLFTDMESIYRHSYR
TfDPP4	59"	ERTMIVKYDYRTGKVPDTLFTYTKTARECTFDQYQGYEVSPTGHRILILWRETEPIYRRSFK
PgDPP4	120'	AAVYDYVRRNLVKPLSEHVGVKVIPTFSPDGRMVAFVRDNNIPIKFKDFDTEVQVTTDG
TfDPP4	119"	AQTfÄYDVRNMVVKPLNDSGÄKVIPTFSPDGRMCAVVDNNIWRKFDYDTEVQVTKDG
PgDPP4	180'	QINSVLNGATDWVYEEEFVGNLMSWSADNAFLAFVRSDES AVPEYRMPMYEDKLYPEDY
TfDPP4	179"	ÄPNRIINGATDWVYEEEFVTNLMSWSÄSÄYLAÄIRSDESÄEVQYAMHÄYGDGYYPGEY
PgDPP4	240'	TYKPKAGEKNSTVSLHLYNVADRNTKSVSLPIDADGYIPRIAFDTNÄDELAVMTLNRLO
TfDPP4	239"	IYKPNAGEKNRSVTLHSYSIÄTKDIKTIPVVDADGYIPRIAFÄÄPÄQLAVMTLNRHO
PgDPP4	300'	NDFKMYVHPKSLVPKLILQDMNKRYVDSDWIQALKFTAGGGFAYVSEKDGFAHIYLYDN
TfDPP4	299"	NIFSMYÄÄPKSGVCKQLKÄESÄTYIDSÄWÄLÄMÄFT--NÄGFLYVSEKDGÄHYÄYQYÄÄ
PgDPP4	360'	KGMHRRITSGNWDVTKLYGVD-ASGTVFYQSAEESPIRRAVYÄÄDAKGRKTKLSLNVGT
TfDPP4	358"	TGVEÄRÄQVÄTKGNWDVTRLIGÄDEÄTNTVYÄESÄEÄSÄPLRAVYÄÄVDÄKGVKÄTRLÄNÄQÄGT
PgDPP4	419'	NÄLÄFSGNYÄÄYÄNTYSSÄÄTPTVÄSVFRSKGÄKÄLÄRTLEÄDNÄLÄRÄLÄKÄYÄRÄNÄPKÄFT
TfDPP4	418"	NSÄSÄFÄNÄFÄYÄVÄNÄRYÄSSÄÄRTPTVÄITÄVNETÄKTÄGÄKÄLÄRTLEÄDNÄSLÄKÄTÄLÄQÄTÄYÄSÄPKÄFÄI
PgDPP4	479'	IÄKTÄQÄSÄLÄNÄWÄIVÄKÄPIDÄFÄPSÄRHÄYÄPÄVÄLÄMVÄQÄYÄSGÄPNÄSQÄVÄLÄDRYÄSÄFDÄWEÄHYÄLÄSKÄGYÄVÄ
TfDPP4	478"	TÄVÄQTÄSÄGYÄLÄNÄWÄIVÄKÄPÄGÄFÄDÄPSÄKÄYÄPÄVMÄFÄQÄYÄSGÄPNÄSQÄVÄLÄDRYÄDÄFÄWEÄQÄYÄLÄÄNGÄVÄIC
PgDPP4	539'	ÄCVÄDÄGRÄGTÄGÄRÄGÄEÄWRÄKÄCTÄYÄMÄQLÄGVÄFÄESÄDÄQÄIÄÄÄÄTÄIÄGÄQLÄPYÄDÄÄRÄIGÄIÄGWÄSÄYÄGGÄYT
TfDPP4	538"	VÄCVÄDÄGRÄGTÄGÄRÄGÄTÄFRÄKÄCTÄYÄLÄKLÄGÄLÄESÄRDÄQÄIÄÄÄÄRÄLÄÄKÄLPÄYÄDÄGÄSRÄMÄIÄGWÄSÄFÄGGÄYN
PgDPP4	599'	TÄLÄMÄLÄSÄTÄGÄNGÄTÄFKÄGÄIÄVÄPÄVÄDÄWRÄFYÄDSÄVYÄTERÄFMÄRÄTPÄKÄNÄSÄGYÄKMÄSSÄLÄDVÄSÄQLÄQG
TfDPP4	598"	TÄLÄMÄLÄSÄTÄGÄNGÄTÄFKÄGÄIÄVÄPÄPÄDÄWRÄYÄDÄTÄVYÄTERÄFMÄRÄTPÄKÄNÄÄNGÄYÄNÄTÄSÄPÄLÄLÄÄKÄDLÄQG
PgDPP4	659'	NÄLLÄIVÄSGÄSÄÄDÄNVÄHLÄQÄNTÄLÄFÄTEÄLÄVÄQÄNIÄPÄFÄMÄIÄYÄMÄKNÄHSÄYÄGGÄNÄTRYÄHLYÄTRÄKÄKÄF
TfDPP4	658"	KÄLLÄIHÄGTÄÄDÄNVÄHÄFÄKÄQÄTÄMÄYÄÄÄLÄVÄQÄGÄKÄQÄFÄMÄHIÄYÄRÄDRÄDHÄGYÄGGÄNÄTRYÄHLYÄTKÄMTÄNE
PgDPP4	719'	LÄFDÄNL
TfDPP4	718"	VÄLÄÄNL

図3 : PgDPP4 と TfDPP4 の相同性
P. gingivalis DPP4 と *T. forsythia* DPP4 のアミノ酸配列アライメントを示す。
 PgDPP4 : *P. gingivalis* DPP4, TfDPP4 : *T. forsythia* DPP4. * : 完全に保存されたアミノ酸残基, . : 保存性低い列を示す。

2. *T. forsythia* DPP4 (TfDPP4)

BFO_1659 をもとに精製した TfDPP4 のアミノ酸配列を図3に、TfDPP4 の分子プロフィールを表1に示した。表1には精製した rTfDPP4 および rPgDPP4 の分子プロフィールも示した。結果は、TfDPP4 のアミノ酸配列は *P. gingivalis* DPP4 (PgDPP4) と相同性が高く

(61.1%)、アミノ酸残基数、分子量および等電点もほぼ一致することが明らかとなった(表1)。

リコンビナント体を用いた解析から、精製した rTfDPP4 (分子量 83,847 Da) の DPP4 活性は rPgDPP4 (分子量 83,402 Da) に匹敵する高い活性を示すことが明らかとなった(図4D)。

次に菌体結合型 TfDPP4 の至適 pH を測定

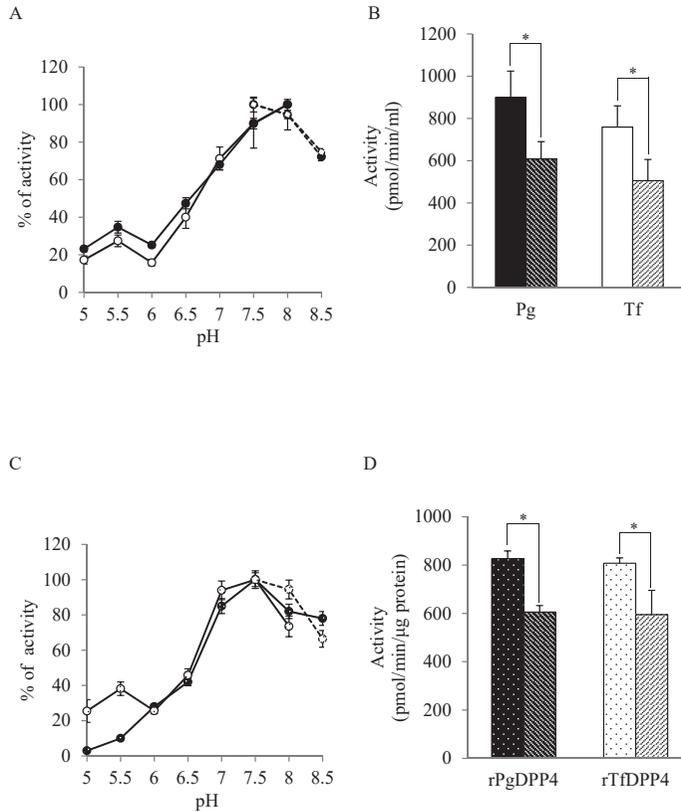


図4：菌体結合型 DPP4 の pH 依存性および DPP4 活性に対する 0.9%NaCl 添加の効果
 A：菌体結合型 DPP4 活性の pH 依存性。リン酸緩衝液 (pH 5.0-8.0, —), Tris-HCl (pH 7.5-8.5, ---). (●) *P. gingivalis*, (○) *T. forsythia* (n ≥ 3, 平均値 ± 標準誤差).
 B：菌体結合型 DPP4 活性に対する 0.9%NaCl 添加の効果。
 0.9%NaCl 添加による DPP4 活性 (■) *P.gingivalis*, (□) *T. forsythia*, (▨) *P.gingivalis* with 0.9%NaCl, (▩) *T. forsythia* with 0.9%NaCl.
 (*) は有意な差 (p < 0.05) を示す (n ≥ 3, 平均値 ± 標準誤差).
 C：rDPP4 活性の pH 依存性。
 リン酸緩衝液 (pH 5.0-8.0, —), Tris-HCl (pH 7.5-8.5, ---). (⊙) rPgDPP4, (⊚) rTfDPP4 (n ≥ 3, 平均値 ± 標準誤差).
 D：rDPP4 活性に対する 0.9%NaCl 添加の影響。
 0.9%NaCl 添加による rDPP4 活性. (■) rPgDPP4, (□) rTfDPP4, (▨) rPgDPP4 with 0.9%NaCl, (▩) rTfDPP4 with 0.9%NaCl.
 (*) は有意な差 (p < 0.05) を示す (n ≥ 3, 平均値 ± 標準誤差).

表 1 TfDPP4 の分子プロフィール

Bacterium	<i>P. gingivalis</i>	<i>T. forsythia</i>
Gene ID	PGN_1469	BFO_1659
MEROPS ID	MER004211	MER285232
Homology (%)	100	61.1
Length (aa)	723	722
pI	7.02	6.48
MW (kDa)	78.0, 71.1	80.3
Catalytic triad	Ser ⁵⁹³ , Asp ⁶⁶⁸ , His ⁷⁰⁰	Ser ⁵⁹² , Asp ⁶⁶⁷ , His ⁶⁹⁹

Recombinant protein	PgDPP4	TfDPP4
Length (aa)	736	738
pI	7.43	6.09
MW (kDa)	83.4	83.8

し, また, 生理的塩濃度条件下, 0.9%NaCl 添加, での DPP4 活性を PgDPP4 と比較検討した (図 4). その結果, 菌体結合型 TfDPP4 の至適 pH は 7.5 付近で PgDPP4 のそれとほぼ一致した (図 4A). これはリコンビナント体を用いた解析からも裏付けられた (図 4C). rPgDPP4 を用いた我々のこれまでの研究²⁰⁾ で 0.9%NaCl 添加で DPP4 活性の有意の低下が観察されていることから, 菌体結合型 TfDPP4, rTfDPP4 および菌体結合型 PgDPP4 の DPP4 活性に対する

0.9%NaCl 添加の影響を検討した (図 4B および図 4D). その結果, 0.9%NaCl 存在下では菌体結合型 TfDPP4, rTfDPP4 のいずれの DPP4 活性も有意に低下することが明らかとなった (TfDPP4: 759 → 505 pmol/min/ml, rTfDPP4: 807 → 594 pmol/min/μg protein) (いずれも $p < 0.05$). また, 菌体結合型 PgDPP4 についても, 0.9%NaCl 存在下で DPP4 活性の有意の低下が観察された (899 → 608 pmol/min/ml) (図 4B).

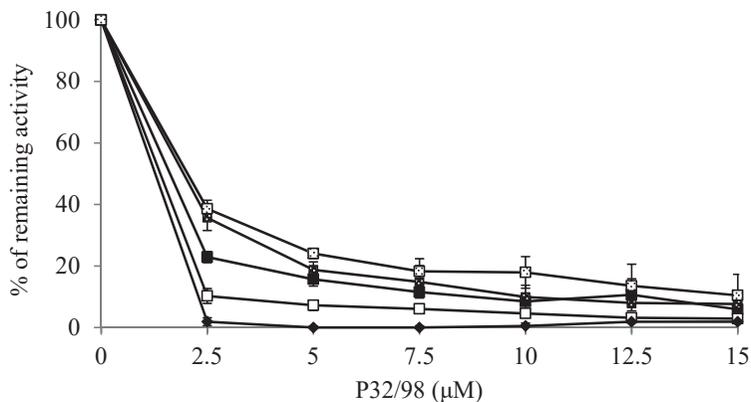


図 5 : ヒト DPP4 阻害剤による歯周病原細菌 DPP4 の活性阻害
ヒト DPP4 阻害剤, P32/98, による歯周病原細菌 DPP4 活性の阻害効果を図に示す ($n \geq 3$, 平均値 \pm 標準誤差). (■) *P. gingivalis*, (□) *T. forsythia*, (◆) *Prev. intermedia*, (●) rPgDPP4, (○) rTfDPP4.

3. ヒトDPP4阻害剤による歯周病原細菌DPP4の阻害

ヒトDPP4阻害剤であるP32/98添加による歯周病原細菌DPP4活性への影響を検討した(図5)。その結果、3菌種のDPP4活性は濃度依存的にP32/98によって阻害され、細菌DPP4がヒトDPP4と類似した機構でGly-Pro-MCAの加水分解を行うことが示された。阻害の程度は、図1に示したDPP4活性の程度に従い、*Prev. intermedia*で最も顕著な阻害が観察され、ついで*T. forsythia*、*P. gingivalis*の順であった。また、rTfDPP4、rPgDPP4においても同様に、添加した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。

4. 菌体結合型DPP4のインクレチン(GLP-1)切断能

菌体結合型DPP4のインクレチン分解能を明らかにする目的で、*P. gingivalis*、*T. forsythia*および*Prev. intermedia*の細菌懸濁液による活性型GLP-1切断効率をGLP-1 active form [GLP-1 (7-37)]を検出するELISA法で検討した(図6)。その結果、*P. gingivalis*、*T. forsythia*

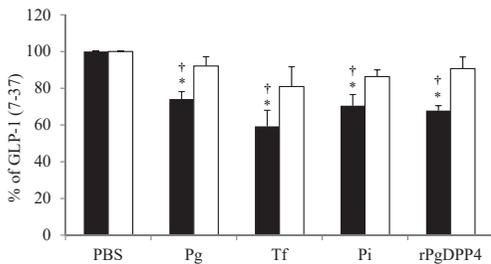


図6：菌体結合型DPP4のインクレチン (GLP-1) 分解能

P. gingivalis、*T. forsythia* および *Prev. intermedia* の細菌懸濁液による活性型GLP-1切断効率をELISA法で検討した(■)P32/98非添加群、(□)P32/98添加群(n ≥ 3, 平均値 ± 標準誤差)。Pg: *P. gingivalis*、Tf: *T. forsythia*、Pi: *Prev. intermedia*。(*)は対照群との有意な差(p < 0.05)を示す。(†)は阻害剤添加群との有意な差(p < 0.05)を示す。

および *Prev. intermedia* の菌体結合型DPP4はいずれも活性型GLP-1を切断すること、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。

考 察

歯周病原細菌をはじめとする口腔細菌が全身疾患の発症・進行に関わる可能性を示す報告は複数なされており、そのメカニズムについても示唆されている³²⁻³⁶⁾。このうち、歯周疾患が糖尿病の病態形成に関わるとの報告は、基礎研究および臨床研究において複数のグループからなされている^{37, 38)}。しかしいずれも病態形成機序に関しては明らかにはされておらず、その分子基盤については未だ不明な点が数多く残されている。

重度歯周炎の原因細菌群であるレッドコンプレックスの一つである *P. gingivalis* は糖非発酵性細菌で、自身のエネルギー産生はジペプチド、トリペプチドの取り込みに依存することが明らかにされている^{39, 40)}。このため、本菌はジペプチド、トリペプチド産生に関わる複数のプロテアーゼやペプチダーゼを保有していることが明らかにされている⁴¹⁾。このうちDPP4はN末端から2番目のアミノ酸がプロリンとアラニンの場合に作用するジペプチダーゼ¹⁶⁾である。ヒトにおいてDPP4はインクレチンを切断・不活化することでインスリン分泌を制御する作用を持ち、糖尿病の病態形成に関わるプロテアーゼであることが明らかにされている^{42, 43)}。我々は最近、このDPP4を *P. gingivalis* 以外の歯周病原細菌が有していることを示した²⁶⁾。そこで本研究では、*P. gingivalis*をはじめとする歯周病原細菌の菌体結合型DPP4活性を測定してこれらの歯周病原細菌が機能的にDPP4活性を発現しているかを検討するとともに、そのインクレチン切断・不活化能について検討した。

歯周病原細菌の菌体結合型DPP4について、蛍光ペプチド基質Gly-Pro-MCAを用いたDPP4活性および抗PgDPP4抗体を用いたWestern blotting法によりその存在を検討した

(図1, 2). その結果, 本研究で用いた6菌種の歯周病原細菌のうち, *P. gingivalis*, *T. forsythia* および *Prev. intermedia* の細菌懸濁液で DPP4 活性および *Trep. denticola* では DPP4 様活性が認められた. DPP4 としては *P. gingivalis*, *T. forsythia* ならびに *Prev. intermedia* に菌体結合型として存在すること, その活性は *P. gingivalis* で最も高く, 次いで *T. forsythia* が高いことが明らかとなった. そこで以下では, これら3菌種の DPP4 について検討を加えた.

PgDPP4 については過去に報告²⁷⁾されている. そこで本研究では DPP4 活性が PgDPP4 に次いで高い TfDPP4 についてリコンビナント体を精製しその分子プロフィール, 特性について PgDPP4 と比較検討した. その結果, TfDPP4 のアミノ酸配列は PgDPP4 のそれと相同性が高く (61.1%), アミノ酸残基数, 分子量および等電点もほぼ一致した (図3, 図4, 表1). さらに, 至適 pH も PgDPP4 のそれと一致すること, 0.9% NaCl 添加で DPP4 活性が抑制されるという酵素学的特性も一致したこと (図4) から, TfDPP4 は PgDPP4 同様, インクレチンを切断・不活化することでインスリン分泌を制御する作用を持ち, 糖尿病の病態形成に関わる可能性が示唆された.

さらに菌体結合型の TfDPP4, PgDPP4 および *Prev. intermedia* DPP4 を用いてヒト DPP4 阻害剤である P32/98 による DPP4 活性阻害効果を検討した (図5). その結果, いずれの場合にも, P32/98 の添加により DPP4 活性が有意に阻害されたことから, *P. gingivalis*, *T. forsythia* および *Prev. intermedia* はいずれも機能的な菌体結合型の DPP4 を発現していることが強く示唆された.

そこで菌体結合型 DPP4 のインクレチン分解能について検討した結果, *P. gingivalis*, *T. forsythia* および *Prev. intermedia* はインクレチンの1つである GLP-1 を有意に切断し得ること, 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 (図

6). この結果は, これらの歯周病原細菌の感染が存在した場合, 2型糖尿病の病態が形成される可能性を示唆する.

これまでのところ, 歯周炎の結果, 過剰産生された炎症性サイトカインによるインスリン抵抗性の変化が糖尿病の病態形成に関わる可能性を示唆する報告⁴⁴⁾がなされている. 歯周炎は口腔という局所の慢性炎症性疾患ではあるが, 病巣部位から TNF- α などの炎症性サイトカインが産生され, 肝細胞でのインスリン抵抗性を引き起こす可能性はある. しかし, 歯周治療により改善される炎症性サイトカインレベルは数 pg/ml と少ないとの報告⁴⁵⁾を勘案すると, 炎症性サイトカインの過剰産生のみが糖尿病の病態形成に関わるとは考えにくい. そこで我々は *P. gingivalis* DPP4 がヒト DPP4 同様にインクレチンを切断し, 糖尿病の病態形成に関わるとの作業仮説を立て種々検討を行ってきた. その結果, *P. gingivalis* DPP4 がインクレチンを切断すること, 上昇したマウスの血糖値の低下を遅延させることを明らかにした²⁶⁾. さらに DPP4 遺伝子の分布についての解析から, 複数の歯周病原細菌が *P. gingivalis* 同様, DPP4 遺伝子を保有していることを明らかにした²⁶⁾. しかし, それらの歯周病原細菌が菌体結合型に DPP4 を有し, それらが機能するかは不明であった. 本研究により, *P. gingivalis*, *T. forsythia* および *Prev. intermedia* が菌体結合型 DPP4 を保有し, DPP4 活性を示すとともに GLP-1 切断能を示すことが強く示唆された. それゆえ, これらの歯周病原細菌の単独あるいは複合感染が持続した場合, 歯周病原細菌の組織侵入²⁹⁾, 血液を介した全身循環への侵入^{46, 47)}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. 今後, もう1つのインクレチンである GIP⁴⁸⁾についても GLP-1 同様に検討が必要である.

以上のことから, 歯周病原細菌由来 DPP4 がインクレチンを切断, 不活性化し, インスリン分泌の抑制が生じることで, 歯周病が糖尿病の発症と進行に関与することが強く示唆された.

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御助言、御校閲を賜りました関西女子短期大学歯科衛生学科 木村重信 教授に深く感謝いたします。さらに本研究に際し、絶えず温かい御支援ならびに御協力を頂きました歯周療法学分野、分子微生物学分野の皆様方に深謝致します。

利 益 相 反

本研究において、公表すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Page, R. C. and Kornman, K. S.: The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000, 14: 9-11, 1997.
- 2) Armitage, G. C.: Periodontal diagnosis and classification of periodontal diseases. *Periodontol* 2000, 34: 9-21, 2004.
- 3) Reddy, M. S., Geurs, N. C and Gunsolley, J. C.: Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann. Periodontol.*, 8:12-37, 2003.
- 4) Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. and Johnson, N. W.: Periodontal diseases. *Lancet.*, 366: 1809-1820, 2005.
- 5) Kimura, S., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Sasaki, M.: Pathogenic factors of *P. gingivalis* and host defense mechanisms. In *Pathogenesis and treatment of periodontitis* (N. Buduneli, ed.) , InTech, Rijeka, Croatia. 3-18, 2012.
- 6) Deasy, M. J., Vogel, R. L., Annes, I. K. and Simon, B. I.: Periodontal Disease Associated with Preleukemic Syndrome. *J. Periodontol.*, 47: 41-45, 1976.
- 7) Nelson, R. G., Shlossman, M., Budding, L. M., Pettitt, D. J., Saad, M. F., Genco, R. J. and Knowler, W. C.: Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care*, 13: 836-840, 1990.
- 8) Imai, K., Victoriano, A. F., Ochiai, K. and Okamoto, T.: Microbial interaction of periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* and HIV-possible causal link of periodontal diseases to AIDS progression-. *Curr. HIV Res.*, 10: 238-244, 2012.
- 9) Okada, M., Kobayashi, M., Hino, T., Kurihara, H. and Miura, K.: Clinical periodontal findings and microflora profiles in children with chronic neutropenia under supervised oral hygiene. *J. periodontal.*, 72: 945-952, 2001.
- 10) Armitage, G. C.: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.*, 4: 1-6, 1999.
- 11) Loe, H.: Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 16: 329-334, 1993.
- 12) Grossi, S. G., Skrepcinski, F. B., DeCaro, T., Robertson, D. C., Ho, A.W., Dunford, R. G. and Genco, R. J.: Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J. Periodontol.*, 68: 713-719, 1997.
- 13) Deacon, C. F., Nauck, M. A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., and Holst, J. J.: Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*, 44: 1126-1131, 1995.
- 14) Meier, J. J., Nauck, M. A., Kranz, D., Holst, J. J., Deacon, C. F., Gaeckler, D., Schmidt, W. E. and Gallwitz, B.: Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes*, 53: 654-662, 2004.
- 15) Drucker, D. J. and Nauck, M. A.: The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.*, 368: 1696-1705, 2006.
- 16) Drucker, D. J.: Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26: 2929-2940, 2003.
- 17) Ahrén, B., Schweizer, A., Dejager, S., Dunning, B. E., Nilsson, P. M., Persson, M. and Foley, J. E.: Vildagliptin enhances islet responsiveness to both hyper- and hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 94: 1236-1243, 2009.
- 18) Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Kimura, S., Kon, A., Haraga, H., Ono, T. and Nemoto, T. K.: Asp- and Glu-specific novel dipeptidyl peptidase 11 of *Porphyromonas gingivalis* ensures utilization of proteinaceous energy sources. *J. Biol. Chem.*, 286: 38115-38127, 2011.
- 19) Rouf, S. M., Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Phenylalanine 664 of dipeptidyl peptidase (DPP) 7 and Phenylalanine 671 of DPP11 mediate preference for P2-position hydrophobic residues of a substrate. *FEBS Open Bio.*, 28: 177-183, 2013.
- 20) Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S. M., Naito, M., Yanase, A., Tetsuo, F., Ono, T., Kobayakawa, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Nakayama, K., Saiki, K., Konishi, K., and Nemoto, T. K.: Identification and characterization of prokaryotic dipeptidyl-peptidase 5 from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.*, 289: 5436-5448, 2014.
- 21) Nemoto, T. K., Ohara-Nemoto, Y., Bezerra, G. A.,

- Shimoyama, Y. and Kimura, S.: *Porphyromonas gingivalis* Periplasmic Novel Exopeptidase, Acylpeptidyl Oligopeptidase, Releases N-Acylated Di- and Tripeptides from Oligopeptides. *J. Biol. Chem.*, 291: 5913-5925, 2016.
- 22) Kiyama, M., Hayakawa, M., Shiroza, T., Nakamura, S., Takeuchi, A., Masamoto, Y. and Abiko, Y.: Sequence analysis of the *Porphyromonas gingivalis* dipeptidyl peptidase IV gene. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1396: 39-46, 1998.
- 23) Banbula, A., Bugno, M., Goldstein, J., Yen, J., Nelson, D., Travis, J. and Potempa, J.: Emerging family of proline-specific peptidases of *Porphyromonas gingivalis*: purification and characterization of serine dipeptidyl peptidase, a structural and functional homologue of mammalian prolyl dipeptidyl peptidase IV. *Infect. Immun.*, 68: 1176-82, 2000.
- 24) Kumagai, Y., Konishi, K., Gomi, T., Yagishita, H., Yajima, A. and Yoshikawa, M.: Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and its participation in virulence. *Infect. Immun.*, 68: 716-24, 2000.
- 25) Chen, T., Yu, W. H., Izard, J., Baranova, O. V., Lakshmanan, A. and Dewhirst, F. E.: The human oral microbiome database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Data-base (Oxford)* 2010:baq013, 2010.
- 26) Ohara-Nemoto, Y., Nakasato, M., Shimoyama, Y., Baba, T. T., Kobayakawa, T., Ono, T., Yaegashi, T., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Degradation of Incretins and Modulation of Blood Glucose Levels by Periodontopathic Bacterial Dipeptidyl Peptidase 4. *Infect. Immun.*, 85: e0277-17, 2017.
- 27) Nishimata, H., Ohara-Nemoto, Y., Baba, T. T., Hoshino, T., Fujiwara, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Identification of Dipeptidyl-Peptidase (DPP) 5 and DPP7 in *Porphyromonas endodontalis*, Distinct from Those in *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*, 9: e114221. doi: 10.1371/journal.pone.0114221. eCollection 2014.
- 28) Shimoyama, Y., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, M., Nemoto, T. K., Tanaka, M. and Kimura, S.: Dominant prevalence of *Porphyromonas gingivalis* fimA types I and IV in healthy Japanese children. *J. Den. Sci.*, 12: 213-219, 2017.
- 29) 高橋晋平, 下山祐, 石川太知, 佐々木大輔, 木村重信, 八重柏隆: 歯周病原細菌の歯肉上皮バリア突破能. *岩医大歯誌*, 42: 1-11, 2017.
- 30) Pederson, R. A., White, H. A., Schlenzig, D., Pauly, R. P., McIntosh, C. H. and Demuth, H. U.: Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide. *Diabetes*, 47: 1253-8, 1998.
- 31) Otsuka, Y., Yamaguchi, S., Furukawa, A., Kosuda, M., Nakazaki, M. and Ishihara, H.: Addition of sitagliptin or metformin to insulin monotherapy improves blood glucose control via different effects on insulin and glucagon secretion in hyperglycemic Japanese patients with type 2 diabetes. *Endocr. J.*, 62: 133-143, 2015.
- 32) Offenbacher, S., Salvi, G. E., Beck, J. D. and Williams, R. C.: The design and implementation of trials of host modulation agents. *Ann. Periodontol.*, 2: 199-212, 1997.
- 33) Ohki, T., Itabashi, Y., Kohno, T., Yoshizawa, A., Nishikubo, S., Watanabe, S., Yamane, G. and Ishihara, K.: Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am. Heart. J.*, 163: 164-167, 2012.
- 34) Nakano, K., Nemoto, H., Nomura, R., Inaba, H., Yoshioka, H., Taniguchi, K., Amano, A., and Ooshima, T.: Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol.*, 24: 64-68, 2009.
- 35) Ziebolz, D., Pabel, S. O., Lange, K., Krohn-Grimberghe, B., Hornecker, E. and Mausberg, R. F.: Clinical periodontal and microbiologic parameters in patients with rheumatoid arthritis. *J. Periodontol.*, 82: 1424-1432, 2011.
- 36) Yoneda, M., Naka, S., Nakano, K., Wada, K., Endo, H., Mawatari, H., Imajo, K., Nomura, R., Hokamura, K., Ono, M., Murata, S., Tohnai I., Sumida, Y., Shima, T., Kuboniwa, M., Umemura, K., Kamisaki, Y., Amano, A., Okanou, T., Ooshima, T., and Nakajima, A.: Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.*, 16: 12-16, 2012.
- 37) Grossi, S. G. and Genco, R. J.: Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann. Periodontol.*, 3: 51-61, 1998.
- 38) Teeuw, W. J., Gerdes, V. E. and Loos, B. G.: Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 33: 421-427, 2010.
- 39) Takahashi, N., Sato, T. and Yamada, T.: Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.*, 182: 4704-4710, 2000.
- 40) Takahashi, N. and Sato, T.: Preferential utilization of dipeptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.*, 80:1425-1429, 2001.
- 41) Nemoto, T. K. and Ohara-Nemoto, Y.: Exopeptidases and gingipains in *Porphyromonas gingivalis* as prerequisites for its amino acid metabolism. *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, 52: 22-29, 2016.

- 42) Conarello, S. L., Li, Z., Ronan, J., Roy, R. S., Zhu, L., Jiang, G., Liu, F., Woods, J., Zycband, E., Moller, D. E., Thornberry, N. A. and Zhang, B. B.: Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 27: 6825-6830, 2003.
- 43) Hansotia, T., Baggio, L. L., Delmeire, D., Hinke, S. A., Yamada, Y., Tsukiyama, K., Seino, Y., Holst, J. J., Schuit, F. and Drucker, D. J.: Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes*, 53: 1326-1335, 2004.
- 44) Arimatsu, K., Yamada, H., Miyazawa, H., Minagawa, T., Nakajima, M., Ryder, M. I., Gotoh, K., Motooka, D., Nakamura, S., Iida, T. and Yamazaki, K.: Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci. Rep.*, doi: 10.1038/srep04828, 2014.
- 45) Iwamoto, Y., Nishimura, F., Nakagawa, M., Sugimoto, H., Shikata, K., Makino, H., Fukuda, T., Tsuji, T., Iwamoto, M. and Murayama, Y.: The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J. Periodontol.*, 72: 774-778, 2001.
- 46) Deshpande, R. G., Khan, M. B. and Genco, C. A.: Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.*, 66: 5337-5343, 1998.
- 47) Li, X., Iwai, T., Nakamura, H., Inoue, Y., Chen, Y., Umeda, M. and Suzuki, H.: An ultrastructural study of *Porphyromonas gingivalis*-induced platelet aggregation. *Thromb. Res.*, 122: 810-819, 2008.
- 48) Seino, Y., Fukushima, M., Yabe, D.: GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *J. Diabetes Investig.*, 22: 8-23, 2010.

Periodontopathic bacterial DPP4 as a risk factor for type 2 diabetes mellitus

Manami NAKASATO¹ · Yu SHIMOYAMA² , Yuko OHARA-NEMOTO³ , Daisuke SASAKI¹ ,
Takayuki K. NEMOTO³ , Minoru SASAKI² , Takashi YAEGASHI¹

¹ Division of Periodontology, Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Takashi YAEGASHI)

² Division of Molecular Microbiology, Department of Microbiology, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Minoru SASAKI)

³ Department of Oral Molecular Biology, Course of Medical and Dental Science, Nagasaki University Graduate
School of Biomedical Science
(Chief: Prof. Takayuki K. NEMOTO)

[Received : December 11 2017 : Accepted : January 5 2018]

Abstract : Periodontitis is known as a risk factor for type 2 diabetes mellitus (T2DM) . However, the molecular mechanism is still unclear. The incretin peptides, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide, are major regulators of post-prandial insulin secretion, which are rapidly degraded to inactive forms with the cleavage of Ala²-Glu³ bond by dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) . Recent studies demonstrated that *Porphyromonas gingivalis*, one of the major causative organisms of chronic periodontitis in humans, possesses DPP4. Since the prokaryotic DPP4 is a homologue to mammalian DPP4, it is possible that periodontopathic bacterial infection could lead to the onset or progression of type 2 diabetes mellitus through the degradation of incretins by those DPP4s.

In this study, we assessed the cell-associated DPP4s and their GLP-1-hydrolyzing activity in periodontopathic bacteria. The results indicated that, among the 6 periodontopathic bacteria tested, *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Prevotella intermedia* possess cell-associated DPP4, which can hydrolyze GLP-1 to the inactive form. In addition, further characterization of *T. forsythia* DPP4 (TfDPP4) using recombinant TfDPP4 indicated that TfDPP4 has a similar amino acid sequence and molecular profiles (molecular mass, the isoelectric point, pH- and salt-dependences) to *P. gingivalis* DPP4 (PgDPP4) .

In conclusion the present findings indicate that some periodontopathic bacteria can possess functional DPP4 associated with its cell surface that can degrade incretins as does human DPP4, and thus periodontitis with periodontopathic bacterial infection could be an important risk factor for T2DM.

Key words : periodontopathic bacterial, dipeptidyl-peptidase 4, incretin, type 2 diabetes mellitus