

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19005

研究課題名(和文) 歯周炎関連全身疾患としての2型糖尿病とその病態形成メカニズムの解析

研究課題名(英文) Type 2 diabetes mellitus as a periodontitis-related systemic disease and analysis of its pathogenesis mechanism

研究代表者

中里 茉那美 (Manami, Nakasato)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：10823841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Porphyromonas gingivalisは2型糖尿病と関連が示されている。研究代表者はP. gingivalis dipeptidyl-peptidase (DPP)4がインクレチンを分解、食後高血糖を上昇・延長することを明らかにした。本研究課題ではDPP4以外のDPPが2型糖尿病の病態形成に関与する可能性を検討した。DPP7はDPP4同様にインクレチンを分解し、さらにインスリンも分解することが明らかとなった。またDPP7をマウスに投与すると、血中GLP-1濃度、血糖値とインスリン濃度が低下した。以上より、P. gingivalisは2型糖尿病に関連すると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病原細菌P. gingivalisのDPP4やDPP7はインクレチンやインスリンなどの血糖値コントロールにかかわる生理活性物質を切断・不活性化することから、口腔局所に感染しているの本菌の血流への侵入が2型糖尿病の病態形成にかかわることが強く示唆された。以上のことから、歯科処置による口腔内のP. gingivalisの減少は2型糖尿病の予防や病態改善に寄与するものと推察される。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis, a Gram-negative anaerobes, is important pathogen associated with chronic periodontitis. And this bacterium is closely related to systemic diseases, such as type 2 diabetes mellitus. We previously demonstrated more direct involvement, as P. gingivalis dipeptidyl-peptidase (DPP)4 was shown to degrade incretin peptides, resulting in elevation and prolongation of postprandial hyperglycemia in a mouse model. In this study, we assessed whether other DPPs could degrade incretins as same as DPP4. P. gingivalis DPP7 has more potent hydrolyzing activity toward incretins and other gastrointestinal peptides than DPP4. In addition, intravenous administration of DPP7 in mice decreased serum levels of active GLP-1 and blood glucose levels. DPP7 was also shown to hydrolyze insulin. In summary, P. gingivalis is important pathogen associated with type 2 diabetes mellitus.

研究分野：歯周療法学分野

キーワード：P.gingivalis 糖尿病 DPP4

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は 'red complex species' をはじめとする歯周病原細菌による慢性炎症性疾患であり、これら歯周病原細菌が全身疾患と関連することが明らかにされている。特に2型糖尿病のリスクファクターに歯周病が報告されている。しかし、歯周病原細菌が2型糖尿病のリスクファクターとして関与するとの報告は少なく、その分子メカニズムは明らかではない。

主要な歯周病原細菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* は生存代謝のため複数のプロテアーゼやペプチダーゼを産生している。その中のジペプチジルペプチダーゼ4 (DPP4: dipeptidyl peptidase 4) はヒト DPP4 同様の機能を有している。DPP4 は食物摂取後のインスリン分泌を促進する生理ペプチドのインクレチン [GLP-1(glucagon-like peptide-1) および GIP (gastric inhibitory polypeptide/glucose dependent insulinotropic polypeptide)] を速やかに分解・不活性化し血糖値をコントロールしている。しかし、過剰な DPP4 の産生はインクレチンの過剰な不活性化を誘導し、血糖値のコントロールを困難にしている。

歯周病原細菌の DPP4 が起因となり、歯周病原細菌の感染がインクレチンの不活性化を介して2型糖尿病の病態形成に関わることが強く推察されるものの、局所の感染症である歯周炎が2型糖尿病の病態形成 / 進行に関与するかは明確にはなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、歯周炎が2型糖尿病のリスクファクターとして起因する分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。歯周病原細菌 DPP4 によるインクレチンの切断能および切断能率を検討する。また生体における歯周病原細菌 DPP4 の影響を検討し、歯周病原細菌が2型糖尿病を惹起する病態形成機序を明らかにする。

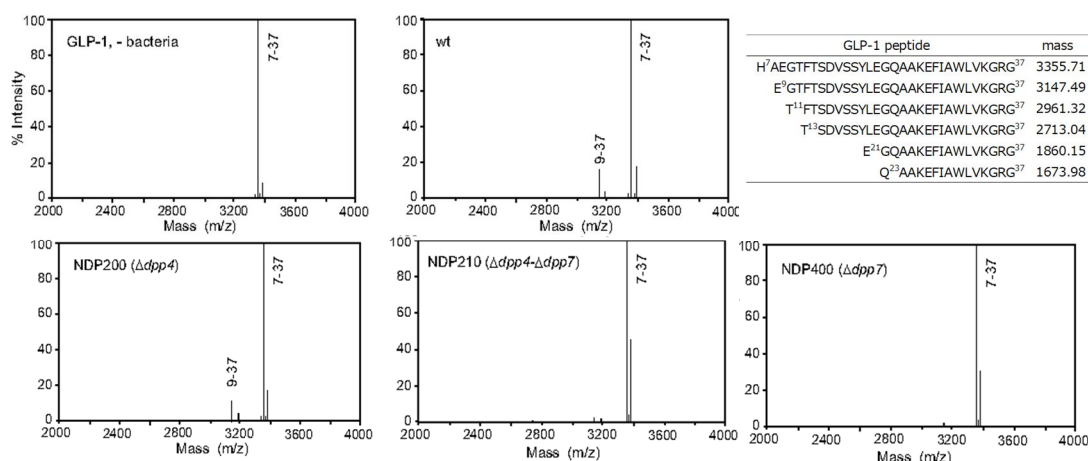
3. 研究の方法

本研究は、歯周病原細菌感染が2型糖尿病のリスクファクターとなるのを明らかにすることを目的として、PgDPP4 および PgDPP7 リコンビナント体を製作し、*P. gingivalis* ATCC 33277 と併せてインクレチンの切断能について MALDI-TOF MS で検討した。さらに、DPPs による生体での2型糖尿病の病態形成機序を探索するため11-13週 C57BL/6N 雌マウスに PgDPP7 リコンビナント体を投与し、血糖値、活性型 GLP-1 およびインスリンの血中濃度を測定し検討を行った。

4. 研究成果

P. gingivalis のインクレチンの切断能の検討により、*P. gingivalis* は GLP-1 を切断することが明らかとなった。また DPPs 欠損株を GLP-1 に作用した結果、DPP4 欠損株では GLP-1 が一部切断され、DPP4-DPP7 欠損株では GLP-1 の切断が完全に認められなかった (図1)。このことから、GLP-1 の切断には PgDPP4 以外に PgDPP7 も関与していることが示唆された。

図1



そこで PgDPP4 と PgDPP7 の切断能についてリコンビナント体を用いて検討した結果、PgDPP4 は GLP-1 を Ala⁸-Glu⁹の間のみでしか切断しなかったのに対し、PgDPP7 は GLP-1 を完全に切断することが明らかとなった (図2)。GIP の切断能についても検討した結果、GIP は PgDPP4 および PgDPP7 の量依存的に切断され、その切断能は PgDPP7 の方がより強いことが明らかとなった (図3および表)。

図 2

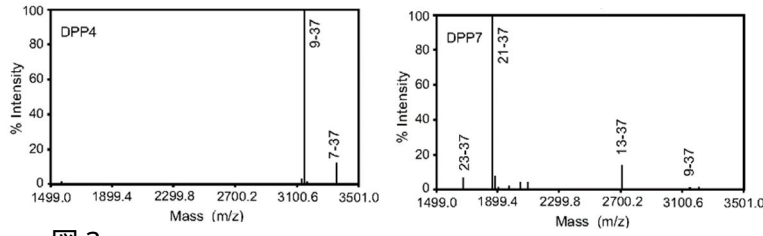
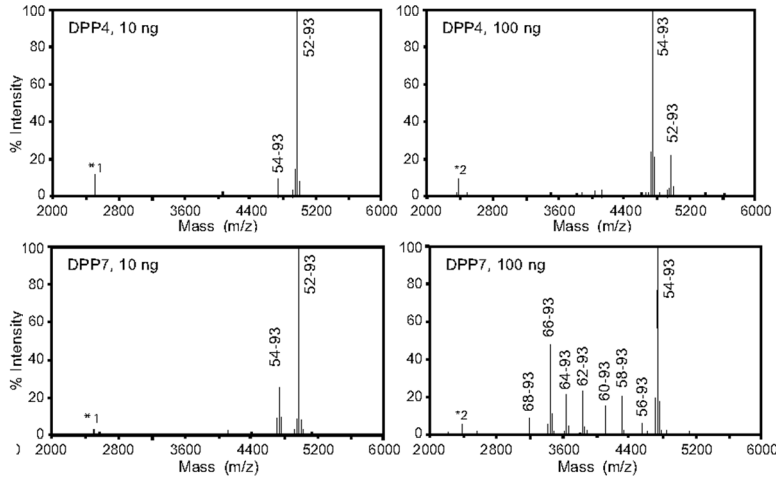


図 3



GIIP peptide	Mass
Y ⁶ AEGTFISDYSIAMDKIHQDFVNWLLACKGKKNLDWKHNITQ ⁹³	4983.6
E ⁶ GTFSIDYSIAMDKIHQDFVNWLLACKGKKNLDWKHNITQ ⁹³	4749.3
T ⁶ FTFSIDYSIAMDKIHQDFVNWLLACKGKKNLDWKHNITQ ⁹³	4565.2
I ⁶ SDYSIAMDKIHQDFVNWLLACKGKKNLDWKHNITQ ⁹³	4314.9
D ⁶ YSIAMDKIHQDFVNWLLACKGKKNLDWKHNITQ ⁹³	4114.7
S ⁶ SIAMDKIHQDFVNWLLACKGKKNLDWKHNITQ ⁹³	3838.4
A ⁶ MDKHQDFVNWLLACKGKKNLDWKHNITQ ⁹³	3638.2
D ⁶ KIHQDFVNWLLACKGKKNLDWKHNITQ ⁹³	3433.9
I ⁶ HQDFVNWLLACKGKKNLDWKHNITQ ⁹³	3190.6

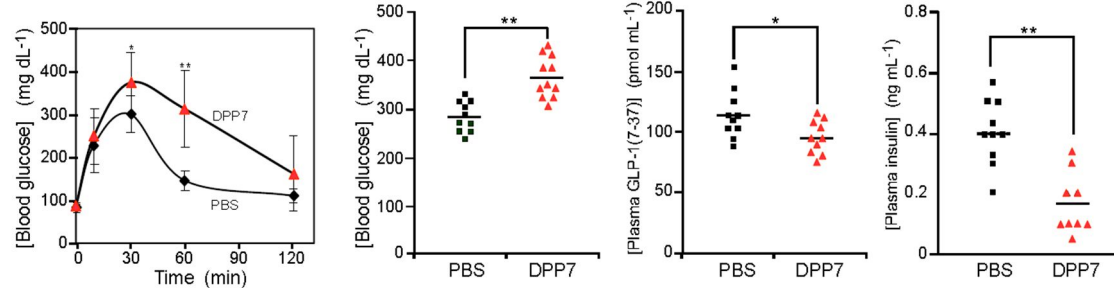
PgDPP4 より PgDPP7 の方が高いインクレチン切断能を有することより、PgDPP7 における生体の糖代謝機能への影響についての検討を行った。マウスに糖負荷試験を実施した結果、PgDPP7 リコンビナント体の投与により有意な血糖値の上昇と高血糖持続時間の有意な延長が認められた (図 4)。さらに活性型 GLP-1 とインスリンの血中濃度の有意な減少が認められた。これらの結果より、PgDPP7 は PgDPP4 と同様に生体内で血糖値を調整する機能を有することが示唆された。また、質量分析の結果から PgDPP7 はインクレチンばかりでなくインスリンも切断することが明らか

となった (表)。以上の成績から、*P. gingivalis* に起因する歯周炎は 2 型糖尿病の病態形成にかかわる基礎疾患となることが強く示唆された。

表

Peptidase	Substrate category	Name	Molar ratio (substrate:enzyme)	t _{1/2} (min) and others	N-terminal sequence and cleavage site
<i>P. gingivalis</i> DPP4	Gastrointestinal peptide	GLP-1 (7-37)	800:1	16	HA EGTFTSDVSSYLEG—
		GIIP (52-93) 800:1	800:1	3	YA EGTFISDYSIAMDK—
		Insulin (A, 1-21; B, 1-30)	800:1	Not cleaved	GIIVEQC ⁶ ASVCSLYQLENYCN EVNQHL ⁶ CGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA
<i>P. gingivalis</i> DPP7	Gastrointestinal peptide	Glucagon (1-29)	8000:1	Scarcely cleaved	HSQGTFTSDYSKYLD ⁶ SRRAQ—
		GLP-1 (7-37)	8000:1	31	HA EGTFTSDVSSYLEG—
		GIIP (52-93)	8000:1	23	YA EG TF IS DY SIAMDK—
		Insulin (A, 1-21; B, 1-30)	8000:1	A: Scarcely cleaved	GIIVEQC ⁶ ASVCSLYQLENYCN FV NQ HL ⁶ CGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA
			800:1	B: 70 ⁶ A: 18 B: 5	GIIVE QC ⁶ ASVCSLYQLENYCN FV NQ HL ⁶ CGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA

図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohara-Nemoto Yuko, Shimoyama Yu, Ono Toshio, Sarwar Mohammad Tanvir, Nakasato Manami, Sasaki Minoru, Nemoto Takayuki K.	4. 巻 298
2. 論文標題 Expanded substrate specificity supported by P1 and P2 residues enables bacterial dipeptidyl-peptidase 7 to degrade bioactive peptides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101585 ~ 101585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101585	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中里 茉那美, 下山 佑, 佐々木 大輔, 八重柏 隆
2. 発表標題 新規ヒルレンス因子としての歯周病原細菌DPP4の性状解析
3. 学会等名 岩手科大学歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉 学, 村井 治, 中里 茉那美, 飯塚 章子, 遠藤 憲行, 昆 由美子, 佐々木 大輔, 八重柏 隆
2. 発表標題 歯周治療による掌蹠膿疱症性骨関節炎症状の改善
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田光, 村井 治, 飯塚 章子, 中里 茉那美, 鈴木啓太, 滝沢尚希, 攝待友宏, 佐々木 大輔, 八重柏 隆
2. 発表標題 歯周炎で保存困難な歯にEr:YAGレーザーを適応した症例
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------