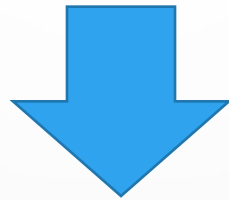


Glyoxal Oxidaseの
糖尿病合併症診断法への応用
～Methylglyoxal新規定量法の可能性～

発表内容の構成

糖尿病合併症の既存診断法、原因物質



Methylglyoxalと糖尿病合併症の関連性



新規Methylglyoxal測定法、GLOX

糖尿病に伴う合併症

- 慢性合併症

糖尿病性網膜症

糖尿病性腎症

糖尿病性神経障害

脳血管障害

虚血性心疾患

心血管疾患

全患者のうち40-50%が罹患

→認知症、死亡

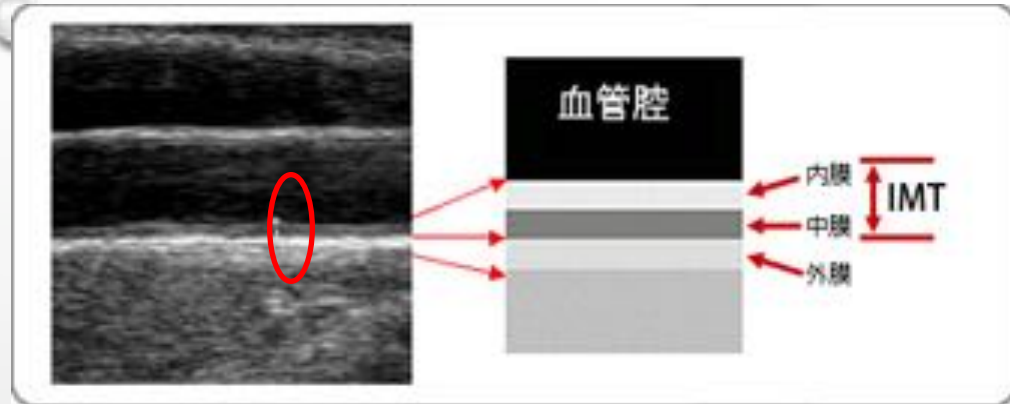
- 急性合併症

糖尿病性昏睡

急性感染症

AGEs、Methylglyoxal、
過酸化脂質、活性酸素

心血管疾患の既存診断法

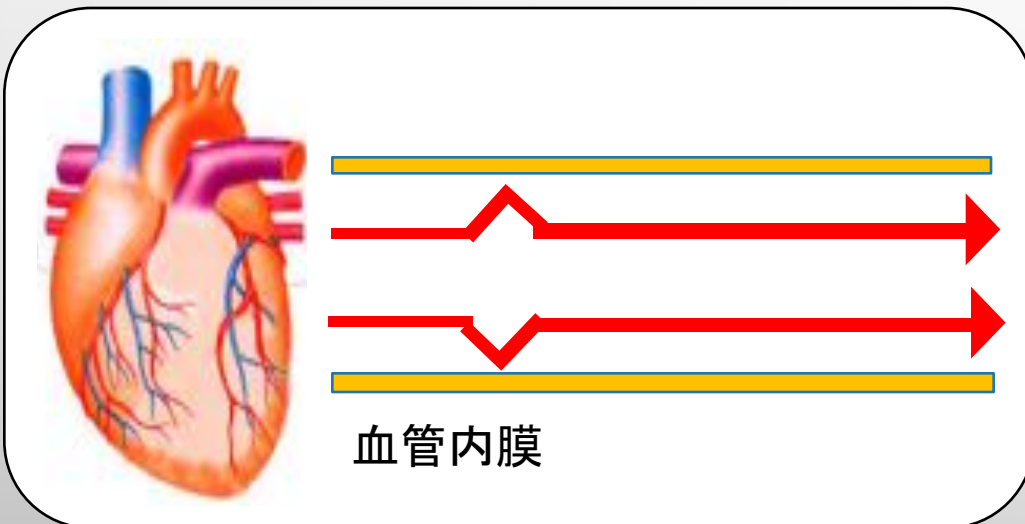


IMT: intima-media thickness (内膜中膜複合体厚)

- 頸動脈におけるエコー検査
- 全身の血管肥厚、プラークの有無を推測可能

【欠点】

- 診断に時間がかかる。
- 他検体を同時に処理できない。

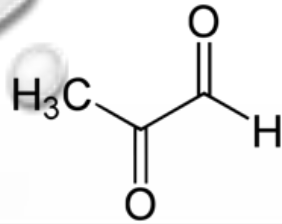


PWV: pulse wave velocity (脈波伝播速度)

- 拍動の伝達速度を測定
- 動脈硬化の進行度が推測可能

【欠点】

- 患者へのストレス
- 診断に時間がかかる。
- 他検体を同時に処理できない。



Methylglyoxal代謝経路

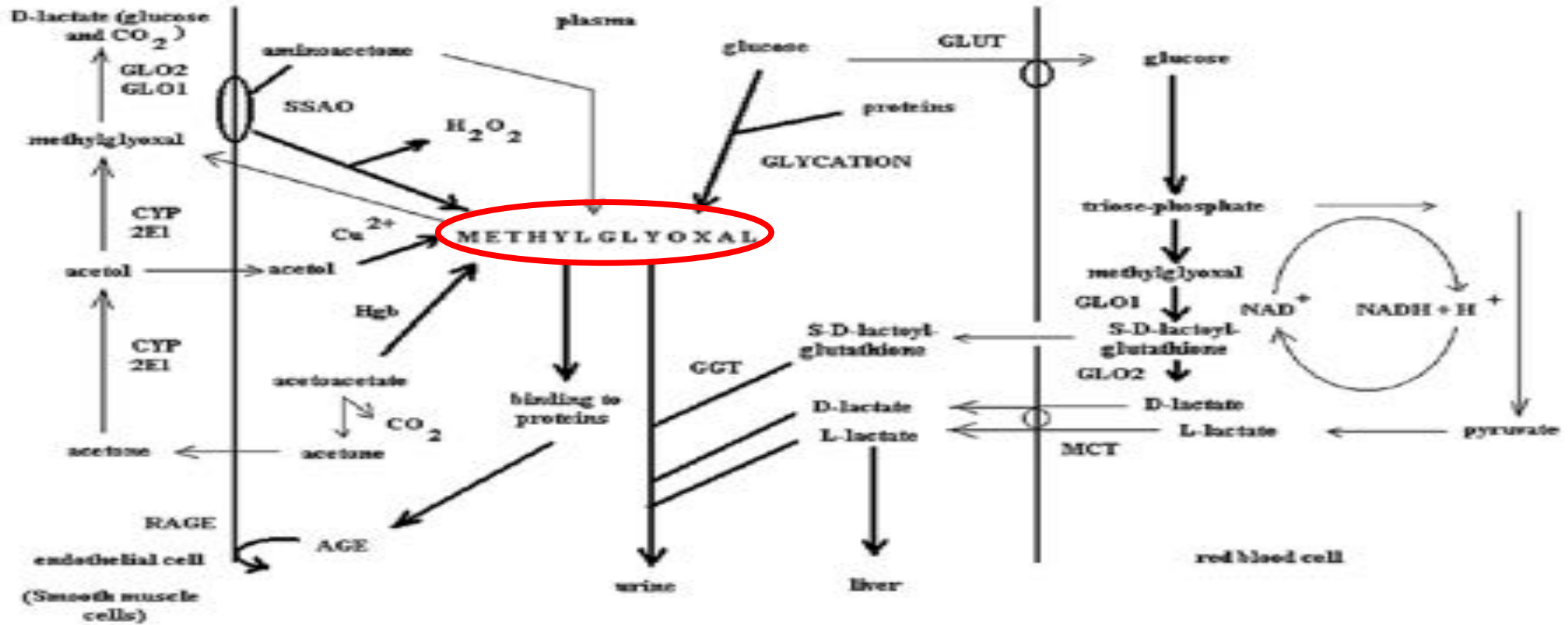
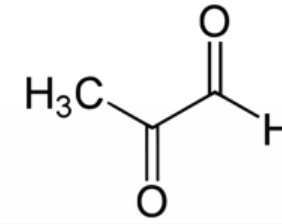
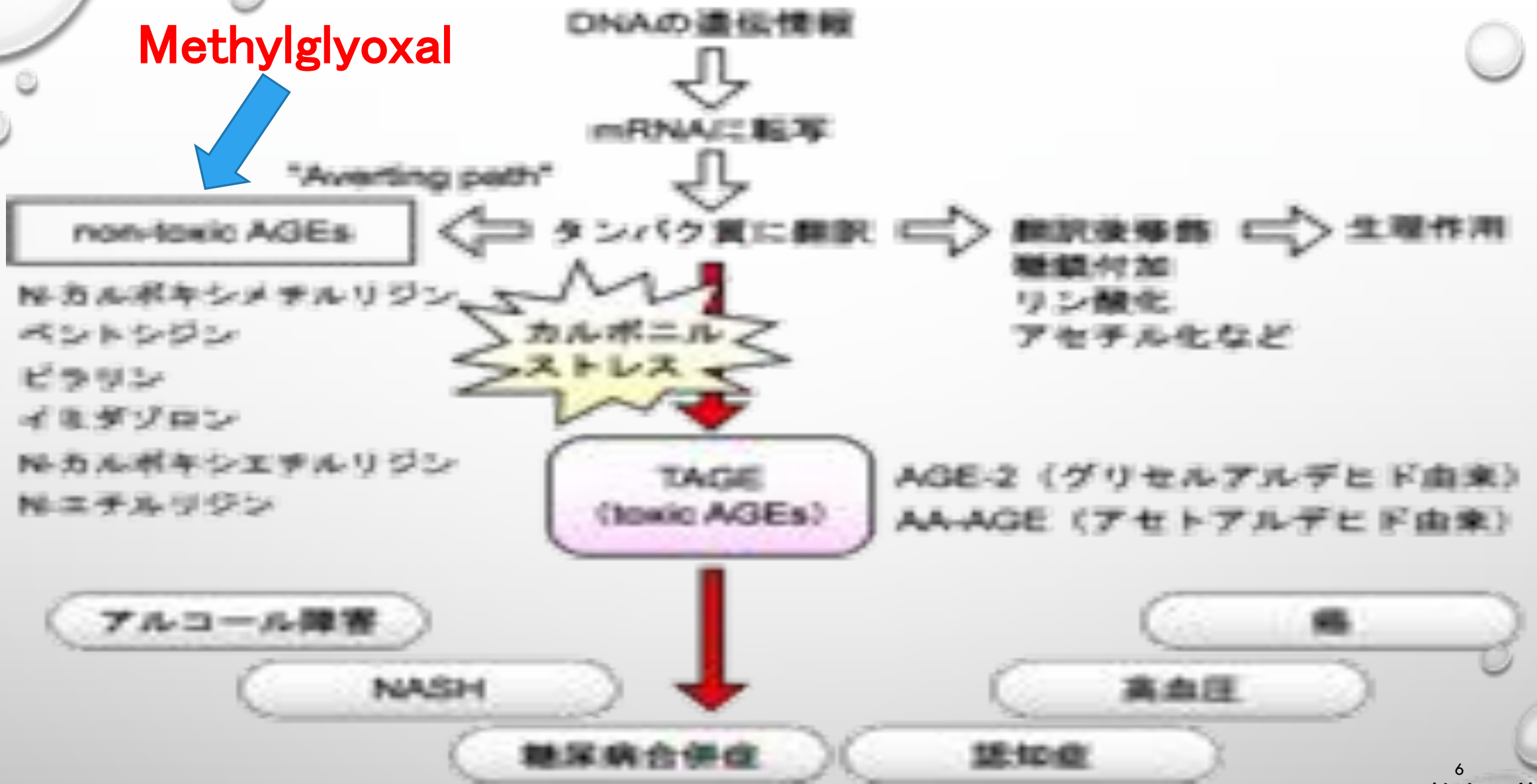


Fig. 2 - Compartments of methylglyoxal formation and degradation in blood vessels. Neither GSH (reduced glutathione) nor NADPH + H⁺ are shown in the figure. Bold lines indicate the most important pathways. S-D-lactoylglutathione enters plasma from damaged cells and is converted to S-D-lactoyl-cysteinyl-glycine and S-D-lactoyl-cysteine by γ -glutamyl-transpeptidase (GGT).

Methylglyoxal



AGEsは糖尿病合併症の誘発因子である

疾病	AGEs*
糖尿病	
腎症	カルボキシメチルリジン (Makino et al., 1995)
神経障害	カルボキシメチルリジン、カルボキシエチルリジン、 ハイドロイミダゾール由来メチルグリオキサール 、フルクトシルリジン (Karachalias et al., 2003)
骨疾患	
変形性骨関節症	ペントシジン、 カルボキシメチルリジン (Verzji et al., 2000; Pokharna et al., 1997)
関節リウマチ	ペントシジン (Takahashi et al., 1997; Chen et al., 1998)
アルツハイマー病	
老人斑	ペントシジン、 ピラリン 、グルコース-AGE (Sasaki et al., 1998; Smith et al., 1994)
神経原線維変化(変性)	ペントシジン、 ピラリン 、グルコース-AGE、 カルボキシメチルリジン (Sasaki et al., 1998; Smith et al., 1994; Kimura et al., 1995)
老化	ペントシジン、 カルボキシメチルリジン (Jono et al., 2002)

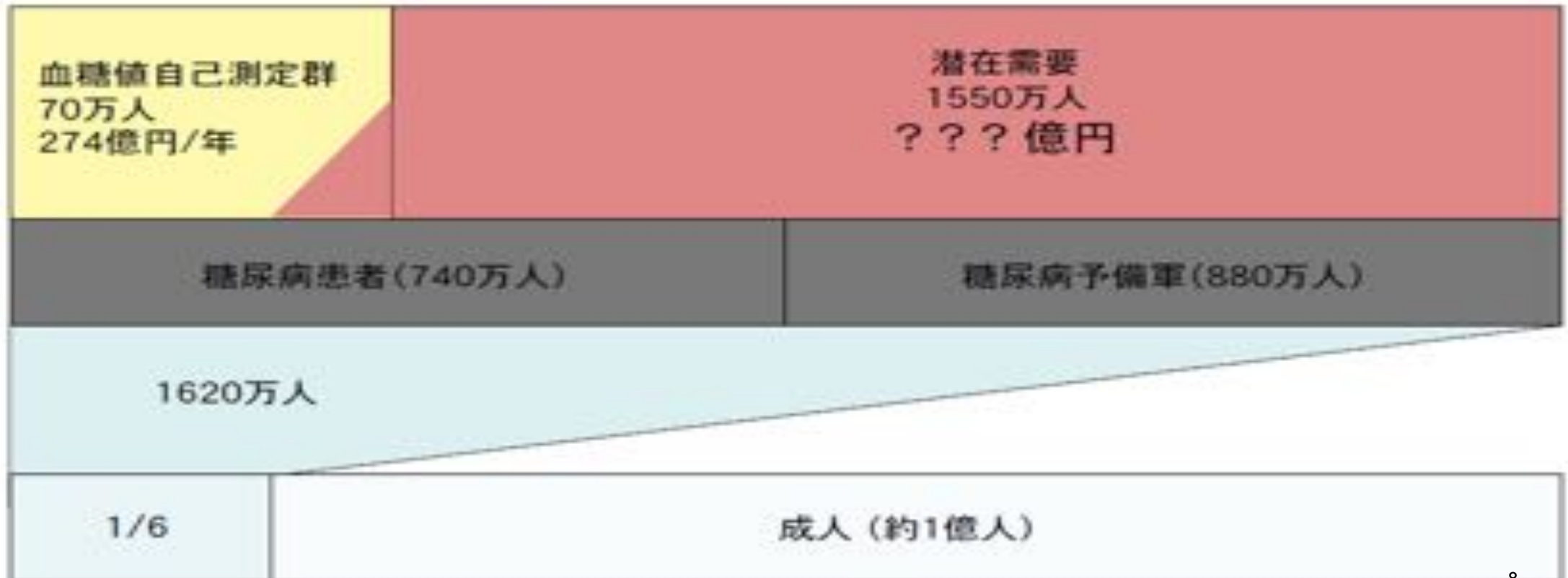
* 中間生成物を含む

想定される利用者・対象および業界

例えば代表的なバイオセンサの例に挙げると、、、

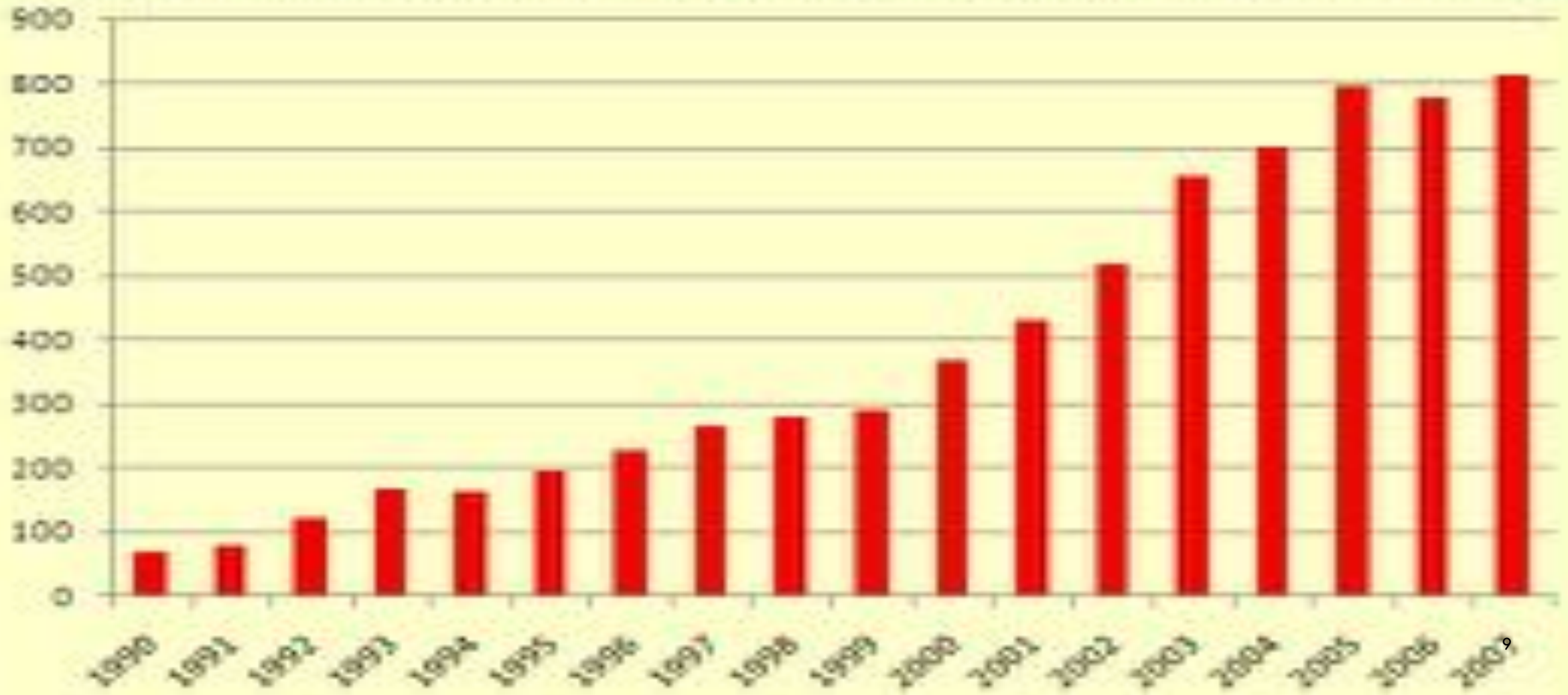
世の中のバイオセンサの約9割が血糖値センサ

国内の糖尿病関連市場



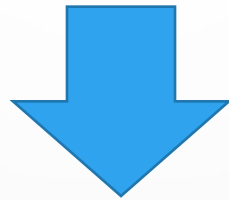
糖尿病性血管合併症への関心の高まり

1990年～2007年までの「糖尿病と内皮細胞」に関連した論文数の推移



発表内容の構成

糖尿病合併症の既存診断法、原因物



Methylglyoxalと糖尿病合併症の関連性



新規Methylglyoxal測定法、GLOX

糖尿病患者ではMethylglyoxal濃度が上昇する

著者(発表年)	測定機器	検体	健常 コントロール (nM)	糖尿病患者 (nM)	腎不全患者 (nM)
McLellan, et al (1992)	HPLC	全血	256	479	
McLellan, et al (1994)	HPLC	全血	79.8	471 (IDDM) 287 (NIDDM)	
Odani, et al (1999)	LC/MS	血漿	653	2194	1528
O'Byrne, et al (2001)	GC/MS	血漿	98		1014 (HD) 582 (PD)
Nemet, et al (2004)	HPLC	血漿	520	708	
Lapolla, et al (2005)	GC/MS	血漿	118	407	243

Methylglyoxal濃度は合併症リスクと相関性を示す

Table 2. The Correlation Between the Percentage Changes During the 5-Year Period of IMT, PWV, SBP, ACR, and eGFR and the MG and DG (Using Simple Linear Regression Analysis)

Variable				
Dependent	Independent	R^2	r	P
% change of IMT	MG	0.3932	0.6271	<0.01
	DG	0.0803	0.2835	NS
% change of PWV	MG	0.3246	0.5697	<0.01
	DG	0.001	0.0316	NS
% change of ACR	MG	0.0979	0.3129	<0.05
	DG	0.1787	0.4227	<0.01
% change of SBP	MG	0.257	0.5069	<0.01
	DG	0.0013	-0.0363	NS
% change of eGFR	MG	0.1294	0.3597	<0.01
	DG	0.0061	0.0781	NS

NS indicates not significant.

IMT : intima-media thickness

PWV : pulse wave velocity

ACR : amount of urinary albumin excretion

SBP : systolic blood pressure

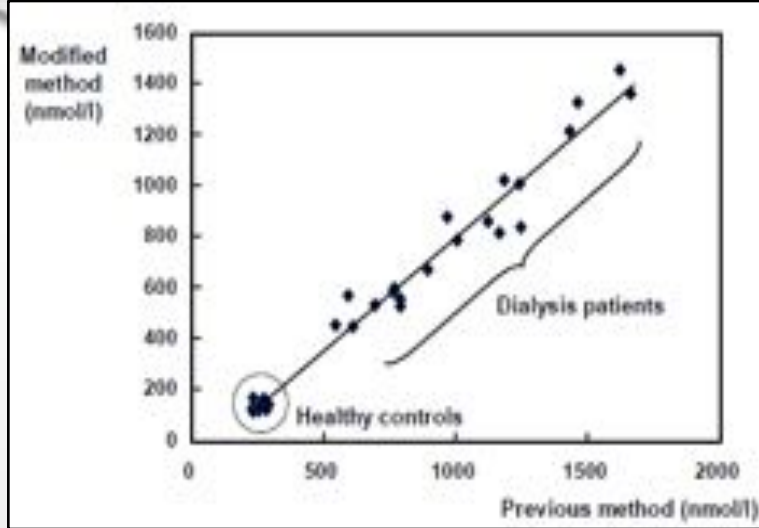
eGFR : estimated glomerular filtration rate

Table 3. A Multiple Regression Analysis, Using the Percentage Changes in IMT, PWV, ACR, SBP, and Cre Over the 5-Year Period as the Dependent or Objective Variables and the Values of MG, DG, HbA1c, TG, BML, DD, and SBP at the Baseline as the Independent Variables

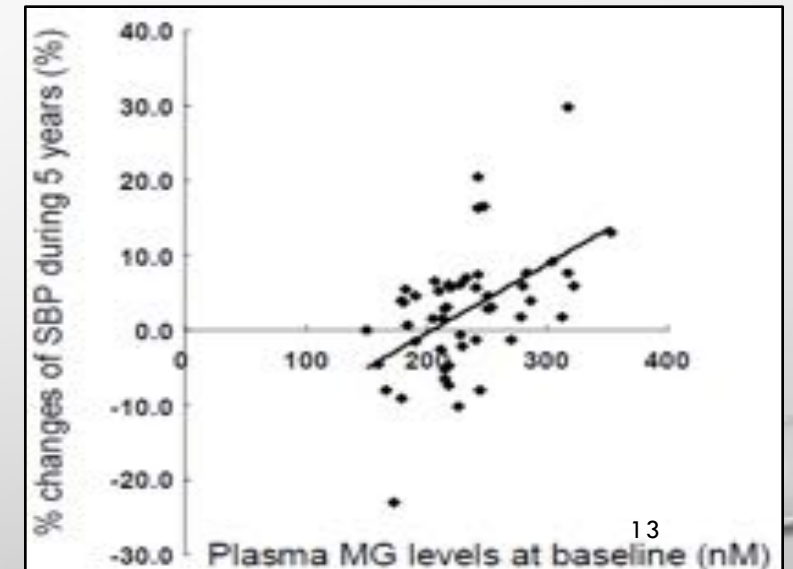
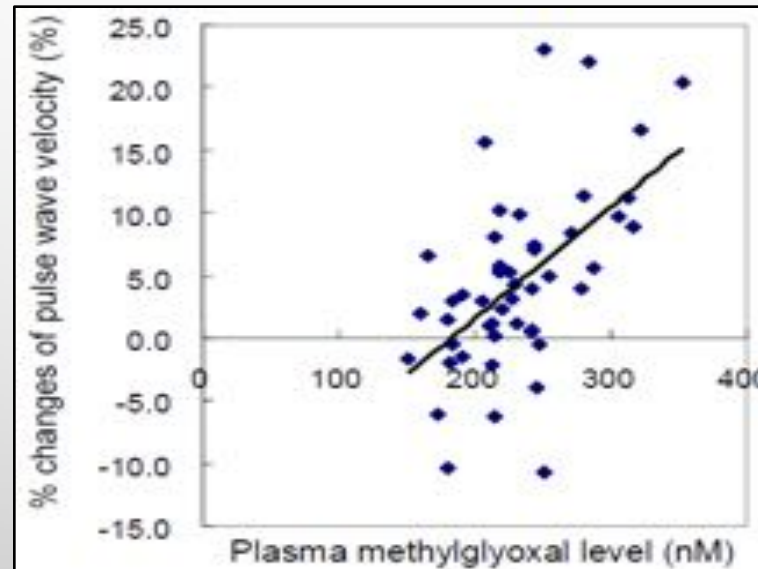
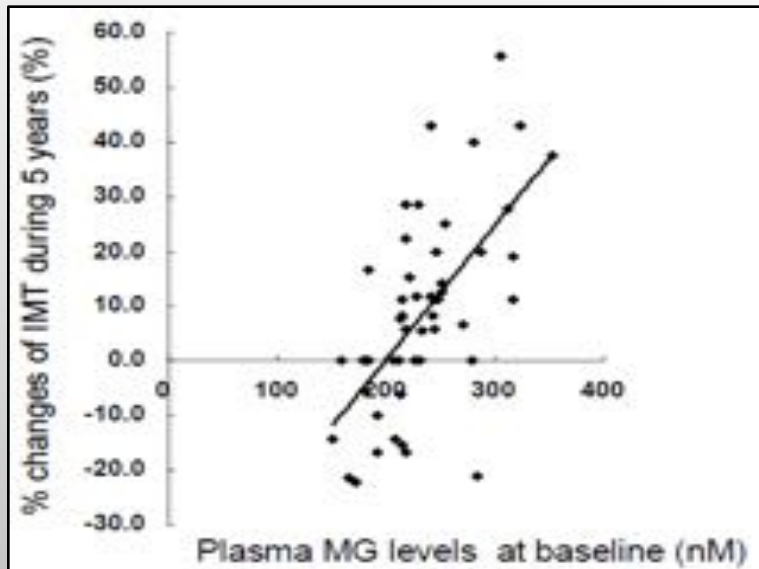
Dependent Variable	Independent Variable	MG	DG	HbA1c	TG	BML	DD	SBP
% change of IMT	β	0.21	0.02	1.16	0.04	-0.06	0.04	0.01
	95% CI	0.11	-0.01	-2.57	-0.02	-1.19	-0.48	-0.23
	P	0.31	0.04	4.88	0.11	1.07	0.55	0.25
% change of PWV	β	<0.01	0.12	0.53	0.17	0.92	0.89	0.91
	95% CI	0.08	-0.00	-0.26	0.00	-0.11	-0.23	0.05
	P	0.03	-0.01	-1.84	-0.02	-0.59	-0.45	-0.22
% change of SBP	β	0.14	0.01	1.31	0.03	0.36	-0.01	0.31
	95% CI	<0.01	0.45	0.74	0.84	0.63	0.04	0.73
	P	0.13	-0.01	-0.64	-0.02	-0.05	-0.02	-0.20
% change of ACR	β	0.09	-0.02	-2.21	-0.04	-0.53	-0.24	-0.30
	95% CI	0.17	0.01	0.94	0.01	0.43	0.20	-0.10
	P	<0.01	0.30	0.42	0.20	0.84	0.83	<0.01
% change of eGFR	β	4.03	1.37	-134.86	-1.09	3.67	-14.28	2.31
	95% CI	-0.73	0.26	-315.99	-4.12	-51.34	-39.49	-9.37
	P	8.79	2.48	46.27	1.96	58.68	10.94	13.99
% change of eGFR	β	0.10	0.02	0.14	0.48	0.89	0.26	0.69
	95% CI	-0.10	-0.01	0.03	-0.06	-0.36	-0.29	0.03
	P	-0.21	-0.03	-4.12	-0.13	-1.62	-0.87	-0.24
		0.01	0.02	4.17	0.01	0.90	0.29	0.30
	P	0.07	0.58	0.99	0.12	0.57	0.32	0.82

DD indicates diabetic duration.

Methylglyoxal濃度は心血管系の増悪によって上昇する

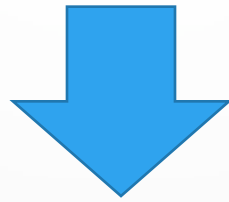


- 糖尿病患者でMethylglyoxal濃度が上昇
- 既知の心血管疾患リスクファクターと相関



発表内容の構成

糖尿病合併症の既存診断法、原因物

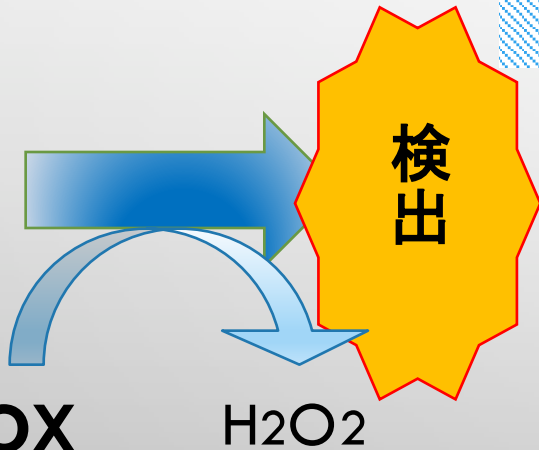
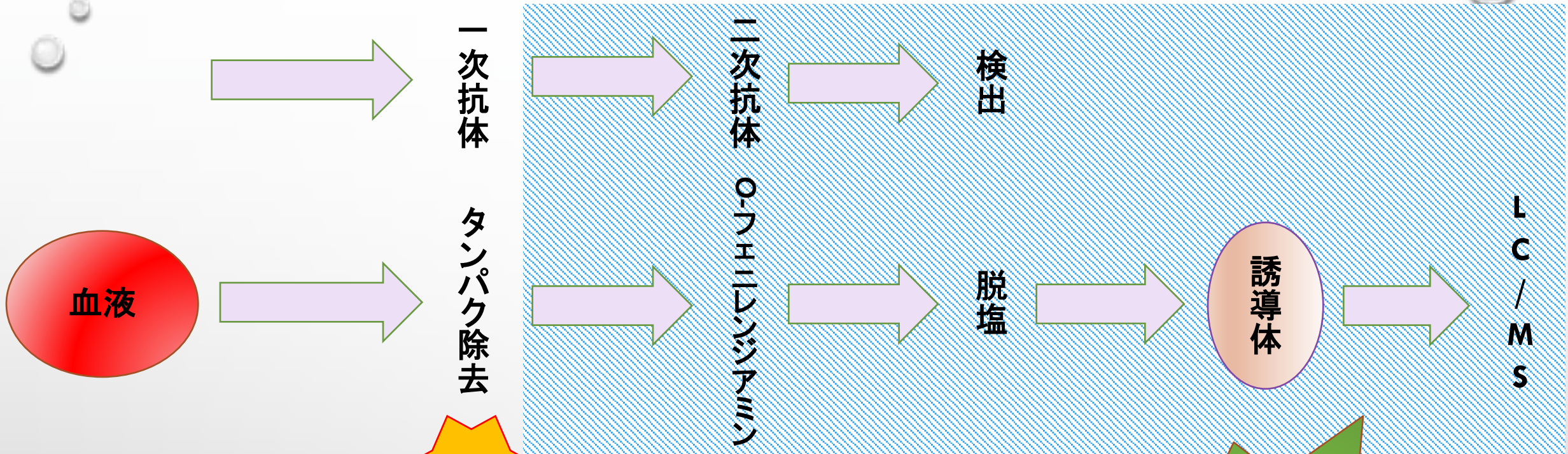


Methylglyoxalと糖尿病合併症の関連性



新規Methylglyoxal測定法、GLOX

新規Methylglyoxal測定法



新規手法の利点

1. 簡便化
2. 検査時間の短縮
3. 高額な検出器が不要
4. 低コスト

前例が無い

GLOXは糖にほとんど反応しない

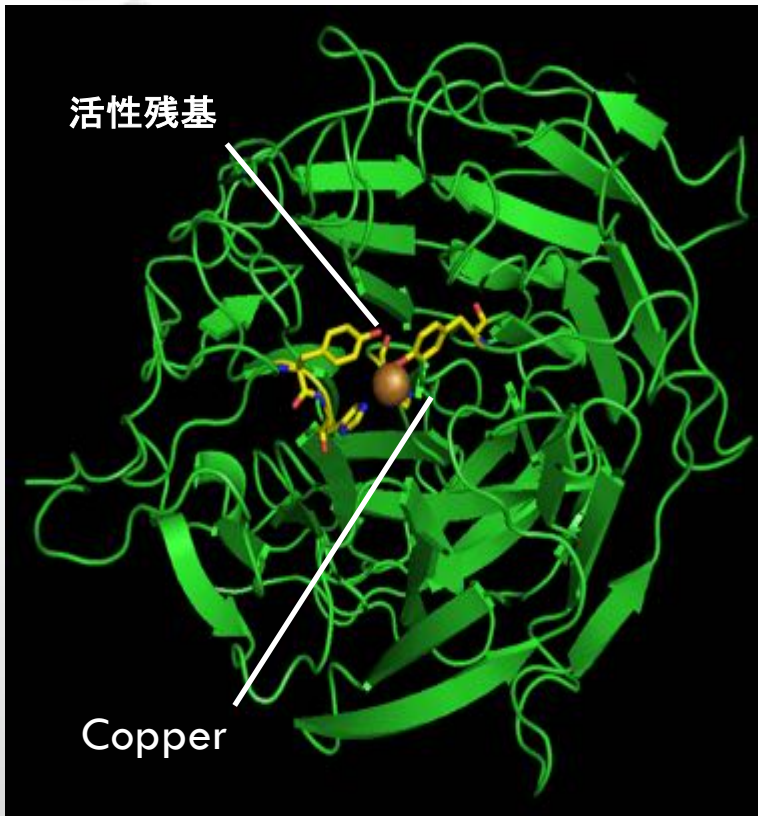
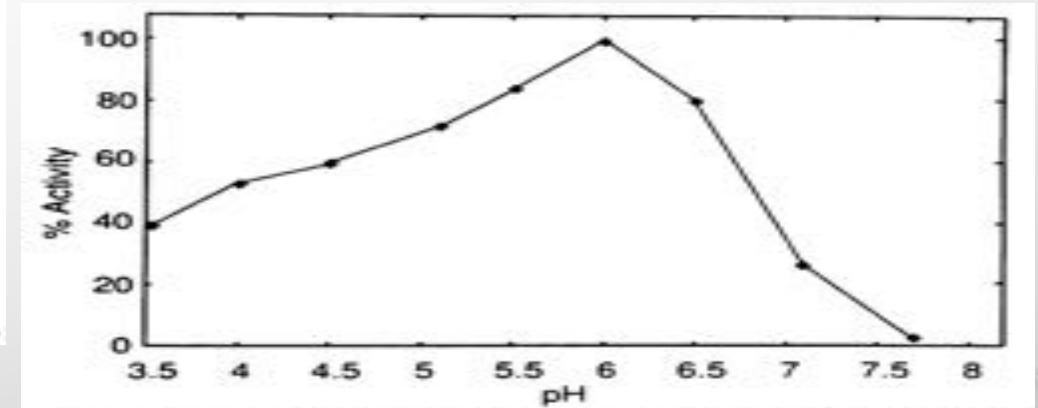


TABLE 1. Oxidase activities of crude extracellular protein

Compound	Activity (%) ^a
Methylglyoxal (CH ₃ COCHO).....	100
Glycolaldehyde (CH ₂ OHCHO).....	69
Acetaldehyde.....	61
Formaldehyde.....	54
Glyoxal (CHOCHO).....	45
Glyoxylic acid (CHOCO ₂ H).....	27
Dihydroxyacetone.....	26
DL-Glyceraldehyde.....	25
Acetol (CH ₃ COCH ₂ OH).....	4
D-Cellobiose.....	<2
D-Glucose.....	<2
D-Galactose.....	<2
D-Xylose.....	<2
Glycerol.....	<2
Hydroxypyruvic acid.....	<2
Pyruvic acid.....	<2
Ethylene glycol.....	<2
Oxalic acid.....	<2
Methanol.....	<2

Table 2. Steady-state kinetics of GLOX

Substrate	K_m , mM	k_{cat} , s ⁻¹	k_{cat}/K_m , M ⁻¹ ·s ⁻¹	% relative activity
Methylglyoxal	0.64	198	309,600	100
Glyoxylic acid	2.5	96	38,200	12.4
Glycolaldehyde	8.3	208	25,000	8.1
Acetaldehyde	8.3	148	17,800	5.7
Formaldehyde	23	254	11,000	3.6
Glyoxal	11.5	118	10,400	3.3
Dihydroxyacetone	38	188	5,000	1.6
DL-Glyceraldehyde	42	148	3,600	1.1



Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase
 Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Apr;87(8):2936-40.

Involvement of a New Enzyme, Glyoxal Oxidase, in Extracellular H₂O₂ Production by *Phanerochaete chrysosporium*
J Bacteriol. 1987 May;169(5):2195-201.

まとめ

Methylglyoxal

- 糖尿病合併症の新規バイオマーカーである。
- 酸化酵素による定量法は確立されていない。

GLOXによる新規定量法開発の利点

- 市場規模が大きい。
- 競合製品が少ない。
- 特許に繋がる可能性が高い。
- 金属酵素に対する知見の蓄積