

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年5月27日(27.05.2022)



(10) 国際公開番号

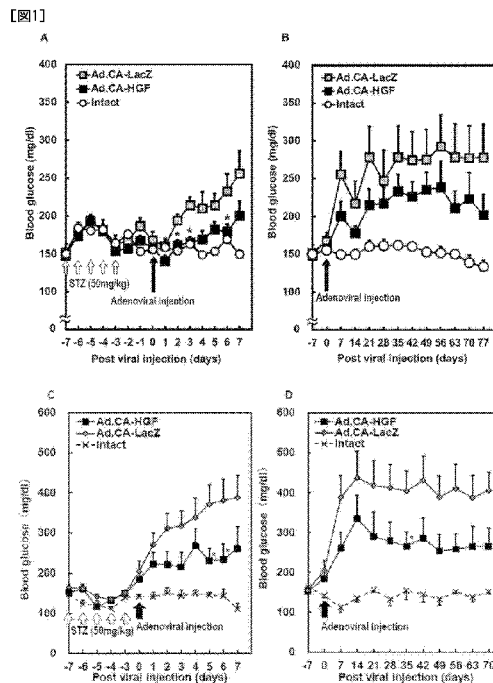
WO 2022/107853 A1

- (51) 国際特許分類:  
*A61K 48/00* (2006.01)    *A61P 3/10* (2006.01)  
*A61K 35/76* (2015.01)    *A61P 43/00* (2006.01)  
*A61K 35/761* (2015.01)    *C12N 15/12* (2006.01)  
*A61K 38/22* (2006.01)    *C12N 15/86* (2006.01)  
*A61P 1/18* (2006.01)    *C12N 15/861* (2006.01)
- (21) 国際出願番号:                    PCT/JP2021/042463
- (22) 国際出願日:                    2021年11月18日(18.11.2021)
- (25) 国際出願の言語:                    日本語
- (26) 国際公開の言語:                    日本語
- (30) 優先権データ:  
 特願 2020-192844    2020年11月19日(19.11.2020) JP  
 特願 2021-145795    2021年9月7日(07.09.2021) JP

- (71) 出願人: 国立大学法人 鹿児島大学(KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 Kagoshima (JP).
- (72) 発明者: 小 賤 健 一 郎 (KOSAI, Ken-ichiro); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人 鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 松田 恵理子(MATSUDA, Eriko); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人 鹿児島大学内 Kagoshima (JP).
- (74) 代理人: 高 島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(54) Title: LOW-DOSE HEPATOCYTE GROWTH FACTOR GENE THERAPY FOR DIABETES

(54) 発明の名称: 糖尿病に対する低用量の肝細胞増殖因子遺伝子治療



(57) Abstract: The present invention provides an agent for protecting and regenerating pancreatic beta cells in a mammal having diabetes, the agent containing a recombinant viral vector that expresses hepatocyte growth factor (HGF), wherein the agent is characterized by being administered in a dose of  $10^{10}$ - $10^{12}$  virus particles (vp)/kg body weight, and by the virus vector including a nucleic acid that encodes HGF downstream of a promoter having transcription activity capable of yielding a therapeutically effective HGF level in the blood at said dose.



WO 2022/107853 A1

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

---

(57) 要約: 本発明は、肝細胞増殖因子 (HGF) を発現する組換えウイルスベクターを含有してなる、糖尿病を有する哺乳動物における膵β細胞の保護・再生剤であって、 $10^{10} \sim 10^{12}$  ウイルス粒子 (vp) / kg 体重の用量で投与され、かつ該ウイルスベクターが、当該用量において、治療上有効な血中HGFレベルを与え得る転写活性を有するプロモーターの下流にHGFをコードする核酸を含むことを特徴とする、剤を提供する。

## 明 細 書

### 発明の名称：糖尿病に対する低用量の肝細胞増殖因子遺伝子治療 技術分野

[0001] 本発明は、安全性と治療効果とを両立した糖尿病に対する遺伝子治療剤に関する。より詳細には、本発明は、治療上有効な量の肝細胞増殖因子（HGF）を発現させ得るプロモーターの下流にHGFをコードする核酸を含むウイルスベクターを含有し、かつ低用量で投与されることを特徴とする、実質的にウイルスベクターによる有害事象を発現しない糖尿病治療剤に関する。

### 背景技術

[0002] 国際糖尿病連合（IDF）の報告によると、2019年現在、世界の糖尿病患者数は4億6300万人にのぼり、このまま増加し続けると、2045年には7億人に達すると予測されている。糖尿病全体の90%を占める2型糖尿病（T2D）は、遺伝的素因と環境要因（生活習慣）とによってインスリン感受性が低下すると、膵臓の $\beta$ 細胞は代償性のインスリン過剰分泌によりインスリンの作用不足を補おうとするが、その状態が長く続くと $\beta$ 細胞の疲弊を招き、十分量のインスリンを分泌できなくなって高血糖状態となる疾患である。

[0003] 一方、1型糖尿病（T1D）は、自己免疫機序により膵 $\beta$ 細胞が破壊されることによりインスリンの分泌が枯渇し、高血糖状態となる疾患である。T1Dは若年で発症するが、その機序の詳細は未だに不明である。

T1D患者は血糖を管理するために、生涯に亘ってインスリンを自己注射する必要がある。しかし、厳格なインスリン療法を行っても血糖コントロールは難しく、高血糖と重症低血糖を繰り返すため、合併症の進行予防が困難である。よってT1Dを根治することができる革新的な治療方法が求められている。

[0004] T1Dを根治する治療方法として、失われた臓器機能を再生・再建する再生医療への期待が高まっている。その一つは膵島移植による $\beta$ 細胞の補充療

法であり、この治療方法が糖代謝の改善に有効であることが報告されている。しかし、膵島移植後にT1D患者は免疫抑制剤を使用しなければならず、更に膵島移植のドナーは不足しているため、この技術の実際の適用は限定されている。

[0005] そこで、T1Dに対する別の再生医療のアプローチとして、*in vivo*遺伝子治療により体内で直接的に、残存する患者自身の $\beta$ 細胞を「保護する（抗細胞死誘導）、及び／又は増殖（再生）させる（再生治癒誘導）」（以下、包括して「『保護・再生』する」という場合がある）試みがなされている。例えば、T1Dに対する治療遺伝子として、肝細胞増殖因子（HGF）を用いた研究がいくつか報告されている（非特許文献1-3）。HGFは最初、強力な肝細胞分裂促進因子として同定されたが、現在では多機能のサイトカインであることが知られており、前臨床及び臨床研究において、多数の疾患に対して細胞保護、抗線維化、及び再生を誘導するなどの治療効果を発揮している。膵臓においても、HGFは内皮細胞及び間葉細胞で発現し、またHGFの受容体であるc-Metも膵前駆細胞、膵島細胞及び膵管細胞にも局在していることが知られている。

[0006] 非特許文献1には、HGFをコードする核酸を含むプラスミド（20 $\mu$ g）を糖尿病発症前のマウスに投与して、インスリン分泌量を維持したことが開示されている。非特許文献2には、HGFをコードする核酸を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを高用量（3.0 $\times$ 10<sup>11</sup>ベクターゲノム（vg）；kg体重あたりに換算すると約1.5 $\times$ 10<sup>13</sup>vg）で糖尿病発症前のマウスに膵管から投与し、血糖の上昇を抑制したことが開示されている。しかしながら、いずれの場合も、T1Dの発症「前」にHGF発現ベクターを投与しているために、既に多くの $\beta$ 細胞が破壊されているT1D患者への臨床応用の有用性を示していない。さらに後者の膵管内投与は、遺伝子導入が膵臓にほぼ限局されるが侵襲性が高く、ヒト臨床における投与手段として現実的ではない。

[0007] 非特許文献3には、T1D発症後のマウスにHGFを発現するアデノウイ

ルス (A d) ベクターを高用量 ( $1.0 \times 10^{11}$  ウイルス粒子 (v p) ; k g 体重あたりに換算すると約  $5 \times 10^{12}$  v p) で尾静脈投与したところ、部分的な奏功がもたらされたことが報告されている。

[0008] しかし、1999年に、先天代謝疾患であるオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対するペンシルベニア大学での臨床試験において、 $6 \times 10^{11}$  v p / k g 体重 (総量  $3.8 \times 10^{13}$  v p) のA dベクターの肝動脈投与により惹起された全身性の炎症反応による死亡事故が発生した (非特許文献4)。そのため、対象疾患に関わらず、血管からA dを *in vivo* で全身投与する遺伝子治療においては、高用量のA dベクターを臨床適用することは、これ以降はなされていない。このような危険性はA dに限ってのことと考えられたため、その後から現在まで、先天性疾患などへの *in vivo* 遺伝子治療 (血管からの全身投与) の臨床応用で一般的に使用されるようになったのは、AAVベクターである。

[0009] ところが、最近 (2020年6月23日) になって、これまで長期に亘り非病原性で安全性が高いと信じられていたAAVベクターにおいても、先天性ミオパチーに対する遺伝子治療の臨床試験において、高用量 ( $3 \times 10^{14}$  v g / k g) のAAVベクターを投与された患者について、重篤な有害事象、特に重篤な肝障害による死亡が3例報告された (非特許文献5、非特許文献6)。前述のとおり、AAVベクターは現在、*in vivo* 遺伝子治療 (血管からの全身投与) の臨床応用では最も汎用されるベクターとなっている。しかし、この報告により、ベクターの種類に関係なく、高用量のベクターの *in vivo* での血管からの全身投与は危険な肝障害を含む重大な有害事象を引き起こす可能性があることが明らかになったばかりであり、高用量ベクターの *in vivo* 遺伝子治療の臨床応用が中断されて見直しがされている。

このように、AAVベクターによる死亡事故は、遺伝子治療の分野において世界的・歴史的な大事件となっている。

## 先行技術文献

## 非特許文献

[0010] 非特許文献1 : Dai C, Li Y, Yang J et al. Hepatocyte growth factor preserves beta cell mass and mitigates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Biol Chem* 2003; 278: 27080-27087.

非特許文献2 : Jimenez V, Ayuso E, Mallol C et al. In vivo genetic engineering of murine pancreatic beta cells mediated by single-stranded adenovirus-associated viral vectors of serotypes 6, 8 and 9. *Diabetologia* 2011; 54: 1075-1086.

非特許文献3 : Park MK, Kim DK, Lee HJ. Adenoviral mediated hepatocyte growth factor gene attenuates hyperglycemia and beta cell destruction in overt diabetic mice. *Exp Mol Med* 2003; 35: 494-500.

非特許文献4 : Raper SE, Chirmule N, Lee FS et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 148-158.

非特許文献5 : Audentes Therapeutics. Letter to the MTM disease community. <https://myotubulartrust.org/audentes-therapeutics-letter-23-june-2020/>.

非特許文献6 : Wilson JM, Flotte TR. Moving Forward After Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy. *Hum Gene Ther* 2020; 31: 695-696.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0011] 従って、本発明の目的は、安全性と治療効果とを両立した、T1Dをはじめとする糖尿病に対する遺伝子治療手段を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0012] 上記の課題を解決すべく、本発明者らはまず、治療遺伝子としてHGF遺

伝子に着目した。これまで報告されているT1Dに対するHGF遺伝子治療では、いずれもサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターの転写制御下でHGFを発現させており（上記非特許文献1-3）、ウイルスベクターの場合、約 $5 \times 10^{12}$ ないし約 $1.5 \times 10^{13}$  vp/kg体重の高用量で投与されている。本発明者らは、*in vivo*遺伝子治療の安全性を担保すべくウイルスベクターの低用量化を実現しつつ、同時に所望の治療効果を得るためには、治療遺伝子の発現効率を増大させる必要があると考えた。そこで、種々の細胞種においてCMVプロモーターや他の汎用されるユビキタスプロモーターよりもさらに強力な転写活性を発揮する可能性があることが報告されているCAプロモーター（CMV前初期エンハンサーと改変ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターとのハイブリッドプロモーター；「CAGプロモーター」とも呼ばれるが、本明細書においては「CAプロモーター」と統一表記する）の転写制御下でHGFを発現するAdベクターを作製し、T1D発症後のモデルマウスに、既報より1~2桁低い用量（ $3 \times 10^8$  pfu； $10^9 \sim 10^{10}$  vpに相当）で尾静脈投与した。その結果、HGF治療群では、投与後約1週間、非治療群に比べて有意に血糖上昇が抑制され、その後も長期間（投与後少なくとも11週間）抑制傾向が維持された。また、非治療群ではT1Dの急性期に残存する $\beta$ 細胞からの代償性のインスリン過剰分泌が見られたが、HGF治療群では正常なインスリン分泌が維持された。IPGTTにおいても、投与後16及び60日目において、血糖上昇は有意に抑制され、インスリン分泌レベルも有意に維持された。後述の実施例では遺伝子導入に一過性発現（通常2~3週間）のAdベクターを用いたにもかかわらず、驚くべきことに、予測される発現期間をはるかに超えて高血糖抑制効果及び耐糖能改善効果を持続させることに成功した。

これらの結果は、低用量のウイルスベクター投与によっても、HGFによる $\beta$ 細胞の保護・再生効果が認められ、しかも当該効果が予想をはるかに超えて長期間持続したことを示すものである。一方、ウイルスベクター投与による肝障害は認められず、その後の経過観察期間においても食欲・運動等に

変化はなく、有害事象は認められなかった。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、治療上有効な量のHGFを発現させ得るプロモーターの転写制御下でHGFを発現するウイルスベクターを、既存の用量よりも低用量で投与することにより、安全かつ有効にT1Dを治療し得ることに成功し、本発明を完成するに至った。

[0013] すなわち、本発明は以下の通りである。

[1]

肝細胞増殖因子（HGF）を発現する組換えウイルスベクターを含有してなる、糖尿病を有する哺乳動物における膵β細胞の保護・再生剤であって、 $10^{10} \sim 10^{12}$ ウイルス粒子（vp）/kg体重の用量で投与され、かつ該ウイルスベクターが、当該用量において、治療上有効な血中HGFレベルを与え得る転写活性を有するプロモーターの下流にHGFをコードする核酸を含むことを特徴とする、剤。

[2]

前記ウイルスベクターがアデノウイルス（Ad）ベクター又はアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、[1]に記載の剤。

[3]

単回投与又は少なくとも60日間の投与間隔で複数回投与される、[2]に記載の剤。

[4]

前記プロモーターがCAプロモーターである、[1]～[3]のいずれかに記載の剤。

[5]

糖尿病が1型糖尿病である、[1]～[4]のいずれかに記載の剤。

[6]

哺乳動物がヒトである、[1]～[5]のいずれかに記載の剤。

[7]

全身投与により投与される、[1]～[6]のいずれかに記載の剤。

[ 8 ]

全身投与が静脈内投与である、[ 7 ] に記載の剤。

[ 9 ]

静脈内投与が末梢の静脈からの投与である、[ 8 ] に記載の剤。

[ 1 0 ]

HGFを発現する組換えウイルスベクターを、糖尿病を有する哺乳動物に投与することを含む、該哺乳動物における膵β細胞の保護・再生方法であって、該ウイルスベクターが、 $10^{10} \sim 10^{12}$ ウイルス粒子(v p) / kg体重の用量で投与され、かつ当該用量において、治療上有効な血中HGFレベルを与え得る転写活性を有するプロモーターの下流にHGFをコードする核酸を含むものである、方法。

### 発明の効果

[0014] 本発明によれば、低用量の投与であっても長期間にわたって所望の膵β細胞の保護・再生効果を奏し得るので、安全性を担保した上で、T1Dをはじめとするインスリン投与が必要な糖尿病に対する、HGFを用いたQOLの高いin vivo遺伝子治療が可能となり、当該治療のヒト臨床への応用の実現可能性を高めることができる。

### 図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1A及び1Cは、独立した2回の実験において、ストレプトゾトシン(STZ)投与によりT1Dを発症したマウスに、アデノウイルスベクターを尾静脈注射した際の、-7日目から7日目の間の血糖値の毎日の変化を示す。なおアデノウイルスベクターを投与した日が0日目である。図1B及び1Dは、アデノウイルスベクターを投与した前記T1Dモデルマウス(図1Bが図1A、図1Dが図1Cにそれぞれ対応する)における、-7日目から77日目(又は70日目)の間の毎週の血糖値の変化を示す。図中、「Ad, CA-HGF」はCAプロモーターの制御下でHGF遺伝子を発現する本発明のウイルスベクター、「Ad, CA-LacZ」はHGFの代わりにβ-ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)が挿入された対照のウイルスベクター

一、「Intact」は如何なる処置も受けていない正常マウスのデータを示す。各図の横軸はウイルスベクター投与後の日数（日）を示し、縦軸は血糖値（mg/dl）を示す。\*： $p < 0.05$

[図2]図2は、図1と同じマウス（灰色バー：Ad, CA-LacZを投与したT1Dモデルマウス；黒色バー：Ad, CA-HGFを投与したT1Dモデルマウス；白色バー：STZ投与もウイルスベクター投与も受けていない正常マウス）において、7日目、14日目、21日目に、血漿インスリン濃度を測定した結果を示すグラフである。縦軸は血漿インスリンレベル（ng/ml）を示す。\*： $p < 0.05$

[図3]図3は、図1と同じマウス（各バーは図2と同義である）において、7日目、14日目、21日目に血漿ASTのレベルを測定した結果を示すグラフである。縦軸は血漿ASTレベル（IU/L）を示す。

[図4]図1と同じマウス（Adベクター投与から16日目）におけるIPGTTの結果を示す。グルコース（2g/kg体重）投与時、投与から30、60及び120分後に採血し、血糖値と血漿インスリンレベルを測定した。図4Aはグルコース投与後の血糖値（mg/dl）、図4Bはグルコース投与後の血漿インスリンレベル（ng/ml）の経時的変化を示す。\*： $p < 0.05$ （Ad, CA-LacZに対して）；#： $p < 0.05$ （Intactに対して）；n. s.：有意差なし

[図5]図1と同じマウス（Adベクター投与から60日目）におけるIPGTTの結果を示す。グルコース（2g/kg体重）投与時、投与から30、60及び120分後に採血し、血糖値と血漿インスリンレベルを測定した。図5Aはグルコース投与後の血糖値（mg/dl）、図5Bはグルコース投与後の血漿インスリンレベル（ng/ml）の経時的変化を示す。\*： $p < 0.05$ （Ad, CA-LacZに対して）；#： $p < 0.05$ （Intactに対して）；n. s.：有意差なし

### 発明を実施するための形態

[0016] 本発明は、安全かつ有効な、HGFを発現する組換えウイルスベクターを

含有してなる、糖尿病を有する哺乳動物における膵β細胞の保護・再生剤（「以下、本発明のβ細胞保護・再生剤」ともいう）を提供する。当該β細胞保護・再生剤は、 $10^{10}$ ～ $10^{12}$ ウイルス粒子（vp）／kg体重の用量で投与され、かつ該ウイルスベクターが、当該用量において、治療上有効な血中HGFレベルを与え得る転写活性を有するプロモーターの下流にHGFをコードする核酸を含むことを特徴とする。

[0017] 本明細書において「膵β細胞の保護・再生」とは、β細胞からの代償性のインスリン過剰分泌を生じることなく、正常なインスリン分泌を維持しつつ、治療的処置を行わない対照と比較して、少なくとも急性期の高血糖が有意に抑制され、その後も長期間（例えば、60日間以上、好ましくは75日間以上、より好ましくは90日間以上、さらに好ましくは120日間以上）にわたって抑制傾向が維持される程度に、残存するβ細胞の機能が保存される、及び／又はβ細胞が増殖することを意味する。即ち、本発明における「膵β細胞の保護・再生」は必然的に「高血糖の抑制」を伴うので、「本発明のβ細胞保護・再生剤」は、「高血糖抑制剤」でもあり得る。また、高血糖を抑制し血糖をコントロールすることは、糖尿病の治療、合併症への進展抑制において最も重要であるので、「本発明のβ細胞保護・再生剤」は「糖尿病の治療剤」でもあり得る。

[0018] 上記非特許文献3によると、CMVプロモーターの制御下でHGFを発現するAdベクターの高用量投与により、高血糖は抑制されたが、血中インスリン／グルコース比は有意に上昇しており、著者らは代償性のインスリン過剰分泌が生じていることが示唆されると考察している。従って、代償性のインスリン過剰分泌を誘発することなく、正常なインスリン分泌を維持しつつ高血糖を抑制し得る本発明のβ細胞保護・再生剤は、インスリン過剰分泌によるβ細胞の疲弊、ひいてはβ細胞の機能不全を生じるリスクが低減される等の有利な効果を奏する。

[0019] 本発明のβ細胞保護・再生剤の有効成分であるHGF発現組換えウイルスベクターに使用されるウイルスベクターとしては、一般に遺伝子治療に用い

られるものであれば特に制限はなく、例えば、アデノウイルス（A d）ベクター、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、狂犬病ウイルスベクター、センダイウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター等を使用することができる。染色体組込みが低頻度で挿入変異のリスクがない、非分裂細胞にも導入可能である、導入遺伝子の中長期的な発現が可能である等の観点から、A dベクター又はA A Vベクターを使用することが好ましい。

[0020] A dベクターの導入遺伝子発現期間（通常2～3週間）はA A Vベクターや染色体組込み型ベクターに比べると短い、H G Fによる膵β細胞保護効果は遺伝子発現期間をはるかに超えて（少なくとも60日以上、好ましくは75日以上、より好ましくは90日以上、さらに好ましくは120日以上）持続するので、H G Fの長期発現による発がんリスク等の副作用のリスクを軽減あるいは回避し得る点で、むしろ有利であり得る。また、A A Vベクターは搭載できる遺伝子サイズが4.7 kbと小さいが、H G Fのコード配列（C D S）は約2.2 kbであり、プロモーターやターミネーター等を加えた発現カセット全体でも3～4 kb程度であるから、使用に問題はない。

[0021] A dベクターは肝臓に集積することが知られているが、H G Fは他臓器の細胞に導入され発現しても、細胞外に分泌されて血流により膵臓に送達され得る。また、A A Vベクターは血清型により組織指向性が異なり、膵臓への指向性を有する血清型としては、例えば、6型、8型、9型等が挙げられる。しかし、ユビキタスなプロモーターを用いれば、他臓器の細胞に導入され発現したH G Fは、やはり血流により膵臓に送達され得るので、用いる血清型に特に制限はない。むしろ、膵臓にウイルスベクターが集積すると、ウイルスカプシド抗原特異的なキラーT細胞によりβ細胞が攻撃されるおそれがあるので、他臓器の細胞でH G Fを発現させることが好ましい場合がある。

[0022] 本発明で使用されるH G F発現組換えウイルスベクターは、 $10^{10} \sim 10^{12}$  v p / k g 体重の用量で投与された際に、治療上有効な血中H G Fレベルを与え得る転写活性を有するプロモーターの下流にH G Fをコードする核酸を

含むことを特徴とする。ここで「治療上有効な血中HGFレベル」とは、前記「膵β細胞の保護・再生」効果を奏するのに十分な血中HGFレベルを意味する。該血中HGFレベルは、糖尿病を有する哺乳動物において膵β細胞の保護・再生効果を奏する濃度範囲である限り特に限定されないが、例えば、ピーク時の血中HGFレベルが2 ng/ml以上、好ましくは2~5 ng/mlであり、投与後1週間の平均血中HGFレベルが0.6 ng/ml以上、好ましくは1 ng/ml以上であり得る。

[0023] 「治療上有効な血中HGFレベルを与え得る転写活性を有するプロモーター」は、 $10^{10} \sim 10^{12}$  vp/kg体重の用量で投与された際に、上記の血中HGFレベルを達成し得る程度の転写活性を有するものであれば特に制限はないが、種々の細胞種において、また、使用するウイルスベクターの種類に応じて、糖尿病に対する既存のHGF遺伝子治療研究で用いられているCMVプロモーターよりも強力な転写活性を有するプロモーターを用いることができる。そのような高活性プロモーターとして、CAプロモーターや、それと同等の転写活性を有するプロモーター、例えば、ポリペプチド鎖伸長因子1 $\alpha$ 1 (EF1A) プロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子1 $\alpha$ 1ショート型 (EFS) プロモーター、CBhプロモーター (CMV前初期エンハンサーと、CAプロモーターとは異なる改変ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターとのハイブリッドプロモーター)、脾限局巢形成ウイルス (SFFV) プロモーター、マウス幹細胞ウイルス (MSCV) プロモーター、シミアンウイルス40 (SV40) エンハンサー/初期プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーター、ユビキチンC (UBC) プロモーター等のユビキタスなプロモーターを挙げることができる。また、組織指向性の高いウイルスベクターを使用する場合や局所投与の場合には、当該標的臓器の組織又は細胞特異的に高発現するプロモーター (例えば、肝臓におけるアルブミンプロモーター、 $\alpha$ -フェトプロテインプロモーター、チロキシン結合グロブリンプロモーター等、膵β細胞におけるインスリンプロモーター、Pdx1プロモーター、Ins2プロモーター等、筋肉におけるミオゲニ

ンプロモーター、骨格筋アクチン $\alpha$ 1 (ACTA1) プロモーター、MHC K7プロモーター、SM22aプロモーター等が挙げられるが、それらに限定されず、そこから分泌発現したHGFが血流により脾臓に送達され得る任意の臓器の組織又は細胞特異的なプロモーターが包含される) を用いることもできる。使用しようとするプロモーターが治療上有効な血中HGFレベルを与え得る転写活性を有することは、例えば、該プロモーターの下流にHGFをコードする核酸を含むウイルスベクターを、 $10^{10} \sim 10^{12}$  vp/kg体重の用量でマウス等の実験動物に投与し、投与後に経時的に採取した血液中のHGFレベルをELISA等により測定して、上記の治療上有効なレベルにあることを調べることにより確認することができる。より簡便には、例えば、HGFの代わりにGFP等のレポーター遺伝子を挿入したウイルスベクターをヒト培養細胞のパネルに感染させ、レポーター活性を指標に、CMVプロモーターに対する転写活性を測定することによっても行うことができる。

[0024] 特に好ましい実施態様において、HGFの発現を駆動するプロモーターとして、CAプロモーターが挙げられる。本発明に用いられるCAプロモーターは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列からなる核酸、又は当該核酸の相補鎖配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズし得る核酸であって、配列番号1で表されるヌクレオチド配列からなる核酸と同等もしくはそれ以上の転写活性を有する核酸を包含する。このような核酸としては、例えば、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約97%以上、最も好ましくは約98%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含有する核酸などが挙げられる。本明細書におけるヌクレオチド配列の相同性は、例えば、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; フィルタリング=0N; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

[0025] ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning, 2nd ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ストリンジェントな条件としては、(1) 洗浄に低イオン強度及び高温、例えば、50°Cで0.015 M 塩化ナトリウム/0.0015 M クエン酸ナトリウム/0.1% 硫酸ドデシルナトリウムを使用し、(2) ホルムアミドのような変性剤、例えば、0.1% ウシ血清アルブミン/0.1% フィコール/0.1% ポリビニルピロリドン/750 mM 塩化ナトリウム、75 mM クエン酸ナトリウムを含む50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) とともに、50% (v/v) ホルムアミドを42°Cで使用することを特徴とする反応条件が例示される。あるいは、ストリンジェントな条件は、50% ホルムアミド、5xSSC (0.75 M NaCl、0.075 M クエン酸ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1% ピロリン酸ナトリウム、5xデンハート溶液、超音波処理鮭精子DNA (50  $\mu$ g/ml)、0.1% SDS、及び10% 硫酸デキストランを42°Cで使用し、0.2xSSC及び50% ホルムアルデヒドで55°Cで洗浄し、続いて55°CでEDTAを含有する0.1xSSCからなる高ストリンジェント洗浄を行うものであってもよい。当業者は、プローブ長等のファクターに応じて、ハイブリダイゼーション反応および/または洗浄時の温度、緩衝液のイオン強度等を適宜調節することにより、容易に所望のストリンジェンシーを実現することができる。

[0026] 本発明に使用される「HGFをコードする核酸」としては、配列番号2 (GenBankにアクセッション番号: NM\_000601として登録されているヒトHGFのmRNA配列の77番目から2263番目のヌクレオチド配列(CDS)に相当)で表されるヌクレオチド配列、又はその相補鎖配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含み、HGFと同等の活性(例、膵 $\beta$ 細胞保護・再生活性)を有するタンパク

質をコードする核酸が挙げられる。

配列番号2で表されるヌクレオチド配列の相補鎖配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸としては、例えば、配列番号2で表されるヌクレオチド配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含有する核酸などが挙げられる。ここで「ストリンジントな条件」とは前記プロモーターの場合と同義である。また、当該核酸は、配列番号3で表されるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、さらに好ましくは約97%以上、特に好ましくは約98%以上の同一性を有するアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列を含むタンパク質が配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同等の活性（例、膵β細胞保護・再生活性）を有するようなアミノ酸配列をコードするものである。

[0027] HGFをコードする核酸は、配列番号2で表されるヌクレオチド配列からなる核酸の非ヒト哺乳動物におけるオルソログであってもよい。例えば、投与対象である哺乳動物由来のHGFをコードする核酸を用いることが望ましい。本発明のβ細胞保護・再生剤の投与対象となる哺乳動物は、糖尿病を有する限り特に限定されず、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル等が挙げられるが、好ましくはヒトである。よって、好ましい実施態様において、HGFをコードする核酸は、ヒトHGF（即ち、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質）をコードする核酸である。

[0028] HGFをコードする核酸を、例えばHGF遺伝子のCDS領域のヌクレオチド配列の一部を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、又は適当な発現ベクターに組み込んだDNAを、HGF遺伝子のCDS領域のヌクレオチド配列を含むDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、Molecular Cloning, 2nd ed.（前述）に記載の方法などに従って行なうこ

とができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

[0029] DNAのヌクレオチド配列は、公知のキット、例えば、Mutant™-super Express Km（宝酒造（株））、Mutant™-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。

[0030] クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、又は所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGA又はTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。

[0031] HGFをコードする核酸を含む発現ベクターは、例えば、HGF遺伝子のCDS領域をコードする核酸から目的とする断片を切り出し、該断片を上記で述べた発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。該発現ベクターは、好ましくは、HGFをコードする核酸の下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有する。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子（テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等）をさらに含有することもできる。

[0032] 本発明のHGF発現組換えウイルスベクターの作製は、従来の遺伝子工学技術、細胞培養技術、ウイルス作製技術を利用して行うことができる [例えば、Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al. eds. (1994) John Wiley & Sons, Inc.; Molecular Cl

oning (A Laboratory Manual), 3rd ed. Volumes 1-3, Joseph Sambrook & David W. Russel eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, New York) (2001); Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Technique, R. Freshney eds., 2nd ed. (1987), Wiley-Liss; Frank L. Graham, Manipulation of adenovirus vector, Chapter 11. p109-p128; E. J. Murray eds., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols (1991); Chen, S-H. et al., Combination gene therapy for liver metastases of colon carcinoma in vivo., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92, 2477-2581 等]。

[0033] 本発明の $\beta$ 細胞保護・再生剤は、ウイルスベクターによる有害事象が実質的に生じない程度の低用量で投与しても、正常なインスリン分泌を維持しつつ高血糖を長期間にわたって抑制し得るので、T1Dや、膵 $\beta$ 細胞が破壊されインスリン投与を必要とするその他の糖尿病（例えば、インスリン抵抗性が進行して代償性のインスリン過剰分泌により $\beta$ 細胞が疲弊し、インスリン分泌障害、ひいては $\beta$ 細胞死をきたしたT2D等）の治療、合併症への進展抑制に使用することができる。

[0034] 本発明の $\beta$ 細胞保護・再生剤は、本発明のHGF発現組換えウイルスベクターを原体のまま用いてもよいが、必要に応じて薬理的に許容し得る担体とともに混合して注射剤などの種々の製剤形態とした後に医薬として用いることもできる。

- [0035] ここで、薬理的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤などの製剤添加物を用いることもできる。
- [0036] 溶剤の好適な例としては、注射用水、生理的食塩水、リンゲル液、アルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油、綿実油などが挙げられる。
- [0037] 溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが挙げられる。
- [0038] 懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子、ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが挙げられる。
- [0039] 等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖などが挙げられる。
- [0040] 緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。
- [0041] 無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコールなどが挙げられる。
- [0042] 防腐剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソル

ビン酸などが挙げられる。

[0043] 抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸塩などが挙げられる。

[0044] 着色剤の好適な例としては、水溶性食用タール色素（例：食用赤色2号及び3号、食用黄色4号及び5号、食用青色1号及び2号などの食用色素）、水不溶性レーキ色素（例：前記水溶性食用タール色素のアルミニウム塩など）、天然色素（例： $\beta$ -カロチン、クロロフィル、ベンガラなど）などが挙げられる。

[0045] 前記医薬組成物の剤形としては、例えば注射剤（例：皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤など）、点滴剤等の非経口剤が挙げられる。

[0046] 本発明の $\beta$ 細胞保護・再生剤は、製剤技術分野において慣用の方法、例えば日本薬局方に記載の方法等により製造することができる。該製剤中の有効成分であるウイルスベクターの含量は、剤形、有効成分の投与量などにより異なるが、例えば約0.1ないし100重量%である。ウイルス力価としては、例えば $10^{10} \sim 10^{11}$  p f u / m l（物理学的力価は生物学的力価より数倍から100倍以上高くなるので、ウイルス粒子に換算すると $2 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{13}$  v p / m l）程度となるように適宜調整することができるが、この範囲に限定されない。

[0047] 非経口的な投与（例えば、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性及び非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性及び非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。本発明において最も好適な剤形は注射液剤である。

[0048] 本発明の $\beta$ 細胞保護・再生剤は、糖尿病に対する既存のHGF遺伝子治療（ $5 \times 10^{12}$ ないし $1.5 \times 10^{13}$  v p / k g 体重）よりも低用量である $10^{10} \sim 10^{12}$  v p / k g 体重の用量で、ヒト又は他の哺乳動物対象に投与す

ることを特徴とする。かかる低用量で投与されることにより、本発明の $\beta$ 細胞保護・再生剤は、実質的に有害事象（特にASTやALTレベルの上昇により特徴づけられる肝機能障害）を生じることなく、安全に使用することができる。しかも、強力な転写活性を有するプロモーターによりHGFの発現が駆動されるので、かかる低用量の投与であっても治療上有効な血中HGFレベルを付与することができ、十分な膵 $\beta$ 細胞の保護・再生効果を得ることができる。

[0049] 該製剤の投与量は、ベクターの種類、プロモーター活性、ウイルスベクターの感染力（物理学的力価：生物学的力価（ $v_p$ ：PFU）比などの製剤自体の要因と、投与経路、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢などの外的要因とに応じて、上記の範囲内で適宜選択することができる。特にAdベクターについては、ウイルス粒子自体が用量依存的な急性毒性を惹起し得るので、 $v_p$ ：PFU比はウイルス用量決定のための重要なパラメータである。例えば、後述の実施例では、 $3 \times 10^8$  PFU/マウス（体重約20g；1kgあたりに換算すると約 $1.5 \times 10^{10}$  PFU）のAdベクターの尾静脈投与により、膵 $\beta$ 細胞の保護・再生（高血糖の抑制と正常なインスリン分泌）効果を奏することが確認されたが、 $v_p$ ：PFU比はウイルスの抽出法等の影響により、数倍～100倍以上の範囲で大きく変動するので、物理的力価に基づく用量としては、約 $3 \times 10^{10}$ ～約 $3 \times 10^{12} v_p / kg$ 体重となり得る。しかしながら、上述のとおり、 $6 \times 10^{11} v_p / kg$ 体重のAdベクターの肝動脈投与により、急性の肝障害による死亡例が報告されているので（上記非特許文献4）、Adベクターを用いる場合は、 $10^{11} v_p / kg$ 体重以下の用量で投与することが望ましい。但し、当該文献におけるような肝動脈投与の場合、より高用量のウイルスベクターが肝臓に集積すると考えられるので、それ以外の全身投与、特に末梢静脈からウイルスベクターを投与する場合には、 $10^{12} v_p / kg$ 体重の用量でも安全に使用し得ると推測される。一方、AAVベクターの場合、最近、高用量（ $3 \times 10^{14} v_p / kg$ 体重）投与群で重篤な肝障害による死亡例が

報告された臨床試験でも、低用量（ $1 \times 10^{14}$  vp/kg 体重）投与群では、肝疾患を有するにもかかわらず肝臓における有害事象を生じなかったことから、やはり、 $10^{12}$  vp/kg 体重の用量でも安全に使用し得ると推測される。

尚、米国食品医薬品局（FDA）は、臨床グレードの Ad ベクターの vp : PFU 比として 30 未満を推奨しているので、臨床応用のために製造される Ad ベクターを、末梢静脈から  $1.5 \times 10^{10}$  PFU/kg 体重の感染力価で投与する場合、 $4.5 \times 10^{11}$  vp/kg 体重未満の用量で投与されることになるので、 $6 \times 10^{11}$  vp/kg 体重の肝動脈投与に比べて、十分に低用量であると考えられる。

[0050] 本発明の  $\beta$  細胞保護・再生剤は、例えば、注射、カテーテル、バルーンカテーテルなどにより非経口的（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、局所注入など）に投与されることが好ましく、全身投与（例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内投与等）がより好ましい。膵管内への局所投与は、遺伝子導入がほぼ膵臓内に限局されるため、一見多臓器への遺伝子導入による有害事象のリスクを回避でき有利であるとも考えられるが、導入遺伝子やウイルスに対するキラー T 細胞による攻撃で  $\beta$  細胞が破壊されるリスクがあるので、他臓器への遺伝子導入を可能にする全身投与は、臨床的に有利である。本発明において使用されるウイルスベクターの用量範囲の中でも、比較的高用量の  $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$  vp/kg 体重の用量で使用する場合は、ウイルスベクターによる有害事象として特に重要な肝障害を回避すべく、肝動脈投与等の肝臓に高用量のウイルスベクターが送達されるような投与経路を避け、例えば、末梢静脈等から本発明の  $\beta$  細胞保護・再生剤を投与することが望ましい。

[0051] 本発明の  $\beta$  細胞保護・再生剤の投与頻度は特に制限されない。下記の実施例で示されるように、Ad ベクターを用いた場合でも、1 回の投与のみで、少なくとも約 2.5 カ月の長期間にわたって、一定程度の高血糖の抑制作用を奏し得る。また、少なくとも 60 日間にわたって膵  $\beta$  細胞のグルコース応

答性インスリン分泌能を保持（耐糖能を改善）させることができる。実施例のマウスについてはさらに経過観察を継続しており、上記の効果がさらに長期間持続することが十分に見込まれる。導入遺伝子が原則染色体に組み込まれないAAVベクターを分裂細胞に導入する場合も同様であり得る。

また、AAVベクターを用いて非分裂細胞を標的細胞とする場合には、より長期にわたってHGFの発現を持続し得るので、さらに長期間（例えば、6カ月以上、好ましくは1年以上、より好ましくは数年以上）、高血糖の抑制作用及び耐糖能の改善作用を奏し得ると考えられる。

よって、本発明の $\beta$ 細胞保護・再生剤は、染色体非組込み型で、レトロウイルスやレンチウイルスベクターに比べて従来安全とされ頻用されてきたAdベクターやAAVベクターを使用する場合でも、例えば、少なくとも60日以上、好ましくは75日以上、より好ましくは90日以上、さらに好ましくは120日以上に1回の投与間隔で投与することができる。また、用いるウイルスベクターの種類に応じて、3カ月～数年に1回の投与間隔で投与することも可能であり、さらに別の実施態様においては単回投与でもあり得る。

[0052] 以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

## 実施例

### [0053] 実験方法

#### 1. 組換えアデノウイルスベクター（Ad）の作製

サイトメガロウイルス前初期エンハンサー（cytomegalovirus immediate early enhancer）と改変ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターとのハイブリッドプロモーター（CAプロモーター）の転写制御下で、ヒトHGFを発現する非増殖型Ad（本明細書において「Ad. CA-HGF」と称する）、ならびに同様にCAプロモーターの転写制御下でLacZ遺伝子を発現する非増殖型Ad（本明細書において「Ad. CA-LacZ」と称する）を、HUMAN GENE THERAPY 10:2013-2017 (1999)に記載の方法で作製した。そのようにし

て作製した組換え Ad を、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2577-2581 (1995) に記載のような常法により増殖させ、精製し、力価を測定した。

#### [0054] 2. 動物実験

18g ~ 20g の体重の、雄の 8 週齢の c57/BL/6N マウス（九動株式会社、鳥栖）を、餌と水を自由に摂取できる状態で飼育した。既報（Diabetes 2010; 59: 1261-1265）と同様に、0.01M クエン酸緩衝液（pH 4.5）に溶解したストレプトゾトシン（STZ；シグマ-アルドリッチ・ジャパン、東京）を、50mg/kg の用量で 1 日 1 回、5 日間連続（-7 日目から -3 日目）で 25 匹のマウスに腹腔内投与した。STZ を注射したマウスを、3 日後（0 日目）に無作為に 2 つの群に分け、 $3 \times 10^8$  プラーク形成単位（pfu）の Ad.CA-LacZ（n=13）又は Ad.CA-HGF（n=12）の何れかを、尾静脈に 1 回注射した。STZ 注射もアデノウイルス遺伝子治療も受けていないマウス（n=8）を正常コントロールとして使用した。正常群のマウスを含む全てのマウスから血液を採取した。採血は、-7 日目から 7 日目においては毎日、14 日目から 77 日目においては週 1 回実施した。血糖値、血漿インスリン及び血漿アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）のレベルを、各図に示す時点で試験した。Adベクター投与後 16 及び 60 日目に腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT）を実施した。マウスを 14 時間絶食後、2g/kg 体重（ヒトにおける 75g 経口グルコース負荷試験（OGTT）相当量）のグルコースを腹腔内投与し、投与直前、投与から 30、60 及び 120 分後に採血して、各時点での血糖値及び血漿インスリンレベルを測定した。インスリン測定は、超高感度マウスインスリン測定 ELISA キット（森永生科学研究所）を用いて行った。

[0055] 全ての動物実験はアメリカ国立衛生研究所のガイドラインに従って行われ、鹿児島大学動物実験倫理委員会の認可を受けて実施した。

#### [0056] 3. 生化学的解析

血糖値を、グルコカード G ブラック（アークレイ、京都）及びメディセーフフィットプロ II（テルモ、東京）を用い、また、血漿 AST 及び ALT レ

ベルを、SPOTCHEM SP-4430臨床自動測定器（アークレイ）を用いて測定した。血漿インスリンレベルはELISAアッセイ（森永株式会社、横浜）により測定した。

#### [0057] 4. 統計解析

データは平均±標準誤差（s.e.）として示した。一元配置分散解析（One-way ANOVA）により多重比較を試験し、Ad.CA-LacZで処理されたマウスとAd.CA-HGFで処理されたマウスとの間の統計学的な有意差の有無を、スチューデントのt検定により決定した。P<0.05を統計学的に有意であると規定した。

#### [0058] 実験結果

##### 1. 低用量のAd.CA-HGF遺伝子治療によるT1Dモデルマウスにおける急性期高血糖の抑制

非処置群（Ad.CA-LacZ投与群）では、血糖濃度はベクター投与から7日目（最初のSTZ注射から14日後）に250mg/dlまで急速に上昇し（図1A）、その後も徐々に上昇し続けた後、270mg/dl前後の高値のまま推移した（図1B）。 $3 \times 10^8$  p.f.u（臨床グレードのAdベクターの場合、約 $10^9$ ～約 $10^{10}$ のv.p.に相当する）のAd.CA-HGFを1回静脈注射すると、3日目から6日目の間に血糖濃度の上昇は有意に抑制された（図1A）。その後の約3カ月間の経過観察においても、非処置群と比べて血糖値は抑制傾向を示し、長期的な効果が認められた（図1B）。上記と同じプロトコールで再度動物実験を行ったところ、同様の結果が得られ、低用量のHGF投与による高血糖抑制効果の再現性が確認された（図1C、1D）。

過去の報告（Exp Mol Med 2003; 35: 494-500）においては、CMVプロモーターの制御下でHGFを発現するAdベクターを、 $1 \times 10^{11}$  v.p（約 $5 \times 10^{12}$  v.p/kg体重）という本実施例の想定値よりも1～2桁も高い用量で投与している。これは、投与ルートが異なるので単純な比較はできないが、Adベクターによる死亡例（上記非特許文献4）よりも10倍近く高用

量であり、ヒト臨床への応用を妨げてきた。本発明ではより強力な転写活性を有するCAプロモーターを使用することで、既報よりも1/10~1/100の低用量であっても、同等以上の高血糖抑制効果を奏することに成功した点で極めて有意義である。

[0059] 2. 低用量のAd, CA-HGF遺伝子治療によるT1Dモデルマウスにおける急性期の血漿インスリン上昇の抑制（残存β細胞の保護・再生作用）

治療効果が得られるメカニズムを評価するために、上記1.のSTZ注入マウスにおける7日目、14日目、及び21日目の血漿インスリン濃度を測定した（図2）。7日目において、非処置群（Ad, CA-LacZ投与群）では血漿インスリン濃度の顕著な上昇が認められた。この現象は、STZ処理によりβ細胞が破壊され、残存するβ細胞が代償的に一時的に異常にインスリンを高産生・分泌する、という過去の知見（*Environ Toxicol Pharmacol* 2001; 9: 71-78）と一致しており、コントロールマウスではβ細胞の細胞死が進行していることを示唆している。一方、Ad, CA-HGF投与群では、7日目における血漿インスリン濃度の上昇はみられず、その後も血漿インスリン量は正常に保たれていた。これらの結果から、低用量のAd, CA-HGFの全身投与により、遺伝子導入された細胞から分泌されたHGFが血流により膵臓に送達し、β細胞の細胞死を抑制したこと（細胞保護作用）によりβ細胞がより多く残存し、正常なインスリン分泌を維持しつつ、治療効果（高血糖抑制効果）がもたらされたことが示唆される。このことは、高用量のHGF発現Adベクター投与により、代償性のインスリン過剰分泌が誘発されたことを示唆するインスリン/グルコース比の高値を認めた既報（*Exp Mol Med* 2003; 35: 494-500）に対して、さらなる優位性を提供するものである。

[0060] 3. 低用量のAdベクターの静脈内投与は肝機能障害を引き起こさない

前臨床試験及び臨床試験の研究において、高用量のAdベクターをインビボで静脈内投与すると、主として肝臓内に遺伝子導入され、そのため重篤な肝障害を引き起こす可能性があることが報告されていた（*Mol Genet Metab* 2

003; 80: 148-158.; Hum Gene Ther 2020; 31: 695-696)。そこで、低用量のA dベクターの静脈内投与による肝障害について評価するために、上記1. の各群のマウスにおける7日目、14日目、及び21日目の血漿A S T及びA L Tレベルを測定した。A dベクターを投与されたマウス（A d. C A - L a c Z投与群及びA d. C A - H G F投与群）のいずれにおいても、3週目まで血漿A S Tレベルの有意な上昇を認めなかった（図3）。同様に、血漿A L Tレベルについても、3週目まで有意な上昇を認めなかった。その後の経過観察期間においても、全てのマウスは食欲・運動に変化はなく、元気な状態であり、実験が終了する77日目まで生存した。これらのデータは、強力なプロモーターによる転写制御の下でH G F遺伝子を発現するA dベクターを低用量で1回静脈注射するという遺伝子治療戦略が、有効であり且つ安全であることを示唆している。

[0061] 4. 低用量のA dベクターの静脈内投与はT 1 Dモデルマウスにおける耐糖能を改善する

A dベクターを投与して16及び60日後にI P G T Tを実施し、食後高血糖の抑制とグルコース応答性インスリン分泌能の確認を行った。H G F遺伝子投与群では、投与16日目（図4）及び60日目（図5）のいずれにおいても、グルコース投与後の血糖上昇抑制がみられ（図4 A、5 A）、インスリン分泌反応においてもグルコース刺激に应答して分泌量の増加が確認された（図4 B、5 B）。

### 産業上の利用可能性

[0062] C Aプロモーター等の強力なプロモーターの転写制御下でH G Fを発現する組換えウイルスベクターは、低用量の投与で膵β細胞の保護・再生効果を示し、正常なインスリン分泌を維持しつつ高血糖抑制効果を奏するので、高用量のウイルスベクターの投与に伴う有害事象のリスクを回避することができる、さらに、従来比較的安全とされてきた染色体非組込み型のウイルスベクターを用いた場合でも、想定される遺伝子発現期間をはるかに超える長期間にわたって当該効果が維持される。したがって、本発明のβ細胞保護・再

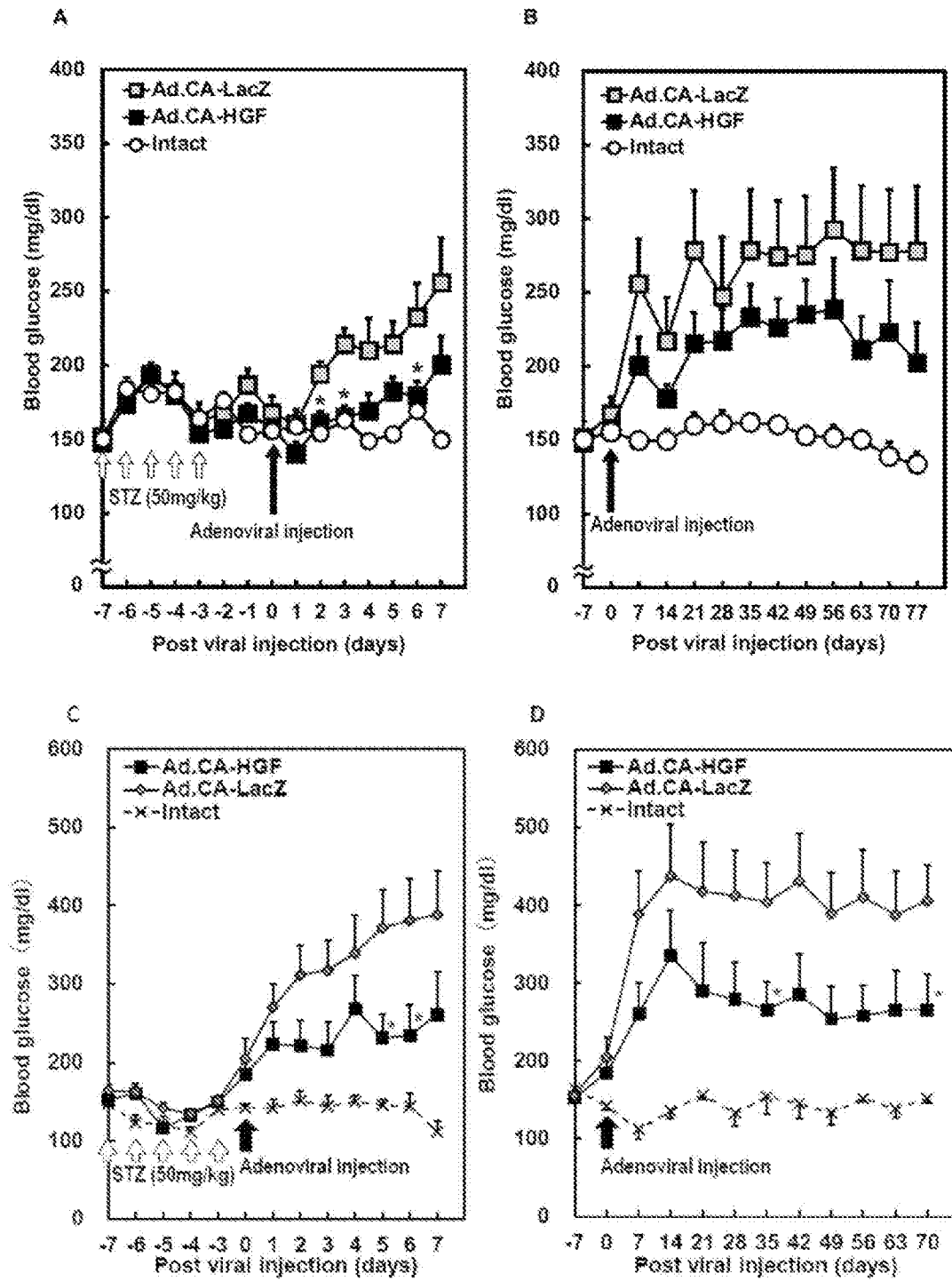
生剤は、安全且つ有効な臨床応用可能な糖尿病に対する遺伝子治療剤となり得る。糖尿病の患者数は世界中で増加し続けており社会問題となっており、本発明の意義は大きい。特にT1Dは若年で発症し、現存する膵島移植療法はその利用が限定的であるので、本発明の膵β細胞保護・再生剤は、T1Dをはじめとする糖尿病に対する代替的かつ汎用性のある再生医療の手段として極めて有用である。

[0063] 本出願は、日本で出願された特願2020-192844（出願日：2020年11月19日）及び特願2021-145795（出願日：2021年9月7日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

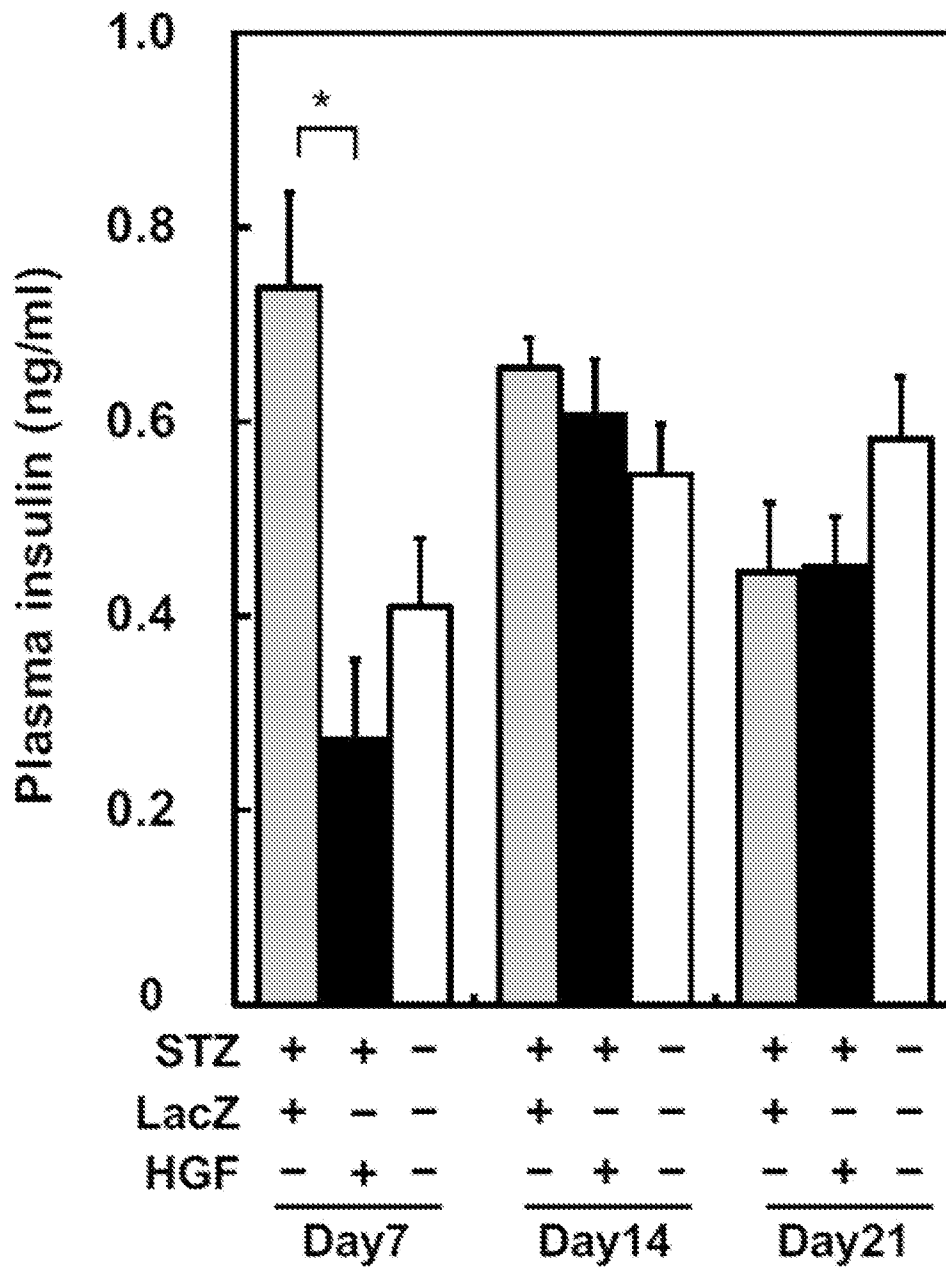
## 請求の範囲

- [請求項1] 肝細胞増殖因子（HGF）を発現する組換えウイルスベクターを含有してなる、糖尿病を有する哺乳動物における膵β細胞の保護・再生剤であって、 $10^{10} \sim 10^{12}$ ウイルス粒子（vp）/kg体重の用量で投与され、かつ該ウイルスベクターが、当該用量において、治療上有効な血中HGFレベルを与え得る転写活性を有するプロモーターの下流にHGFをコードする核酸を含むことを特徴とする、剤。
- [請求項2] 前記ウイルスベクターがアデノウイルス（Ad）ベクター又はアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、請求項1に記載の剤。
- [請求項3] 単回投与又は少なくとも60日間の投与間隔で複数回投与される、請求項2に記載の剤。
- [請求項4] 前記プロモーターがCAプロモーターである、請求項1～3のいずれか1項に記載の剤。
- [請求項5] 糖尿病が1型糖尿病である、請求項1～4のいずれか1項に記載の剤。
- [請求項6] 哺乳動物がヒトである、請求項1～5のいずれか1項に記載の剤。
- [請求項7] 全身投与により投与される、請求項1～6のいずれか1項に記載の剤。
- [請求項8] 全身投与が静脈内投与である、請求項7に記載の剤。
- [請求項9] 静脈内投与が末梢の静脈からの投与である、請求項8に記載の剤。
- [請求項10] HGFを発現する組換えウイルスベクターを、糖尿病を有する哺乳動物に投与することを含む、該哺乳動物における膵β細胞の保護・再生方法であって、該ウイルスベクターが、 $10^{10} \sim 10^{12}$ ウイルス粒子（vp）/kg体重の用量で投与され、かつ当該用量において、治療上有効な血中HGFレベルを与え得る転写活性を有するプロモーターの下流にHGFをコードする核酸を含むものである、方法。

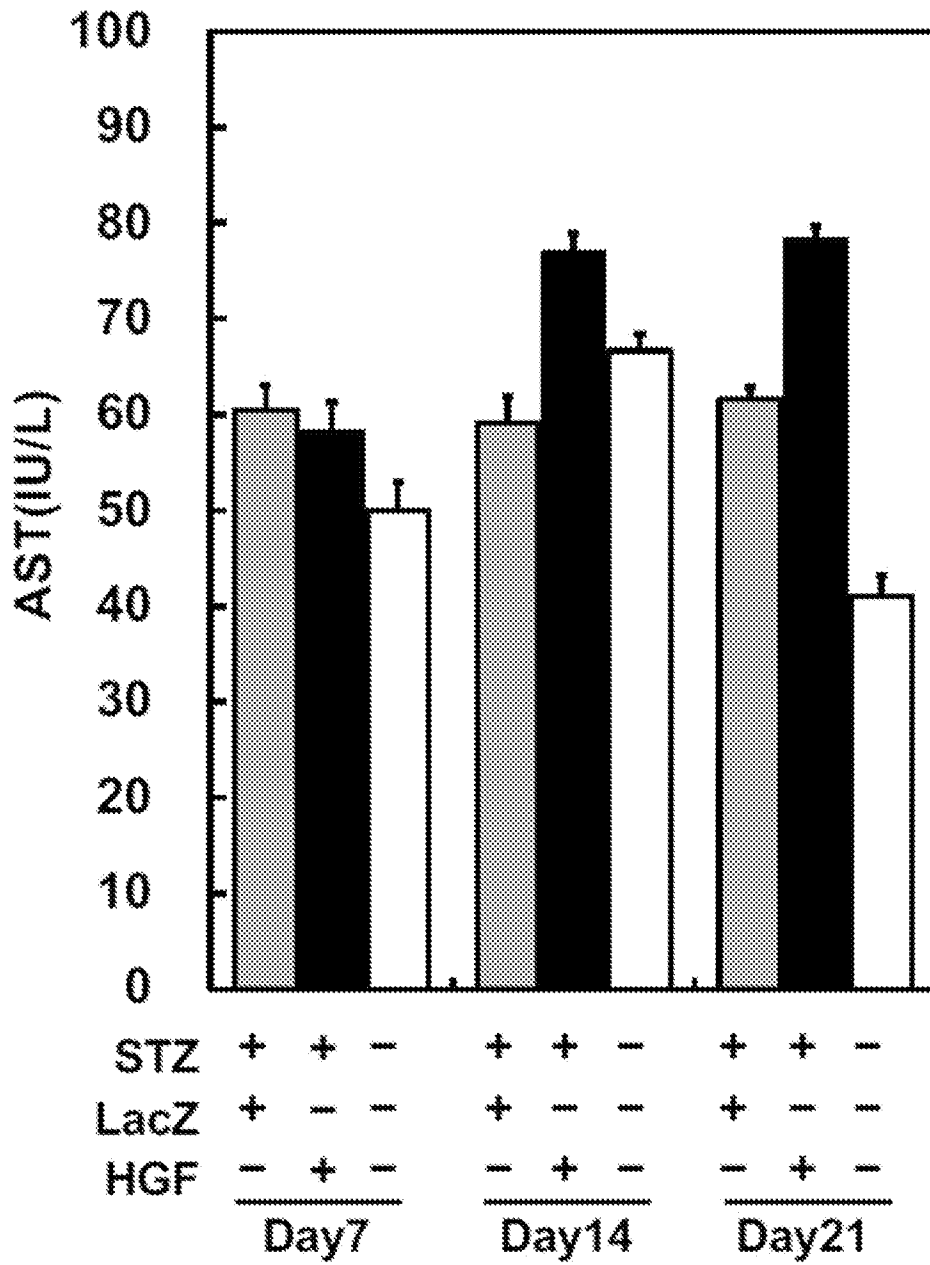
[Figure 1]



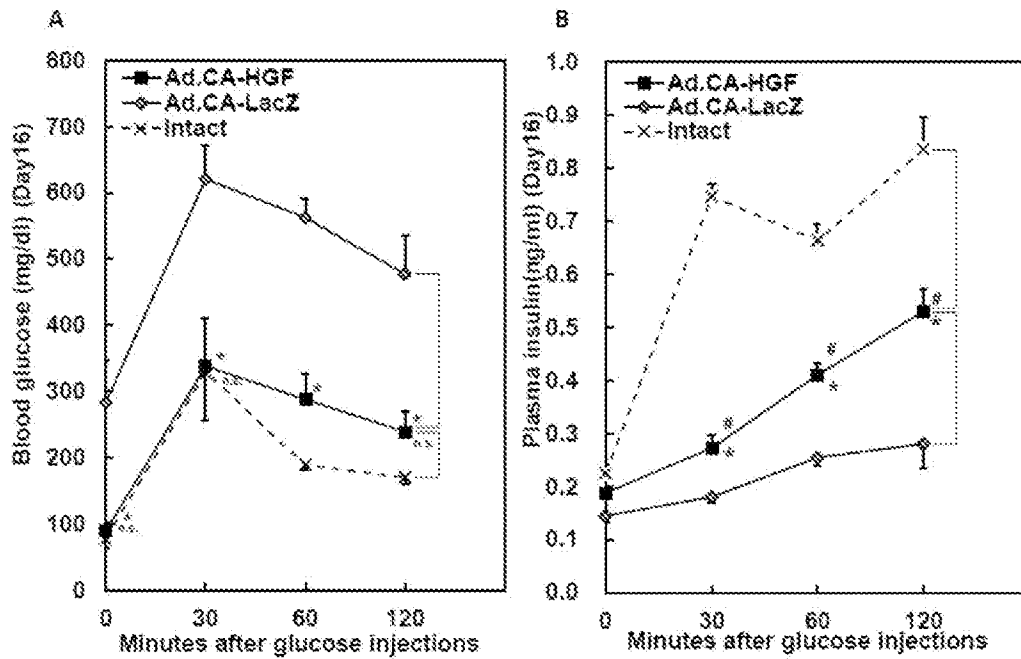
[図2]



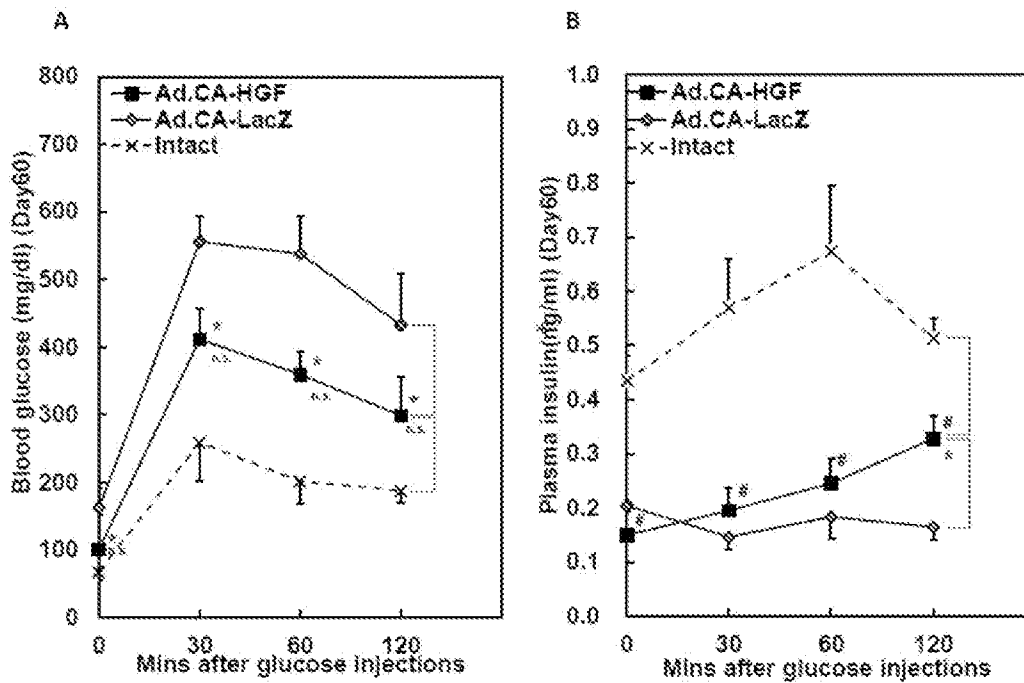
[図3]



[ 4 ]



[ 5 ]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/042463

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><i>A61K 48/00</i>(2006.01)i; <i>A61K 35/76</i>(2015.01)i; <i>A61K 35/761</i>(2015.01)i; <i>A61K 38/22</i>(2006.01)i; <i>A61P 1/18</i>(2006.01)i; <i>A61P 3/10</i>(2006.01)i; <i>A61P 43/00</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/12</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/86</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/861</i>(2006.01)i            FI: A61K48/00; A61K35/76; A61K35/761; A61K38/22; A61P1/18; A61P3/10; A61P43/00 105; C12N15/12 ZNA;            C12N15/86 Z; C12N15/861 Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K48/00; A61K35/76; A61K35/761; A61K38/22; A61P1/18; A61P3/10; A61P43/00; C12N15/12; C12N15/86; C12N15/861		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PARK, Mi-Kyoung et al. Adenoviral mediated hepatocyte growth factor gene attenuates hyperglycemia and beta cell destruction in overt diabetic mice. EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE. 2003, vol. 35, no. 6, pp. 494-500 in particular, abstract, fig. 4, p. 495, left column, second paragraph to right column, first paragraph	1-10
Y	LEE, Hye-Jeong et al. Prevention of Diabetes Using Adenoviral Mediated Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer In Mice. Korean J Physiol Pharmacol. 2003, vol. 7, pp. 261-266 in particular, abstract, fig. 3, p. 262, left column, third and fourth paragraphs	1-10
Y	中野正和ほか, アデノウイルスベクターによる遺伝子治療. ウイルス. 2003, vol. 53, no. 2, pp. 147-153, (NAKANO, Masakazu et al. Adenovirus vectors for gene therapy), non-official translation (Virus.) in particular, p. 147, right column, third paragraph	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>14 December 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>28 December 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NIWA, Hitoshi et al. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. <i>Gene</i> . 1991, vol. 108, no. 2, pp. 193-200 in particular, table 1	1-10
Y	LI, Yiwen et al. Postinfarction Treatment With an Adenoviral Vector Expressing Hepatocyte Growth Factor Relieves Chronic Left Ventricular Remodeling and Dysfunction in Mice. <i>Circulation</i> . 2003, vol. 107, no. 19, pp. 2499-2506 in particular, abstract, fig. 1, p. 2500, left column, third paragraph	1-10
A	KAGAWA, Tomoyo et al. Hepatocyte Growth Factor Gene Therapy Slows Down the Progression of Diabetic Nephropathy in db/db Mice. <i>Nephron Physiology</i> . 2006, vol. 102, no. 3-4, pp. 92-102 entire text, all drawings	1-10
P, X	MATSUDA, Eriko et al. Safe and low-dose but therapeutically effective adenovirus-mediated hepatocyte growth factor gene therapy for type 1 diabetes in mice. <i>Life Sciences</i> . March 2021, vol. 268, no. 119014, pp. 1-5 entire text, all drawings	1-10

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 48/00(2006.01)i; A61K 35/76(2015.01)i; A61K 35/761(2015.01)i; A61K 38/22(2006.01)i;                  A61P 1/18(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i;                  C12N 15/86(2006.01)i; C12N 15/861(2006.01)i                  FI: A61K48/00; A61K35/76; A61K35/761; A61K38/22; A61P1/18; A61P3/10; A61P43/00 105; C12N15/12 ZNA;                  C12N15/86 Z; C12N15/861 Z</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K48/00; A61K35/76; A61K35/761; A61K38/22; A61P1/18; A61P3/10; A61P43/00; C12N15/12; C12N15/86;                  C12N15/861</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年							
日本国実用新案公報	1922-1996年																
日本国公開実用新案公報	1971-2021年																
日本国実用新案登録公報	1996-2021年																
日本国登録実用新案公報	1994-2021年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>PARK, Mi-Kyoung et al., Adenoviral mediated hepatocyte growth factor gene attenuates hyperglycemia and beta cell destruction in overt diabetic mice, EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE, 2003, Vol. 35, No. 6, p. 494-500 特に要約, 図4, 495頁左欄第2段落-右欄第1段落</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>LEE, Hye-Jeong et al., Prevention of Diabetes Using Adenoviral Mediated Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer In Mice, Korean J Physiol Pharmacol, 2003, Vol. 7, p. 261-266 特に要約, 図3, 262頁左欄第3-4段落</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>中野正和 ほか, アデノウイルスベクターによる遺伝子治療, ウイルス, 2003, Vol. 53, No. 2, p. 147-153 特に147頁右欄第3段落</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NIWA, Hitoshi et al., Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene, 1991, Vol. 108, No. 2, p. 193-200 特に表1</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	PARK, Mi-Kyoung et al., Adenoviral mediated hepatocyte growth factor gene attenuates hyperglycemia and beta cell destruction in overt diabetic mice, EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE, 2003, Vol. 35, No. 6, p. 494-500 特に要約, 図4, 495頁左欄第2段落-右欄第1段落	1-10	Y	LEE, Hye-Jeong et al., Prevention of Diabetes Using Adenoviral Mediated Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer In Mice, Korean J Physiol Pharmacol, 2003, Vol. 7, p. 261-266 特に要約, 図3, 262頁左欄第3-4段落	1-10	Y	中野正和 ほか, アデノウイルスベクターによる遺伝子治療, ウイルス, 2003, Vol. 53, No. 2, p. 147-153 特に147頁右欄第3段落	1-10	Y	NIWA, Hitoshi et al., Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene, 1991, Vol. 108, No. 2, p. 193-200 特に表1	1-10
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
Y	PARK, Mi-Kyoung et al., Adenoviral mediated hepatocyte growth factor gene attenuates hyperglycemia and beta cell destruction in overt diabetic mice, EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE, 2003, Vol. 35, No. 6, p. 494-500 特に要約, 図4, 495頁左欄第2段落-右欄第1段落	1-10															
Y	LEE, Hye-Jeong et al., Prevention of Diabetes Using Adenoviral Mediated Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer In Mice, Korean J Physiol Pharmacol, 2003, Vol. 7, p. 261-266 特に要約, 図3, 262頁左欄第3-4段落	1-10															
Y	中野正和 ほか, アデノウイルスベクターによる遺伝子治療, ウイルス, 2003, Vol. 53, No. 2, p. 147-153 特に147頁右欄第3段落	1-10															
Y	NIWA, Hitoshi et al., Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene, 1991, Vol. 108, No. 2, p. 193-200 特に表1	1-10															
<p>国際調査を完了した日</p> <p>14.12.2021</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>28.12.2021</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>吉川 阿佳里 4U 1581</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>																

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	LI, Yiwen et al., Postinfarction Treatment With an Adenoviral Vector Expressing Hepatocyte Growth Factor Relieves Chronic Left Ventricular Remodeling and Dysfunction in Mice, <i>Circulation</i> , 2003, Vol. 107, No. 19, p. 2499-2506 特に要約, 図1, 2500頁左欄第3段落	1-10
A	KAGAWA, Tomoyo et al., Hepatocyte Growth Factor Gene Therapy Slows Down the Progression of Diabetic Nephropathy in db/db Mice, <i>Nephron Physiology</i> , 2006, Vol. 102, No. 3-4, p. 92-102 全文, 全図	1-10
P, X	MATSUDA, Eriko et al., Safe and low-dose but therapeutically effective adenovirus-mediated hepatocyte growth factor gene therapy for type 1 diabetes in mice, <i>Life Sciences</i> , 2021.03, Vol. 268, No. 119014, p. 1-5 全文, 全図	1-10

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見: