(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9月9日(09.09.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/186282 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 35/761 (2015.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/485 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/18 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/008898

(22) 国際出願日： 2022年3月2日(02.03.2022)

(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 2021-033714 2021年3月3日(03.03.2021) JP
特願 2021-145796 2021年9月7日(07.09.2021) JP

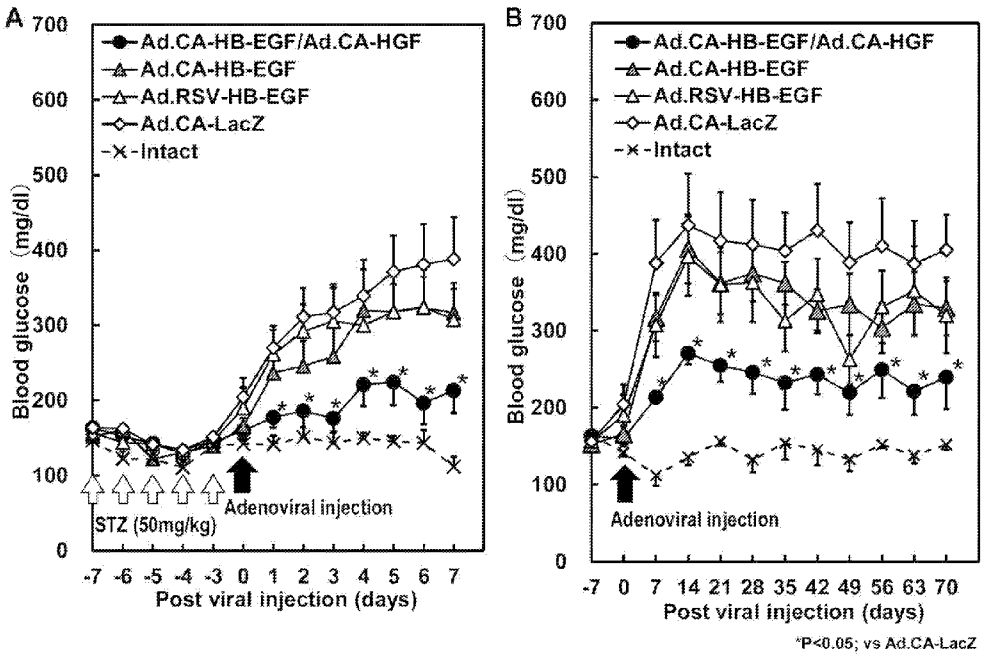
(71) 出願人:国立大学法人 鹿児島大学(**KAGOSHIMA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 Kagoshima (JP).

(72) 発明者: 小 賊 健 一 郎 (**KOSAI, Ken-ichiro**); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21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21番24号 国立大学法人 鹿児島大学内 Kagoshima (JP).

(54) **Title:** HB-EGF GENE THERAPY FOR DIABETES

(54) 発明の名称： 糖尿病に対するＨＢ－ＥＧＦ遺伝子治療

[図1]



(57) **Abstract:** The present invention provides a new gene therapy method which is less invasive and is capable of providing a desired therapeutic effect on diabetes including T1D. Specifically, provided is a pancreatic β cell protecting/regenerating formulation for mammals with diabetes, the formulation containing a nucleic acid that encodes a heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF). The formulation is characterized by being systemically administered. The above-described formulation containing, in combination, a nucleic acid that encodes a hepatocyte growth factor

WO 2022/186282 A1

[続葉有]

(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).

(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, JM, 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)）

(HGF) is also provided.

(57) 要約：本発明は、侵襲性が比較的低く、かつＴ１Ｄをはじめとする糖尿病に対して所望の治療効果を奏し得る、新規な遺伝子治療手段を提供する。具体的には、ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子（ＨＢ－ＥＧＦ）をコードする核酸を含有してなる、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、全身投与されることを特徴とする、剤を提供する。肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）をコードする核酸を組み合わせてなる、前記製剤も提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 糖尿病に対するＨＢ－ＥＧＦ遺伝子治療

技術分野

[0001] 本発明は、治療効果を確保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、ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子（ＨＢ－ＥＧＦ）をコードする核酸を含有してなる、糖尿病を有する哺乳動物における膵β細胞の保護・再生剤等に関する。

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β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β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β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β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。しかも、Ｔ１Ｄではβ細胞に対する持続的な自己免疫反応が起こっているため、仮にドナーが見つかったとしても、何度も移植を繰り返す必要がある。

[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β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。本発明者らは、最近高用量のアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターを用いた遺伝子治療の臨床試験で重篤な有害事象による死亡が３例報告されたことに鑑み、低用量で安全に使用でき、且つ膵β細胞の保護・再生効果を奏するＨＧＦ遺伝子治療剤を開発し、特許出願している（特許文献１）。

[0006] ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子（ＨＢ－ＥＧＦ）は、ＥＧＦファミリーに属する増殖因子であり、まず膜結合型の前駆体（ｐｒｏＨＢ－ＥＧＦ）として合成された後、膜近傍ドメインで特異的なメタロプロテイナーゼにより切断されて生じる可溶性ＨＢ－ＥＧＦが、多くの細胞種に対して分裂促進作用を示すことが知られている。しかし、これまでＴ１Ｄに対するＨＢ－ＥＧＦ遺伝子治療の研究は極めて少ない。唯一、アロキサン膵部分灌流Ｔ１Ｄモデルマウスに対し、膵管内逆行性注入によりＨＢ－ＥＧＦをコードするアデノウイルス（Ａｄ）ベクターを局所投与し、腹腔内グルコース負荷試験（ＩＰＧＴＴ）の結果、新たに分化又は増殖したインスリン産生細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌し得ることが示唆されたとする報告がある（非特許文献１）。しかしながら、ＩＰＧＴＴにおける０分血糖（空腹時血糖）は非治療群でも正常値を示し、ＨＢ－ＥＧＦ投与群と非治療群との間に有意差を認めなかったことから、動物モデルがＴ１Ｄの病態を呈し

ているとは言えないし、本来インスリン分泌量が最も増加するはずの３０分後において高血糖を抑制できていないことから、Ｔ１Ｄに対する治療効果を奏する程度のグルコース応答性インスリン分泌の改善はみられなかったと解釈される。しかも、この投与方法は侵襲性が高く手技も煩雑なため、ヒトへの臨床応用は現実的ではない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特願2020-192844

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Kozawa, J. et al., Pancreas, 31: 32-42 (2005)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 従って、本発明の目的は、侵襲性が比較的低く、かつＴ１Ｄをはじめとする糖尿病に対して所望の治療効果を奏し得る、新規な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

[0010] 上記の目的を達成すべく、本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子を膵臓に局所投与するのではなく、全身投与することにより、Ｔ１Ｄモデルマウスにおいて、投与後少なくとも１０週間の長期にわたり血糖上昇が抑制され、さらに、ＩＰＧＴＴでもグルコース投与後の血糖上昇抑制がみられ、インスリン分泌反応においてもグルコース投与後の分泌量増加が確認された。ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子とともにＨＧＦ遺伝子を投与すると相乗効果が得られ、長期にわたり高血糖が有意に抑制され、ＩＰＧＴＴにおいても、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。

なお、後述の実施例ではＡｄベクターベクター投与による有害事象は、試験中及びその後の経過観察期間も含めて認められなかった。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子、好ましくはさらにＨＧＦ遺伝子を全身投与（例、静脈内投与）することにより、低侵襲性で、かつ正常な機能を保持するβ細胞の保護・再生が可能な、Ｔ１Ｄをはじめとする糖尿病に対する有効な新規遺伝子治療を提供することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は以下の通りである。

［項１］

ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子（ＨＢ－ＥＧＦ）をコードする核酸を含有してなる、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、全身投与されることを特徴とする、剤。

［項２］

肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）をコードする核酸を組み合わせてなる、項１に記載の剤。

［項３］

膵β細胞がグルコース応答性インスリン分泌能を保持する、項１又は２に記載の剤。

［項４］

全身投与が静脈内投与である、項１～３のいずれか１項に記載の剤。

［項５］

核酸がウイルスベクター上に担持されている、項１～４のいずれか１項に記載の剤。

［項６］

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、項５に記載の剤。

［項７］

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、項６に

記載の剤。

［項８］

ウイルスベクターが、１×１０^{10}～２×１０^{12}ウイルス粒子（ｖｐ）／ｋｇ体重の１回用量で投与される、項５～７のいずれか１項に記載の剤。

［項９］

糖尿病が１型糖尿病である、項１～８のいずれか１項に記載の剤。

［項１０］

哺乳動物がヒトである、項１～９のいずれか１項に記載の剤。

［項１１］

有効量のＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を、糖尿病を有する哺乳動物に全身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。

［項１２］

有効量のＨＧＦをコードする核酸をさらに投与することを含む、項１１に記載の方法。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、安全かつ低侵襲性で、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、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

[0013] [図1]図１Ａは、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（Ａｄ）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は、Ａｄベクターを投与した前記Ｔ１Ｄモデルマウスにおける、－７日目から７０日目の間の毎週の血糖値の変化を示す。図中、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。

[図2]図１と同じマウス（Ａｄベクター投与から１６日目）におけるＩＰＧＴ

Ｔ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２Ａはグルコース投与後の血糖値（ｍｇ／ｄｌ）、図２Ｂ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。

[図3]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３Ａはグルコース投与後の血糖値（ｍｇ／ｄｌ）、図３Ｂ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。

[図4]図４は、図１と同様の５群のマウスにおいて、３日目、５日目、７日目、１４日目に血漿ＡＳＴのレベル及び血漿ＡＬＴのレベルを測定した生化学解析の結果を示すグラフである。縦軸は血漿ＡＳＴレベル（ＩＵ/Ｌ）又は血漿ＡＬＴレベル（ＩＵ/Ｌ）を示す。

[図5]図５は、ウイルス投与後の検体（肝臓）を用いた組織解析（ＨＥ染色）を示す。

[図6]図６は、Ａｄ．ＣＡ－ＨＢ－ＥＧＦ及びＡｄ．ＣＡ－ＨＧＦを投与したマウスと、Ａｄ．ＣＡ－ＬａｃＺを投与したマウスの検体（肝臓）を用いた組織解析（ＨＥ染色）を示す。

発明を実施するための形態

[0014] １．本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）

本発明は、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を含有してなる、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（Ｉ）」ともいう）を提供する。当該β細胞保護・再生剤は、全身投与により対象の哺乳動物に投与されることを特徴とする。

[0015] 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（既存のβ細胞の自己再生と幹細胞もしくは内分泌前駆細胞からの分化の両方を含む）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。上記非特許文献１によると、Ａｄベクターを用いてＨＢ－ＥＧＦ遺伝子を膵管内逆行性注入にてアロキサン膵部分灌流マウスに局所投与した場合、非治療（ＬａｃＺ遺伝子投与）群との間に空腹時血糖において差はなかったと報告されている。非治療群における空腹時血糖が正常値であることから、そもそも動物モデルがＴ１Ｄの病態を呈していない（空腹時高血糖を抑制し得る程度にインスリン分泌が可能なβ細胞が維持されている）ことが示唆され、Ｔ１Ｄに対する治療効果を実証できていない。一方、本発明では、後記実施例において、非治療群の空腹時血糖（ＩＰＧＴＴにおける０分血糖）が正常マウスのそれと比べて著明に高値を示し（即ち、動物モデルが明確にＴ１Ｄの病態を呈している）、ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子投与群において、空腹時血糖が非治療群と比べて低下することを実証している。従って、空腹時の高血糖を抑制し得る本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）は、既知のＨＢ－ＥＧＦ遺伝子治療剤に対して有利な効果を奏するといえる。

[0016] 好ましくは、「膵β細胞の保護・再生」とは、グルコースによる刺激に応答してインスリンを分泌し、糖負荷による血糖上昇を抑制する機能、即ち、グルコース応答性インスリン分泌能を保持するβ細胞の保護・再生を意味する。残存するβ細胞の保護及び／又は新たなβ細胞の分化もしくは増幅によりβ細胞量は保持されても、β細胞のグルコース応答性インスリン分泌能が低いと、食後高血糖を抑制することができず、十分な血糖コントロールが達

成されない場合がある。例えば、上記非特許文献１では、試験されたアロキサン膵部分灌流マウスは、空腹時血糖を正常レベルに維持し得る程度にインスリン分泌が可能なβ細胞を維持していたと考えられるが、それにも拘わらず、少なくとも糖負荷後６０分まではＨＢ－ＥＧＦ遺伝子投与群と非治療群との間で血糖値変化に有意差はなく、ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子の膵局所投与は十分な食後高血糖の抑制効果がないことを示している。一方、本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）は、ＩＰＧＴＴにおいて、グルコース応答性のインスリン分泌とそれに基づく食後高血糖の抑制効果を奏すること、しかも当該効果を長期間保持することが実証されている。

[0017] 本発明に使用される「ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸」は、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよく、あるいはＤＮＡ／ＲＮＡキメラであってもよい。好ましくはＤＮＡが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＲＮＡまたはＤＮＡ：ＲＮＡのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。ＨＢ－ＥＧＦをコードするＤＮＡとしては、ゲノムＤＮＡ、ヒトもしくは他の哺乳動物の細胞・組織由来のｃＤＮＡ（ｃＲＮＡ）、合成ＤＮＡ（ＲＮＡ）などが挙げられる。

[0018] 本発明に使用される「ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸」は、少なくとも分泌型である可溶性ＨＢ－ＥＧＦをコードするヌクレオチド配列を含む。好ましくは、「ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸」は、膜結合型ＨＢ－ＥＧＦであるｐｒｏＨＢ－ＥＧＦをコードするヌクレオチド配列を含み、より好ましくは、Ｎ末端にシグナル配列を含む初期翻訳産物であるｐｒｅｐｒｏＨＢ－ＥＧＦをコードするヌクレオチド配列を含む。ＨＢ－ＥＧＦはまずシグナル配列を含む前駆体として合成された後、小胞体でシグナル配列が切断されて膜結合型のｐｒｏＨＢ－ＥＧＦとなり、さらに膜近傍ドメインで特異的なメタロプロテイナーゼにより切断されて可溶性ＨＢ－ＥＧＦを生じる。本発明においては、全身投与により血流に入ったＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸は、

肝臓などの核酸又はベクター（例、ウイルスベクター）が指向する臓器に送達される。指向する臓器が膵臓以外である場合、当該臓器の細胞から分泌発現する可溶性ＨＢ－ＥＧＦが血流により膵臓へ送達され、主としてβ細胞の保護・再生作用を発揮すると考えられる。従って、少なくとも可溶性ＨＢ－ＥＧＦをコードするヌクレオチド配列を含めば、適切なシグナル配列を含む分泌発現ベクターに挿入することで、直接可溶性ＨＢ－ＥＧＦとして分泌発現させることもできる。但し、人工的な分泌発現機構が首尾よく機能しない可能性もあり得るので、まず膜結合型のｐｒｏＨＢ－ＥＧＦとして発現させた後、投与対象である哺乳動物に内在のプロテアーゼの作用を利用して可溶性ＨＢ－ＥＧＦを生じさせることが好ましい。また、シグナル配列をネイティブなシグナル配列以外のものに置換して分泌効率を改善させることもできるが、逆に分泌効率が低下する場合もあり得るので、好ましい実施態様においては、ネイティブなシグナル配列を含むｐｒｅｐｒｏＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を用いることができる。

[0019] より具体的には、「ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸」として、配列番号１［ＧｅｎＢａｎｋにアクセッション番号：ＮＭ＿００１９４５として登録されているヒトＨＢ－ＥＧＦのｍＲＮＡ配列の２７６番目から９０２番目のヌクレオチド配列（ＣＤＳ）に相当（２７６番目から３３２番目がシグナルコドン、３３３番目から４６１番目がプロペプチドコード領域、４６２番目から７１９番目が可溶性ＨＢ－ＥＧＦコード領域にそれぞれ相当）］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、ＨＢ－ＥＧＦと同等の活性（例、膵β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１で表されるヌクレオチド配列（但し、該核酸がＲＮＡの場合、該塩基配列中の「ｔ」は「ｕ」と読み替える）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９

５％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。

また、当該核酸は、配列番号２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２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。

[0020] 本明細書における塩基配列の同一性は、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＝ＯＮ；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。

また、本明細書におけるアミノ酸配列の同一性は、相同性計算アルゴリズムＮＣＢＩ ＢＬＡＳＴを用い、以下の条件（期待値＝１０；ギャップを許す；マトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２；フィルタリング＝ＯＦＦ）にて計算することができる。

[0021] 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うことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ストリンジェントな条件に従って行うことができる。

[0022] 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℃で０．０１５Ｍ塩化ナトリウム／０．００１５Ｍ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／７５０ｍＭ塩化ナトリウム、７５ｍＭクエン酸ナトリウムを含む５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５）とともに、５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミドを４２℃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（０．７５Ｍ塩化ナトリウム、０．０７５Ｍクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％ピロ燐酸ナトリウム、５ｘデンハート溶液、超音波処理鮭精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳ、及び１０％硫酸デキストランを４２℃で使用し、０．２ｘＳＳＣ及び５０％ホルムアルデヒドで５５℃で洗浄し、続いて５５℃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。

[0023] ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸は、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ＨＢ－ＥＧＦ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、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸は、ヒトＨＢ－ＥＧＦ（即ち、配列番号２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。

[0024] ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を、例えばＨＢ－ＥＧＦ遺伝子のＣＤＳ領域のヌクレオチド配列の一部分を有する合成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、

ＨＢ－ＥＧＦ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うことができる。

[0025] ＤＮＡのヌクレオチド配列は、公知のキット、例えば、ＭｕｔａｎＴＭ－ｓｕｐｅｒ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ｋｍ（宝酒造（株））、ＭｕｔａｎＴＭ－Ｋ（宝酒造（株））等を用いて、ＯＤＡ－ＬＡ　ＰＣＲ法、Ｇａｐｐｅｄｄｕｐｌｅｘ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。

[0026] 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。

[0027] ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を含む発現ベクターは、例えば、ＨＢ－ＥＧＦ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ＤＮＡ断片を適当な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。

発現ベクターとしては、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（Ａｄ）ベクター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）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のウイルスベクター、動物細胞発現用プラスミド（例：ｐＡ１－１１、ｐＸＴ１、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＲ

ｃ／ＲＳＶ、ｐｃＤＮＡＩ／Ｎｅｏ）等の非ウイルスベクターを使用することができる。遺伝子導入・発現効率が高い、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、Ａｄベクター又はＡＡＶベクターを使用することが好ましい。

[0028] Ａｄベクターの導入遺伝子発現期間（通常２～３週間）はＡＡＶベクターや染色体組込み型ベクターに比べると短いが、ＨＢ－ＥＧＦによる膵β細胞保護・再生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、ＨＢ－ＥＧＦ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、ＡＡＶベクターは搭載できる遺伝子サイズが４．７ｋｂと小さいが、ＨＢ－ＥＧＦのコード配列（ＣＤＳ）は６２４ｂｐ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１～２ｋｂ程度であるから、使用に問題はない。

[0029] Ａｄベクターは肝臓に集積することが知られているが、ＨＢ－ＥＧＦは他臓器の細胞に導入され発現しても、細胞外に分泌された可溶性ＨＢ－ＥＧＦが血流により膵臓に送達され得る。また、ＡＡＶ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分泌発現した可溶性ＨＢ－ＥＧＦ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ＨＢ－ＥＧＦを発現させることが好ましい場合がある。

[0030] プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、哺乳動物細胞である場合、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）由来

プロモーター（例：ＣＭＶ前初期プロモーター）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）由来プロモーター（例：ＨＩＶ　ＬＴＲ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）由来プロモーター（例：ＲＳＶ　ＬＴＲ）、マウス乳癌ウイルス（ＭＭＴＶ）由来プロモーター（例：ＭＭＴＶ　ＬＴＲ）、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）由来プロモーター（例：ＭｏＭＬＶ　ＬＴＲ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）由来プロモーター（例：ＨＳＶチミジンキナーゼ（ＴＫ）プロモーター）、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）由来プロモーター（例：ＳＶ４０初期プロモーター）、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）由来プロモーター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）由来プロモーター（例：ＡＡＶ　ｐ５プロモーター）、アデノウイルス（ＡｄＶ）由来プロモーター（Ａｄ２またはＡｄ５主要後期プロモーター）等のウイルスプロモーター、並びにβ－アクチン遺伝子プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成蛋白質遺伝子プロモーターなどが用いられる。

[0031]　ベクターとしてウイルスベクターを使用する場合、有害事象のリスクを低減するために、低用量での投与が望ましいが、低用量で所望の治療効果を奏するには、治療上有効な血中ＨＢ－ＥＧＦ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ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を搭載させる必要がある。例えば、ウイルスベクターによる遺伝子治療に頻用されているＣＭＶプロモーターやＲＳＶ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１α１（ＥＦ１Ａ）プロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子１α１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β－アクチンプロモーターとのハイブリッドプロモーター）、脾現局巣形成ウイルス（ＳＦＦＶ）プロモーター、マウス幹細胞ウイルス（ＭＳＣＶ）プロモーター、ＳＶ４０エンハンサー／初期プロモーター、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。

[0032] 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、α－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α１（ＡＣＴＡ１）プロモーター、ＭＨＣＫ７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ＨＢ－ＥＧＦが血流により膵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。

[0033] 該発現ベクターは、好ましくは、ＨＢ－ＥＧＦ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。また、所望により、エンハンサー、スプライシングシグナル、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子、ＳＶ４０複製起点などをさらに含有してもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、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が挙げられる。

[0034] また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をコードするヌクレオチド配列（シグナルコドン）を、ＨＢ－ＥＧＦをコードするＤＮＡの５’末端側に付加してもよい。例えば、インスリンシグナル配列、α－インターフェロンシグナル配列、抗体分子シグナル配列などを用いることができる。

[0035] ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を含む発現ベクターの作製は、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．；Ｍｏｌｅｃｕｌａ

r Cloning（A Laboratory Manual），3rd ed. Volumes 1－3，Josseph 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］。

[0036] また、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を含む発現ベクターとして非ウイルスベクターを使用する場合、該発現ベクターの導入は、ポリＬ－リジン－核酸複合体などの高分子キャリアーを用いるか、リポソームに被包して行うことができる。リポソームはリン脂質からなる数１０～数１００ｎｍの粒径のカプセルで、その内部にＨＢ－ＥＧＦをコードするプラスミド等のベクターを封入できる。

[0037] 本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）は、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β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β細胞が疲弊し、インスリン分泌障害、ひいてはβ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。

[0038] 本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）は、本発明のＨＢ－ＥＧＦ発現ベクターを原体のまま用いてもよいが、必要に応じて薬理学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。

[0039] ここで、薬理学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。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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：β－カロチン、クロロフィル、ベンガラなど）などが挙げられる。

[0049] 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。

[0050] 本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）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}～10^{11}ｐｆｕ／ｍｌ（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2×10^{10}～2×10^{13}ｖｐ／ｍｌ）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。

[0051] 非経口的な投与（例えば、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、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。

[0052] 該製剤の投与量は、ベクターの種類、プロモーター活性、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、年齢等によって異なるが、例えば、ＨＢ－ＥＧＦ発現ベクターとしてＡｄベクターを用いる場合、過去の臨床試験において、６×１０^{11}ウイルス粒子（ｖｐ）／ｋｇ体重（総量３．８×１０^{13}ｖｐ）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が（Mol Genet Metab 2003; 80: 148-158）、Ａｄベクターは肝臓への集積性が高いため、肝動脈投与の場合はより高用量のＡｄ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Ａｄベクターを投与する場合には、約１０倍の５×１０^{12}ｖｐ／ｋｇ体重の用量ぐらいまでは安全に使用し得ると推測される。例えば、１回用量として約５×１０^{9}～約５×１０^{12}ｖｐ／ｋｇ体重、好ましくは約１×１０^{10}～約２×１０^{12}ｖｐ／ｋｇ体重である。また、ＨＢ－ＥＧＦ発現ベクターとしてＡＡＶベクターを用いる場合、最近の臨床試験において、高用量（３×１０^{14}ｖｐ/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が（Audentes Therapeutics. Letter to the MTM disease community. https://myotubulartrust.org/audentes-therapeutics-letter-23-june-2020/；Hum Gene Ther 2020; 31: 695-696）、同臨床試験でも低用量（１×１０^{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、１０^{14}ｖｐ／ｋｇ体重以下の用量で安全に使用し得ると推測される。例えば、１回用量として約５×１０^{9}～約５×１０^{13}ｖｐ／ｋｇ体重、好ましくは約１×１０^{10}～約１×１０^{13}ｖｐ／ｋｇ体重である。

[0053] 例えば、後述の実施例では、約５×１０^{12}ｖｐ／ｋｇ体重のＡｄベクターの尾静脈投与により、Ｔ１Ｄに対するＨＢ－ＥＧＦ遺伝子治療の効果を実証している。上記非特許文献１では、生物学的力価として４×１０^{8}ｐｆｕ（約２×１０^{10}ｐｆｕ／ｋｇ体重）のＡｄベクターをマウスに膵管内逆行性注入

している。ｖｐ：ｐｆｕ比はウイルスの抽出法等の影響により大きく変動するので、物理的力価に換算した用量は不明であるが、ｖｐ：ｐｆｕ比が１００倍以上の場合は約２×１０^{12}ｖｐ／ｋｇ体重以上と見積もられる。膵管内逆行性注入は遺伝子導入が膵臓内に限局されているため、全身投与に比べて投与量を顕著に低減させることができるので、膵管内逆行性注入と同等の投与量で全身投与することにより、膵管内逆行性注入した場合よりも優れた血糖上昇抑制効果を奏し得ることは驚くべきことである。

[0054] 一方、ＨＢ－ＥＧＦ発現ベクターとして非ウイルスベクターをリポソームに被包して用いる場合には、体重約４ｋｇのカニクイザルを用いた臨床研究では６６６μｇのＤＮＡを静脈投与して安全性が確認されているため同量が目安となる。例えば、成人の１回投与量として約２～約１０ｍｇ、好ましくは約５～約８ｍｇである。

[0055] 本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）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、腹腔内など）に全身投与される。ここで「全身投与」とは、投与された製剤中のＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸及び／又は該核酸から産生・分泌された可溶性ＨＢ－ＥＧＦが血流に乗って全身に循環し、結果として膵β細胞の保護・再生に寄与し得る限り、膵臓への局所投与以外の、静脈投与のみならず筋肉投与や腹腔内投与等の投与方法であってよい。

膵管内への局所投与は、遺伝子導入がほぼ膵臓内に現局されるため、一見他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細胞による攻撃で却ってβ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。

また、膵管内逆行性注入をヒト臨床に応用する場合、開腹の必要こそないが、内視鏡的逆行性胆道膵管造影（ＥＲＣＰ）により遺伝子導入を行わねばならず、侵襲性が高く手技も煩雑であるので、静脈注射などの全身投与は患者の忍容性や簡便さの点においても極めて有利である。さらに、上記非特許

文献１によれば、膵管内逆行性注入の場合、ベクターの濃度、容量、注入速度及び時間を厳密にコントロールしないと、重篤な膵炎を引き起こすリスクがあり、この点でも全身投与の方が安全性が高いといえる。

[0056] 上記非特許文献１において、著者らは、糖尿病に対するＨＢ－ＥＧＦ治療に際して、ＨＢ－ＥＧＦタンパク質の注射ではなく遺伝子治療を用いた理由として、ＨＢ－ＥＧＦタンパク質の生物活性の持続性が低いことや、膵液中のプロテアーゼにより大部分が不活性化されると推測したことを挙げている。彼らは、膵管細胞で発現した膜結合型のｐｒｏＨＢ－ＥＧＦのオートクライン又はジャクスタクライン作用による膵管細胞からのβ細胞の分化又は新生が最重要であり、それに加えて、膵管細胞から分泌された可溶性ＨＢ－ＥＧＦのパラクライン効果により膵島内の残存β細胞が保護・再生されたと考察している。従って、非特許文献１の教示に接した当業者であれば、肝臓等の遠隔臓器から分泌発現した可溶性ＨＢ－ＥＧＦが血流により膵臓に送達され、エンドクライン作用によりβ細胞の保護・再生効果をもたらすとは予測し得なかったと解するのが相当である。そのため、膵臓以外を主要な標的臓器として遺伝子導入し、当該臓器の細胞から分泌発現した可溶性ＨＢ－ＥＧＦの作用によりβ細胞を保護・再生し、血糖の上昇を抑制するという糖尿病の治療戦略は新規かつ独創的である。

[0057] 尚、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、静脈等、特に末梢静脈等から本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）を投与することが望ましい。

[0058] 本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）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７０日間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β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ＨＢ－ＥＧＦ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β細胞保護・再生剤（Ｉ）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。

[0059] ２．本発明のβ細胞保護・再生剤（ＩＩ）

本発明はまた、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸とＨＧＦをコードする核酸とを組み合わせてなる、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、少なくともＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸が全身投与されることを特徴とする剤（以下、「本発明のβ細胞保護・再生剤（ＩＩ）」ともいう）を提供する。

[0060] 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３（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β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３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ェ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３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「ストリンジェントな条件」とは前記ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸の場合と同義である。また、当該核酸は、配列番号４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４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。

[0061] ＨＧＦをコードする核酸は、配列番号３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４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。

[0062] ＨＧＦをコードする核酸は、前記ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸と同様の方法でクローニングすることができ、前記と同様の各種ウイルスベクター又は非ウイルスベクターのプロモーターの下流に挿入することができる。ＨＧＦをコードする核酸は、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸とともに単一の発現ベクター中に挿入されてもよいし、それぞれ別個の発現ベクター中に挿入されてもよい。ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸とＨＧＦをコードする核酸とが単一の発現ベクター中に挿入される場合、単一のプロモーターの制御下に置かれてもよいし、それぞれ別個の同一もしくは異なるプロモーターの制御下

に置かれてもよい。前者の場合、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸とＨＧＦをコードする核酸とはどちらが上流（プロモーターに近い側）に配置されてもよいが、両核酸の間に哺乳動物細胞内でジシストロニックな発現を可能にする配列（例：ＩＲＥＳ配列、口蹄疫ウイルス由来２Ａ配列）が挿入される。また、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸とＨＧＦをコードする核酸とがそれぞれ別個の発現ベクター中に挿入される場合、発現ベクターの種類は同じでも異なっていてもよい。また、両核酸は同一もしくは異なるプロモーターの制御下に置かれてもよい。

[0063] ＨＧＦをコードする核酸は、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸と併用することにより、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β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β細胞が疲弊し、インスリン分泌障害、ひいてはβ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。

[0064] 本発明のβ細胞保護・再生剤（ＩＩ）は、本発明のＨＢ－ＥＧＦ発現ベクター及び本発明のＨＧＦ発現ベクターを原体のまま用いてもよいが、必要に応じて薬理学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。ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸とＨＧＦをコードする核酸とがそれぞれ別個の発現ベクター中に挿入されている場合、本発明のβ細胞保護・再生剤（ＩＩ）は、両発現ベクターを含有する単一の医薬組成物として製剤化されてもよいし、各々の発現ベクターを別個に製剤化し、併用してもよい。各々の発現ベクターを別個に製剤化する場合、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を含む発現ベクターを含有する製剤は、前記本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）と同様にして製剤化し、同様の投与経路にて投与することができる。また、ＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸とＨＧＦをコードする核酸とが単一の発現ベクター中に挿入されている場合も、該発現ベクターを含有する製剤は、前記本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）と同様にして製剤化し、同様の投与経路・投与量・投与頻度にて投与

することができる。

[0065] 本発明のβ細胞保護・再生剤（ＩＩ）において、各々の発現ベクターを別個に製剤化する場合、ＨＧＦをコードする核酸を含む発現ベクターは、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質を、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して製剤化される。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。溶剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤としては、それぞれ前記本発明のβ細胞保護・再生剤（Ｉ）において例示されたものが同様に好ましく使用され得る。

[0066] 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。

[0067] ＨＧＦをコードする核酸を含む発現ベクターを含有する製剤は、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}～10^{11}ｐｆｕ／ｍｌ（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2×10^{10}～2×10^{13}ｖｐ／ｍｌ）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。

[0068] 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。ＨＧＦをコードする核酸を含む発現ベクターを含有する製剤の最も好適な剤形は注射液剤である。

[0069] 本発明のβ細胞保護・再生剤（ＩＩ）が、各々の発現ベクターを別個に製

剤化した形態で提供される場合、両製剤は、用時混合して単一の医薬組成物として投与されてもよいし、別個の製剤として、同時又は時間差をおいて、同一又は異なる投与経路にて投与されてもよい。

[0070] 各々の発現ベクターが別個に製剤化された本発明のβ細胞保護・再生剤（ＩＩ）の投与量は、ベクターの種類、プロモーター活性、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、年齢等によって異なるが、例えば、ＨＢ－ＥＧＦ発現ベクター及びＨＧＦ発現ベクターとしてＡｄベクターを用いる場合、例えば、両発現ベクターの総量として１回あたり約５×１０^{9}～約５×１０^{12}ｖｐ／ｋｇ体重、好ましくは約１×１０^{10}～約２×１０^{12}ｖｐ／ｋｇ体重である。また、ＨＢ－ＥＧＦ発現ベクター及びＨＧＦ発現ベクターとしてＡＡＶベクターを用いる場合、例えば、両発現ベクターの総量として１回あたり約５×１０^{9}～約５×１０^{13}ｖｐ／ｋｇ体重、好ましくは約１×１０^{10}～約１×１０^{13}ｖｐ／ｋｇ体重である。

一方、ＨＢ－ＥＧＦ発現ベクター及びＨＧＦ発現ベクターとして非ウイルスベクターをリポソームに被包して用いる場合には、例えば、両発現ベクターの総量として成人１回あたり約２～約１０ｍｇ、好ましくは約５～約８ｍｇである。

[0071] 各々の発現ベクターが別個に製剤化された本発明のβ細胞保護・再生剤（ＩＩ）における両発現ベクターの量比は、所望のβ細胞保護・再生効果（空腹時及び食後高血糖の抑制、グルコース応答性インスリン分泌能の保持）を奏する限り特に制限されないが、例えば、ＨＢ－ＥＧＦ発現ベクター：ＨＧＦ発現ベクター比が１０：１～１：１０、好ましくは５：１～１：５、より好ましくは２：１～１：２の範囲内で適宜選択することができる。

[0072] 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

[0073] 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β－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）又はラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーターの転写制御下で、ヒトＨＢ－ＥＧＦを発現する非増殖型Ａｄ（本明細書においてそれぞれ「Ａｄ．ＣＡ－ＨＢ－ＥＧＦ」、「Ａｄ．ＲＳＶ－ＨＢ－ＥＧＦ」と称する）、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（本明細書においてそれぞれ「Ａｄ．ＣＡ－ＨＧＦ」と称する）、並びに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。

[0074] 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（ｐＨ４．５）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４０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４つの群（各群１０匹）に分け、

（１）２×１０^{11}ｖｐのＡｄ．ＣＡ－ＬａｃＺ

（２）１×１０^{11}ｖｐのＡｄ．ＣＡ－ＨＢ－ＥＧＦ＋１×１０^{11}ｖｐのＡｄ．ＣＡ－ＬａｃＺ

（３）１×１０^{11}ｖｐのＡｄ．ＲＳＶ－ＨＢ－ＥＧＦ＋１×１０^{11}ｖｐのＡｄ．ＣＡ－ＬａｃＺ

（４）１×１０^{11}ｖｐのＡｄ．ＣＡ－ＨＢ－ＥＧＦ＋１×１０^{11}ｖｐのＡｄ．ＣＡ－ＨＧＦ

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＝４）を正常コントロール（ｉｎｔａｃｔ）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７０日目においては週１回実施した。血糖値を図１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。

[0075] 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。

[0076] ３．生化学的解析

血糖値を、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。

血漿アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）及び血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）のレベルは、各群のウイルス投与３、５、７及び１４日後の検体を用いてＳＰＯＴＣＨＥＭ ＳＰ－４４３０臨床自動測定器（アークレイ）により測定した。

[0077] 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－ＨＢ－ＥＧＦ＋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。

[0078] ５．組織学的解析

ウイルス投与後のマウスの肝臓を用い、各群のウイルス投与３、５、７及

び１４日後の検体を用いてInt J Mol Med.38(6):1673-1682（2016）の記載と同様に組織学的解析を行った。

[0079] 実験結果

１．ＡｄベクターによるＨＢ－ＥＧＦ（及び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）に約４００ｍｇ/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、４００ｍｇ/ｄｌ以上の高値のまま推移した（図１Ｂ）。１×１０^{11}ｖｐのＡｄ．ＣＡ－ＨＢ－ＥＧＦ又はＡｄ．ＲＳＶ－ＨＢ－ＥＧＦを１回静脈注射すると、７日目までに血糖値の上昇は抑制された（図１Ａ）。その後の約１０週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）。ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子に加えてＨＧＦ遺伝子を併用した群では、ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子単独の場合よりもさらに強力に高血糖を抑制し、長期間にわたって有意な効果を示した。

[0080] ２．ＡｄベクターによるＨＢ－ＥＧＦ（及びＨＧＦ）遺伝子治療によるＴ１Ｄモデルマウスにおける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

治療遺伝子を投与して１６及び６０日後にＩＰＧＴＴ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。投与後１６日目において、ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子投与群ではグルコース投与後の血糖上昇抑制がみられ（図２Ａ）、インスリン分泌反応においてもグルコース刺激に応答して分泌量の増加が確認された（図２Ｂ）。これらの効果は、血糖値と同様に、ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子にＨＧＦ遺伝子を併用することで、相乗的に増大した。投与後６０日目においても、同様の結果が観察された（図３Ａ、図３Ｂ）。以上より、遺伝子治療により長期にわたり耐糖能が改善することが明らかとなった。

[0081] ３．本実施例の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 2003; 80: 148-158.; Hum Gene Ther 2020; 31: 695-696）。そこで、本実施例のＡｄ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．の各群と同様の５群のマウスにおける３日目、５日目、７日目、及び１４日目の血漿ＡＳＴ及びＡＬＴレベルを測定した（図４）。いずれにおいても、生化学検査（ＡＳＴおよびＡＬＴ）で２００ＩＵ／Ｌを超える異常値は見られず（図４）、Ａｄ．ＣＡ－ＬａｃＺ群の組織解析から肝障害の程度は軽度～中程度だったことから（図５、図６）、安全性に問題がない投与量であることを確認した。また、ＨＢ－ＥＧＦ群では、ＬａｃＺ群と比較してＡＳＴおよびＡＬＴ値の上昇が抑制され（図４）、さらにＨＢ－ＥＧＦ／ＨＧＦ群では強い抑制効果が得られた（図１～３）。このことから、ＨＢ－ＥＧＦ、さらにＨＢ－ＥＧＦ／ＨＧＦは、糖尿病のβ細胞に対する保護・再生作用だけでなく、ウイルス投与による肝機能障害の併発も抑制できることを確認した。

産業上の利用可能性

[0082] 全身投与によるＨＢ－ＥＧＦ遺伝子治療は、膵β細胞の保護・再生効果を示し、正常なインスリン分泌能を維持しつつ高血糖抑制効果を奏する。さらに、ＨＢ－ＥＧＦ遺伝子にＨＧＦ遺伝子を併用することで、より著明にグルコース応答性インスリン分泌能が改善され、随時血糖、空腹時血糖の上昇抑制のみならず、食後高血糖も著明に抑制することができる。糖尿病に対するＨＢ－ＥＧＦを用いた遺伝子治療としては、侵襲性が高く手技も煩雑な膵管内逆行性注入によるものがこれまで報告されていたが、β細胞の分化・増殖は正常マウスでしか示されておらず、高血糖抑制効果も十分に実証されていなかった。本発明によれば、静脈注射のような全身投与により、しかも膵局所投与と同等の低用量の投与でも、より優れたβ細胞保護・再生効果、高血糖抑制効果を奏する。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。従って、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。

[0083] 本出願は日本で出願された特願２０２１－０３３７１４（出願日：２０２１年３月３日）及び特願２０２１－１４５７９６（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] ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子（ＨＢ－ＥＧＦ）をコードする核酸を含有してなる、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、全身投与されることを特徴とする、剤。

[請求項2] 肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）をコードする核酸を組み合わせてなる、請求項１に記載の剤。

[請求項3] 膵β細胞がグルコース応答性インスリン分泌能を保持する、請求項１又は２に記載の剤。

[請求項4] 全身投与が静脈内投与である、請求項１～３のいずれか１項に記載の剤。

[請求項5] 核酸がウイルスベクター上に担持されている、請求項１～４のいずれか１項に記載の剤。

[請求項6] 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５に記載の剤。

[請求項7] 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６に記載の剤。

[請求項8] ウイルスベクターが、１×１０^{10}～２×１０^{12}ウイルス粒子（ｖｐ）／ｋｇ体重の１回用量で投与される、請求項５～７のいずれか１項に記載の剤。

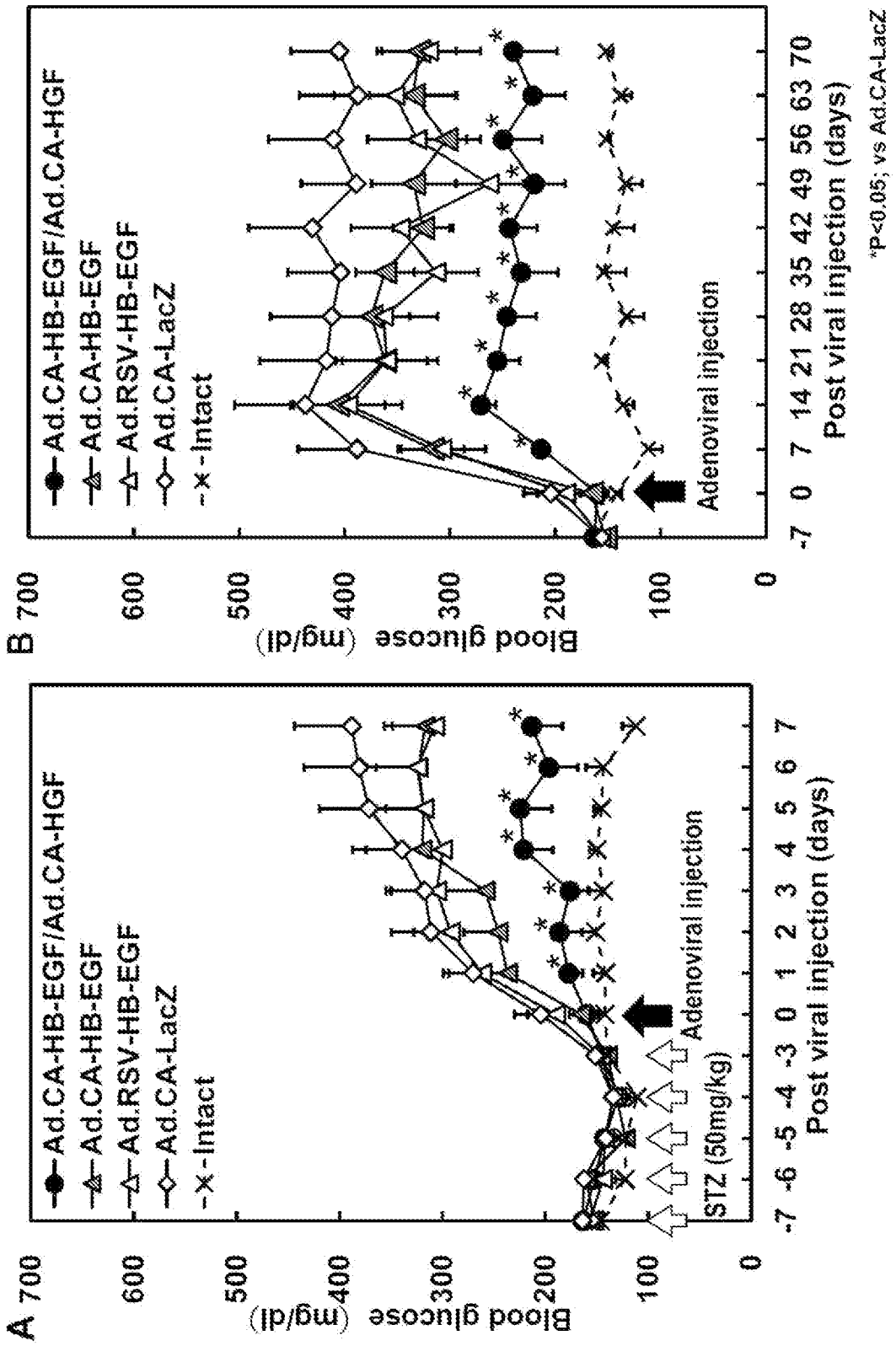
[請求項9] 糖尿病が１型糖尿病である、請求項１～８のいずれか１項に記載の剤。

[請求項10] 哺乳動物がヒトである、請求項１～９のいずれか１項に記載の剤。

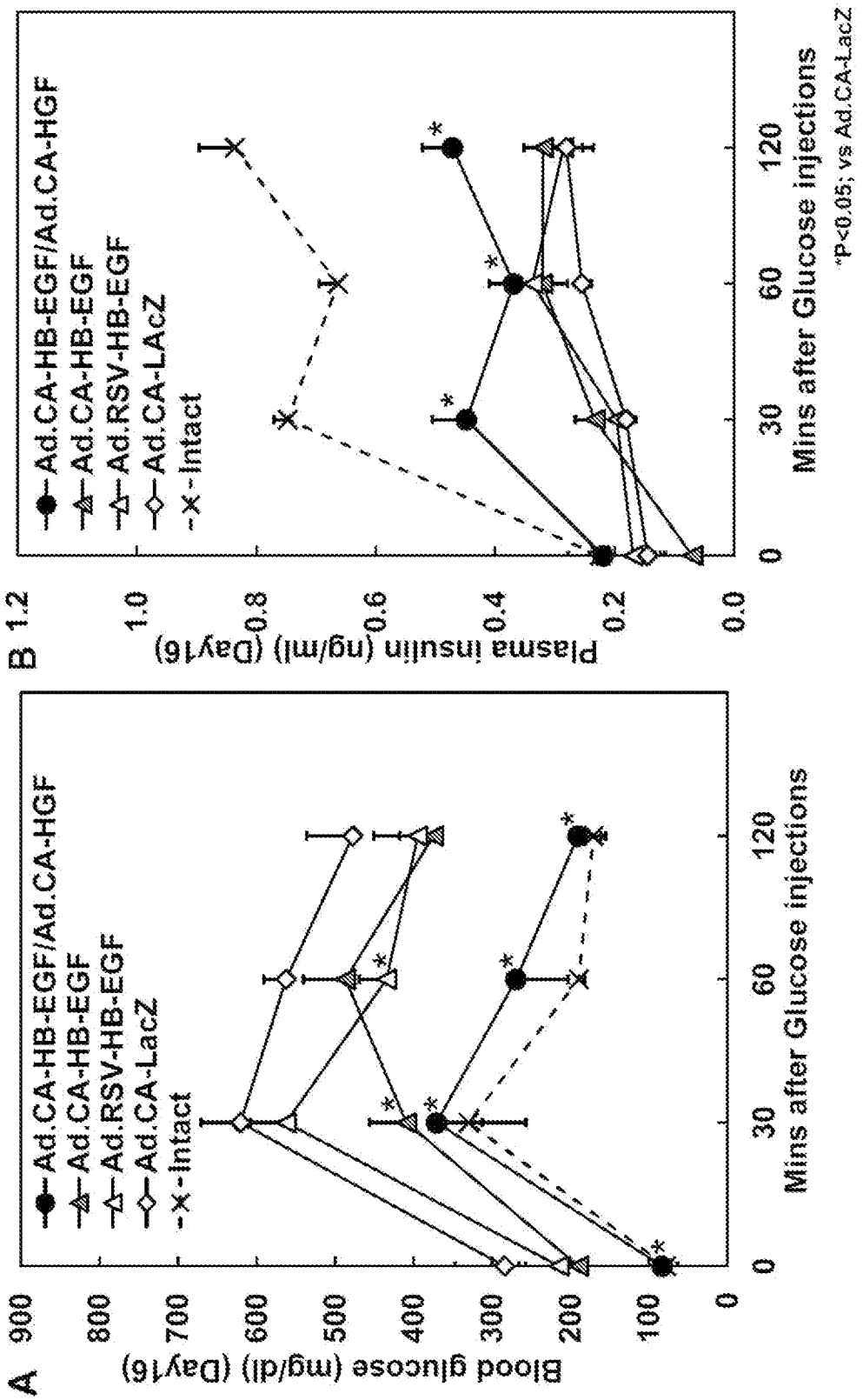
[請求項11] 有効量のＨＢ－ＥＧＦをコードする核酸を、糖尿病を有する哺乳動物に全身投与することを含む、該哺乳動物における膵β細胞の保護・再生方法。

[請求項12] 有効量のＨＧＦをコードする核酸をさらに投与することを含む、請求項１１に記載の方法。

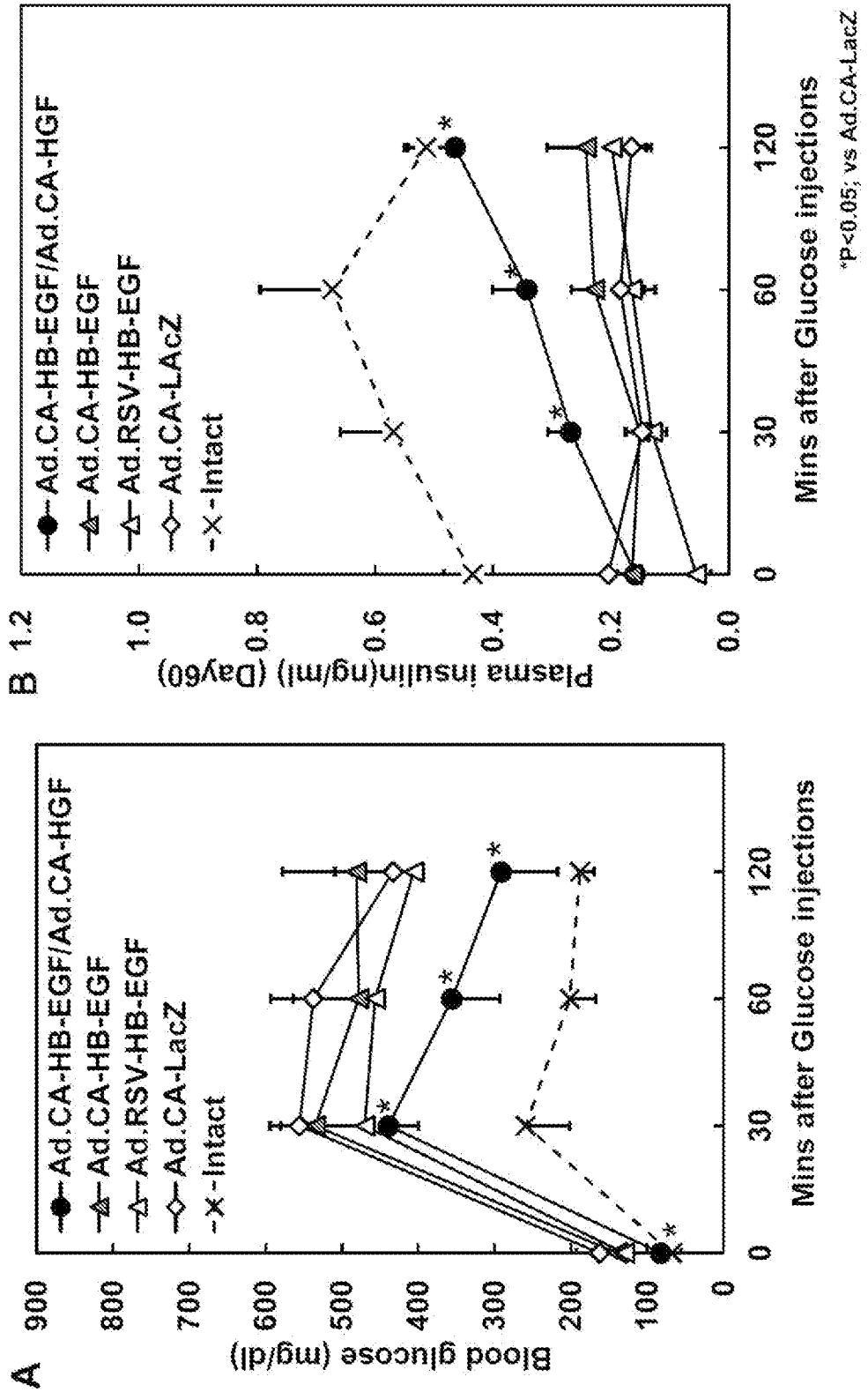
[図1]


A
B
Blood glucose (mg/dl)
Post viral injection (days)
Adenoviral injection
STZ (50mg/kg)
Ad.CA-HB-EGF/Ad.CA-HGF
Ad.CA-HB-EGF
Ad.RSV-HB-EGF
Ad.CA-LacZ
Intact
*P<0.05; vs Ad.CA-LacZ

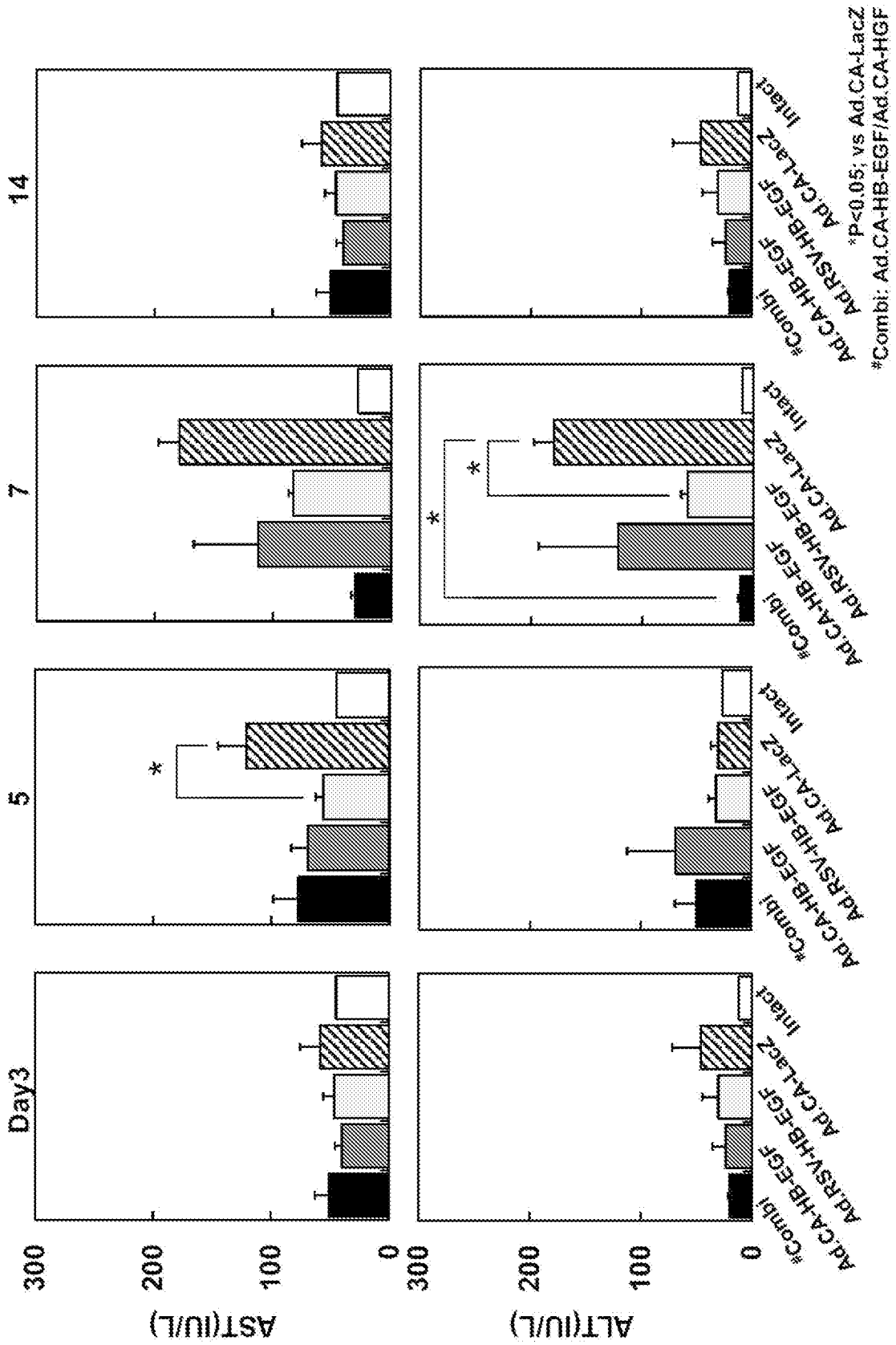
[図2]


A
Blood glucose (mg/dl) (Day16)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
30
60
120
Mins after Glucose injections
Ad.CA-HB-EGF/Ad.CA-HGF
Ad.CA-HB-EGF
Ad.RSV-HB-EGF
Ad.CA-LacZ
Intact
B
Plasma insulin (ng/ml) (Day16)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
30
60
120
Mins after Glucose injections
Ad.CA-HB-EGF/Ad.CA-HGF
Ad.CA-HB-EGF
Ad.RSV-HB-EGF
Ad.CA-LAcZ
Intact
*P<0.05; vs Ad.CA-LacZ

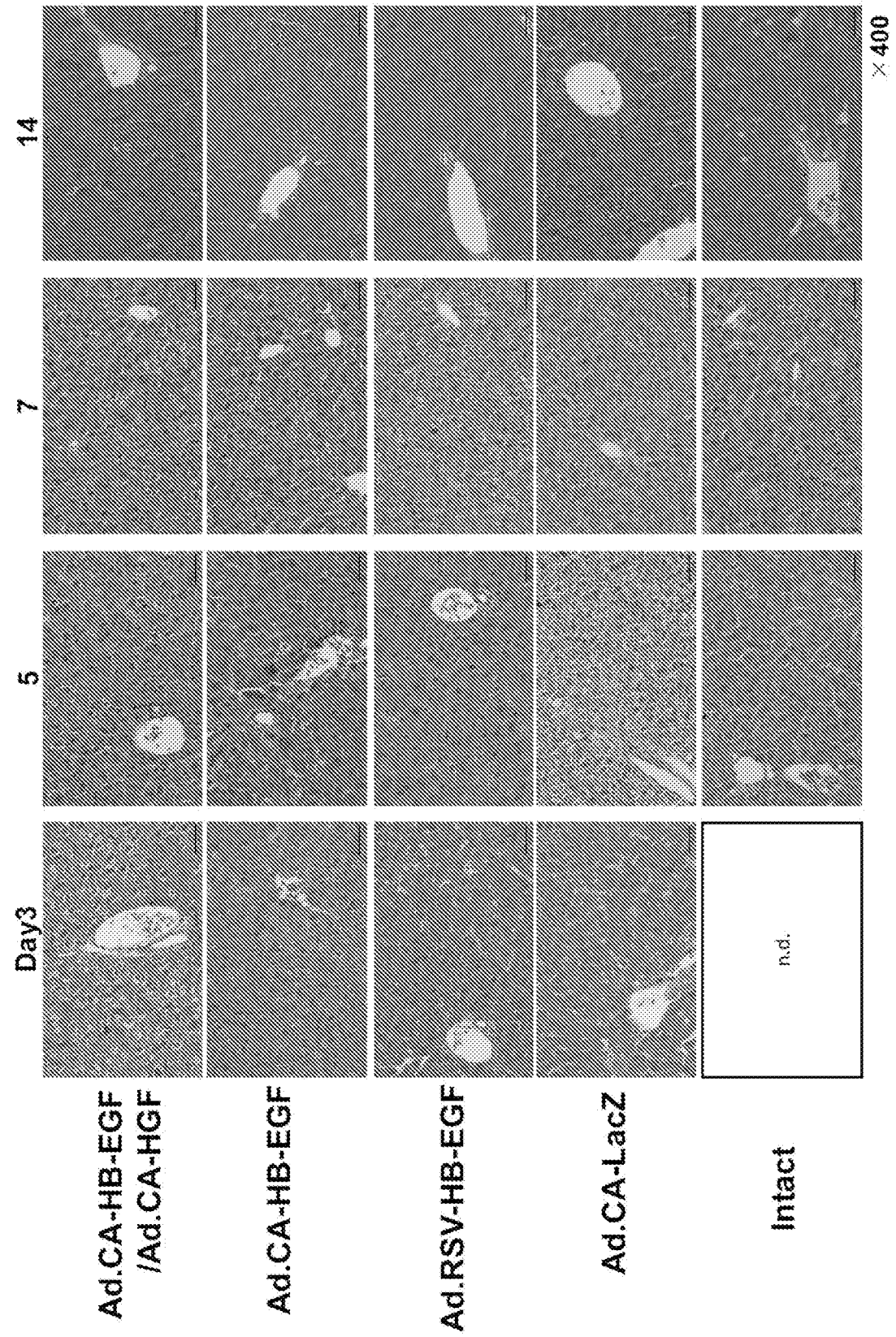
[図3]


A
Blood glucose (mg/dl)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
30
60
120
Mins after Glucose injections
Ad.CA-HB-EGF/Ad.CA-HGF
Ad.CA-HB-EGF
Ad.RSV-HB-EGF
Ad.CA-LacZ
Intact
B
Plasma insulin(ng/ml) (Day60)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
30
60
120
Mins after Glucose injections
Ad.CA-HB-EGF/Ad.CA-HGF
Ad.CA-HB-EGF
Ad.RSV-HB-EGF
Ad.CA-LAcZ
Intact
*P<0.05; vs Ad.CA-LacZ

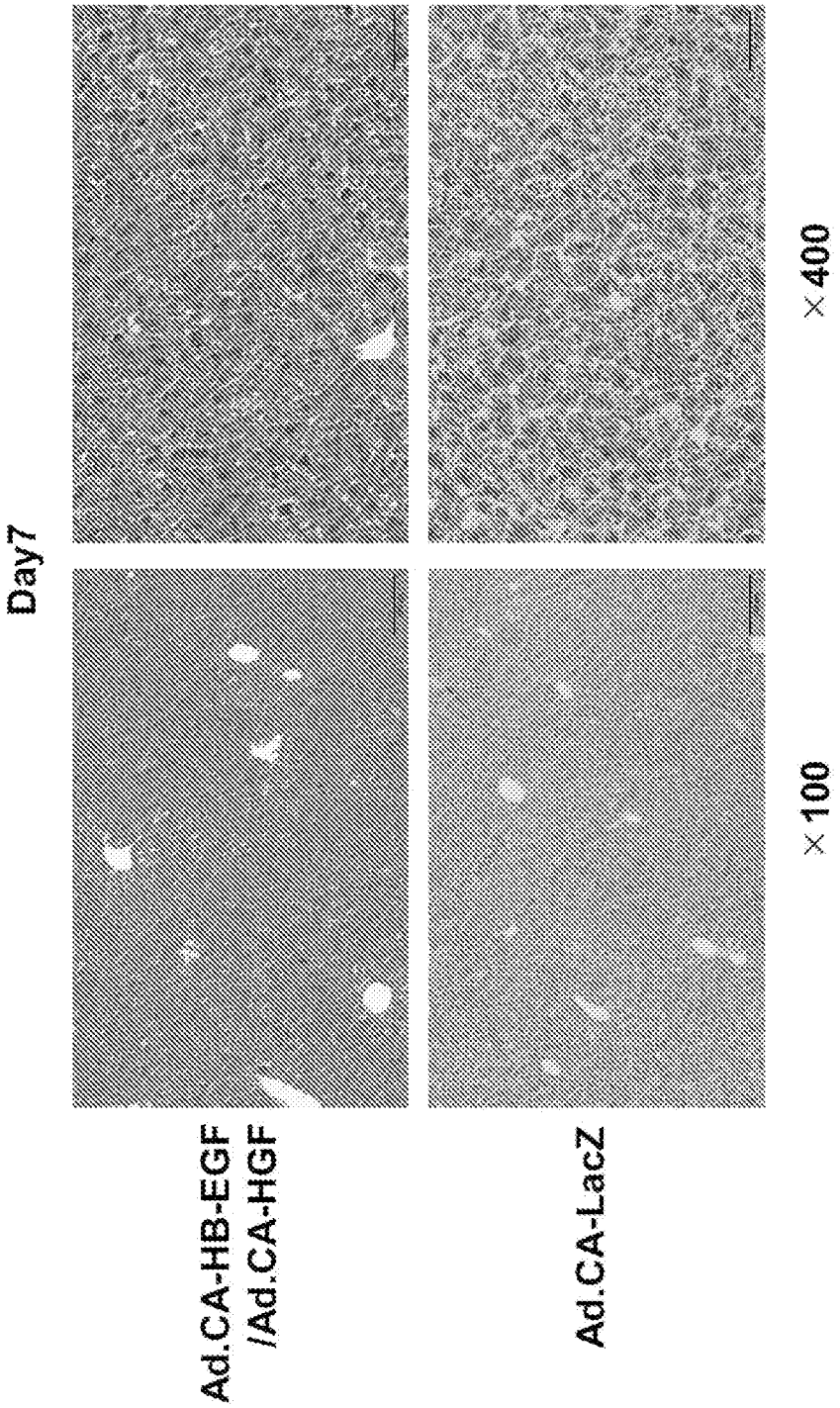
[図4]


Day3
5
7
14
AST(IU/L)
ALT(IU/L)
300
200
100
0
*
Intact
Ad.CA-LacZ
Ad.RSV-HB-EGF
Ad.CA-HB-EGF
*Combi
*P<0.05; vs Ad.CA-LacZ
*Combi: Ad.CA-HB-EGF/Ad.CA-HGF

[図5]


Day3
5
7
14
× 400
Ad.CA-HB-EGF /Ad.CA-HGF
Ad.CA-HB-EGF
Ad.RSV-HB-EGF
Ad.CA-LacZ
Intact
n.d.

[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/008898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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; ***C07K 14/475***(2006.01)i; ***C07K 14/485***(2006.01)i; ***C07K 14/62***(2006.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12N 15/12***(2006.01)i; ***C12N 15/18***(2006.01)i; ***C12N 15/19***(2006.01)i; ***C12N 15/86***(2006.01)i; ***C12N 15/861***(2006.01)i; ***C12N 15/864***(2006.01)i

FI: A61K48/00 ZNA; A61K38/22; A61P1/18; A61P3/10; A61K35/76; C12N15/12; C12N15/18; C12N15/86 Z; C12N15/861 Z; C12N15/864 100Z; C07K14/475; C07K14/485; C12N5/10; A61P43/00 105; A61P43/00 121; A61P43/00 111; A61K35/761; C07K14/62; C12N15/19 ZNA

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K48/00; A61K35/76; A61K35/761; A61K38/22; A61P1/18; A61P3/10; A61P43/00; C07K14/475; C07K14/485; C07K14/62; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/18; C12N15/19; C12N15/86; C12N15/861; C12N15/864

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 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATSUDA, E. et al. Safe and low-dose but therapeutically effective adenovirus-mediated hepatocyte growth factor gene therapy for type 1 diabetes in mice. Life Sciences. 04 January 2021, vol. 268, Article No. 119014, pp. 1-5, https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.119014 abstract, p. 4, left column, 2nd paragraph	1-12
Y	KOZAWA, J. et al. Regenerative and therapeutic effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on diabetes by gene transduction through retrograde pancreatic duct injection of adenovirus vector. Pancreas. 2005, vol. 31, no. 1, pp. 32-42, http://dx.doi.org/10.1097/01.mpa.0000163177.59920.f8 abstract	1-12
Y	WO 2007/037514 A1 (KAGOSHIMA UNIVERSITY) 05 April 2007 (2007-04-05) p. 2, 2nd paragraph	1-12

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ 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	Date of mailing of the international search report
25 March 2022	**05 April 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/008898

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	宮川 潤一郎, 膵β細胞のアポトーシス・再生, 別冊・医学のあゆみ, 糖尿病・代謝症候群－State of arts 2004-2006, 2004, pp. 77-83 table 1, non-official translation (MIYAGAWA, Junichiro. Apoptosis and regeneration of pancreatic β cells. separate volume: Journal of clinical and experimental medicine. Diabetes and metabolic syndrome-state or arts 2004-2006.)	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/008898

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/008898

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2007/037514 A1	05 April 2007	US 2009/0130062 A1 paragraph [0005] EP 1949907 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/008898

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

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; C07K 14/475(2006.01)i; C07K 14/485(2006.01)i; C07K 14/62(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/18(2006.01)i; C12N 15/19(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; C12N 15/861(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)i

FI: A61K48/00 ZNA; A61K38/22; A61P1/18; A61P3/10; A61K35/76; C12N15/12; C12N15/18; C12N15/86 Z; C12N15/861 Z; C12N15/864 100Z; C07K14/475; C07K14/485; C12N5/10; A61P43/00 105; A61P43/00 121; A61P43/00 111; A61K35/761; C07K14/62; C12N15/19 ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K48/00; A61K35/76; A61K35/761; A61K38/22; A61P1/18; A61P3/10; A61P43/00; C07K14/475; C07K14/485; C07K14/62; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/18; C12N15/19; C12N15/86; C12N15/861; C12N15/864

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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	MATSUDA, E., et al., Safe and low-dose but therapeutically effective adenovirus-mediated hepatocyte growth factor gene therapy for type 1 diabetes in mice, Life Sciences, 2021.01.04, Vol.268, Article No.119014, pp.1-5, https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.119014 Abstract, 第4頁左欄第2段落	1-12
Y	KOZAWA, J., et al., Regenerative and therapeutic effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on diabetes by gene transduction through retrograde pancreatic duct injection of adenovirus vector, Pancreas, 2005, Vol.31, No.1, pp.32-42, http://dx.doi.org/10.1097/01.mpa.0000163177.59920.f8 Abstract	1-12

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"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
"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
"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）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"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
"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
"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
"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
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
25.03.2022	05.04.2022

名称及びあて先
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

権限のある職員（特許庁審査官）
佐々木　大輔 4U 3962
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

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	WO 2007/037514 A1 (国立大学法人　鹿児島大学) 05.04.2007 (2007-04-05) 第2頁第2段落	1-12
Y	宮川 潤一郎, 膵β細胞のアポトーシス・再生, 別冊・医学のあゆみ, 糖尿病・代謝症候群－ｓｔａｔｅ　ｏｆ　ａｒｔｓ　２００４－２００６, 2004, pp.77-83 表1	1-12

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/008898

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:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/008898

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2007/037514 A1	05.04.2007	US 2009/0130062 A1 [0005] EP 1949907 A1	