

特集《バイオ・ライフサイエンス 委員会》

# iPS細胞技術とそれをめぐる 特許出願動向についての分析



バイオ・ライフサイエンス委員会委員長 石埜 正穂\*

京大の山中伸弥教授らによるiPS細胞(induced Pluripotent Stem cells; 人工多能性幹細胞)の成果の発表に対する世間の大きな反響は、最近のバイオメディカル分野における日本の国際競争力強化への期待の高まりを象徴している。山中グループは、たった4つの遺伝子セットの発現によって体細胞を初期化(再プログラミング)できるという驚くべき事象を見出した。これは自然科学上の大発見であり、ES技術の抱える問題を克服するための突破口となる可能性を秘めている。この全く新しい技術に関係した知的財産権の行方について、最近の動向をまとめつつ考察する。

## 1. 技術的背景

ES細胞(Embryonic Stem cells)は、初期胚(胚盤胞の内部細胞塊)に由来する細胞であり、高い増殖能と様々な細胞に分化できる多能性を有することから、再生医療におけるドナー細胞(組織)の供給源として近年大きな期待が寄せられている。しかし、ES細胞は受精卵を使用する点で倫理的に重大な問題を持つ。また、治療に際しては基本的に他人の細胞を用いることになるので、拒絶反応も避けられない。クローン胚技術を応用することにより、これらの問題を回避するES細胞技術の開発も原理的には可能だが、受精卵を壊して作製する点で倫理的課題がやはり残る。

そこで患者自身の体細胞から直接、ES細胞と同じ多能性を持った幹細胞(iPS細胞)を誘導・樹立して、そこから分化させて必要な細胞(あるいは組織)を取得すれば、倫理的問題も拒絶反応の問題もいっぺんに回避することができる。すなわち、iPS細胞の開発は胚性幹細胞(ES細胞)の欠点を補う代替技術としての重大な側面を有している。脊髄損傷や若年性糖尿病など、細胞移植療法によって治療が期待される疾患は多く、iPS細胞技術への期待は益々高まっている。しかし、分化の制御や癌化の回避など、ES細胞技術からそのまま引き継いだ基本的な課題やiPS細胞に固有

な問題につき、まだまだ乗り越えるべき壁は高く、今後のさらなる研究開発に期待がかかっている。

一方、治療への直接的な応用以外にも、例えばiPS細胞を遺伝子疾患患者の体細胞から樹立して所望の細胞・組織に分化させれば、遺伝子疾患の研究や医薬のスクリーニング等にきわめて有用な系となるため、そのような方向での研究も進んでいる。これらの応用に関しては、治療的使用におけるような高いハードルもなく、今後の積極的な活用が期待されている。

## 2. iPS細胞の誘導技術に関する出願動向

### 2-1 iPS細胞誘導因子に関する研究成果の概要

iPS細胞技術については、当然のことながら、まずiPS細胞をどうやってうまく誘導・樹立するか、というところが基本的な技術的課題となる。山中グループの最初の成果は、「たった数個の内因性遺伝子を活性化することによって体細胞を初期化誘導できる」という新たな知見を提供し、世の中に強烈なインパクトを与えた。しかし、初期化誘導に必要な遺伝子の活性化を起こさせるためには、当初示された4遺伝子(c-Myc, Oct3/4, Sox2, Klf4)を直接導入する以外に、あるいはその延長線上に、他の方法がいくらかでも存在する可能性が考えられ、しかもそのような代替手段の具体的内容は、当初の成果から必ずしも予測できない。

すなわち、iPS誘導に関して、最初の成果のインパクトをそのまま踏襲するような広く独占的な権利は存在しないし、今後も確保できない可能性が予測され、そのことをまず大前提として考える必要がある。実際に、当初とは異なる遺伝子セットの導入、あるいは適当なペプチドや化学物質等への一定期間の曝露、使用する細胞の選択の工夫その他によって、新しい方法で体細胞を初期化誘導するような成果が、米国をはじめ

\* 2008年度バイオ・ライフサイエンス委員会第4部会長。札幌医科大学医学部衛生学講座准教授、同大学附属産学・地域連携センター副所長(知的財産管理室長)。

とする世界の研究室から次々に発表され始めている。これらはそれぞれ、当初の特許ではカバーできない別次元の技術や知的財産を生み出し得るものである。そこでまず、これらの研究成果とその知財的な展望について、代表的なグループごとに概観しつつ検討する。

#### (1) 山中グループ (京都大学)

京大の山中グループは、上述のように iPS 細胞という全く新しい研究対象分野を切り開き、この技術に係る世界最初の特許権取得も果たした (その経緯・内容については 2-2 で検討する)。体細胞初期化に関しては、当初マウスで成功<sup>(1)</sup>、その後ヒトで成功<sup>(2)</sup>し、いずれも世界で最初に報告している。その後、培養の工夫などによって、c-Myc を除いた 3 遺伝子によっても体細胞を初期化誘導できることを示した<sup>(3)</sup>。知財的には、4 遺伝子による iPS 細胞誘導方法が開示されている環境下で 3 遺伝子による同様な誘導方法の特許権が新たに成立する可能性については議論の分かれるところである。この場合、その他の要件、たとえば 4 遺伝子から 3 遺伝子に減らすことを可能にした技術 (例えば培養条件や細胞選択の工夫等) が発明の構成要素として求められる場面もあろう。このことに関連して、がん遺伝子である c-Myc を使用しない技術は当初から期待されていたところ、4 遺伝子からこれを除いた 3 遺伝子を用いた場合に iPS 細胞の樹立効率が顕著に落ちることから、後ほど示すように、それを補うような重要技術が複数のグループから登場している。

#### (2) Thomson グループ (Wisconsin Alumni Research Foundation)

米ウィスコンシン大学の James Thomson 博士は 1998 年にヒト受精卵から ES 細胞を世界で初めて分離した ES 細胞研究の権威である。Thomson グループは、新生児由来細胞の使用ではあるが、山中グループとは異なる 4 因子 (Oct4, Sox2, Nanog, Lin28) でヒト体細胞の初期化誘導に成功、ヒトの成果としては、山中博士と相前後して世界に先駆けた報告を行った<sup>(4)</sup>。また、この成果に基づいて、早い段階で特許出願も行っている (出願の経緯・内容については 2-3 で検討する)。

#### (3) Ding グループ (Scripps Research Institute)

Sheng Ding 博士らのグループは、Oct3/4, Klf4 の 2 遺伝子と低分子化合物の組み合わせによって、マウスの胎仔線維芽細胞から iPS 細胞を樹立することに成功した<sup>(5)</sup>。これらの成果を基にして今後確保されるであろう知的財産権が注目される。Ding グループは、

さらに化学物質単独での iPS 細胞誘導をめざしている。もちろん、化学物質単独での誘導技術の開発については世界の研究グループが目下水面下で鎬を削っているものと思われる。この試みが成功すれば、遺伝子導入に依存した誘導方法に取って代わる革新的な誘導技術をもたらし得る。

Ding グループは、最近ではタンパク質の導入による iPS 細胞の樹立にも成功している<sup>(6)</sup>。この方法では、ポリアルギニンによる細胞膜通過ドメイン (PTD; Protein transduction domain) を結合して細胞膜を透過できるように改変した山中博士の 4 因子のリコンビナントタンパク質を、細胞内濃度を維持できるように持続的にマウス体細胞に暴露し、iPS 細胞 (彼らはこれを piPS 細胞: protein-induced Pluripotent Stem cells と呼んでいる) を樹立することに成功した。この成果の知的財産的な影響については、3. で検討する。

なお、Ding グループの以上の成果に係る論文には次に掲げる Schöler 博士も名を連ねている。

#### (4) Schöler グループ (Max Planck Institute for Molecular Biomedicine)

Hans R. Schöler 博士らのグループは、Sox2 や c-Myc を内因性に発現しているマウス神経幹細胞 (NSC) に Oct3/4, Klf4 の 2 遺伝子のみを導入することで iPS 誘導に成功した<sup>(7)</sup>。さらにその後、培養時間の延長等によって、Oct3/4 のみで iPS 細胞を樹立することに成功している<sup>(8)</sup>。これらの技術が当初の 4 因子を用いた成果に基づく特許権の範囲外に属することは明白である (図 2 参照)。iPS 細胞の原料である体細胞の供給源は、皮膚細胞等のように簡便に取得できる体細胞でなくとも、例えば骨髄等から得られる成人幹細胞等であってよいことを考えれば、使用する遺伝子が少ない分、治療応用により近い技術である可能性もある。但し、本法は脳の幹細胞を使用するので、実用化に際しての敷居はむしろ高い可能性がある。

#### (5) Melton グループ (Harvard University)

Douglas A. Melton 博士らのグループは、HDAC 阻害剤 (バルプロ酸) を用いることによって、ヒト新生児線維芽細胞から Oct3/4, Sox2 のたった 2 因子のみで iPS 細胞を樹立することに成功した<sup>(9)</sup>。この技術は基本的には iPS の誘導効率を高める目的のものであり、下記 2-3 (1) の Thomson が取得する可能性のある権利 (Oct3/4, Sox2 の 2 因子による再プログラミング方法)、あるいは例えば 2-1(1) で述べた山中グループ

プの成果 (c-Myc なしの 3 因子による誘導) から得られることが期待される権利の下流に位置することになるだろう。

これとは全く別に、このグループは、分化した膵臓外分泌細胞を、Pdx1, Ngn3, Mafa の 3 遺伝子の導入によって、直接  $\beta$  細胞に再転換させた。iPS 細胞技術を介さないで分化細胞を再分化させるという極めて重要な成果といえる<sup>(10)</sup>。

#### (6) Hongkui Deng グループ (北京大学)

山中グループの 4 因子から c-Myc を除いた Oct3/4, Sox2, および Klf4 の 3 因子に p53 siRNA や UTF1 を加えることによって、ヒト成人線維芽細胞から高効率で iPS 細胞を誘導した<sup>(11)</sup>。

#### (7) Huck-Hui Ng グループ (Genome Institute of Singapore)

Oct4, Sox2, および Esrrb の 3 因子を用いて、マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) から iPS 細胞を誘導した<sup>(12)</sup>。

#### (8) Jaenisch グループ (Whitehead Institute for Biomedical Research)

Rudolf Jaenisch 博士らのグループは、山中グループの 4 因子に C/EBP  $\alpha$  を加えることにより、終末分化したマウス B 細胞から iPS 細胞誘導を行った<sup>(13)</sup>。その他、iPS 細胞を血球系細胞に分化させて鎌形赤血球症のマウスを治療した報告、薬剤選抜のためのマーカーを体細胞に予め導入することなくコロニーの形態によって iPS 細胞の選抜する技術の報告、誘導因子を 1 つのベクターに乗せて導入する技術に関する報告など、iPS 細胞関連の論文を多数発表している。これらの研究は基本的に仮説を検証したり基本技術を応用する堅実なタイプの内容であることから、学問的には重要であっても特許的には際立った権利を確保しにくいかもしれない。ただ、薬剤耐性因子に頼らないコロニー選抜法などの実用的な工夫も多く、それらの中から有用でクリティカルな特許が生まれる可能性もある (2-3 (2) において検討)。

#### (9) その他

このほかにも、別の誘導活性遺伝子または小分子を用いたり、誘導を抑える因子の阻害を行ったり、それらを組み合わせたりなど、様々な iPS 細胞誘導に係る新規の技術や関連する特許が今後登場してくることが予想され、そのうちどのようなものがコア技術になるかについては予測困難な状況にあるといえる。

## 2-2 山中グループの成果に係る出願をめぐる動向

### (1) 問題点の当初の指摘

iPS 技術の今後の流れは不透明だが、山中グループが当初マウス細胞を用いて c-Myc, Oct3/4, Sox2, Klf4 の 4 遺伝子で成功した iPS 誘導方法が、世界で最初に iPS 細胞技術の扉を開いた、きわめて先駆的かつ優れた成果であることに変わりはない。現在のところ、iPS 細胞に関係した世界の多くの成果は、基本的にこの技術に追随したり、それを応用したものであるため、少なくとも実験室レベルでは、この 4 遺伝子を使用する誘導方法が当面の標準的なテクニックとなっている。従って、この誘導方法は、将来治療に直接使用されない可能性があるにしても、薬剤のスクリーニング系などに今後も広く活用され続けていく可能性がある。その意味では、この成果を基にした最初の京大の特許出願 (WO2007/069666) に一定の価値があることは間違いない。

現在、WO2007/069666 から分割した出願が既に日本国で特許を受けているが、この PCT 出願については、当初次の問題点が指摘されていた。

#### ① バイエル社が同様な技術につき出願している件

バイエル社のグループもヒトでの iPS 細胞誘導に関する成果を論文発表した<sup>(14)</sup>、コレスポンディングオーサーの桜田一洋氏が、山中グループがマウスで iPS 細胞誘導に成功した 4 因子を用いて、山中グループよりも早くヒト iPS 誘導に成功していた可能性をマスコミを通じて示唆した。

#### ② 特許性の問題

WO2007/069666 の明細書の実施例 13 には、ヒト成人皮膚細胞からは iPS 細胞が樹立できないかのようなネガティブデータと受け取れる記載があるため、ヒトを対象とする部分の権利化が危ぶまれた。また、PCT の国際調査報告においては、4 因子を用いた iPS 細胞誘導技術の進歩性を否定する見解が出されていた。

#### (2) 桜田グループの発明に係る出願 (バイエル、後に iZumi Bio が承継)

前項の①に関しては、日本の国内出願 JP20070159382 (2007/6/15)、およびそれを優先権の基礎とした PCT 出願 WO2009/0006930 (2007/11/20)、ならびに同じ JP20070159382 を優先権の基礎とする 2 件の PCT 出願 (WO2009/0006997, WO2009/0007852) およびイギリスの国内出願 GB2450603 (いずれも

2008/6/13 出願) が, 2008 年末から 2009 年 1 月にかけて次々に公開された。

これらの出願に共通かつ最先の優先日 (日本国内出願の出願日である 2007/6/15) は, 山中グループの「マウス」iPS 細胞の論文発表 (2006 年 8 月), および山中グループの iPS 細胞特許出願 WO2007/069666 の優先日 (2005/12/13) および出願日 (2006/12/6) のいずれよりも後になっている (図 1 参照)。従って, WO2007/069666 の分割出願につきヒトにおける iPS 細胞の製法に関する特許が認められている現状においては, 同じ 4 因子を用いた同様なヒト iPS 細胞誘導法に関する権利に関して, バイエル社の出願は (少なくとも日本では) 後願ということになる。

一方, もし WO2007/069666 に関してヒトにおける権利が認められないことがあるとすれば (例えば他国での審査において, あるいは日本でも今後無効審判があり得るため), 桜田グループ出願の優先日が山中グループの「ヒト」iPS 細胞の論文が公開された 2007 年 11 月より早いことから, 山中グループの 4 因子を用いたヒト iPS 細胞誘導に関しては, 桜田グループの出願が最先かつ新規な出願ということにもなり得る。また, 桜田グループのほうが先にヒト iPS 細胞の作成に成功していたとの主張に従えば, 米国においては桜田グループの出願が優位に立つ可能性もある。

ただ, 桜田グループの出願優先日前に, 既に山中グループの最初のマウスの成果が論文発表されている (そもそも桜田グループのヒト iPS の研究成果も山中グループのマウスの成果を応用したものと考えられる) ので, ヒトの iPS 細胞誘導に関して, マウスにおける場合と全く同じ 4 因子を用いるとしただけの権利が認められるかどうかは微妙といえる。一方, ヒトにおける iPS 細胞誘導につき, マウスにおいて開示されていた内容と異なる努力工夫を行ってれば, その部分の権利の確保についてはケースバイケースといえよう。

そこで桜田グループの研究成果に係る出願の内容を見ることにする。桜田グループの一連の成果は, 直近の 2008/6/13 に提出された 2 つの PCT 出願に集約されていると思われる。そのうちの一方である WO2009/007852 は<sup>(15)</sup>, 長期自己複製可能な非胚性・体細胞性のヒト多能性細胞という, iPS 細胞の最上位概念ともいえる物質クレームを第 1 クレームとして備えている。以下, 独立または従属したクレームにおい

て, 一定の ES 特異的遺伝子マーカーの発現による限定, 生後細胞に山中グループの 4 因子 (あるいはそこから c-Myc を除いた 3 因子) を強制発現させたり ES 様形態に着目してコロニーを選別するなどの製法ステップによる限定などを行っている。また, ES 細胞と iPS 細胞の遺伝子発現パターンの違いに着目した幹細胞の物質クレームも試みている。基本的には, ヒト iPS 細胞の発明を最初に行ったという自らの主張する前提に立った野心的な内容になっているといえる。

ちなみにこの出願は当初の日本国出願 JP20070159382 には掲載されていない豊富なデータを開示する。これらは 2 つの基礎出願, PCT 出願 WO2009/006930 (2007/11/20) およびそれより後に出願された米国仮出願 61/040,646 (2008/03/28) から記載されているものだが, その大部分は, JP20070159382 の出願時の成果 (ヒト体細胞から山中 4 因子により iPS 細胞コロニーを取得したデータ, およびマウス幹細胞から 3 因子により ALP 活性陽性細胞コロニーを得たデータ) を補足するデータとなっている。また, 追加データのうちの大部分を開示する WO2009/006930 の出願日は, 山中グループのヒト iPS 細胞成果の論文の電子版の公表日と (奇しくも?) 重なっている。一方, WO2009/007852 においては, 追加データに加え, prophetic example (予想実施例) として, 多能性誘導因子を PTD 融合ペプチドの形で導入する手順や, 多能性誘導 siRNA をスクリーニングする手順なども追加掲載している。

一方, 2008/6/13 の PCT 出願のうちの他方 (WO2009/0006997) は, 最先の出願である JP20070159382 のみを基礎としていて, その発明の内容を引き継いでいる。発明の特徴は, Tert, Nanog, Oct3/4, Sox2 がエピジェネティックな不活性化を受けていない「未分化幹細胞」(出生直後の組織や胎盤等にみられる) に遺伝子導入を行うことにより, 高い効率で iPS 細胞を誘導しようというものである。特定の細胞を使用する限定がかけられている面で権利範囲が狭くなっているが, 少なくとも山中グループの出願と同一ではない。また逆に, 「未分化幹細胞」を使用する前提のもとでは, c-Myc なしでも iPS 細胞誘導が可能なることを実証したと主張してクレームしている (但し c-Myc を除いた実施例はマウスに関してのみ言及されている)。この出願が特許として成立すれば, 今後の技術展開次第で一定の有用性を見出せる可能性もある。

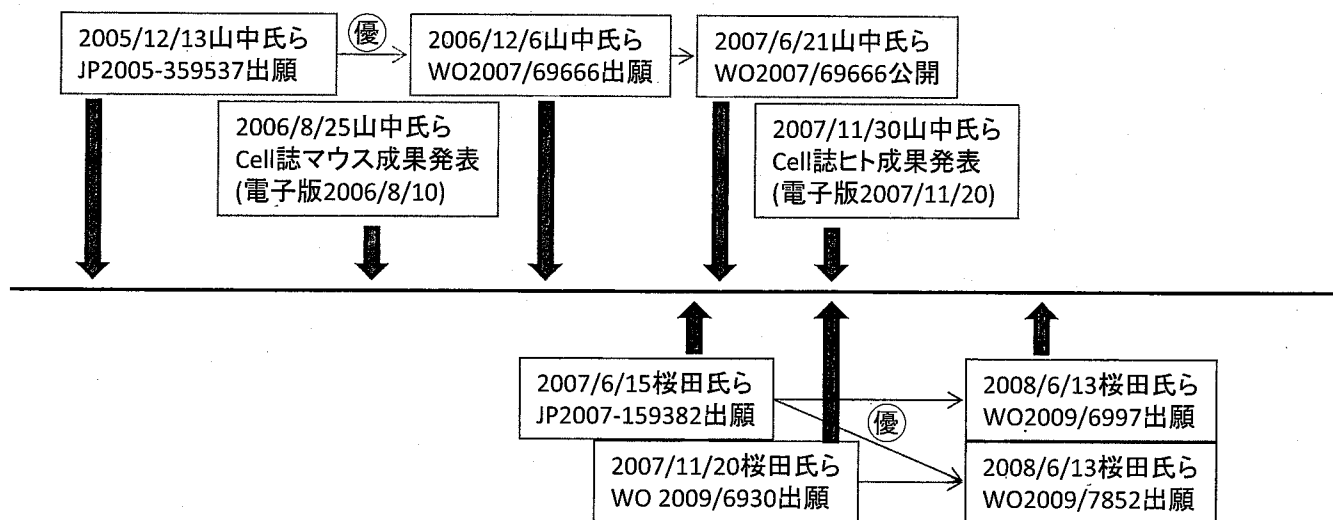


図1 山中グループと桜田グループのそれぞれの成果に係る論文発表および出願の時系列的な関係

なお、これら桜田グループのiPS細胞出願の権利については、バイエル社から米バイオベンチャーのiZumi Bio社に譲渡された旨が発表されている（PCT出願については、公開時に既に出願人がiZumi Bio社となっている）。

### (3) 山中グループの最初のiPS出願の権利化

既に言及したが、WO2007/069666については、その後この出願から「体細胞から誘導多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の4種の遺伝子：Oct3/4, Klf4, c-Myc, 及びSox2を体細胞に導入する工程を含む方法」という製法クレームのみが分割出願され、早期審査の請求がなされた。この親出願には上記(1)②で述べた問題もあったため、出願人はこの過程で上申書を提出して詳細な意見を述べている。

まず、国際調査報告で否定的見解の出された進歩性の問題に関し、スクリーニング方法が公知だった（自らの先行出願WO2005/080598に方法の記載があることから）とはいえ、そもそも存在するかどうかも分からなかった因子を見つけ出し、そのことによって長年切望されていた新技術を提供することができたのだから、容易想到性の判断は不当であるとの主張を行った。次に、ネガティブデータの懸念に関しては、実施例13は単に8日目にコロニーが得られなかった事実を示しているだけで、iPS細胞ができないことを示すデータではないと主張、逆にこの実施例の基データが記載されている発明者の実験ノートを提出し、同じ実験における12日目の細胞が未分化状態を示すアルカリホスファターゼ陽性を呈していることなどから、この例は実際にはヒト成人皮膚線維芽細胞から4遺伝子

のみの導入でiPS細胞が製造できる成功例を説明したものであると主張している。

その後、この分割出願は特に拒絶理由の通知もなく2008年8月に特許査定を受けた（特許第4183742号）。

上申書の中で、代理人らは、実施例13でiPS細胞のコロニーがうまく形成されなかった理由の1つとして、ヒトのES細胞用培地を使用できる環境になかったことを掲げている。つまり、当時山中研究室でヒトES細胞用培地を持っていなかったことが、ヒト成人細胞を対象とした実施例を提示できなかった一因として主張された。日本ではヒトES細胞の研究が厳しく規制されており、山中研究室もこれを扱える環境になかった。このような逆境がiPS誕生の原動力になったともいえようが、代理人らの主張に従えば、同じ規制の影響によって、せっかくのiPS成果についても十分な実験データを出せる環境になく、特許性が脅かされる結果になったということになる。

### 2-3 その他のiPS細胞誘導関連出願の動向

これらのほかにも、複数のグループによる特許出願が公開されはじめています。

#### (1) Thomsonグループの成果に係る出願

Thomsonグループの最初のPCT出願（WO 2008/118820）はかなり大胆な第一クレームで始まっている。

A method of reprogramming primate somatic cells, the method comprising the steps of : exposing a plurality of potency-determining factors to the primate somatic cells under conditions sufficient to reprogram the cells, wherein the potency-determining factors do

not comprise c-Myc and Klf4 ; and culturing the exposed cells to obtain reprogrammed cells having a higher potency level than the primate somatic cells.

ここでは、c-Myc および Klf4 を含まないことを特徴とする複数の potency 決定因子への曝露によって霊長類体細胞を再プログラムする方法がクレームされている。c-Myc と Klf4 は山中発明で使用されている 4 つの因子のうち、癌化に特に関係する因子として懸念されているものなので、これらを使用しない誘導方法は確かに好ましい。「c-Myc と Klf4 を含まない」などの限定により、いずれの国で実質的にどの範囲まで有効な権利確保が可能かは不明だが、もしもこれに近い形で有効な権利が成立すれば、山中出願とは抵触しない部分で、途方もなく広い権利範囲をカバーできる大胆かつ挑戦的なクレーム立てとなる。また、上位クレームでは必ずしも iPS 細胞の完成体までを求めず、再プログラムの意味を「体細胞よりも多能性の度合いが高くなる」という程度のものに定義することによって、求められる実施例のハードルをより低くする工夫もなされている（なお、次の Jaenisch グループの出願においても an agent that reprograms somatic cells to a less differentiated cells とするなどの類似の工夫がみられる）。

いずれにしても、山中グループと一部異なる 4 因子 (Oct4, Sox2, Nanog, Lin28) を使用する iPS 細胞誘導技術に限定した範囲では少なくとも一定の権利を確保できることが予想される。当該因子を用いた誘導技術については、他グループの研究が進んでいないため、Thomson グループの独壇場といえる。そればかりか、この出願は、誘導因子をさらに 3 つ、あるいは 2 つまで減らしたクレームも備えている。すなわち、この WO2008/118820 は 3 つの米国仮出願 60/919687 (2007/3/23)、60/974980 (2007/9/25)、60/989058 (2007/11/19) を基礎としており、最初の仮出願の段階では誘導因子を上記 4 因子にまで絞り切れていなかったが、2 番目の出願から最終的な 4 因子が登場している。そしてその後さらに仮出願を活用して実施例を追加していく過程で、前述の論文<sup>(4)</sup>には登場していなかったヒト成人皮膚細胞の実施例 (4 因子使用) も加わっているばかりか、胎児線維芽細胞を使用する系においては Lin28 を除いた 3 因子によって、さらにもっと分化度の低い細胞を使用する系においては、Oct4, Sox2 の 2 因子のみによって、低い効率ながら、

再プログラミングが実現できることまでをも示している。

Oct4, Sox2 は iPS 細胞誘導においてかなり本質的な役割を担う因子であることが次第に分かってきているので (図 2 も参照)、Thomson グループ (WARF) の出願は将来極めて重要な意味を持つ可能性を秘めているかもしれない (上述 2-1 (5) の Melton グループの成果に関する記載も参照)。

## (2) Jaenisch グループの成果に係る出願

Jaenisch グループの出願 WO2008/124133 (4/7/2008) は、新規な iPS 細胞の誘導因子に関する出願ではないが、再プログラミングされた細胞を選別するための方法や、そのような方法によって得られた細胞の発明を記載している。WO2008/124133 は基本的に 3 つの実施例をもとにしており、それぞれの実施例はこの出願が基礎とする米国仮出願 60/922121 (2007/4/7)、60/959341 (2007/7/12)、および 61/36065 (2008/3/12) において順に開示されている。

米国仮出願 60/922121 の実施例は、体細胞ではメチルトランスフェラーゼを欠くと急激にアポトーシスを起こすが、iPS 細胞は ES 細胞と同様、これに抵抗性であるというデータを示しており、そのことを根拠として再プログラミング細胞を識別したり、体細胞を再プログラムする薬剤を選別する技術をクレームしている。米国仮出願 60/959341 の実施例は、薬剤選抜を利用せずに細胞コロニーの形態的特徴によって再プログラミング細胞を選択する技術を開示しているため、それを根拠として、選択マーカーを含まない体細胞において形態的特徴によって再プログラムされた体細胞を識別するステップを含む、再プログラム細胞の誘導方法をクレームしている。米国仮出願 61/36065 には、B 細胞を再プログラミングすることに成功した研究成果が記載されており、分化体細胞を多能性状態に再プログラムする方法、再プログラムされた分化体細胞を選択する方法、それらによって得られた細胞等をクレームしている。このほか、女性の体細胞では X 染色体の一方が不活化している (ライオニゼーション) のに対し、ES 細胞では両染色体とも転写活性があることから、X 染色体の活性化状態を指標として再プログラミング細胞を識別したり再プログラミング薬剤をスクリーニングする方法 (但し実施例はない。この件については次項も参照) をクレームするなど、かなり

盛り沢山な出願内容となっている。

これとは別に、同グループからは、Wnt経路の刺激を介することにより（c-Mycの強制発現なしでも）一定の効率でiPS細胞誘導を行う技術の特許出願がなされ、公開されている（WO 2009/032194）。

### (3) Hochedlingerグループの成果に係る出願 (General Hospital Corp.)

上記JaenischグループのWO2008/124133に少し遅れて、ハーバード大学のKonrad Hochedlinger博士らのグループから、類似した内容の出願がなされている（WO2008/151058, 2008/5/30出願）。この出願は、米国仮出願60/932,267（2007/5/30）を優先権の基礎としており、形態の違いとマーカー発現を活用してNanog非発現分化初代細胞から誘導多能性幹細胞を選別する方法、およびX染色体の再活性化を活用してNanog非発現雌細胞から誘導多能性幹細胞を選別する方法のクレームを備えている。形態による選択に

関する実施例やクレームに関してはJaenischグループよりも優先日が早い。一方、Jaenischグループの出願ではHochedlinger出願の優先日より前に提出された仮出願60/922,121（2007/4/7）の段階から既にX染色体の活性化状態による選択に関するクレームが記載されているが、Hochedlingerグループの出願では、X染色体の活性化状態を指標とした細胞選別に関する実施例が、仮出願60/932,267（2007/5/30）の段階から盛り込まれている。

形態に係る選別法もX染色体再活性化に係る選別法も、いずれもES細胞とiPS細胞の共通性に注目したものであり、進歩性主張の可否については微妙かもしれないが、米国内のすぐ近くの研究機関同士で、仮出願を活用した熾烈な出願競争を行っている様子が窺えて興味深い。しかし、これらの機関から同様なクレームを備える出願が相次いでいることは、大学ゆえの情報管理の甘さや情報のコンタミネーションが生じてい

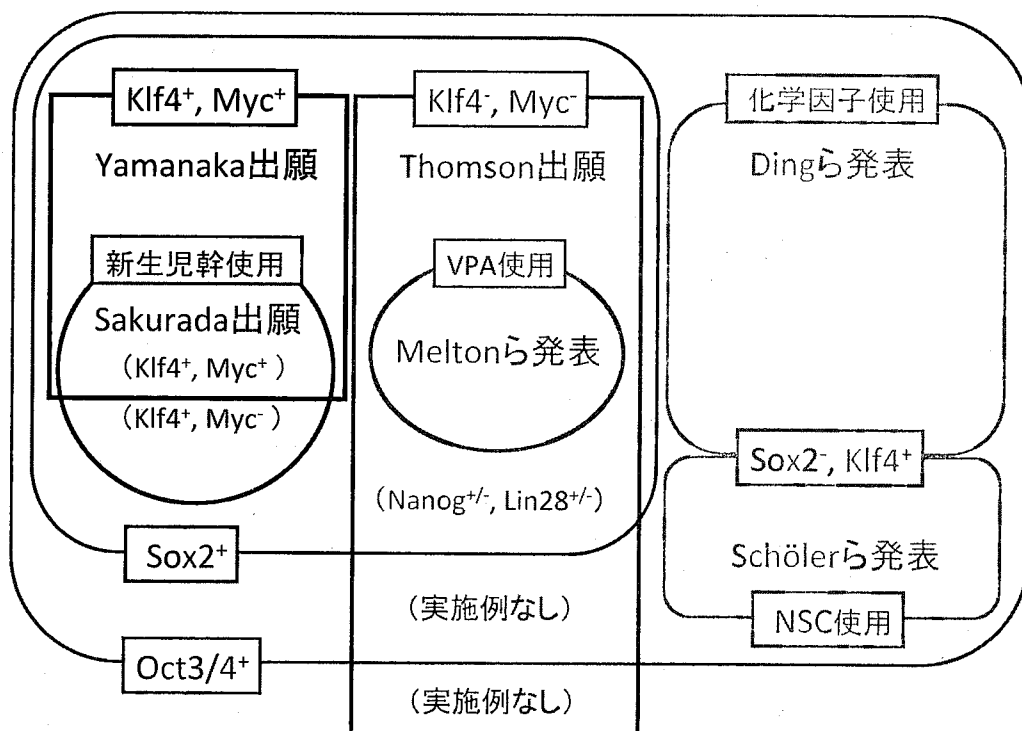


図2 iPS細胞を誘導する因子に関する各研究成果から想定される特許の実質的な権利範囲の相互関係図。図に示されているのは、初期（2008年末時点で開示されていたもの）の主だった成果の推定権利範囲である。出願されていたものについては注目すべきクレームにつき、論文のみのものについては、その内容から想定される権利範囲を筆者が独断で推定した。具体的には、山中グループ特許第4183742号、Thomsonグループ出願WO2008/118820の第1クレーム、Sakuradaグループ出願WO 2009/006997の第23クレーム（製法の最上位）、Meltonグループの論文Nature Biotechnology 2008；26：1269-1275、Dingグループの論文Cell Stem Cell 2008；3（5）：568-574、Schölerグループの論文Nature 2008；454：646-650の、それぞれの推定権利範囲が記載されている。なお、マウスのみ研究成果についてもヒトで同等の技術が成り立ち、かつ権利を確保できるとする前提で図示した。この図に表された関係は今後の情勢に基づいて変化する可能性がある。

る可能性を示唆している<sup>(16)</sup>。

#### (4) Shi-Lung Lin グループの成果に係る出願 (University of Southern California)

このグループの出願 US2008/293143 には、ヘアピン様プレ miRNA 分子である mir-302 のサイレンシング効果により、癌細胞等を ES 様細胞に再プログラミングする方法がクレームされている。斬新で興味深い、癌細胞を使用していることや、この発明に関連した他の研究がまだないことなどから、この出願の効果については未知数である。同成果に関しては論文も公表されている<sup>(17)</sup>。

なお、最近 University of California, San Francisco の Blalock らのグループは、同じく miRNA を用いて iPS 細胞の樹立効率を改善した成果の論文を発表している<sup>(18)</sup>。この報告では、miR-291-3p, miR-294, miR-295 が、山中因子から c-Myc を除いた 3 因子でのマウス iPS 細胞の樹立効率を改善できることを示している。これらの miRNA は c-Myc の下流に位置するらしい。

miRNA を用いた iPS 細胞誘導に関しては、これからも様々な成果が生まれてくる可能性がある。

### 3. 誘導因子の導入に関する技術

以上において、iPS 細胞誘導に関係した技術について考察した。再プログラミングに必要な因子そのものの発明に加え、iPS 細胞の誘導効率が低いことから（特に c-Myc を使用しない場合など）、iPS 細胞の誘導効率を高めたり、誘導された iPS 細胞をうまく選別したりする手法が iPS 細胞の樹立に際しては重要となり、そのような技術も多数登場している。

一方、それらとは別の観点に立つ技術として、iPS 細胞誘導に伴う細胞の癌化の危険性を減らすための、誘導因子の導入方法に関する一連の論文が最近立て続けに公表され、注目を集めた。

#### (1) ベクターの工夫

再プログラミングのための遺伝子導入の場面において、当初の技術ではレトロウイルスを活用しているが、導入遺伝子が細胞の染色体に挿入されてしまう欠点がある。この場合、再プログラミングに使用したがん関連遺伝子が細胞で過剰に発現したり、遺伝子が組み込まれる過程で内因性遺伝子に悪影響が及び、細胞の癌化が誘発されてしまう危険が生じる。

そこで外来遺伝子の挿入がない iPS 細胞の作製を実

現する一連の技術が生み出され、提案された。たとえば、Hochedlinger グループは、アデノウイルスを使用した遺伝子導入によってマウスの iPS 誘導に成功した<sup>(19)</sup>。もちろん導入に用いるウイルスの工夫は他にも可能であり、例えば中西真人博士（産業技術総合研究所）らのグループも、センダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞様の細胞を樹立することに成功してプレス発表している。一方、山中グループは、ウイルスではなくプラスミドベクターを使用した 4 因子のトランジェントな発現によって iPS 細胞の誘導に成功し、注目された<sup>(20)</sup>。ただ、当初のこれらの手法は、ヒト細胞では必ずしも成功しておらず、また iPS 細胞誘導効率が非常に低いという欠点があった。

これに対して、Thomson グループは、エピソーマルに増殖する Epstein Barr ウイルスのモジュールを含むベクターを使い、しかも山中グループの 4 遺伝子と自らの 4 遺伝子を組み合わせる工夫をするなどによって、新生児の皮膚細胞から導入遺伝子の組み込まれない iPS 細胞を高効率で樹立している<sup>(21)</sup>。また、梶グループ<sup>(22)</sup> や Andras Nagy グループ<sup>(23)</sup> は、piggyBac トランスポゾンを用いた 4 因子の導入により、ヒト体細胞の iPS 細胞誘導に成功している。この方法では、誘導後に導入遺伝子をそのまま取り除くことが可能である。

これらの技術は、遺伝子の導入による細胞の iPS 細胞誘導技術に依存する限りにおいては、重要な基本的技術となる可能性を秘めており、特許出願や標準的技術の確立の行方が気になるところである。

#### (2) 「誘導因子」がタンパク質のケース

一方、2-1 (3) でも述べたように、最近、Ding グループは、細胞染色体に組み込まれて悪影響を及ぼす心配のある DNA を導入に用いず、その産物であるタンパク質の導入による iPS 細胞誘導に成功した。このような技術は当然当初から期待されていたものだが、実現まで意外に時間がかかっている。タンパク質導入による iPS 細胞誘導技術については、初期の遺伝子導入の成果を基にした既公開の各 iPS 関連出願においても、当初から導入因子として遺伝子をタンパク質で代替した技術の登場を想定したクレームづくりをしているが、実施例がない状態でこのような技術を実質的な権利範囲に含み得るかどうかは直ちには明らかでない。一方、タンパク質を使用した誘導技術それ自体に係る出願（なされているとして）が、どの程度の範囲の権



利を確保できるかについても、興味を持たれるところである。少なくとも、公知の誘導因子である4遺伝子がコードするタンパク質にPTDを結合して細胞に導入した、というだけでは、進歩性をクリアすることが困難な可能性がある。

#### 4. iPS細胞物質特許に関する留意点

最後に、iPS細胞自体に係る特許出願が抱えていると思われる重要な課題を掲げておく。iPS細胞は本質的にES細胞の模倣であり、少なくとも当面の技術の大勢が目指している範囲では、ES細胞に近いほどiPS細胞として優れているということになる。すると、基本的には物質としてのiPS細胞の新規性が問題となる。

前例を見るに、新規方法で得たES細胞について、従来法で得たES細胞に対し新規性の主張をすることは難しい<sup>(24)</sup>、ES細胞の分化技術の発明において、当該方法で作製した細胞（例えば内皮細胞）について、基本的に製法だけの限定によって、普通の内皮細胞に対する新規性を主張することは困難である<sup>(25)</sup>。これらのケースと同様、iPS細胞の場合も、これをES細胞とどう区別するかが問題となる。また、第2、第3の誘導方法で樹立したiPS細胞の場合は、さらに既存の方法で誘導したiPS細胞との区別まで求められることになる。

現時点で公開されているほとんどのiPS細胞の特許出願が、「胚由来ではない」「体細胞に由来する」「〇〇因子を用いて誘導した」「〇〇の選別ステップを経て作製した」などの製法・由来による限定によって、自らの技術によって得られたiPS細胞の差別化を試みるクレームを備えている。しかし、これらの限定のみによって発明に係るiPS細胞の新規性を担保することは、結果物たるiPS細胞とES細胞等とを見分ける手段が提供されていない以上、一般には困難といえよう<sup>(26)</sup>。

そこで、たとえば誘導に用いた外来遺伝子が染色体に組み込まれていることを根拠として差別化を図ることもあり得る。しかし、それは誘導細胞が内包する欠点による規定にすぎず、染色体挿入を避けた新規誘導方法（プラスミドベクター等を用いたり、タンパク質・小分子を用いたりする方法）の登場によってあっさり凌駕されてしまう。逆に後者の方法で作製したiPS細胞については、ES細胞との区別がより困難といえる。

あるいは、たとえば上述のJaenischグループの技

術ようにB細胞からiPS細胞を作製した場合には、作製したiPS細胞において染色体のリアレンジメントを経たことによる「印」が残っていることになる。B細胞でなくてもiPS細胞には体細胞時代を経験したこと由来する何らかの「印」が残っていたり、遺伝子発現パターンなどES細胞と異なる部分があると考えられるので、そのような特徴の存在を具体的に主張することによって、iPS細胞を少なくともES細胞と区別することは可能であろう。ただ、そのような差別化は少なくともiPS細胞の優位性に基づくものではなく、細胞というものの自体に多様なバリエーションがある中で、新規性の根拠として主張することの有効性や効果については依然として不明である<sup>(27)</sup>。

一方、もし治療対象とする患者の体細胞から常にiPS細胞を作製するというのであれば、たとえば「対象者のHLAタイプと完全に一致した」などの用途的な限定も可能であろう。従って、何らかのケースにおいて、何らかの手段によって、一定の範囲のiPS細胞の「物質特許」を獲得することは可能かもしれない。各出願に係る今後の審査過程の動向に注目したい。

#### 5. おわりに

以上の考察については速報的な要素が大きく、新しい展開をもたらす得る斬新な成果の報告が相次ぐ中で<sup>(28)</sup>、今回検討の対象となった各研究成果・特許（出願）の位置づけが変わることも十分に考えられる。注目される分野ゆえに、世界中の傑出した研究者によって体細胞再プログラミングのメカニズムの解明や周辺技術の研究がすさまじいスピードで進んでいる。しかし、iPS細胞研究はまだ始まったばかりである。したがって、様々な側面においてまだ解明すべきことが山積みになっている状況に変わりはなく、それ故に、現時点では想像できないような革新的な成果の登場も今後大いに期待される。

実用面から見ると、使用する細胞、使用する再プログラミング因子、その因子の形態（遺伝子、タンパク質、小分子等）やその導入方法、癌化の制御方法、iPS細胞誘導効率の改善法、iPS細胞の分化制御方法などの中の多くのポイントについて、好適な条件の確立からほど遠い状況にあることも事実である。従って、特に治療を視野においた分野に関しては、それぞれのポイントに関連してこれから登場してくると考えられる新しい技術やそれらに係る特許が重要な意味を持つ

てくることもある。そのような技術は初期の特許でカバーできない場合もあるだろうし、初期の技術を刷新するような内容を携えているようなこともあるかもしれない。今後も当分の間、iPS 細胞研究の展開から目が離せない状態が続く。

(以上の考察は筆者の独断に基づくものであり、特定の委員会や団体等の意見・見解を代表するものではありません。また、iPS 細胞誘導技術に関する知財の動向にポイントを置いたストーリーの流れから、多くの科学的に重要な iPS 細胞関連の論文成果に関する記載を割愛していることをお断りしておきます)

#### 注

- (1) Cell 2006; 126: 663-676
- (2) Cell 2007; 131: 861-872
- (3) Nature Biotechnology 2008; 26: 101-106
- (4) Science 2007; 318: 1917-1920
- (5) Cell Stem Cell 2008; 3 (5): 568-574
- (6) Cell Stem Cell 2009; 4 (5): 381-384
- (7) Nature 2008; 454: 646-650
- (8) Cell 2009; 136 (3): 411-419
- (9) Nature Biotechnology 2008; 26: 1269-1275
- (10) Nature. 2008; 455 (7213): 627-632.
- (11) Cell Stem Cell 2008; 3: 475-479
- (12) Nature Cell Biology 2009; 11: 197-203
- (13) Cell 2008; 133 (2): 250-264
- (14) Stem Cell Research 2008; 1 (2): 105-115
- (15) 本稿における WO2009/007852 の内容検討は、日本製薬工業協会によって行われている大学 iPS 研究に対する「知財支援プロジェクト」をサポートする目的で 2009 年度バイオ・ライフサイエンス委員会委員有志において行った詳細分析を参考にしている。
- (16) 実際には Hochedlinger グループから特許出願の実施例に相当する iPS 細胞の X 染色体再活性化に関する論文 (Cell Stem Cell 2007; 1 (1): 55-70) が同じ頃に発表されており、Jaenisch もそこに共著者として名を連ねている。この論文において Jaenisch がどのような貢献をしたかは不明だが、研究の遂行、あるいは論文の執筆に際して、研究内容の少なくともアウトラインが

Hochedlinger 側から Jaenisch 側に開示されていたと見るのが自然であろう (もともと Hochedlinger は Jaenisch 研究室のポスドクであった)。なお、各グループの特許出願の発明者欄に相手方研究者は一切名を連ねていない。

- (17) RNA. 2008; 14: 2115-2124
- (18) Nat Biotechnol. 2009; 27: 459-461
- (19) Science 2008; 322 (5903): 945-949
- (20) Science 2008; 322 (5903): 949-953
- (21) Science. 2009; 324 (5928): 797-801
- (22) Nature. 2009; 458 (7239): 771-775
- (23) Nature. 2009; 458 (7239): 766-770
- (24) WO1999/020741 の日本国出願の審査過程において、出願人はフィーダー細胞を用いないで作製した ES 細胞につき従来法で作製した ES 細胞に対して「フィーダー細胞が混入しない」など主張して新規性を主張したが、顕微鏡的に ES 細胞のみを集めることができる、などの理由で認められなかった。
- (25) WO2003/040319 の米国出願の審査過程において、出願人は、発明に係る分化誘導方法で得られた胚性幹細胞由来の内皮細胞培養物に係る権利を主張したが、結果物である内皮細胞が引用内皮細胞と同じでないことを証明する立証責任は出願人にあると指摘され、細胞クレームを削除している。
- (26) 前述の京大の WO2007/069666 においては、分割出願によって製法のみの特許をまず成立させたため、この問題は当面回避されている。
- (27) 本特集「ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングの知財戦略」の考察でも言及されているように、細胞の不適當な特定は適切な権利確保の意味で致命傷となり得る。
- (28) 本報告は、基本的には 2009 年 4 月頃までの情報に基づく。その後、本論文投稿時点でも既に山中グループの新しい出願 WO2009/057831 (c-Myc なし 3 因子による iPS 細胞誘導の発明を含む出願) や、Shi-Lung Lin グループの上記成果に関する国際出願 WO2009/058413 などが次々に公開されているところであるが、今回の分析の対象に加えることはできなかった。

(原稿受領 2009. 5. 29)