

iPS 細胞技術の展開と特許争奪競争 における現状分析

会員・札幌医科大学 石埜 正穂, 知的財産戦略ネットワーク 翁 雅男

はじめに

マウス線維芽細胞に Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 遺伝子を導入して iPS 細胞を樹立した京大の山中らの報告 (*Cell* 2006 126, 663-676) を契機に, 特定の因子を使用して iPS 細胞を誘導する技術に関する激しい研究競争がスタートした。以来, 関係する論文が多数発表され, それに対応した特許出願が続々と公開されてきている。国内外において複数の特許も成立しはじめた。この間の技術の展開は著しく, いま本稿のような整理・検討を行っても, たちまち古びて時代錯誤になってしまうかもしれない。しかしながら, iPS 細胞関連技術の知的財産がどういう状況になっているのかを把握したいとの強い期待もあるところ, 参考情報として少しでも関係各位のお役に立てればとの思いから, 敢えて現状 (2010 年 10 月中旬現在) における可能な分析を行い報告する次第である。速報的で不正確になる危険性については, どうかご了解いただきたい。

本稿では, iPS 細胞関連技術に関して, まず今までに成立した特許について考察し, その後で, 出願公開情報等から技術動向を分析する。なお, 論旨を分かりやすくする観点から, 引用するクレームの一部は, 発明の趣旨を損なわない程度に敢えて簡素化して記載した。また, 今のところこの分野の主要な出願の殆どが大学等の学術的な研究成果をベースとしていることや, 帰属先がベンチャー等の中で転々と変わっても混乱を来たさないように, 特許出願の識別においては, 原則として出願人ではなく, 基本的に研究チームを主導すると思われる研究者 (発明者) の名前を使用した。なお文中, 前報とは「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」(石埜・パテント 2009(7) p23-32) を指す。

1. iPS 細胞誘導のコア的因子に関する発明

1-1 権利化された発明

(1) 山中らおよび桜田らの特許について

次項で述べる Jaenisch らの'828 特許をとりあえず除き, iPS 細胞に関してこれまでに国内外で成立した特許は, 山中らの 3 つの日本国特許 (第 4183742 号, 第 4411362 号, 第 4411363 号) と, 桜田らの英国特許 (GB2450603) のみである。これらはすべて iPS 細胞の製造法の特許である。具体的に見てみよう。

A) 山中らの特許 (京都大学)

①特許第 4183742 号

「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, Sox2 を体細胞に導入する工程を含む方法。」という唯一の請求項からなる特許である。これは, iPS 細胞を樹立した成果に基づいて世界で最初に行われた PCT 出願 WO2007/069666 の国内移行出願である特願 2007-550210 から分割, 成立した iPS 細胞の第 1 号特許であり, 対象を山中 4 因子の遺伝子を導入する, 製造方法の権利のみに絞っている。成立の経緯に関する詳細については, 筆者の前報等をご参照いただきたい。

②特許第 4411362 号

同様に特願 2007-550210 からの分割出願で, 「Oct3/4, Klf4 及び Sox2 の 3 種の遺伝子が導入された体細胞を bFGF の存在下で培養する工程を含む, 誘導多能性幹細胞の製造方法。」という内容の請求項 1 および体細胞をヒトに限定した請求項 2 からなる特許である。bFGF の存在下で培養することによって c-Myc を除いた 3 因子でも iPS 細胞が誘導できるという知見に基づく権利である。

③特許第 4411363 号

これも特願 2007-550210 からの分割出願で, 3 つの請求項からなる。上記特許第 4183742 号の方法, また

は特許第 4411362 号の方法によってそれぞれ誘導多能性幹細胞を得る工程、およびそれらの工程で得られた誘導多能性幹細胞を分化誘導する工程を含む体細胞の製造方法をクレームしている。前者が請求項 1、後者が請求項 2 で、請求項 3 はそれらのヒト細胞への限定である。

なお、山中らの最初の出願から分割出願した出願は他にもある(図 2 を参照)。特願 2009-056748 は、遺伝子のみならず遺伝子産物の導入も範囲に含むものであり、特願 2009-056749 は遺伝子を 4 因子に限定しない広い範囲を狙ったものであるが、いずれも現在特許庁に係属中である。前者に関しては下記で再び言及する。

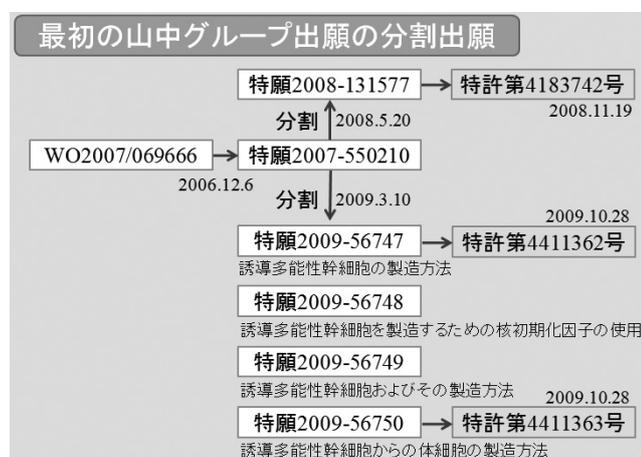


図 2

B) 桜田らの英国特許 (iPierian)

① GB2450603

第一クレームは、「インビトロで長期自己再生でき、かつ 3 胚葉に分化するようなヒト多能性幹細胞を誘導するインビトロの方法」であって、「ヒトの生後組織に Oct3/4, Sox2, Klf4 (c-Myc は含まない) の遺伝子のそれぞれを強制発現させて、FGF-2 の存在下で培養することを含む方法」というものである。当初出願では、使用細胞が未分化な幹細胞等に限定されていたが、そのような限定が外れて特許されている。山中らの特許第 4411362 号とほぼ同様な内容のものが英国で特許を受けたことになる(但し、GB2450603 は遺伝子を「強制発現」させるという記載になっており、表現上は必ずしも「遺伝子導入」に限定していない)。この特許の基礎となる特開 2008-307007 の出願時(2007.6.15)にはマウスを使用した山中らの最初の iPS 細胞の論文が既に公表されていたが(2006.8.10; Cell 電子版)、その後のヒト iPS 細胞の論文(2007.11.20;

Cell 電子版) や WO2007/069666 はまだ公表されていない(図 3)。このため、最初の論文に記載のない、c-Myc を使用せずに FGF-2 (bFGF) を使用して iPS 細胞を樹立する部分についての権利が認められた可能性もある。しかし山中らの最初の出願である WO2007/069666 には当該記載が存在していることから、この出願またはその派生出願が現在の EP から GB に移行すれば先後願の問題が出てくる可能性があり、そうなった場合の判断が注目される(GB2450603 は英国に直接出願されたため EP 経由の WO2007/069666 との先後願関係はまだ判断されていない)。なお、桜田らのその他の初期の出願の内容に関しては、前報をご参照いただきたい。

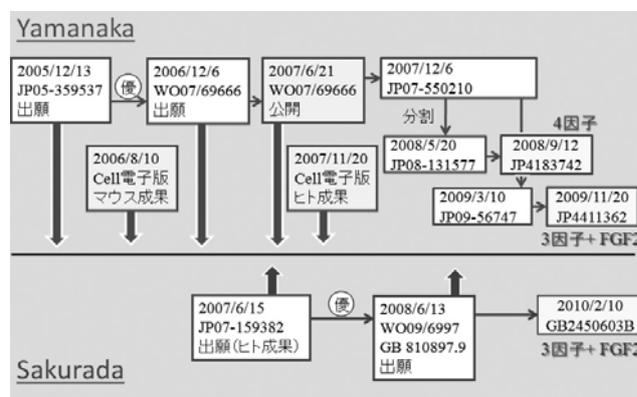


図 3

(2) Jaenisch らの米国特許 (Whitehead ; Fate Therapeutics に独占的实施権)

iPS 細胞の、しかも誘導因子の特許といえるかどうかは微妙だが、少なくとも iPS 細胞誘導技術に深く関係する特許が最近米国で成立した。Whitehead の Jaenisch らによる米国特許第 7,682,828 号である(以下'828 特許と呼ぶ)。

体細胞を未受精卵に核移植したり ES 細胞と細胞融合させたときに、体細胞由来の染色体が初期化されることは、iPS 細胞技術の基礎となった知見である。すなわち、未受精卵や ES 細胞の中に体細胞を初期化させる因子が存在することは、iPS 細胞誕生の前から既に想定していた。山中らの報告が画期的だったのは、ES 細胞等の中に存在する不特定多数の因子を当てにするのではなく、定まった有限の、しかもたった数個の因子のみを使用して実際に核の初期化誘導に成功したからである。裏を返せば、iPS 細胞誕生の背景には、初期胚や ES 細胞の未分化維持、増殖に関わるとされる遺伝子が既にいくつも報告され、それらの遺伝子やその働きを調べる研究も多数行われている状況があっ

た。山中らが最初に使用した iPS 細胞誘導因子のスクリーニング方法についても、類似の方法が少なくともアイデアのレベルで存在したり、実際に一部試されたりしていた可能性も伺える。'828 特許はそのことを如実に物語っている。この特許の出願優先日は、山中らの WO2007/069666 よりも遥かに早く、何と 2003 年末まで遡る（仮出願 60/525,612 (2003.11.26), 60/530,042 (2003.12.15))。

'828 特許の第 1 クレームは一見複雑だが、整理すると、「選択マーカー①と動作可能に連結した内在性多能性遺伝子②」をゲノム中に含み、さらに「多能性タンパク質③をコードする外来性の核酸（制御配列に動作可能に連結）」を含む「初代体細胞」に関するクレームであるところ、「選択マーカー①」については、その「発現が内在性多能性遺伝子②の発現と実質的にマッチ」という条件が、「内在性多能性遺伝子②」および「多能性タンパク質③」については、それらのいずれも「多能性 ES 細胞で発現し、ES 細胞の多能性に必要であって、かつ ES 細胞が分化すると発現が下方制御される」という条件が付されている。これは例えば、内在性多能性遺伝子②を Oct4 遺伝子、多能性タンパク質③を Sox2 タンパク質とした場合、Oct4 の近傍に同プロモータ下で制御される選択マーカーをノックインしたトランスジェニック (TG) 動物から得た初代細胞に、発現ベクターに載せた Sox2 遺伝子を外来性に導入した状態を表すといえる (図 1)。



図 1

これをスクリーニング用システムの中で捉えた場合、スクリーニングの過程において、多能性遺伝子探索スクリーニング用の細胞に候補遺伝子の載ったベクターを導入した場面に該当するかもしれない。一方、iPS 細胞の樹立過程として捉えた場合、iPS 細胞樹立

用の細胞に誘導因子を導入し、これから培養をつづけて iPS 細胞への誘導をかけようという段階に該当するかもしれない（この場合 iPS 細胞自体は当初の体細胞の状態から形質が変わっていることから「初代体細胞」とは言い難く、'828 特許は iPS 細胞製造過程のいわば中間産物をクレームしていることになる）。

問題はこのクレームの守備範囲だが、山中らが使用した初期の選別用細胞のようなものをそのまま使用して米国で iPS 細胞誘導因子のスクリーニングや iPS 細胞の製造をつづければ、このクレームに抵触する可能性もある。しかしながら'828 特許は、オフィスアクションへの対応過程で、対象をゲノム中にマーカーが導入された初代細胞に限定したため、権利範囲として、図 1 のような TG マウスから初代細胞を得るような系以外、やや想定しにくいものになっている。マーカーを使用しない系はもとより抵触しないし、例えば、Thomson らの最初の iPS 細胞の論文 (*Science* 318 (2007) 1917) に記載の、マーカーをノックインした ES 細胞を分化させてから使用するような系も対象外となる。

一方、この特許の登録直前に、2つの派生する米国出願（継続出願 12/703,015 と分割出願 12/703,061）がなされ、最近相次いで公開された。このうち前者の第 1 クレームは、「多能性タンパク質①をコードする外来性の核酸②（制御配列に動作可能に連結）」を含む初代体細胞を含む組成物であって、その「外来性の核酸②の発現が内在性多能性遺伝子の発現をもたらす」、 「多能性タンパク質①は多能性 ES 細胞で発現し、ES 細胞の多能性に必要で、かつ ES 細胞が分化すると発現が下方制御される」という内容となっている。また、後者の第一クレームは、「制御配列に動作可能に連結した外来性多能性遺伝子を導入することを含む、初代体細胞を分化度がより低い状態に再プログラミングする方法」であって「外来性に導入した核酸の発現が内在性多能性遺伝子の発現をもたらす」といった内容になっている。これらのいずれの出願も、'828 特許と違い、クレームに「選択マーカー」の構成要件は存在しない。外来性多能性遺伝子の導入が内在性の多能性遺伝子（導入された遺伝子と同じ場合も含む）の発現の活性化をもたらす（上記下線部）、という奇妙な限定がなされているものの（'828 特許の成立過程で示された先行文献に基づく 35USC102 違反を回避するためか）、多能性遺伝子を初代細胞に外来性に導入するよ

うな、iPS細胞製造方法、iPS細胞の中間産物、あるいは誘導因子のスクリーニング系がすべて含まれそうな大胆なクレームである。

ところで、これら全ての基となる米国出願 10/997,146 に掲載されている実施例はたった1つのみである。その内容は、誘導可能な Oct4 遺伝子を導入した TG マウスを作製し、このマウスから線維芽細胞を得て、Oct4 を誘導 / 非誘導してからレシピエント胚 (卵) に核移植し、胚盤胞まで育てて ES 細胞を得たというもので、Oct4 誘導細胞において、より効率的に胚盤胞形成・ES 細胞の樹立がみられるという結果を得ている。つまり、Oct4 の発現で体細胞が再プログラミングを受け易くなるという解釈から、出願人は、多能性遺伝子の発現自体が再プログラミングの指標になるというアイデアを導き出し、選択マーカーを使用する一定範囲に限定された 828 特許をまず成立させたわけだ。

派生する 2 つの出願についての審査はこれからだが、特定遺伝子の導入だけで ES 細胞に匹敵するような iPS 細胞を樹立できるという認識が全くない段階での出願につき、どのような範囲まで権利が認められ得るかという観点から、興味もたれる。ただ、いずれにしても、多能性遺伝子 c-Myc を初代細胞に導入するような実験が既に癌研究領域で連綿と実施されていた出願当時の背景なども考えると、これらの派生出願が獲得可能な権利は限定的であろう。

1-2 特許出願中の発明

(1) WO2007/069666 関連米国出願

山中らの最初の iPS 細胞出願 WO2007/069666 から、米国では次のような複数の派生する出願が公開されている。

① 12/086,479 (US 2009/0068742)

WO2007/069666 の米国移行出願である。

② 12/213,035 (US 2009/0047263) 2008.6.13

WO2007/069666 の一部継続出願 (CIP) であるが、挑戦的なクレーム 1 (A pluripotent stem cell induced by reprogramming a somatic cell, wherein the reprogramming is performed in the absence of eggs, embryos, or embryonic stem (ES) cells) から、クレーム 31 までが iPS 細胞の物質クレームとなっている。クレーム 32 からは製造方法クレーム (A method for preparing an induced pluripotent stem

cell by nuclear reprogramming of a somatic cell, which comprises contacting a nuclear reprogramming factor with the somatic cell to obtain an induced pluripotent stem cell.) で、下位クレームとして転写因子 Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28 (遺伝子および遺伝子産物) や追加的な成長因子 bFGF, SCF の様々な組み合わせ、それにさらに SV40 Large T antigen, HPV16 E6, HPV16 E7, Bmi1, Fbx15, Nanog, ERas, ECAT15-2, Tc11, β -catenin, ECAT1, Esg1, Dnmt3L, ECAT8, Gdf3, Sox15, ECAT15-1, Fth117, Sall4, Rex1, UTF1, Stella, Stat3, Grb2 (遺伝子および遺伝子産物) を追加的に組み合わせたクレームを包含し、Sall4 で誘導効率を上げるクレームまでをも含む幅広い内容の出願である。

以下の③~⑤はこの出願②および WO2007/069666 から派生する出願だが、いずれも日本における分割出願に対応した内容となっている。これは特許審査ハイウェイ (PPH) を活用しているためである。

③ US 12/457,356 (US2010/0062533)

12/213,035 の継続出願・WO2007/069666 の CIP である。日本で最初に成立した 4 遺伝子特許 (第 4183742 号) と同じ内容。

④ US 12/656,908 (US2010/0210014)

これも 12/213,035 の継続出願・WO2007/069666 の CIP である。Oct3/4, Klf4, Sox2 + bFGF による iPS 細胞の製造方法クレームで、日本国特許第 4411362 号と同じ内容。

⑤ US 12/656,907 (US2010/0216236)

これも 12/213,035 の継続出願・WO2007/069666 の CIP である。日本国特許第 4411363 号と同じ、分化過程までを包含する製造方法をクレームしている。

⑥ US 12/289,873 (US2009/0227032)

これも 12/213,035 の継続出願・WO2007/069666 の CIP である。誘導効率を上げることのできる Sall1/Sall4 因子を活用するという内容になっている。

その他の海外移行出願については省略する。なお、WO2007/069666 の欧州移行出願は EP1970446 であり、ここから 2010.2.26 に 3 つの分割出願 (EP2206724, EP2206778, EP2208786) が行われ、公開されている。これらは、US 12/213,035 と類似の広い範囲のクレームや、iPS 細胞を分化させて得られた細胞を薬剤のスクリーニング等に用いる方法のクレームを包含している。

(2) 誘導因子に関するその他の出願

表 1 に誘導因子に関する PCT 出願の概要を掲載した。雑駁になるが、その内容につき以下に簡単な説明を加えておく（前項および前報で解説したものは除く）。

WO2007/069666	山中 4 因子、他	京大・山中ら
WO2008/118820	Oct4, Sox2 (± Nanog, ± Lin28)	ウイスコンシン大・Thomson ら
WO2009/006997	Oct3/4, Sox2, Klf4 (幹細胞)	桜田ら
WO2009/007852	Oct3/4, Sox2, Klf4, 他	桜田ら
WO2009/057831	Oct3/4, Sox2, Klf4, 他	京大・山中ら
WO2009/061442	Oct4, Sox2 (+ ROCK 阻害剤)	ハーバード大・Daley ら
WO2009/102983	Oct4, Sox2 + HDAC 阻害剤	ハーバード大・Melton ら
WO2009/117439	Oct4, Klf4 + GSK3 阻害剤等	スクリプス研究所 Sheng Ding ら
WO2009/136867	Oct4, Sox2, Esrrb (MEF 細胞)	シンガポール・Huck-Hui Ng ら
WO2009/144008	Oct4(Klf4)のみ (神経幹細胞)	Max Planck・Schöler ら
WO2010/042800	Sall4 の使用	ネバダ癌研究所・Ma ら
WO2010/050626	Oct4, Nanog (Sox2 なし)	京大・山中ら
WO2010/098419	Klf4 を IRX 様因子等で代替	京大・山中ら
WO2010/051526	Oct4 ± Sox2 (間葉系幹細胞)	コロンビア大・Wang ら

表 1

・WO2008/118820 は、ウイスコンシン大の Thomson らが山中らと同時期に報告したヒト iPS 細胞誘導に成功した論文 (*Science* 318 (2007)1917) の内容が基本となった出願である。実施例では、新生児線維芽細胞・成人皮膚細胞において 4 因子 (Oct4, Sox2, Nanog, Lin28) で、ヒト胎児肺線維芽細胞においてはそのうち 3 因子 (Nanog または Lin28 が不要) で、ヒト ES に Oct4 プロモータ -EGFP-Neo をノックインしてから間葉系の細胞に分化させた細胞においては 2 因子 (Oct4, Sox2) のみで、iPS 細胞様のコロニーを得ている。c-Myc や Klf4 を使用しないで体細胞より高い分化能を有する細胞を誘導する方法、といった広いクレームから、Oct4, Sox2 の 2 因子, Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 の 4 因子, その中間の 3 因子を使用するなどの方法についてのクレームを携えている。

・WO2009/061442 は、ハーバード大の Daley らが *Nature* 451, 141-146 (2008) に報告した内容に基づいている。ヒト ES 由来線維芽細胞において、4 因子から Klf4 または c-Myc を除いてもごく低い頻度で ES 細胞様コロニーができるという実施例から、Oct4, Sox2 の 2 因子で iPS 細胞を誘導するクレームや、さらに ROCK 阻害剤を加える方法のクレームなどを携えている。

・WO2009-102983 は、ハーバード大の Melton らが *Nat Biotechnol.* 2008 (26) 1269-1275 に報告した、HDAC 阻害剤を使用して Oct4, Sox2 のみで iPS 細胞を誘導 (ヒト新生児線維芽細胞使用) した内容に基づく。

・WO2009/117439 は、スクリプス研究所の Sheng Ding らが *Cell Stem Cell* 2008 (3) 568-574 や *Stem Cells* 2009 (12):2992-3000 に報告した、GSK3 阻害剤等を使用して Oct4, Klf4 のみでヒト iPS 細胞誘導した知見に基づく。

・WO2010/042800 は、ネバダ癌研究所・Yupo Ma らの Sall4 に関する成果に基づく出願である。Sall4 を使用するという点から見ると、この出願の最先の優先日が 2008.10.10 であることから、山中らの基礎出願 US 12/289,873 (2008.6.13) のほうが優先日の点ではやや早い。なお、Ma らの出願は Sall4 単独でも誘導可能な因子という観点でとらえているが、山中らの出願は、Sall4 について、誘導効率を高める補助的な観点でとらえている。

・WO2009/057831 は、京大・山中らが *Nat Biotechnol.* (2008) 26(1):101-6 に掲載した、c-Myc を除く 3 因子による iPS 細胞誘導に関する知見等を基にした出願である。

・WO2009/136867 はシンガポールの Huck-Hui Ng らが *Nature cell biology* 2009;11 (2):197-203 に掲載した成果に基づく出願で、Oct4, Sox2 と Esrrb (Err タンパク質) で iPS 細胞を誘導できるというものだが、実施例はマウス胎仔線維芽細胞のみが用いられている。

・京大の山中らは上述の各出願のほか、Oct4, Nanog (Sox2 なし) でヒト iPS 細胞を誘導する出願 (WO2010/050626) や、Klf4 を IRX/GLIS/PTX/DMRTB1 様因子で代替する出願 (WO2010/098419) を行っている。

・PCT 出願ではないが、北京大・Hongkui Deng グループは、山中 4 因子や c-Myc を除いた 3 因子に UTF1 を加えて細胞に導入し、siRNA によって p53 を抑制することで誘導効率を改善したとする成果 (*Cell Stem Cell.* 2008 3(5):475-9) に基づき、米国出願をしている (US2010/0093090)。

このほか、下記の細胞の項でも言及するが、特定の細胞の活用によって必要な誘導因子の数を節約する出願も一部、表 1 に記載した。WO2009/144008 は、Max Planck 研究所の Schöler らが Sox2 や c-Myc を内因性に発現している神経幹細胞を用いて Oct4 ± Klf4 のみで iPS 細胞誘導した成果 (*Nature* 2008(454) 646-650; *Cell* 2009(136) 411-419) に基づく出願であり、WO2010/051526 はコロンビア大・Wang らの、間葉系幹細胞を使用することで Oct4 ± Sox2 のみで iPS

細胞誘導を行う発明の出願である。

1-3 誘導因子に関する各出願の先後願等関係について

当初の特許争奪戦は、いかに使用する因子を少なくするかというところに主眼がおかれていた側面がある。もし、iPS 細胞誘導に必ず使用せざるを得ないようなコアの因子で権利を押さえることが出来れば、それを含んだ多数の因子による iPS 細胞誘導の実施をカバーできることにもなる。当初の山中らの知見は、使用因子を、実施態様を考慮した常識レベル（皮膚等の体細胞を取得し、それを再現性をもって初期化できるということ）の限界である 4 因子にまで狭めたものであった。実施例がどこまでの権利範囲をフォローできるかの問題（その詳細については前報でも述べた）は別として、4 因子の発明ということでは、山中らの WO2007/069666 が出願の早さにおいて圧倒的な独走態勢にあることは間違いない。一方、4 因子から c-Myc、またはさらに Klf4 を除いた 3～2 因子のみを使用した iPS 細胞誘導に関しては、その後複数の機関から相次いで出願がなされている。それらの関係を整理すると、次のようになる。

① Oct4, Sox2, Klf4 でヒト iPS 細胞を誘導する発明の可能な優先日

・ Daley ら 米国仮出願 61/002,026 (2007.11.6) (ヒト dH1f 細胞使用)

dH1f 細胞：ヒト ES 細胞を分化させて得られた線維芽細胞

・ 山中ら 米国仮出願 60/996,289 (2007.11.9) (成人ヒト皮膚細胞使用)

② Oct4, Sox2 でヒト iPS 細胞を誘導する発明の可能な優先日

・ Thomson ら 米国仮出願 60/989058 (2007.11.19) (ヒト clonal CD45+A 細胞使用)

clonal CD45+A 細胞：ヒト ES 細胞を間葉系の細胞に分化させた細胞

・ Daley ら 米国仮出願 61/002,026 (2007.11.6) (ヒト dH1f 細胞使用)

これら出願の優先日は相互にきわめて近く、かなり熾烈な出願競争となっていることがわかる。優先日の有効性については、実施例や技術背景など考慮すべき

点がたくさんある。たとえば、山中らの出願を除き、いずれも分化レベルの低い不自然な細胞を用いているにすぎない。もちろん米国であれば先発明も考えなくてはいけない。従って、どの出願からどのような権利が成立するのか、現時点では予測困難といえる。

ところで上述のとおり、原則に従えば、使用する因子をより少なくしたほうが、より広い範囲の権利を確保できるはずである。しかしながら、例えば 4 因子に関する先願や公知技術が存在する以上、そのうち 3 因子を使用するというだけの権利は成立し得ない。つまり、「Oct4 + Sox2 + Klf4 + c-Myc を使用する」という発明に対して、「Oct4 + Sox2 + Klf4 を使用する」という「上位概念」の発明は、「下位概念」である前者の発明が先願か公知技術にあたる場合は、新規性がないか実質同一とみなされる。しかしながら、最初の 4 因子から除くことになる遺伝子を積極的に使用しないことを条件として、たとえば「Oct4 + Sox2 + Klf4 を使用するが c-Myc を使用しない」という構成（以下「c-Myc なし」とする）にすると、含む含まれるの関係が成立しなくなり、少なくとも新規性・同一性の問題はクリアできる。あくまでも誘導因子だけに着目した場合ではあるが、このように、当初の 4 因子のうちの「一部の使用」ということのみに関して後から出願されて成立する特許は、原理的に、4 因子の使用に対して権利が及び得ず、4 因子の出願と相互に利用関係も生じないことになる。

なお、次節でも述べる、4 因子のうち c-Myc の代わりに L-Myc を使用する態様は、「c-Myc なし」の技術的範囲に入ってしまうことに留意する必要がある。しかし実際のところ世界最初の iPS 細胞の出願である WO2007/069666 においては、明細書に L-Myc や N-Myc の使用が一定の実施例とともに開示されているし、第一クレームはこれらを包括した Myc ファミリーの使用として記載している。従ってこの出願の後願となる実質全ての出願については、4 因子から「c-Myc」を除外するだけでは原理的に不十分で、「Myc ファミリーを使用しない」などとしないうり特許性が否定される可能性が強い。ただ、「c-Myc なし」の出願が WO2007/069666 の公開前に行われている場合は、拡大先願の適用如何の問題もあり、特に米国ではインターフェアレンスに持ち込まれかねず、状況は予断を許さない。

1-4 権利関係についてのまとめ

以上の関係につき、各出願の源となる新規な学術的知見のエッセンスを権利範囲と仮想して描いた発明相互の関係が図4である。この図はかなり大雑把なものだが、iPS細胞誘導因子に関する出願が「群雄割拠」している様相が見て取れると思う。先述のように、この図に表現された「含む含まれる」の関係は必ずしも利用関係の存在を意味しない。また、学術的知見の影響力と権利化可能な範囲とは別次元の話なので、最終的な「障地」についてはこの図とかけ離れたものになる可能性が高いし、そもそも実用化においてキーとなる部分を確保することが大切なので、広い領地を獲得すれば優位というわけでもない。

なお、現段階で特許出願の公開がまだないため図には示していないが、Sox2, c-Myc, Tcl-1A をレンチウイルスで導入しヒト iPS 細胞を樹立した報告（ブラジルの Picanço-Castro ら）のほか、メラノサイトから Sox2 なしで、ヒト臍帯血細胞から Oct4 と Sox2 だけで、ヒト羊膜細胞から Oct4, Sox2, Nanog で、毛乳頭細胞（マウス）から Oct4 と Klf4 で iPS 細胞を樹立した等の成果が論文として発表されている。

小分子だけを用いて iPS 細胞を誘導する可能性については当初から大きな期待があるところだが、今のところ主要論文・公開公報レベルでそのような技術についての情報は無い。

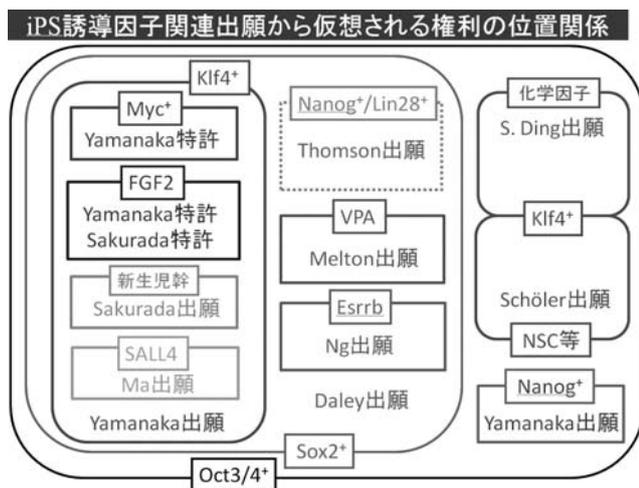


図4

2. iPS細胞誘導効率・クオリティー向上等のための関連発明

2-1 細胞クオリティー等のための誘導因子の工夫

当初の出願は、上述のように、限界に挑戦する研究上の興味のほか、できるだけ広い権利を確保する期待

からコアとなる誘導因子を求める意図や、c-Myc, あるいは Klf4 など、癌化を起しそうな因子の使用を避ける意図などから、誘導に使用する因子数を減らす方向に注目が集まる側面があった。しかし、実際には完成度の高い iPS 細胞を製造するためには、より多くの因子を使用したほうが良い可能性がある。クオリティー向上に資する追加的因子についての権利が成立すれば、当初の少数因子を使用する権利との間で利用関係が生じる可能性もあるし、いずれにせよ、実用化の場面では、使用因子の選択という部分だけでも複数の権利を使用する必要が出てくるかもしれない。

因子を増やす技術としては、山中らの4因子と Thomson らの4因子を併せて活用する態様（計6因子になる）が、Thomson や山中ら自身の出願（WO2009/149233, US2009/0047263）も含めて、複数開示されている。そのほか、出願情報はまだないが、例えばシンガポールの Lim グループは、Oct4, Sox2, Klf4 に Tbx3 を加えることによりマウス iPS 細胞の質（生殖系列寄与能）を向上させるという報告をしている（*Nature* 2010 463, 1096-1100）。

特定因子の使用によるクオリティー向上という意味では、最近、京大の中川・山中グループから、c-Myc の代わりに L-Myc を用い、腫瘍形成がなく分化能の高い iPS 細胞を高率で樹立したという報告がなされた（*PNAS* 2010 107 (32) 14152-14157）。L-Myc 使用の場合に想定される権利関係については、前項で言及したとおりである。

2-2 誘導因子以外の発明について

iPS 細胞誘導効率の改善やスピードアップ、誘導に必要な因子数の節約、iPS 細胞のクオリティー改善（癌化の低減や分化能の向上）その他の目的のために、細胞の培養方法や培養組成物、由来となる体細胞の選択、誘導因子の導入方法など、多方面からの重要な工夫がなされ、出願されている。Jaenisch らは最近、ヒト等の ES 細胞を、より未分化なマウス ES 細胞と同等な形質に変換する技術を報告しているが（*PNAS* 2010 107 (20) 9222-9227）、このような技術も iPS 細胞の適用範囲を拡大させるものとして期待されている。iPS 細胞の実用化の段階においては、これらのような、あるいはもっと違う種類の、複数の周辺技術を活用しなければならないであろう。現時点で開示されているそれらの例について、表2にカテゴリー別

1) 由来細胞
WO2009/058413 癌細胞から mir-302 で再プログラミング
WO2009/096049 体細胞として肝臓・胃上皮細胞を使用することで腫瘍発生の危険を低減
WO2009/144008 神経幹細胞の使用により Oct4 + Klf4 のみで iPS 細胞誘導
WO2010/051526 間葉系幹細胞の使用により Oct4 + Sox2 のみで iPS 細胞誘導
WO2010/013359 歯髄細胞の使用により高効率に iPS 細胞誘導
WO2010/036923 ケラチノサイト (毛髪) から高効率に iPS 細胞誘導
WO2010/092186 マウス GSK 細胞を一定条件で培養、ES 細胞株の iPS 細胞を樹立
2) 誘導効率の改善
WO2009/032194 Wnt 経路の刺激
WO2009/033920 ヒストン H3K9 のメチル化阻害
WO2009/075119 ES 細胞で高度に発現している miRNA の活用
WO2009/101407 MAPK 経路調節
WO2009/142717 低酸素培養
WO2009/143421 ヒストンメチル化酵素阻害・同脱メチル化酵素活性化
WO2009/147445 Oct4 の作用点 (ESET) の発現調整
WO2009/148057 サイトカインの組み合わせ
WO2010/004989 低タンパク質培地の最適条件
WO2010/013845 低酸素培養
WO2010/033906 TGF β signal 阻害
WO2010/033969 羊水の使用 (iPS 誘導効率化)
WO2010/077955 TGF β -R・MEK 阻害剤 (iPS 誘導効率化・スピード改善)
WO2010/102267 TGF β signal 阻害
3) 培養方法
WO2009/123349 ラミニン5 の活用 (支持細胞・血清なしにPSCを増殖)
WO2009/151844 羊水で線維芽細胞を培養 (c-kit ⁺ ・CD117 ⁺ のPSCを得る)
WO2010/004096 レクチン活用で無血清化 (PSCの多能性を維持した培養)
WO2010/033925 GAG結合ペプチド培養基 + ROCK阻害剤培地 (最適)
WO2010/068758 細胞を胚様体様細胞塊の状態に培養し初期化誘導
WO2010/084970 不死化・自複製伝子入れ現実的支持細胞等をフィードに
US2010-0167398 脱落膜由来の間葉系幹細胞 (間質) 利用
4) 選別方法
WO2008/124133 WO2008/151058 メチル化・形態・×活性化で選別
WO2010/016253 Nanogプロモータ活性を指標 (高腫瘍性低い2次Neurosphere)
WO2010/033084 PODXLの表面発現を指標 (適切なiPS細胞選別)
WO2010/033991 導入遺伝子 silencing と TRA-1-60, DNMT3B, REX1 指標 (完全誘導)
WO2010/073760 蛍光標識幹細胞を動物組織原基に移植 (腫瘍化しない細胞の選別)
5) 誘導因子の導入方法
WO2009/133971 プラスミドベクター (因子の一過性発現: マウス胎仔細胞)
WO2009/149233 WO2010/048567 EBV配列含有プラスミド (エピソーマルに増殖)
WO2010/012077 トランスポゾン (因子の一過性発現・高率誘導: 胎児細胞)
WO2010/022194 トランススプライシング技術 (誘導後に因子除去)
WO2010/028019 アデノウイルスベクター (因子の発現: マウス成体肝)
WO2010/038904 人工染色体 (ゲノム組み込みなし・誘導後因子発現阻止)
WO2009/152529 WO2010/030003 WO2010/042490 US2010-0150889
2A peptide (因子のポリシストロニック発現で誘導効率化)
US20100233804 PTD結合ペプチド (遺伝子を使用せずに誘導)

表2

に列挙するとともに、以下補足説明を加える。

1) 由来細胞

iPS 細胞の誘導に適した細胞と適さない細胞があることは明白といえる。例えば、分化度の低い細胞や増殖能の高い細胞のほうが再プログラミングに対する敷居が低く、材料として好ましいことが期待される。これらの工夫として、ケラチノサイト (毛髪) やヒト歯髄細胞からそれぞれ効率的に iPS 細胞誘導するという、ソーク研究所・IzpisuaBelmonte ら (WO2010/

036923), 岐阜大 (手塚)・京大グループ (WO2010/013359) の出願が公開されている。また、誘導因子の項目で既に述べたが、使用する細胞の工夫が誘導因子の節約にも繋がる例として、神経幹細胞 (WO2009/144008) や、間葉系幹細胞 (WO2010/051526) から iPS 細胞を誘導する発明が出願されている。Klf4 や c-Myc を内在性に発現している脂肪組織や歯髄組織中の Stro-1 発現細胞を使用する出願も最近公開された (WO2010/105311)。毛色は少々異なるが、癌細胞から mir-302 で再プログラミングするという Shi-Lung Lin らの出願 (WO2009/058413) もある。

同様な知見は論文ベースで続々登場している。それらの例を列挙すると、メラノサイト (Sox2 なしで) (Hochedlinger ら, *J Cell Sci.* 2009 122 (Pt 19) 3502-10.), ヒト臍帯血細胞 (Oct4 と Sox2 だけで) (IzpisuaBelmonte ら *Cell Stem Cell* 2009 5 (4) 353-357; Martin ら *Cell Stem Cell* 2009 5 (4) 434-441; Linzhao Cheng ら *Blood* 2009 114 (27) 5409-10; 川真田ら *Exp Hematol.* 2010 38 (2) 154-62), ヒト羊膜細胞 (Oct4, Sox2, Nanog で) (多田ら *Genes Cells* 2009 14 (12) 1395-404; Xiao-hong Wang ら *Differentiation* 2010 80 (2-3) 123-9.), 毛乳頭細胞 (Oct4 と Klf4 だけで) (マウントサイナイ医科大・Rendl ら, *Stem Cells* 2010 28 (2) 221-8.), 親知らずの間葉系間質細胞 (産総研・大串ら, *J Biol Chem.* 2010 285 (38) 29270-8), ヒト肝前駆細胞 (miR-145 阻害剤と TGF β リガンドで) (東大・森口ら, *ACSC* 2010 2 (1) 5-9) などを使用してそれぞれ iPS 細胞を誘導する報告がある。

一方これらとは全く別に、クオリティーの高い iPS 細胞を得るための工夫として、肝臓・胃上皮細胞の使用により腫瘍発生の危険を低減させるという京大・山中らの出願 (WO2009/096049) もある。

2) 誘導効率の改善

当初の技術では、体細胞数千~1万個から1個程度の iPS 細胞しか得られなかったため、誘導効率の改善がきわめて重要な解決課題として取り組まれてきた。効率の改善は誘導に必要な培養時間の短縮にも貢献する。誘導因子の数を減らすと iPS 細胞の誘導効率が落ちるので、逆に誘導効率を改善するための方法は誘導に必要な因子数の節約に繋がる側面もある。

DNA のメチル化やヒストンの修飾の状態は、核初期化に大きく関係すると考えられてきたため、これら

に影響する化学物質を、誘導効率を高めるための補助的因子として活用する出願が多くなされている。Whitehead の Young らの出願 (WO2009/033920) や、ジョンズ・ホプキンス大の Song らの出願 (WO2009/143421) のほか、先述の Melton らの HDAC 阻害剤を使用して 2 因子で iPS 細胞を誘導する出願 (WO2009/102983) もこの類に含まれる。

細胞にストレスを与えるような培養条件によって誘導効率の改善を実現する技術の出願もある。ハーバード大の Ramanathan ら (WO2009/142717) や、京大・山中ら (WO2010/013845) の出願はそれぞれ低酸素培養によって、TAKARA の出願 (WO2010/004989) は低タンパク質培地の飢餓条件で誘導効率の改善を行う効果を主張している。

TGF β ・MEK・MAPK 経路等のシグナル経路の阻害によって誘導効率を改善する出願も多くなされている (ハーバード大・Eggan ら: WO2010/033906, スクリプス研究所・Sheng Ding ら: WO2010/077955, ケンブリッジ大・Smith ら: WO2009/101407)。Jaenisch らの Wnt 経路刺激に関するもの (WO2009/032194) や、先述の Sheng Ding らの GSK3 阻害剤を使用したもの (WO2009/117439) も関連性がある。サイトカインの組み合わせに関する出願も出ている (協和醗酵キリン: WO2009/148057)。成長因子等を含む羊水を活用する出願もこのカテゴリーに入るであろう (マウントサイナイ医科大・Polgar ら: WO2010/033969)。

一方、類似した一連の miRNA を活用する出願が 2 つのグループから出ている。一つは京大の山中らの、胚性幹細胞において高度に発現している miRNA の活用で c-Myc を使わずに高率で iPS 細胞を誘導するという出願 (WO2009/075119) で、もうひとつは UCSF の、Blelloch らの胚性幹細胞の細胞周期調節 miRNA (ESCC miRNA) が再プログラミングに関係するという成果 (Nat Biotechnol. 2009 May;27(5):459-61) に基づく出願 (WO2010/115050) である。このほか、Oct4 の作用点である ESET の発現調整で誘導効率を制御するという Leng-Siew Yeap らの出願 (WO2009/147445) も公開されている。

論文レベルでは、さらにバラエティーに富んだ誘導効率改善法が報告されている。それらは例えば、ビタミン C (中国/オーストリア・Duanqing Pei ら: *Cell Stem Cell* 2009 6(1)71-79), 酪酸 (ノースカロライナ大・Zhang ら: *J Biol Chem.* 2010 285(33)25516-21 お

よびジョンズ・ホプキンス大・Cheng ら: *Stem Cells.* 2010 28(4)713-20), E-カドヘリン (中国科学院・Gang Pei ら: *Stem Cells.* 2010 28(8)1315-25.) などを利用して iPS 細胞誘導を効率化している。

先述のとおり、誘導効率改善のため p53 を抑制する工夫が Hongkui Deng ら (*Cell Stem Cell* 2008 3(5):475-9 / US2010/0093090) によって開示されていたが、p53 経路と iPS 細胞誘導に関するより詳しい研究が、京大の山中ら、スペインの Serrano ら、ソーク研究所の Izpisúa Belmonte ら、ハーバード大の Konrad Hochedlinger ら、スペインの Blasco らの各グループのそれぞれから同じジャーナルの同じ号 (*Nature* 2009 460(7259)) に発表された。これらのうち、Izpisúa Belmonte らの出願 (WO2010/111422) が p53 阻害剤と Oct4, Sox2 によって高効率に iPS 細胞を誘導する方法として公開されている。

3) 培養方法

誘導効率の改善やスピードアップに繋がる培養方法の出願に関しては前項で示した。培養技術としては、形質が変わらないよう維持するための最適培地の工夫や、特定の分化を起こさせる環境として使用される培地の工夫が基本となろう。これらの多くは ES 細胞も iPS 細胞も含む多能性幹細胞全般がターゲットである。成果が培養基の成分の選択や濃度の微妙な調整などの地道な作業の結果である場合は、少なくとも広い特許にはなりづらい側面もあるが、培養の結果を左右する決定的な要素の発見は権利として一定の影響力も発揮できよう。一方、再生医療への実用化に向け、安全性 (病原性因子の排除) や安定性 (確実な供給, 組成の透明性) における要請から、動物由来材料を使用しない系を確立することも重要であり、フィーダーフリー、ゼノフリーの培養などの技術に関する出願も出始めている。

フィーダーフリー、ゼノフリー関係では、ラミニン 5 の活用 (オリエンタル酵母・京大: WO2009/123349) や、レクチンの活用 (フィンランド・Impola ら: WO2010/004096) に関する出願がみられる。ウイスコンシン大の Kiessling ら (WO2010/033925) は、GAG 結合ペプチド培養基を足場とし、ROCK 阻害剤を使用した培地の組み合わせで培養の最適化を試みている。ROCK 阻害剤は先述の Daley ら (WO2009/061442) においても使用されているが、ヒト ES 細胞

を分散させると ROCK (Rho キナーゼ) が働いて細胞がアポトーシスに向かうため、これを押さえる効果が知られている。

羊水の使用については誘導効率改善の項でも触れたが、培養の安定化等の観点から羊水や胎盤を活用する出願もある。例えば、大量に得られる脱落膜由来の間質を利用する工夫 (理研グループ: US2010/0167398) や、羊水中で線維芽細胞を培養すると c-kit が上昇して CD117⁺ の多能性幹細胞が得られるというセントピーターズ大の Sciorra らの出願 (WO2009/151844) がある。

このほか、不死化・自殺の両遺伝子を入れ現実の支持細胞等をフィーダにする面白い工夫 (阪大の井上・西田ら: WO2010/084970) もある。

iPS 細胞の出願というわけではないが、その他、線維芽細胞を胚様体細胞塊の状態に培養して再プログラミングするというルイビル大の Dean らの出願 (WO2010/068758) や、マウス GS 細胞を一定条件で培養、ES 細胞様の gPS 細胞を樹立するという Max Planck 研究所の Schöler らの出願 (WO2010/092186) も公開されている。

4) 選別方法

選別方法に関する最も初期の出願としては、Whitehead の Jaenisch らの WO2008/124133 と、ハーバード大の Hochedlinger らの WO2008/151058 がある。前報でも紹介したが、これら 2 つの出願は師弟関係にある研究者同士の独立した出願であり、X 染色体の活性化状態、Dnmt1 抵抗性による選別、細胞形態による選別等の記載において、相互に内容が交錯している。このうち細胞形態のみに依存して iPS 細胞を選別する方法は大変重要で、論文レベルでは、Jaenisch ら (*Nat Biotechnol.* 2007 25 (10):1177-81) や、UCSF の Ramalho-Santos ら (*Cell Stem Cell* 2007 1 (3):245-7) によって最初に報告されている。当初、iPS 細胞のクローニングには薬剤耐性マーカーを使用していたが、このようなものを細胞に導入しなければ iPS 細胞が得られないとすれば、再生医療の実用化において極めて不都合だからである。形態による選別の権利がどちらの出願から生まれるのか、あるいは生まれないのかは大変興味を持たれるところである。形態選別に関する記載を伴う仮出願の出願日に関しては、両者のうち Hochedlinger らが先行しているが、先

発明も考慮すると、行方は全くわからない。

クオリティーの高い iPS 細胞クローンを識別するための選別方法も重要である。シンガポールの Choo らの出願は PODXL という表面分子が iPS 細胞特異的に発現しているとの知見を、iPS 細胞を選別したり、分化の際に残って癌化のもとになる iPS 細胞を除去するために活用している (WO2010/033084)。ハーバード大の Daley/Schlaeger らの出願は、完全にリプログラミングが生じていることを確認できるとする指標として、導入遺伝子 silencing と TRA-1-60, DNMT3B, REX1 をクレームしている (WO2010/033991)。大塚製薬/自治医大 (小林) グループは、蛍光標識幹細胞を動物組織原基に移植し、腫瘍化しない細胞を選別する工夫を出願している (WO2010/073760)。

5) 誘導因子の導入方法

誘導因子を細胞に作用させる際、当初の技術ではレトロウイルスを用いて遺伝子を細胞に導入していた。この手法は iPS 細胞誘導に適していたが、導入遺伝子が染色体の不特定な位置に組み込まれることによって宿主の遺伝子発現を乱したり、導入遺伝子自体の発現が安定しなかったり、あるいは誘導後も導入遺伝子が発現したりする問題があり、その結果、安定な誘導細胞が得られなかったり、細胞が癌化しやすくなるなどの不都合があった。そこで、そのような不都合を避けるための様々な工夫が考案されている。

京大・山中らはプラスミドベクターを用いてマウス胎仔細胞から iPS 細胞を誘導 (WO2009/133971)、Hochedlinger らはアデノウイルスベクターを使用してマウス成体肝から iPS 細胞を誘導している (WO2010/028019)。一方、ウイコンシン大・Thomson らは、EBV 配列含有プラスミドで導入因子をエピソームに増殖させ、iPS 細胞の高率の誘導に成功している (WO2009/149233, WO2010/048567)。エジンバラ大学の梶らとトロント大学の Nagy らは、piggyBac トランスポゾンを使用して iPS 細胞を高率に誘導している (WO2010/012077)。鳥取大・押村グループ (京大共願) は人工染色体を使用してゲノムへの組込みなしで因子を導入し、iPS 細胞を誘導後その因子の発現を阻止する工夫を施している (WO2010/038904)。誘導後に導入因子を除去する技術の出願もある (VIRXSYS: WO2010/022194)。

各因子の発現の不均一性を補うべく、2A ペプチド

等を用いて複数因子をポリシストロニックに発現させる出願も多く機関からなされている (Whitehead・Jaenisch ら: WO2009/152529; 協和発酵キリン: WO2010/030003; ボストン大・Mostoslavsky ら: WO2010/042490; アラバマ大・Townes ら: US2010/0150889)。これらの出願は, IRES2・SV40/EF1 α ・Cre/loxP などの利用によって, 発現の低さを補ったり, 誘導後に因子切り出すなど, 様々な工夫も組み合わせて開示している。

DNA の導入によらない技術の開発もなされている。特に, 適当な小分子によって内在性の初期化遺伝子を活性化できれば, 外来遺伝子導入による上述の不都合を避けることができる上, 安定・安価な誘導も期待できることから, そのような小分子のスクリーニングが当初より精力的になされてきた。しかしながら現時点では, 上述のごとく, 遺伝子を完全に小分子で代替する技術の到来には必ずしも至っていない。

一方, 誘導因子の転写・翻訳産物を使用する iPS 細胞誘導は直接的かつ理想的であり, 原理的にも当然可能と理解されていたものだが, 実現までにやや時間がかかった。最初の報告はスクリプス研の Sheng Ding らによるもので, 4 因子の PTD 融合リコンビナントペプチドを繰り返し体細胞に導入して iPS 細胞を樹立することに成功 (*Cell Stem Cell* 2009 4(5) 381-384), これに 1 か月遅れてハーバード大学の Kwang-Soo Kim らも同様の成果を報告した (*Cell Stem Cell* 2009 4(6) 472-476)。Sheng Ding らの報告に関連した出願が最近米国で公開されている (US2010/0233804, 出願日 2010.3.12)。これは Oct3/4, Klf4 と低分子化合物の組み合わせで iPS 細胞誘導する発明のところで紹介した WO2009/117439 (出願日 2009.3.17) の CIP である。なお, この WO2009/117439 には, ペプチドによる iPS 細胞誘導の実施例が既に記載されている (2008.10.31 および 2008.3.17 になされた仮出願にはまだその記載がない)。桜田らの WO2009/007852 も, 実施例がないながら, PTD 融合リコンビナントに関するクレームを備えている (PTD ペプチドの最初の記載は 2008.3.28 出願の仮出願 US61/040,646 から)。そもそも, 山中らによる世界最先の iPS 細胞の出願である WO2007/069666 も誘導因子を遺伝子に特定しているわけではなく, 前述のとおり, その分割出願 (特願 2009-56748) では「体細胞から誘導多能性幹細胞を製造するための, Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2 の 4 遺伝

子, またはそれらの遺伝子産物の使用」等をクレームしている。

ペプチド導入による iPS 細胞の樹立方法は, 現時点では誘導効率が悪く実施に伴う費用も高価な可能性がある。しかし, 遺伝子を用いないという意味では安全性の観点から格段に有利とも言えるし, 効率を改善する技術が進めば費用面も解決され実用性も出てくる。従って, ペプチド導入に関する権利が, どの出願にどのような形式でもたらされるのか, 非常に興味を持たれる。もちろん, 初期の出願は実施可能要件 (記述要件) の非充足を理由に, 実施例を伴う Sheng Ding らの出願は進歩性を理由に, いずれも権利が殆ど成立しない可能性も十分に考えられる。各国での審査ごとに異なる結果になる可能性もあり, 今後の成り行きを注視したい。

なお, ごく最近, DNA でもペプチドでもなく, 合成 RNA を使用するという画期的な第三の方法で iPS 細胞を高効率に誘導する方法がハーバード大の Derrick J. Rossi らによって報告された (*Cell Stem Cell*, 2010 7(5) 618-30)。対応する特許出願も当然なされているものと思われ, その内容が注目される。

6) ダイレクト・リプログラミング

iPS 細胞への初期化を全く介さずに直接他の細胞に転換するダイレクト・リプログラミングの技術も, ごく一部だが, 登場してきている。ハーバード大の Melton らは, 膵臓外分泌細胞を Pdx1, Ngn3, Mafa の導入で β 細胞に直接転換する方法を報告 (*Nature* 2008 455 (7213) 627-32), 特許出願もしている (WO2010/022395)。論文ベースでは, グラッドストーン研究所の家田・Srivastava らから, マウス線維芽細胞を Gata4, Mef2c, Tbx5 で心筋細胞 (iCM 細胞と命名) に直接転換したとの報告 (*Cell* 2010 142(3) 375-86) が, また, スタンフォード大の Wernig らから, マウス線維芽細胞を Ascl1, Brn2, Myt1l 導入で神経細胞 (iN 細胞と命名) に直接転換したとの報告 (*Nature* 2010 463, 1035-1041) がなされている。

3. iPS 細胞活用技術に関する発明

iPS 細胞については, 再生医療に直接用いる期待はもちろん, 医薬のスクリーニング, 難病の研究材料など, 幅広い活用が考えられる。再生医療材料としての使用にあたっては, 細胞の品質向上や分化制御など乗

り越えるべき壁も高いが、実現を期待させるような画期的な技術もでてきている。例えば、東大の中内らの出願 (WO2010/021390) は、臓器欠損動物の胚盤胞にヒト iPS 細胞を移植してヒト臓器を製造する技術を開示している。三次元的で複雑な臓器を構築する難問を一気に解決する可能性を秘めた技術である。また、理研の度会らのグループは、B 細胞をリプログラミング・増殖させてから再び分化させヒト mAb を製造する方法 (WO2010/027062) や、NKT 細胞をリプログラミング・増幅させ再び分化させて癌治療に用いる方法 (WO2010/027094) に関する出願を行っている。これらは、増殖させにくい終末分化細胞のクローンをいったん未分化状態に戻すことによって大量培養を可能にし、増殖後再び分化させて抗体産生に使用したり患者の体内で機能させたりするという、大変面白い iPS 細胞の活用法である。

分化誘導技術の発達はいPS細胞の実用化に向けて必須であり、出願も多数出てきているが、ES細胞以来の技術の蓄積と重なることもあり、iPS細胞技術の解析に特化した本稿では詳しく触れない。最近の出願動向をざっと概観すると、例えば神経に関しては、iPS細胞から分化させたニューロスフェア移植で神経損傷を治療する方法 (WO 2009/110113)、ES/iPS細胞を2種の SMAD シグナリング阻害剤で神経系に分化させる方法 (WO2010/091241)、多能性幹細胞を神経幹細胞に分化させるのに最適な培養方法 (WO2010/090007)、ES細胞等を GSK 阻害剤、TGF β /Activin 経路阻害剤、AMPK 経路阻害剤を含む分化培地で培養して神経前駆細胞を調整する方法 (WO2010/108005) などの出願がある。心臓血管系に関しては、サイクロスポリン A を用いた高効率心筋 (前駆) 細胞分化誘導法 (WO2009/118928)、QT 間隔に影響する医薬スクリーニング用の iPS 由来細胞パネル (WO2009/114133)、ES/iPS細胞を mir143, mir145 で平滑筋 (血管平滑筋) に分化させる方法 (WO2010/104796)、心筋細胞への分化の際に高張液で培養を行うことにより多能性幹細胞等を破壊して心筋細胞を純化する方法 (WO2010/114136) などの出願がある。その他、ES/iPS細胞から BMP4 含有無血清培地で骨・軟骨細胞を分化誘導する方法 (WO2010/008100)、OP9 フィーダを使用し ES/iPS細胞から骨髄単球性細胞を安定調整する方法 (US20100081199)、患者 HLA 適合血小板 (巨核球) を大量で安定に調製する技術

(WO2009/122747)、低酸素限定培地で PSC を CD34⁺ 細胞の造血系細胞や内皮系細胞に分化させる技術 (WO2010/096746; WO2010/099539)、幹細胞を SUR1/Hir6.2 と接触させ膵臓前駆 Ngn3 陽性細胞に分化させる方法 (WO2010/100150)、多能性幹細胞を中胚葉に分化させるための一連の化合物 (WO2010/091241) などの出願が見られる。

4. おわりに

彗星のように現れてから休むことなく進歩しつづけている iPS 細胞誘導技術の流れに沿って、誘導原理自体が解明されていない手探り状態のままに、熾烈な特許出願競争が展開されている。本稿ではその現状について分析を試みたが、核となり得る誘導因子関連出願の相互の陣取り競争に加え、誘導効率の改善や、癌化低減・分化能の向上などの iPS 細胞のクオリティーの向上を求めた、追加的因子や培養方法・由来細胞に関する工夫、誘導因子の活性化手段の技術 (ベクター、低分子、ペプチド、RNA など) など、クリティカルな周辺技術に関する特許出願が続々と登場している状況が観察された。

ただ、冒頭でも述べたように、iPS細胞の登場自体はそれまでの核初期化技術等の研究の蓄積の上に成立したものである。また、iPS細胞の最初の公表後、世界の研究者の興味がここに集中し、技術が少し進む度に多数の機関から競って論文発表や特許出願がなされてきた。これらのことから、誰もが避けて通れないような「基本特許」の成立はそもそも困難とも考えられる。加えて、米国における WARF の ES 細胞特許の再審査 (Foundation of Taxpayer & Consumer Rights v. Patent of WARF, Appeal 2010-001854, Patent 7,029,913 (April 28, 2010) : ここでは、マウス ES 細胞樹立の成功からヒト ES 細胞樹立の成功が、その方法に関する重大な指標とともに、当然予測されていたとのスタンスに立った結論が出されている) や、Ariad の CAFC 判決 (Ariad Pharmaceuticals, Inc. v. Eli Lilly & Co. Fed. Cir. 2010 en banc : ここでは、ノーベル賞学者 David Baltimore を中心としたパイオニア的な成果に基づく医薬発明に対し、明細書の記述要件の充足を厳しく求めている) の結果からも見て取れるように、先駆的発明に基づいた広い特許の成立がますます困難になりつつある背景がある。こうして特許が細分化される結果、実用化の主体、あるいは

実用化において採用されるシステムごとに、使われる特許の住み分けが生じることが予測される。

いずれにせよ、iPS 細胞特許争奪競争における最大のポイントは、iPS 細胞に対する「物質特許」が成立し得ないであろうことにある。そもそも、対象となる細胞が変幻自在で得体の知れないブラックボックスであることから、物質としての特定が難しい。しかも、iPS 細胞技術が ES 細胞の代替をめざす限りにおいては、理想の iPS 細胞は ES 細胞と同一ということになり、新規性がない。もっとも、iPS 細胞は HLA タイプがドナーと同一であるし、リンパ球から誘導する場合は遺伝子の再構成が起こっているため、それらの特徴を ES 細胞との差別化において活用できるかもしれない。しかし、iPS 細胞自体の存在が公知化（山中ら *Cell* 2006 126, 663-676）してしまった以降の出願が、そのような工夫によって確保できる権利は限定的であろう。

以上、iPS 細胞技術については、狭い範囲の特許しか成立し難いだろうし、成立するにしても一般的に代替可能とされる「製法特許」にすぎないであろう、と

の見込みを述べた。そうはいつても、iPS 細胞製造の一連のステップの中で際立って有利な 1 プロセスについての権利を確保できれば、一定の主導権を握ることは可能であろう。もちろん、そのようなプロセスが誘導因子に関係するとは限らず、どのような範疇のプロセスがそのような主導権を握りうるかは不透明である。むしろ、今後注視しなければいけないのは、この画期的な iPS 細胞技術の活用の結果、具体的にどのような医療が実現化されることになるのか、ということであろう。その時使用される特許があるとして、それがどのようなものになるのか。体細胞の再プログラミングや分化誘導に関する技術が黎明期にある現段階において、それはまだ誰にも予測できない。

謝辞

この原稿執筆のきっかけとなる講演等の機会をあたえていただいた高須直子氏ほか iPS 細胞研究所 (CiRA) の皆様に感謝します (MI)。

(原稿受領 2010. 10. 28)

