

特集《バイオ・ライフサイエンス》

日本のバイオ・ライフサイエンス産業の
国際的競争力の特許面からの調査・研究

平成 22 年度バイオ・ライフサイエンス委員会第 4 部会

越智 豊, 大森未知子, 北川英陸, 志摩美裕貴, 星野貴光

要 約

弁理士会バイオ・ライフサイエンス委員会第 4 部会では、バイオ・ライフサイエンス産業にとって画期的であった、京都大学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) の知的財産についての調査を行っている。2006 年 8 月マウス iPS 細胞に引き続き、2007 年 11 月にはヒト iPS 細胞が発表され、その関連知的財産については、2008 年 8 月に世界で始めて、日本特許庁が認め、現在国内では 3 件の特許が認められた。海外でも、漸く昨年、Jaenisch のスクリーニング特許が米国で、桜田氏のヒト iPS 細胞作成方法が英国で特許となった。今年度は、英国でヒト iPS 細胞での広範囲に特許が認められた、桜田特許について、包袋を基に検討を行った。優先権の有効性、ダブルパテントの問題が、明らかになったが、今年 2 月に発表された京都大学と iPierian との提携によって、これらが問題とならない可能性が高まった。

最後に、執筆中に、EP において京都大学の iPS 細胞関連技術に関する山中出願がかなり広い範囲で特許となったことが発表され、コメントを加えた。

目次

1. はじめに
2. 桜田英国出願の審査経過と結果
3. 考察
4. おわりに

1. はじめに

日本のバイオ・ライフサイエンス産業にとって、京都大学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) の発明は画期的であった。2006 年 8 月マウス iPS 細胞に引き続き、2007 年 11 月にはヒト iPS 細胞が発表されたが、その関連知的財産については、2008 年 8 月に世界で始めて、日本特許庁が認め、昨年も、2 件特許が認められた。これらについての分析は、昨年度報告した。

海外でも iPS 細胞研究は、熾烈を極めているが、特許出願の審査に関しては、漸く昨年、Jaenisch のスクリーニング特許が米国で、桜田氏のヒト iPS 細胞作成方法が英国で特許となった。今年度は、英国でヒト iPS 細胞での広範囲に特許が認められた、桜田特許について、包袋を基に検討を行い、今年 2 月に発表された京都大学と iPierian との提携についても、考察を加

えた。

最後に、EP において、京都大学の iPS 細胞関連技術に関する山中出願がかなりの広い範囲での特許となったとの報道があり、コメントを加えた。

2. 桜田英国出願の審査経過と結果

1. 概略

2007 年 6 月 15 日出願の日本出願 (2007-159382) を基に優先権を主張してバイエル社から、2008 年 6 月 13 日に英国に直接、出願した。一方で、欧州特許庁を受理官庁とする、PCT 出願 (WO2009/006930) も行っている。この出願の請求項は、日本出願の請求項 35 項を英訳したものに、1 項加えているだけであるが、英国出願においては、請求項は 34 項で、内容は、日本出願、PCT 出願とは大きく異なっている。

審査過程では、まず、予備審査で、2007 年 6 月 24 日、説明の図が日本語で書かれており、英語で書かれた図を提出するよう、指摘を受ける。そして、2008 年 10 月 27 日、①請求項 1 ~ 17, 23 ~ 34 と②請求項 18 ~ 22 は別発明であり、複数の発明を含んでいると、審査官から指摘される。

その後、2008.12.9 バイエル社がこの特許に関する権利を売却したため、出願人がバイエル社から米国ベンチャーの iZumi に変更となる。尚、桜田氏もバイエル社から iZumi に移っている。

2009年3月13日、早期審査 (Urgent accelerated examination) を申請するとともに、第一回の補正を行い、請求項 2, 4~7, 18~23 を削除、単一発明とし、結果、請求項は 1~23 となる。また、詳細な説明の文言を訂正した。

しかし、審査官は請求項 1~4, 7, 8, 12 について特許の心証に至らず、同年7月9日、出願人は請求項 2, 19 を削除、これにより請求項は 1~21 となる。

この年、特許に関する権利が iZumi から、さらに米国西海岸のベンチャー iPierian に移り、8月21日出願人が iPierian に変更になる。

その後、2009年11月23日 出願人は請求項 1~11, 13, 17~21 を削除し、元の請求項 12, 14, 15, 16 を請求項 1~4 とし、審査官は詳細な説明との矛盾点を指摘し、これらの訂正を条件に特許とした。

2. 詳細

1) 当初出願の請求項は下記の 34 項であった。

Claim ver.1,

1. Human pluripotent stem cells induced from undifferentiated stem Cells present in human postnatal tissue and having in vitro long-term self-renewable ability and the pluripotency to differentiate into ectoderm, mesoderm and endoderm.

2. Human pluripotent stem cells established from human postnatal tissue by the introduction of each of an Oct3/4, Sox2 and Klf4 gene and either the c-Myc gene or a histone deacetylase inhibitor, said human postnatal tissue comprising undifferentiated stem cells in which each gene of Tert, Nanog, Oct3/4 and Sox 2 has not undergone epigenetic inactivation.

3. Human pluripotent stem cells derived from human postnatal tissue by introducing thereinto either Oct3/4, Sox2 and Klf4, or Oct3/4, Sox2 and Klf4 as well as c-Myc or a histone deacetylase inhibitor.

4. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 1 to 3 induced from undifferentiated

stem cells present in a human postnatal tissue, wherein said undifferentiated stem cells present in the human postnatal tissue were subjected to a primary culture or a second subculture or a subculture in a low serum concentration.

5. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 1 to 3 induced by the forced expression of each of the three genes Oct3/4, Sox 2 and Klf4 cells present in a human postnatal undifferentiated stem cells present tissue were subjected to a primary subculture or to a subculture in a low serum concentration.

6. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 1 to 3 induced by the forced expression of each of the four genes Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc in undifferentiated

stem cells present in a human postnatal tissue, wherein said undifferentiated stem cells present in the human postnatal tissue were subjected to a primary culture or a second subculture or to a subculture in a low serum concentration.

7. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 1 to 3 induced by combining the forced expression of each of the three genes of Oct3/4, Sox2 and Klf4 and a histone deacetylase inhibitor treatment in undifferentiated stem cells present in human postnatal tissue wherein said undifferentiated stem cells present in the human postnatal tissue was subjected to a primary culture or a second subculture or to a subculture in a low serum concentration.

8. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 1 to 3 induced by combining the forced expression of each of the three genes of Oct3/4, Sox2 and Klf4 and a MS-275 treatment in an undifferentiated stem cells present in a human postnatal tissue wherein said undifferentiated stem cells present in the human postnatal tissue were subjected to a primary culture or a second subculture or to a subculture in a low serum concentration.

9. Human pluripotent stem cells according to any one of Claims 4 to 8 wherein FGF-2 was also used in the culture.

10. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 4 to 8 wherein PDGF and FGF were also used in the culture.
11. Human pluripotent stem cell according to any one of claims 4 to 10 wherein the culture is conducted in a lower density.
12. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 1 to 11 wherein said human pluripotent stem cells are positive for Nanog and/or positive for alkaline phosphatase staining and/or positive for Tert.
13. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 1 to 12 wherein said human pluripotent stem cells have teratoma-forming potential when transplanted into a test animal.
14. Human pluripotent Stem Cells according to any one of claims 1 to 13 wherein said human postnatal tissues a tissue immediately after birth.
15. Human pluripotent stem cells according to claim 14 wherein said human postnatal tissues derived from a neonatal tissue or an umbilical cord tissue.
16. Human pluripotent stem cells according to claim 14 wherein said human postnatal tissues derived from a neonatal skin or blood vessel derived from the umbilical cord.
17. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 1 to 16 having the in vitro potential of differentiating into primordial germ cells.
18. An undifferentiated stem cell in which each of the genes Tert, Nanog, Oct3/4 and Sox2 has not undergone epigenetic inactivation, which stem cell can be induced into a human pluripotent stem cell having in vitro long-term self-renewal ability and the pluripotency of differentiating into ectoderm, mesoderm and endoderm by the forced expression of each of the three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4, said undifferentiated stem cell being obtainable from a human postnatal tissue.
19. An undifferentiated stem cell in which each of the genes Tert, Nanog, Oct3/4 and Sox2 has not undergone epigenetic inactivation, which stem cell can be induced into a human pluripotent stem cell having in vitro long-term self-renewal ability and the pluripotency of differentiating into ectoderm, mesoderm and endoderm by the forced expression of each of the four genes of Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc, said undifferentiated stem cell being obtainable from a human postnatal tissue.
20. An undifferentiated stem cell in which each of the genes Tert, Nanog, Oct3/4 and Sox2 has not undergone epigenetic inactivation, which stem cell can be induced into a human pluripotent stem cell having in vitro long-term self-renewal ability and the pluripotency of differentiating into ectoderm, mesoderm and endoderm by combining the forced expression of each of the three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 and a histone deacetylase inhibitor treatment, said undifferentiated stem cell being obtainable from a human postnatal tissue.
21. An undifferentiated stem cell in which each of the genes Tert, Nanog, Oct3/4 and Sox2 has not undergone epigenetic inactivation, which stem cell can be induced into a human pluripotent stem cells having in vitro long-term self-renewal ability and the pluripotency of differentiating into ectoderm, mesoderm and endoderm by combining the forced expression of each of the three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 and an MS-275 treatment, said undifferentiated stem cell being obtainable from a human postnatal tissue.
22. An undifferentiated stem cell according to any one of claims 18 to 21 and further defined by the specific feature (s) of any one or more of claims 14 to 17.
23. Method of inducing a human pluripotent stem cell wherein an undifferentiated stem cell present in a human postnatal tissue, in which each of the genes Tert, Nanog, Oct3/4 and Sox2 has not undergone epigenetic inactivation, is subjected to a primary culture or a second subculture or to a third or fourth subculture in a low serum concentration at 0 to 5% , and then either : -

(a) each of the three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 is subjected to forced expression ; Or

(b) each of the three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 plus C-Myc is subjected to forced expression ; Or

(C) forced expression of each of three genes of Oct3/4, Sox2 and Klf4 is combined with a histone deacetylase inhibitor treatment or with an MS-275 treatment.

24. A method of inducing a human pluripotent stem cell wherein human postnatal tissues subjected to a primary culture or a second subculture or to a third or fourth subculture in a low serum concentration at 0 to 5% and then either : -

(a) each of the three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 is subjected to forced expression ; Or

(b) each of three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 plus c-Myc is subjected to forced expression ; Or

(C) forced expression of each of the three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 is combined with a histone deacetylase inhibitor treatment or with an MS-275 treatment.

25. A method according to claim 23 or claim24 wherein said culturing is in the presence of FGF-2 or in the presence of PDGF and EGF.

26. A method according to any one of claims 23 to 25 wherein said human postnatal tissue is a tissue immediately after birth.

27. A method according to claim 26 wherein said human postnatal tissue is a tissue derived from a neonatal tissue or an umbilical cord tissue, or is a tissue derived from a neonatal skin or a blood vessel of the umbilical cord.

28. A method of culturing human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 1 to 17 in a culture medium comprising an inhibitor of Rho associated kinase as an active ingredient.

29. Human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 1 to 17 for use in regenerative medicine.

30. Human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 1 to 17 for use in a disease resulting from tissue degeneration or injury.

31. Human pluripotent stem cells as defined in any

one of claims 1 to 17 for use in cell replacement therapy.

32. The use of human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 1 to 17 in the manufacture of a medicament for treatment or prophylaxis of a disease resulting from tissue degeneration or injury or for use in cell replacement therapy.

33. A pharmaceutical formulation comprising human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 1 to 17, optionally together with a carrier, diluent or excipient.

34. Human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 1 to 17 for use as a pharmaceutical.

2) その後、複数発明、文言の齟齬を指摘され、請求項 2, 4 ~ 7, 18 ~ 23 を削除し、下記の 23 項になる。

Claim Ver.2

1. Human pluripotent stem cells derived from human postnatal tissue and having in vitro long-term self renewal ability and the pluripotency to differentiate into ectoderm, mesoderm and endoderm.

2. Hunan pluripotent stem sells according to claim 1 derived from human postnatal tissue by introducing thereinto factors comprising Oct3/4, Sox2 and Klf4.

3. Hunan pluripotent stem cells according to claim 2 wherein said factors further comprises c-Myc or a histone deacetylase inhibitor.

4. Hunan pluripotent stem cells according to claims 2 or 3 wherein said human postnatal tissue has been subjected to a primary culture or a second subculture or to a subculture in a low serum concentration.

5. Hunan pluripotent stem cells according to claim 4 wherein FGF-2 was also used in the culture.

6. Hunan pluripotent stem cells according to claim 4 wherein PDGF and FGF were also used in the culture.

7. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 2 to 6 and which are positive for Nanog and/or positive for alkaline phosphatase staining and/or positive for Tert.

8. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 2 to 6 and which have teratoma-forming potential when transplanted into a test animal.
9. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 2 to 8 wherein said human postnatal tissue is a tissue immediately after birth.
10. Human pluripotent stem cells according to claim 9 wherein said human postnatal tissue is derived from a neonatal tissue or an umbilical cord tissue.
11. Human pluripotent stem cells according to claim 9 wherein human postnatal tissue is said derived from neonatal skin or a blood vessel derived from the umbilical cord.
12. Human pluripotent stem cells according to any one of claims 1 to 17 having the in vitro potential of differentiating into primordial germ cells.
13. A method of inducing human pluripotent stem cells wherein human postnatal tissue is subjected to a primary culture or a second subculture or to a third or fourth subculture in a serum concentration of up to 5% , and then
either : -
(a) each of three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 is subjected to forced expression ; or
(b) each of three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 plus c-Myc is subjected to forced expression ; or
(C) forced expression of each of the three genes Oct3/4, Sox2 and Klf4 is combined with a histone deacetylase inhibitor treatment or with an MS-275 treatment.
14. A method according to claim13 wherein said culturing is in the presence of FGF-2 or in the presence of PDGF and EGF.
15. A method according to claim13 or claim14 wherein said human postnatal tissue is a tissue immediately after birth.
16. A method according to claim15 wherein said human postnatal tissue is a tissue derived from a neonatal tissue or an umbilical cord tissue, or is a tissue derived from neonatal skin or a blood vessel of the umbilical cord.
17. A method of culturing human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 2 to 12 in a culture medium comprising an inhibitor of Rho associated kinase as an active ingredient.
18. Human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 2 to12 for use in regenerative medicine.
19. Human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 2 to12 for use in a disease resulting from tissue degeneration or injury.
20. Human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 2 to12 for use in cell replacement therapy.
21. The use of human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 2 to12 in the manufacture of a medicament for treatment or prophylaxis of a disease resulting from tissue degeneration or injury or for use in cell replacement therapy.
22. A pharmaceutical formulation comprising human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 2 to 12, optionally together with a carrier, diluent or excipient.
23. Human pluripotent stem cells as defined in any one of claims 2 to12 for use as a pharmaceutical.

しかし、2009年4月8日に拒絶理由通知が出された。内容は下記のものである。

1) 新規性について

京都大山中教授 EP 出願である EP1970446 A1 (document. A, 以下 doc.A とする) を引例として, claim1-4, 7, 8, 12 は新規性なしとされる。

doc.A はヒト体細胞から多能性幹細胞を生成させる 4 因子 (Oct-3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) の遺伝子産物を含む核初期化因子の使用を開示している。

ヒト線維芽細胞をマウス ES 細胞用培地に置いても 4 因子はヒト iPS 細胞を誘導しないが, doc.A 実施例 13 では追加の因子を組み合わせることで誘導に成功している。追加の因子である TERT, SV40, Large T antigen 等によりトランスフォームされた細胞が不死化された多能性を有しない細胞であるとの出願人の主張は可能性のことであり, 実施例 13 で使用された因子の組み合わせはヒト成人線維芽細胞から多能性細胞の生成を導いている。よって, claim1-4, 7, 8, 12 は新規性なしとされた。

2) 進歩性について

京都大山中教授 EP 出願である doc.A と CELL, Vol. 126, No.4, Aug 2006 (以下, doc.D とする) を引例として claim1-23 は進歩性なしとされる。

doc.D はマウス成体線維芽細胞からの iPS 細胞の生成における 4 因子の使用を開示している。4 因子がヒト体細胞から多能性細胞を生成しうるかは証明されていないが、「多能性のコントロールに重要なステップで、患者の体細胞から直接多能性細胞を生成することが可能になるだろう」との記載は明らかに当業者をヒト細胞の試みに導くものである。

本願 6 頁では「マウスでは、3 因子 (Oct-3/4, Sox2, Klf4) のみの導入が ES 細胞様多能性幹細胞のトランスフォーメーションに影響する」、そして「ヒトでも同様であることが予想される」と記載されている。本願実施例 11 - 13 はマウスで行われており、ヒトでは行われていない。これは当業者が前段階としてマウス細胞を用い、次にヒト細胞を用いることの証拠である。doc.A においても、マウス細胞で実験した後ヒト細胞で実験している。

現在の claims はヒト iPS 細胞の生成に要求される培養条件や追加の因子など進歩性を有する構成を規定していない。よって、進歩性を有しない。

3) 明確性、一貫性、サポート要件について

審査官は claim 1 は過度に広く、そして推論的であると考えられ、明細書によって十分にサポートされていないとする。サポートがあるのは 3 因子、4 因子、更にヒストンデアセチラーゼ阻害剤に関する方法のみとする。

それに対し、2009 年 7 月 22 日、出願人は下記の反論を行った。

1) 請求項の訂正について

claim 2, 19 をキャンセルし、クレーム数は 21 になった。また、claim 2 に規定していた「3 因子を含む因子の導入によるヒト出生後組織由来のヒト多能性幹細胞」という限定を claim 1 に付加した。

2) 新規性について

doc.A は法 2 条 (3) の規定に従い、新規性においてのみ引例適格を有する。doc.A において、ヒト細胞の実施例はマウス ES 細胞培養培地が使用されている。doc.A 出願後の山中教授らの言及において、「レトロウイルスによる遺伝子導入の後、マウス ES 細胞

培養培地に線維芽細胞を置いてもヒト iPS 細胞は誘導されなかった」、[「iPS 細胞はマウスにおいてのみ生成した」] を考慮すると、doc.A はいかなるヒト iPS 細胞も開示しない。補正後の本願発明は新規性を有すると反論した。

3) 進歩性について

進歩性の判断では後知恵の回避が必要である。doc.D の公開から 1 年を超えても、Yamanaka を含む iPS 分野のリーダーの間でさえ、ヒト iPS 細胞を得ることについて強く懐疑的であった。

また、マウスとヒトの ES 細胞には多くの違いがあるので、ヒトに必要な (リプログラミング) 因子はマウスと違うと信じられていた。ゆえに、doc.D はヒト iPS 細胞の生成について何ら示唆を提供しない。更に、doc.D はマウスについての多能性レポーター系を開示するが、ヒトについては開示がない。ゆえに、ただでさえ生成率の低い iPS 細胞について、当業者はヒト細胞の多能性レポーター系を開発せねばならなかった。驚くべきことに、本願発明は当該レポーター系無しでヒト iPS 細胞を単離でき、かつ、技術分野の否定的態度を克服したものであり、進歩性を有する。

4) 明確性、一貫性、サポート要件について

出願人は審査官の claim1 への評価には承服しないが、単に審査を促進する観点から、審査官の示唆に従い claim2 の限定を claim1 に導入する。よって、明確性、一貫性、サポート要件に適合すると信ずるとした。

2009 年 8 月 7 日、審査官は再び、拒絶理由通知を行った。

1) 新規性

Claim 1-3, 6, 7, 11 は、やはり新規性なしとした。具体的には、Cell. 2007 Nov 30 ; 131 (5) : 861-72 (以下、2007 年の「Cell 誌等」とする。) は、doc.A 実施例 13 の追加の因子を除いた 4 因子によるヒト iPS 細胞の生成を開示する。doc.A 著者による、doc.A 実施例 13 の条件で iPS 細胞が得られなかった明確な開示はなく、doc.A は引例適格を有し、Claim 1-3, 6, 7, 11 は新規性なしとした。

2) 進歩性について

引例を doc.D のみに変更して claim1-21 は進歩性なしとした。

claim1 に係る発明と doc.D が開示する発明の相違点は、doc.D は 4 因子を用いてマウス出生後組織から

マウス多能性幹細胞を得たのに対し、本願発明は3因子又は4因子を用いてヒト出生後組織からヒト多能性幹細胞を得ることである。

doc.Dには「4因子を使用してマウスiPS細胞を製造したことは多能性をコントロールする重要なステップであり、患者の多能性幹細胞を作れるようになるだろう。」とある。よって、この技術分野の次なるステップはこれらの実験をヒト細胞で行うことであるし、この分野において第1にマウスで試験し、次にヒトに適用することは当然である。

もしこのことが受け入れられないのであれば、本願の3因子に関する発明はマウスの実施例のみであり、claim1は全範囲がサポートされない。即ち、マウス細胞のみしかサポートがない。

出願人の反論は、Yamanaka因子を用いたヒトiPS細胞の生成を当業者に諦めさせるものではなく、また、claim1の発明はヒト多能性幹細胞に関するもので、レポーター系の相違は進歩性において考慮しないとした。

2009年9月2日に行われた電話応対に対して再び、2009年9月21日に拒絶理由通知が行われた。

審査官は新規性について、2007年のCell誌の記載を根拠に、新規性違反は解消されない、また、他の拒絶理由も依然として解消していないとした。

2009年11月23日、出願人は下記のごとく、対応した。

物クレームであるclaim1-11, 13, 17-21を削除し、方法クレームについては、リプログラミング因子としてc-Mycを除く限定をした。

具体的には、新規性については①claim1-11, 13, 17-21をキャンセルし、claim12, 14, 15, 16をclaim1-4に繰上げ、②新しいclaim1ではヒトiPS細胞の機能的な特徴を明示する補正を行い、選択的な(b)と(c)は削除した。更に、リプログラミング方法でc-Mycを使用しない、FGF-2存在下での培養が必要であるとした。

いずれの技術水準においても、リプログラミング因子としてc-Mycを除けることを開示しておらず、doc.A実施例13の方法においても、c-Mycを使用し、かつ、FGFを使用していないから、本発明は新規性を有するとした。

また、進歩性についても、技術水準を構成する全ての文献においては、マウス細胞のリプログラミングには少なくともc-Mycを含む4因子が必要であるとされている。

Cell Stem Cell, Vol.1, No.1, epub, Jun 7 2007 (以下、doc.Hとする)ではc-MycとKlf4間のバランスがiPS誘導に決定的な役割を果たすだろうと述べられている。c-Mycの重要性はdoc.Dにおいても詳細に研究されており、c-Mycを除くとコロニーの形態がES細胞様ではないとの記載があり、c-Myc及びKlf4が必須の因子として同定されている。更にYamanakaはNature (2007, 447 at page 619)にて「おそらく、更なる転写因子が要求される」としている。

これに対し本願発明者はc-Myc「無し」でヒト出生後細胞をリプログラムしてiPS細胞を得ることを見出したものであり、進歩性を有するとした。

これに対し、審査官と出願人の間で、電話で議論がなされた。

審査官は11月23日付けの補正について、「クレーム発明はc-Mycなしとしているが、明細書の記載はc-Myc必須となっている」と指摘し、出願人側は、「本英国出願は日本出願を基礎とするものであり、記載には「unusual」などところがある。当業者が、本発明が記載要件に適合しているかを検討するときは、出願人が経た経過の順序が重要である。出願人は、4因子でマウスと同様にヒトiPSを確立後、マウスにおいてc-MycなしでのiPSについての実験を行った。このc-Mycなしのマウス実験の方法でヒトiPSも作成できると理解するはずである。」とした。

これに対し、審査官は明細書の記載をクレームに適合させる補正と新規事項回避等のための補正の示唆をした。

2009年12月23日、出願人側は、審査官の指示に従い、示唆に基づく補正を行った。

結果、2010年1月12日、特許査定となった。

最終請求項は下記の4項である。

Claim Ver.4

1. A in vitro method of inducing human pluripotent stem cells having in vitro long-term self-renewal ability and pluripotency to differentiate into ectoderm, mesoderm and endoderm, comprising subjecting human postnatal tissue to forced expression of

each of the genes Oct3/4, Sox2 and Klf4, but not c-Myc, and culturing in the presence of FGF-2.

2. A method according to claim1 wherein said human postnatal tissue is a tissue immediately after birth.

3. A method according to claim2 wherein said human postnatal tissue is a tissue derived from a neonatal tissue or an umbilical cord tissue, or is a tissue derived from neonatal skin or a blood vessel of the umbilical cord.

4. A method according to any preceding claim wherein said human pluripotent stem cell are cultured in a medium comprising an inhibitor of Rho associated kinase as an active ingredient.

和訳

【請求項 1】

C-Myc を含まない、Oct3/4、Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子をヒト出生後の組織に強制発現させ、FGF-2 存在下に培養することを特徴とする、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 2】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ヒト出生後の組織が新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である、或いは新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

Rho associated kinase の阻害剤を有効成分として含有する培地で請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞を培養する方法。

3. 考察

1) 優先権について

優先権の基礎となる当初の日本出願においての請求項は下記のものである。

【請求項 1】

Tert, Nanog, Oct3/4 及び Sox2 の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とするヒト出

生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導した試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞。

【請求項 2】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第 2 継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導した請求項 1 に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 3】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第 2 継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞に Oct3/4、Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子を強制発現することで誘導した請求項 1 に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 4】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第 2 継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞に Oct3/4、Sox2、Klf4 及び c-Myc の 4 つの各遺伝子を強制発現することで誘導した請求項 1 に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 5】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第 2 継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞に Oct3/4、Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子の強制発現とヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理を組み合わせることで誘導した請求項 1 に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 6】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第 2 継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞に Oct3/4、Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子の強制発現と MS-275 処理を組み合わせることで誘導した請求項 1 に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 7】

前記未分化な幹細胞の培養において更に FGF-2 を用いることを特徴とする請求項 2～6 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 8】

前記未分化な幹細胞の培養において更に PDGF と EGF を用いることを特徴とする請求項 2～6 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 9】

前記未分化な幹細胞の培養において更に低密度であることを特徴とする請求項 2～8 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 10】

前記ヒト多能性幹細胞が Nanog 陽性である請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 11】

前記ヒト多能性幹細胞がアルカリフォスファターゼ染色陽性である請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 12】

前記ヒト多能性幹細胞が Tert 陽性である請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 13】

前記ヒト多能性幹細胞が試験動物に移植するとテマトーマ形成能を有する請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 14】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 15】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 16】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 17】

前記ヒト多能性幹細胞が更に試験管内で始原生殖細胞への分化能を有する請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 18】

Tert, Nanog, Oct3/4 及び Sox2 の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4, Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子を強制発現することで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能

性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 19】

Tert, Nanog, Oct3/4 及び Sox2 の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4, Sox2, Klf4 及び c-Myc の 4 つの各遺伝子を強制発現することで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 20】

Tert, Nanog, Oct3/4 及び Sox2 の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4, Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子の強制発現とヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理を組み合わせることで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 21】

Tert, Nanog, Oct3/4 及び Sox2 の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4, Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子の強制発現と MS-275 処理を組み合わせることで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 22】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 23】

前記ヒト出生後の組織が、出生直後の組織でかつ新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 24】

前記ヒト出生後の組織が、出生直後の組織でかつ新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 25】

前記ヒト多能性幹細胞が更に試験管内で始原生殖細

胞への分化能を有する，請求項 18～24 のいずれか 1 項に記載の未分化な幹細胞。

【請求項 26】

Tert, Nanog, Oct3/4 及び Sox2 の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を，初代培養又は第 2 継代培養した後にあるいは 0 から 5% の低濃度血清で第 3 継代培養から第 4 継代培養した後に，Oct3/4, Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子を強制発現することを特徴とするヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 27】

前記強制発現する Oct3/4, Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子に更に c-Myc を加えた 4 つの各遺伝子を強制発現することを特徴とする，請求項 26 に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 28】

前記 Oct3/4, Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子を強制発現することに加え，更にヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理を組み合わせることを特徴とする請求項 26 に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 29】

前記 Oct3/4, Sox2 及び Klf4 の 3 つの各遺伝子を強制発現することに加え，更に MS-275 処理を組み合わせることを特徴とする，請求項 26 に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 30】

前記未分化な幹細胞が FGF-2 の存在下で培養されていることを特徴とする，請求項 26～29 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 31】

前記未分化な幹細胞が PDGF と EGF の存在下で培養されていることを特徴とする，請求項 26～29 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 32】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である，請求項 26～31 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 33】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である，請求項 26～31 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 34】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である，請求項 26～31 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項 35】

Rho associated kinase の阻害剤を有効成分として含有する培地で請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載のヒト多能性幹細胞を培養する方法。

英国で特許となった請求項は，iPS 細胞作成方法に限定し，最終的には 4 項となったが，請求項 1 は日本出願当初の請求項 26，請求項 2 は日本出願当初の請求項 33，請求項 3 は日本出願当初の請求項 34，請求項 4 は日本出願当初の請求項 35 が基礎となっている。これらを明細書とともに，優先権の妥当性を検討した。

1. 英国特許請求項 1 において，iPS への誘導を受ける細胞（被誘導細胞）は「ヒト出生後組織（human postnatal tissue）」となっている。一方，優先権証明書において被誘導細胞は「ヒト出生後組織に存在する未分化な幹細胞」となっている。優先権証明書の 0008 によれば，ヒト出生後組織には未分化な幹細胞以外の細胞が含まれると考えられる。そうすると，特許クレームがカバーする「ヒト出生後組織に存在する未分化な幹細胞以外の細胞」について優先権証明書に記載されているといえるか疑問である。

2. 英国特許クレームでは，ヒト iPS 細胞への誘導のために「Oct3/4, Sox2 及び Klf4 の 3 遺伝子を強制発現させ，他方，c-Myc は発現させない」とある。一方，優先権証明書では 3 遺伝子のみの強制発現の場合には，ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の使用との組み合わせが前提となる旨の記載がある（0007）。また，実施例では，ヒトについて 3 遺伝子の強制発現のみによる iPS 細胞誘導の例はない（マウスについては実施例 13 で評価している）。しかし，優先権証明書の 0013 には，マウスの結果に基づいて「ヒトの場合にも同様に……可能であると考えられる」との記載がある。この 0013 の記載より，特許クレームの構成「ヒトにおいて，Oct3/4, Sox2 及び Klf4 の 3 遺伝子を強制発現させ，他方，c-Myc は発現させない」について，優先権証明書に記載がないと判断するのは難しいと考える。

3. 英国特許クレームのヒト iPS 細胞への誘導方法は、3 遺伝子の強制発現「後」に、FGF-2 存在下で培養する工程を含んでいる（クレーム 1）。他方、優先権証明書では、強制発現「前」に FGF-2 存在下で培養すること（0030 及び 0048～0050）や、誘導「後」のヒト iPS 細胞を FGF-2 存在下で培養すること（0062）は記載されているが、「誘導手段の一部」として、強制発現後かつ誘導完了前に FGF-2 存在下で培養することが記載されているといえるか疑問である。

2) 英国でのダブルパテントについて

英国特許法において、明らかにダブルパテントを規定した条文は認められない。しかし、英国特許法 72 条、73 条において、裁判所、特許庁長官は特許を取り消す権限を与えられており、確認訴訟等の結果で、取り消されると考えられる。

京都大学山中出願が EP で未だ審査中であるが、この出願が英国国内出願として審査になった場合、当然確認訴訟が起こされると考えられ、その経過が注目される。

山中出願におけるヒト iPS 細胞の有効性と、桜田出願における進歩性、サポート要件が問題になるであろう。これは、EP 出願、米国出願においても同様であろう。

この問題の起因は、当初の出願の記載にある。出願時期を急ぐ為に、現実、データ不十分で出願する事は多々、生じる。今回においても、山中出願においては、マウスではデータがサポートされているが、ヒトについては微妙な点があるのは否定出来ない。また、桜田出願においても、マウスについては 3 因子でのデータはあるものの、ヒトについてのデータは明細書に存在しない。

日本特許庁においては、山中出願において、iPS 細胞のコロニーが可視となるのは① iPS 細胞が出現する、②その iPS 細胞が増殖する、の 2 段階が必要であり、コロニーが確認出来なかったからと言って、iPS 細胞が存在しない訳ではないとの理論が、ラボノートのアルカリフォスファターゼ染色のデータ提出等で認められた。

しかし、USPTO、EP 或いは英国でその理論が認められるかはこれからの審査結果に注目しなければならない。

3) 戦略性について

この出願は、バイエル社 PCT 出願とともに、直接、

英国出願を行っている。その意図を考察するに、「英国では審査が早く、特許化もし易いとの判断もあったのでは」と Nature 誌でも指摘があった。確かにその意図は、請求項を「iPS 細胞」物質特許は諦め、製造方法に特化して早急に特許化を図ったとも推察される。

もっとも、英国で特許となったからと言って、EP が容易に桜田出願について、有利な判断をするとも思えないが、まずは一国でも特許化した実績を狙った可能性は否定出来ない。

4) 京都大学と iPierian 社との提携について

今年 2 月 1 日に京都大学と iPierian との提携が発表され、既に日本国内で成立している京都大学が保有する iPS 細胞関連 3 特許と、既に英国で特許となった桜田特許及びこれに関する出願の権利をクロスライセンスすることとなった。桜田特許は当初、バイエル薬品研究所の桜田先生が 3 因子でのヒト iPS 細胞作成をバイエル社から出願、その後、権利は米国ベンチャーの iZumi 社に売却され、更に、iPierian 社に移った。今回の提携の背景には、米国においては未だ先発明主義が採用されており、山中教授と桜田先生とどちらが、先に発明したかを争うインターフェアランスが開かれようとしていたことがあり、現実インターフェアランスとなると、費用、時間も掛かり、その間、特許の帰属が決まらず、iPS 細胞研究において、特許のライセンスをどこから得るのかを考えながら研究を進めなければならないこととなる。

今回の提携によって、少なくとも山中教授開発の京大特許と桜田先生開発の iPierian 特許については、出願中のものも含め、ライセンスは容易になる。この結果、iPS 細胞を利用した難病の治療、薬剤開発、再生医療の発展において、障害が一つ減ったと思われる。

また、iPierian 社の SAB (Scientific Advisory Board) 委員にはそうそうたるメンバーがおり、山中教授が就任することにより、最先端の情報交換が可能となり、研究の発展が期待できる。

その後、6 月の知財学会において、京都大学のスタッフより「iPierian 社の CEO が解雇され、今後、iPS 細胞分野から撤退する」との情報が得られた。当然、SAB も無くなり、前記の内容は期待できなくなり、iPierian 社としては、撤退の方向を模索していたのかも知れない。

5) EP における山中出願の特許成立の報道について

7 月 11 日、かねてから審査に継続していた京都大学

の山中出願が特許されたとの報道があった。現在、推測される請求項は Oct, Klf, Myc ファミリーの 3 因子、或いは Sox ファミリーを加えた 4 因子及びその遺伝子産物も加わった因子及びそれら因子の使用のようである。今までの認められてきた請求項からすれば、かなり広範囲な請求項と思われる。これについては、平成 23 年度弁理士会ライフサイエンス委員会第 5 部会で検討の予定である。

4. おわりに

今回は、英国で特許となった桜田出願の包袋を中心に、iPierian 社との提携、EP での山中出願の特許化も加えて、検討を行った。

日本のバイオ・ライフサイエンス産業の国際的競争力について、iPS 細胞の応用研究、再生医療の研究開発は、国内多数の研究者が日夜、鋭意、研究の努力をおこなっており、日本政府も緊縮財政の中、多大な研究費を捻出している。

一方、米国ではここ数年、莫大な研究費が投資され、確実に成果を挙げ、マウス iPS 細胞は山中教授が世界に先駆け、発明したにも拘らず、ヒト iPS 細胞については米国 Thomson 教授と同時発表と追いつかれ、中国を始め、世界中で鋭意、研究開発されている。米国の研究費の凄さもさることながら、アジアパワーにも注目せねばならない。近年の Nature 誌のライフサイエンス分野においても、第一著者にかなりの中国名が認められる。また、米国大学の教授においても、中国名が増加している。

更に、気になることは、その米国で第一線の中国人の研究者が、中国の研究所、ベンチャーに帰国、研究

を行う流れがあることである。今や、中国における研究開発の投資額は増大している。現時点では、その実績は未だ目立っていないが、今後、日米欧に肩を並べるのは時間の問題であろう。

今後の流れを考えれば、ライフサイエンス分野においても、日本の市場以上に、アジア市場が発展する事が予想される。その中で、日本が、国内の研究実績を日本国内だけでなく、グローバルに特許戦略を如何に効率よく展開することが出来るのか、弁理士会としても、検討しなければならないと考える。

一方で、京都大学と iPierian 社との提携に関して、知的財産の活用については争うばかりでなく、研究・開発を効率よく進めるためにも、クロスライセンスの活用の重要性が再認識させられる。今回、京都大学が日本で既に iPS 細胞作成方法について 3 特許を取得していたことは、素晴らしい発明に加えて、やはり有利に働いたと考えられ、日本の競争力は期待出来る部分が相当あり、これらの知財活用も重要であろう。

最後に、iPS 細胞関連の特許に関して、今後も多数の特許が出現してくると思われるが、未だ、再生医療への実用化には道程が遠く、どの特許が最終的に利用されるか不明である。PCR のような基本特許は、iPS 細胞には現在、存在しない。場合によっては、iPS 細胞を経ずに幹細胞から目的の細胞を得る方法が中心になるかもしれない。しかし、日本のバイオ・ライフサイエンスにおける研究開発技術力は十分にあると思われる、今後に期待したい。

以上

(原稿受領 2011. 7. 27)