(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
2017 年 7 月 27 日(27.07.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/126551 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01) *C12N 5/0793* (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/001544

(22) 国際出願日: 2017 年 1 月 18 日(18.01.2017)

(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 2016-010940 2016 年 1 月 22 日(22.01.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町１番 Aichi (JP).

(72) 発明者: 須賀 英隆(SUGA Hidetaka); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町１番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 小川 晃一郎(OGAWA Koichiro); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町１番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 笠井 貴敏(KASAI Takatoshi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町１番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 有馬 寛(ARIMA Hiroshi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町１番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 萩野 幹治(HAGINO Mikiharu); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ１丁目１番地 Gifu (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

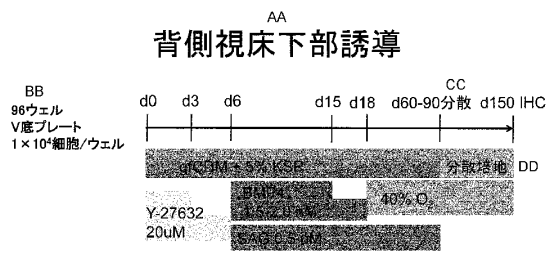
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,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

(54) **Title**: DIFFERENTIATION INDUCTION FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS INTO HYPOTHALAMIC NEURONS

(54) 発明の名称 : ヒト多能性幹細胞から視床下部ニューロンへの分化誘導



EE 分散培地:DFNB, CNTF(10 ng/ml), BDNF(50 ng/ml), NT3(50 ng/ml), FBS(容量比で全体量の10%)
DFNB:DMEM/F12(7 g/l グルコース, N2サプリメント, B27サプリメント添加)

FF コーティング剤:マトリゲル, PDL, ラミニン

AA Dorsal hypothalamic induction
BB 96-well, V-bottomed plate, 1X10(4) cells/well
CC Dispersion
DD Dispersion medium
EE Dispersion medium: DFNB, CNTF (10 ng/mL), BDNF (50 ng/mL), NT3 (50 ng/mL), FBS (10% of the total volume by volume ratio); DFNB: DMEM/F12 (7 g/L of glucose, N2 supplement, B27 supplement added)
FF Coating agent: Matrigel, PDL, laminin

(57) 要約:

(57) **Abstract**: Provided is a method for efficiently inducing differentiation from human pluripotent stem cells into hypothalamic neurons. Also provided is a method for constructing a cellular structure that integrates pituitary tissue and hypothalamic tissue from human pluripotent stem cells. A cellular structure including hypothalamic tissue is obtained by a method including a step for suspension culturing human pluripotent stem cell spheroids in a medium including a low concentration of an osteogenic factor signaling pathway activator and a low concentration of a substance capable of acting on the Shh signaling pathway, and a step for also suspension culturing the cell spheroids obtained in that step in a medium including a low concentration of a substance capable of acting on the Shh signaling pathway. A cellular structure including hypothalamic tissue and pituitary tissue is also obtained by a method including a step for suspension culturing human pluripotent stem cell spheroids in a medium including an osteogenic factor signaling pathway activator and a substance capable of acting on the Shh signaling pathway, a step for also suspension culturing the cell spheroids formed in that step in a medium including an osteogenic factor signaling pathway activator and a substance capable of acting on the Shh signaling pathway, and a step for suspension culturing the cell spheroids obtained in that step in a medium suitable for simultaneous pituitary and hypothalamic induction .

[続葉有]

WO 2017/126551 A1

ヒト多能性幹細胞から視床下部ニューロンへと効率よく分化誘導する方法を提供する。また、ヒト多能性幹細胞から視床下部組織と下垂体組織が一体化した細胞構造体を構築する方法を提供する。ヒト多能性幹細胞の凝集塊を、低濃度の骨形成因子シグナル伝達経路活性化物質及び低濃度の Shh シグナル経路作用物質を含む培地中で浮遊培養するステップと、当該ステップで得られた細胞凝集塊を、低濃度の Shh シグナル経路作用物質を含む培地中で更に浮遊培養するステップを含む方法によって、視床下部組織を含む細胞構造体を得る。また、ヒト多能性幹細胞の凝集塊を、骨形成因子シグナル伝達経路活性化物質及び Shh シグナル経路作用物質を含む培地中で浮遊培養するステップと、当該ステップで形成された細胞凝集塊を、骨形成因子シグナル伝達経路活性化物質及び Shh シグナル経路作用物質を含む培地中で更に浮遊培養するステップと、当該ステップで得られた細胞凝集塊を、下垂体及び視床下部の同時誘導に適した培地中で浮遊培養するステップを含む方法によって、視床下部組織と下垂体組織を含む細胞構造体を得る。