

(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
2025年1月2日(02.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/005076 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/68 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/022952

(22) 国際出願日: 2024年6月25日(25.06.2024)

(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 2023-104009 2023年6月26日(26.06.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 Hyogo (JP).

(72) 発明者: 紙崎 孝基 (KAMIZAKI, Koki); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 南康博(MINAMI, Yasuhiro); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府

大阪 市 中央 区 道 修 町 1 - 7 - 1 北 浜
コニシビル 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

規則4.17に規定する申立て:

一 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v))

(54) Title: METHOD FOR SCREENING SUBSTANCE THAT SUPPRESSES INTRAMUSCULAR ADIPOSE TISSUE (IMAT) FORMATION, AND COMPOSITION FOR SUPPRESSING IMAT FORMATION

(54) 発明の名称: 骨格筋内脂肪組織 (IMAT; Intramuscular adipose tissue) 形成抑制物質をスクリーニングする方法、及びIMAT形成抑制用組成物

(57) Abstract: The present invention provides, inter alia, a method for screening a substance that suppresses intramuscular adipose tissue (IMAT) formation. Provided are: a method for screening a substance that suppresses IMAT formation, the method comprising: (I) a step for bringing a Wnt5b protein, an Ror2 protein, and a test substance into contact with each other; and (II) a step for confirming that the test substance inhibits binding of the Wnt5b protein and Ror2 protein; and a composition for suppressing IMAT formation.

(57) 要約: 骨格筋内脂肪組織 (IMAT; Intramuscular adipose tissue) 形成抑制物質をスクリーニングする方法等の提供。(I) Wnt5bタンパク質、Ror2タンパク質、及び被験物質を接触させる工程、並びに (II) 前記被験物質がWnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害することを確認する工程を含む、IMAT形成抑制物質をスクリーニングする方法、並びにIMAT形成抑制用組成物。

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 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)）

明 細 書

発明の名称：

骨格筋内脂肪組織（I M A T ; I n t r a m u s c u l a r a d i p o s e t i s s u e）形成抑制物質をスクリーニングする方法、及びI M A T形成抑制用組成物

技術分野

[0001] 本開示は、I M A T形成抑制物質をスクリーニングする方法、及びI M A T形成抑制用組成物等に関する。

背景技術

[0002] 骨格筋の維持や再生には、骨格筋組織幹細胞である衛星細胞（S a t e l l i t e c e l l s ; S C s）や間葉系前駆細胞（M e s e n c h y m a l p r o g e n i t o r c e l l s ; M P C s）が重要な役割を担っている。

骨格筋損傷後にS C sは増殖し、分化・融合を経て最終的に筋線維を形成し損傷部位の修復に寄与する。また、骨格筋に常在するM P C sは、S C sの増殖や分化を促進することで骨格筋再生を促す。一方で、筋ジストロフィーやサルコペニアをはじめとする骨格筋の病的状態ではM P C sが脂肪細胞に分化し、骨格筋中に本来ほとんど存在しないはずのI M A Tを形成し、筋機能の著しい低下を引き起こすことが知られている。これらのことから、骨格筋再生においてS C sとM P C sは厳密に制御されていると考えられるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。

これまでに、損傷後の骨格筋において分泌性糖タンパク質であるW n t タンパク質の受容体として知られるR o rファミリー受容体R o r 1およびR o r 2の発現が上昇することが見出されている（K a m i z a k i K, e t a l., J. B i o l. C h e m., 2017, 292, 38）。R o r 1（R e c e p t o r t y r o s i n e k i n a s e l i k e o r p h a n r e c e p t o r 1）はS C sにおいて高

発現しており、骨格筋損傷後のSCsの増殖を促進することで骨格筋再生に寄与することが明らかにされている (Kamizaki K, et al., J. Biol. Chem., 2017, 292, 38)。

異所性脂肪蓄積: ectopic fat accumulation

異所性脂肪細胞: ectopic adipocytes

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1: Aging (Albany NY). 2018 Apr 25; 10 (4): 747-763. doi: 10.18632/aging.101425.

非特許文献2: Cell Stem Cell. 2019 Mar 7; 24 (3): 433-446. e7. doi: 10.1016/j.stem.2018.12.014. Epub 2019 Jan 24.

非特許文献3: Nature. 2022 Jul; 607 (7920): 790-798. doi: 10.1038/s41586-022-04924-6. Epub 2022 Jun 29.

非特許文献4: Nat Med. 2015 Jul; 21 (7): 786-94. doi: 10.1038/nm.3869. Epub 2015 Jun 8.

非特許文献5: Nat Cell Biol. 2018 Aug; 20 (8): 917-927. doi: 10.1038/s41556-018-0151-y. Epub 2018 Jul 26.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] MPCsが骨格筋の維持および再生に寄与するか、IMATの形成を促進するかを決定付ける分子機構は十分に解明されていないが、MPCsの骨格筋維持・再生機構を維持するとともに、MPCsのIMAT形成能を抑制す

ることで、骨格筋の病的状態を阻害できることが期待されることから、IMAT形成能を抑制する物質を同定することができれば、骨格筋の諸疾患や骨格筋の加齢に伴う病変（ロコモティブ症候群、フレイルなど）の病状改善に大きく貢献するとともに、超高齢社会を迎えた我が国をはじめ、国際的にも人々のQOL、ADLの向上に大きく寄与することが出来るが、現状そのような効果をもつ物質は見出されておらず、その同定方法やスクリーニング法などは確立されていない。本開示は、IMAT形成抑制物質をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。また、本開示は、IMAT形成抑制用組成物を提供することも課題の1つである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、Ror2 (Receptor tyrosine kinase like orphan receptor 2) はMPCsにおいて高発現しているとともに、IMAT形成時に発現上昇するWnt5bの受容体として機能することで、MPCsの過剰な増殖を誘導しIMATの形成に寄与していることを見出しており、Wnt11-Ror2シグナルがMPCsの細胞老化を抑えることで骨格筋の維持・再生に寄与する一方で、病的状態ではMPCsにおいてWnt5b-Ror2シグナルが活性化することでIMAT形成が促進される可能性などを見出してきた。これらの独自の知見を踏まえて、これらの知見の集積に用いたin vitro及びin vivoでの解析手法を利活用することにより、MPCsにおいてWnt11-Ror2シグナルを維持しつつ、Wnt5b-Ror2シグナルを抑制する物質を選別することで、骨格筋の諸疾患や骨格筋の加齢に伴う病変（ロコモティブ症候群、フレイルなど）の病状改善に大きく貢献し得る物質の同定（スクリーニング）法を見出した。

[0006] 本開示は、例えば以下の項に記載の主題を包含する。

項1.

(1) Wnt5bタンパク質、Ror2タンパク質、及び被験物質を接触させる工程、並びに

(11) 前記被験物質がWnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害することを確認する工程を含む、

IMAT形成抑制物質をスクリーニングする方法。

項2.

工程(1)において、さらにWnt11タンパク質を接触させ、

工程(11)において、さらに前記被験物質がWnt11タンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害しないことを確認する、項1に記載の方法。

項3.

(1) SCs、MPCs、及びシュワン細胞からなる群より選択される少なくとも1種と、被験物質とを接触させる工程、

並びに

(2) 前記被験物質がWnt5bの発現量を抑制することを確認する工程を含む、

IMAT形成抑制物質をスクリーニングする方法。

項4.

前記工程(2)において、前記被験物質がWnt11の発現量を抑制しないことを確認する、項3に記載の方法。

項5.

(A) Wnt5bタンパク質、Ror2タンパク質、p38タンパク質及び被験物質を接触させる工程、並びに

(B) 前記被験物質がp38タンパク質のリン酸化を阻害することを確認する工程を含む、

IMAT形成抑制物質をスクリーニングする方法。

項6.

IMAT形成抑制が、MPCsの増殖抑制によるものである、項1～5のいずれか一項に記載の方法。

項7.

Wnt5bタンパク質の中和抗体、又はWnt5b遺伝子の発現を抑制する

核酸を有効成分とする、I M A T形成抑制用組成物。

項 8.

I M A Tの蓄積が認められる筋疾患又は症状の抑制又は治療に使用するための、項 7 に記載の I M A T形成抑制用組成物。

項 9.

前記 I M A Tの蓄積が認められる筋疾患又は症状が、筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、サルコペニア、フレイル又はロコモティブ症候群である、項 8 に記載の I M A T形成抑制用組成物。

発明の効果

[0007] M P C s が骨格筋の維持・再生に関わるか、あるいは I M A T形成の促進に寄与するかを決定付ける分子機構についてはこれまで十分に解明されていなかったが、本発明者らは、M P C sにおけるW n t 1 1－R o r 2シグナルは骨格筋の維持・再生に、一方、W n t 5 b－R o r 2シグナルはI M A Tの形成にそれぞれ重要であることを見出した。これらの知見から、R o r 2がW n t 1 1の受容体として機能するか、W n t 5 bの受容体として機能するかが、M P C sの機能を決定付ける上で重要であることが明らかとなった。W n t 5 bやW n t 1 1、R o r 2は発生過程における組織・器官形成や、がんの進展において重要な役割を担っているが、正常な成体組織においてはほとんど発現が認められないことから、W n t 5 bやW n t 1 1、R o r 2を筋疾患の治療標的とすることは、副作用が少なく有効性の高い治療方法の開発に繋がることが期待され、当該治療法発見における大きな優位性の一つである。しかしながら、M P C sは骨格筋維持・再生にも重要であることから、単にM P C sの機能を抑制すれば良い訳ではなく、骨格筋維持・再生機構を保持しつつ、I M A T形成能を抑制する必要がある。

本発明者らは、以上の独自の知見を踏まえ、W n t 1 1－R o r 2シグナルを保持しつつ、W n t 5 b－R o r 2シグナルを抑制するような物質を選定することが可能であり、骨格筋の諸疾患や骨格筋の加齢に伴う病変（ロコモティブ症候群、フレイルなど）の病状改善に大きく貢献し得る物質を同定

する方法を確立した。

I M A T 形成抑制物質をスクリーニングする方法が提供される。また、I M A T 形成抑制用組成物が提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1] S C s 及び M P C s における R o r 2 の発現量を測定した結果を示す。

[図2] C t x を投与した前脛骨筋 (T A 筋 ; T i b i a l i s a n t e r i o r (T A) m u s c l e) から単離した M P C s の増殖能、脂肪細胞分化能、及び細胞老化を測定した結果を示す。

[図3] コントロールマウス及び R o r 2 c K O マウスにおける、T A 筋、腓腹筋 (G a s t r o c n e m i u s m u s c l e)、及びヒラメ筋 (S o l e u s) 重量の測定結果、並びに T A 筋における筋線維の染色結果を示す。

[図4] コントロールマウス及び R o r 2 c K O マウスにおける、T A 筋における筋線維、及び脂肪染色結果を示す。

[図5] C t x を投与した T A 筋から単離した M P C s における W n t 1 1 の発現量、及び細胞老化を測定した結果を示す。

[図6] C t x を投与した T A 筋から単離した M P C s におけるストレスファイバー及び核染色結果を示す。

[図7] C t x 投与筋、及び G l y c e r o l 投与筋における W n t ファミリー遺伝子の発現量、並びに C t x を投与した T A 筋から単離した M P C s に W n t 5 a 又は W n t 5 b を添加した際の細胞増殖測定結果を示す。

[図8] C t x を投与した T A 筋から単離した M P C s を用いたウェスタンブロットの結果、及び C t x を投与した T A 筋から単離した M P C s を用いた W S T - 8 アッセイの結果を示す。

[図9] C t x 又は G l y c e r o l を投与し 3 日後の E D L (E x t e n s o r d i g i t o r u m l o n g u s) 筋をホルマウント染色した結果を示す。

[図10] C t x または G l y c e r o l を投与し 3 日後の T A 筋から単離した各種細胞における W n t 5 b の発現量を測定した結果を示す。

[図11] C t x を投与した T A 筋から単離した M P C s における W n t 5 b の発現量、及び細胞増殖を測定した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本開示に包含される各実施形態について、さらに詳細に説明する。

本開示は、 I M A T 形成抑制物質をスクリーニングする方法を包含する。本明細書において、当該方法を、「本開示のスクリーニング方法」等と表記することがある。

[0010] 本明細書において、 I M A T (骨格筋内脂肪組織 ; I n t r a m u s c u l a r a d i p o s e t i s s u e) は、骨格筋内に見られる異所性脂肪組織を意味する。本来、骨格筋にはほとんど脂肪が存在しないにも関わらず、脂肪が蓄積している状態である。

[0011] 本開示のスクリーニング方法は、 W n t 5 b タンパク質、 R o r 2 タンパク質、及び被験物質を接触させる工程を含む。本明細書において、当該工程を工程 (I) 等と表記することがある。

[0012] W n t (W i n g l e s s - t y p e M M T V i n t e g r a t i o n s i t e f a m i l y) タンパク質は、分泌性糖タンパク質であり、 R o r タンパク質等と結合することが知られている。 W n t タンパク質は哺乳類において 19 種類が同定されており、例えば、 W n t 5 a 、 W n t 5 b 、 W n t 11 等が存在する。該タンパク質のアミノ酸配列、塩基配列等は、公知のデータベース等から知ることができる。例えば、 N C B I (National Center for Biotechnology Information) において、ヒトの W n t 5 b 遺伝子の m R N A 配列のアクセッション N o . は、 N M _ 030775 であり、ヒトの W n t 11 遺伝子の m R N A 配列のアクセッション N o . は、 X M _ 005274231 である。

W n t 5 b 産生細胞としては、例えば、 S C s 、 M P C s 、 シュワン細胞等が挙げられる。

W n t 11 産生細胞としては、例えば、 M P C s 等が挙げられる。

[0013] R o r (R e c e p t o r t y r o s i n e k i n a s e - l i k e

orphan receptor) タンパク質は、1回膜貫通型受容体であり、Wnt タンパク質の受容体として機能し、非古典的Wnt 経路を活性化することが知られている。Ror タンパク質としては、例えば、Ror1、Ror2等が知られている。該タンパク質のアミノ酸配列、塩基配列等は、公知のデータベース等から知ることができる。例えば、NCBIにおいて、ヒトのRor2遺伝子のmRNA配列のアクセッションNo. は、NM_001318204である。

Ror2発現細胞としては、例えば、MPCs等が挙げられる。

[0014] 被験物質としては、特に限定されない。例えば、化合物及び組成物であり得る。化合物としては、例えば低分子化合物や、核酸（例えばDNA、RNA等）やタンパク質（例えば抗体又はその一部等）、ポリマー等の高分子化合物であってよい。組成物としても、生物（例えば動物、植物、微生物等）から得た抽出物等であってもよく、化合物を2種以上組み合わせたものであってもよい。

[0015] 工程（1）において、Wnt5bタンパク質、Ror2タンパク質、及び被験物質を接触させる方法としては特に限定されない。例えば、Wnt5bタンパク質、Ror2タンパク質、及び被験物質を適当な溶媒中に添加してもよく、Ror2タンパク質を発現する細胞に対して、Wnt5bタンパク質、及び被験物質を添加等してもよい。

適当な溶媒としては、特に限定されない。例えば、水、細胞培養用液体培地等が挙げられる。

Wnt5bタンパク質の濃度としては、特に限定されない。例えば、0.1～4 µg/ml程度等とすることができる。

Ror2タンパク質の濃度としては、特に限定されない。例えば、0.1～4 µg/ml程度等とすることができる。

被験物質の濃度は、被験物質の種類に応じて、適宜設定することができる。

接触時の温度としては、特に限定されない。例えば、25～40℃程度、

好ましくは30～40℃程度等とすることができる。

接触時間としては、特に限定されない。例えば、10秒～3時間程度、好ましくは3分～1時間程度等とすることができる。

接触時には、必要に応じて、例えば、攪拌、振盪等することができる。

Ror2タンパク質を発現する細胞としては、例えば、MPCs等が挙げられる。

[0016] 本開示のスクリーニング方法は、工程（I）において、さらにWnt11タンパク質を接触させることができる。換言すれば、本開示のスクリーニング方法は、工程（I）において、Wnt5bタンパク質、Wnt11タンパク質、Ror2タンパク質、及び被験物質を接触させることができる。

[0017] Wnt5bタンパク質、Wnt11タンパク質、Ror2タンパク質及び被験物質を接触させる方法としては特に限定されない。例えば、Wnt5bタンパク質、Wnt11タンパク質、Ror2タンパク質、及び被験物質を適当な溶媒中に添加してもよく、Ror2タンパク質を発現する細胞に対して、Wnt5bタンパク質、Wnt11タンパク質、及び被験物質を添加等してもよい。

Wnt11タンパク質の濃度としては、特に限定されない。例えば、0.1～4 µg/ml程度等とすることができる。

その他、接触方法については、上述した記載を援用することができる。

[0018] 本開示のスクリーニング方法は、さらに、被験物質がWnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害することを確認する工程を含む。本明細書において、当該工程を工程（II）等と表記することがある。

[0019] 工程（II）において、被験物質がWnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害することを確認する方法としては、特に限定されない。例えば、ELISA法やアルファスクリーン法、Biacoreシステムを用いた解析等が挙げられる。

[0020] 例えば、各種解析手法による吸光度や発光、蛍光、表面プラズモン共鳴等の分析により、Wnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合が検出

可能であることを確認した上で、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、Wnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合量が35%以上減少することが好ましい。当該範囲の上限若しくは下限は、例えば、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、又は100%程度であってもよい。具体的には、35～100%程度であってもよい。

[0021] 本開示のスクリーニング方法によれば、例えば、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、Wnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害し得る物質をスクリーニングすることができる。

[0022] 後述する実施例に示すとおり、Wnt5b及びRor2はp38を介してMPCsの増殖を促進することにより、骨格筋組織中におけるMPCsの過剰な蓄積を誘導し、IMATの形成に寄与していると考えられる。

理論に拘束されることを望むものではないが、本開示のスクリーニング方法により得られるIMAT形成抑制物質は、Wnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害することによって、MPCsの過剰な増殖を抑制し、IMATの形成を抑制し得ると推測される。

[0023] 工程(1)において、Wnt5bタンパク質、Ror2タンパク質、Wnt11タンパク質及び被験物質を接触させた場合、本開示のスクリーニング方法は、工程(11)において、さらに、被験物質がWnt11タンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害しないことを確認する工程を含む。換言すれば、本開示のスクリーニング方法は、工程(11)において、被験物質がWnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害すること、かつWnt11タンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害しないことを確認することができる。

[0024] 被験物質がWnt11タンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害しないことを確認する方法としては、特に限定されない。例えば、ELISA法やアルファスクリーン法、Biacoreシステムを用いた解析等が挙げ

られる。

[0025] 工程 (11) において、最初に被験物質がWnt 5bタンパク質とRor 2タンパク質との結合を阻害することを確認し、次に当該被験物質がWnt 11タンパク質とRor 2タンパク質との結合を阻害しないことを確認してもよく、最初に被験物質がWnt 11タンパク質とRor 2タンパク質との結合を阻害しないことを確認し、次に当該被験物質がWnt 5bタンパク質とRor 2タンパク質との結合を阻害することを確認してもよく、被験物質がWnt 5bタンパク質とRor 2タンパク質との結合を阻害し、かつWnt 11タンパク質とRor 2タンパク質との結合を阻害しないことを同時に確認してもよい。

[0026] 本明細書において、「阻害しない」とは、完全に、又は実質的に阻害しないことを意味する。「実質的に阻害しない」とは、例えば、各種解析手法による吸光度や発光、蛍光、表面プラズモン共鳴等の分析により、Wnt 11タンパク質とRor 2タンパク質との結合が検出可能であることを確認した上で、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、Wnt 11タンパク質とRor 2タンパク質との結合量の減少率が30%以下であることを意味する。好ましくは20%程度、より好ましくは10%程度、さらにより好ましくは5%程度、いっそう好ましくは3%程度、特に好ましくは1%程度以下であってもよい。あるいは、Wnt 11タンパク質およびRor 2タンパク質を共発現する細胞 (MPCs など) において、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、アクチン・ストレスファイバーの形成や核形態の異常などの増加率が30%以下であることを意味する。好ましくは20%程度、より好ましくは10%程度、さらにより好ましくは5%程度、いっそう好ましくは3%程度、特に好ましくは1%程度以下であってもよい。

[0027] 本開示のスクリーニング方法によれば、例えば、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、Wnt 5bタンパク質とRor 2タンパク質との結合を阻害し得、かつWnt 11タンパク質とRor 2タ

ンパク質との結合を阻害し得ない物質をスクリーニングすることができる。

[0028] 後述する実施例に示すとおり、Wnt5b及びRor2はp38を介してMPCsの増殖を促進することにより、骨格筋組織中におけるMPCsの過剰な蓄積を誘導し、IMATの形成に寄与していると考えられる。また、後述する実施例に示すとおり、Wnt11及びRor2は、MPCsにおけるストレスファイバーの形成を抑制することで、核形態異常とそれに伴うcGas-Sting経路の活性化を抑制し、その結果、MPCsの細胞老化を抑制することにより骨格筋の再生や維持に寄与していると考えられる。

理論に拘束されることを望むものではないが、本開示のスクリーニング方法により得られるIMAT形成抑制物質は、Wnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害することによって、MPCsの過剰な増殖を抑制し、IMATの形成を抑制し得る一方で、Wnt11タンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害しないことによって、MPCsの細胞老化を抑制し、骨格筋を維持又は再生し得ると推測される。

[0029] また、このようにWnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合を阻害することによって、MPCsの過剰な増殖が抑制され、IMATの形成を抑制し得る。従って、Wnt5bの発現量を抑制することによっても、Wnt5bタンパク質とRor2タンパク質との結合が低減し、これによってMPCsの過剰な増殖が抑制され、IMATの形成を抑制し得るといえる。Wnt5b産生細胞として例えばSCs、MPCs、シュワン細胞等が挙げられる。このことから、本開示のスクリーニング方法は、(1) SCs、MPCs、及びシュワン細胞からなる群より選択される少なくとも1種と、被験物質とを接触させる工程、並びに(2) 前記被験物質がWnt5bの発現量を抑制することを確認する工程を包含するものであってもよい。また、Wnt5b産生細胞は、更にRor2及び／又はp38を産生する細胞であってもよい。このことから、前述の工程(1)及び(11)を包含するスクリーニング方法は、該工程(1)及び(2)をさらに含んでもよく、含まなくてもよい。また、該工程(1)及び(2)を包含するスクリーニング方法は

、前記工程（１）及び（１１）を含まなくてもよい。本開示を制限するものではないが、例えば前述の通り、前記工程（１）において、R o r 2 タンパク質を発現する細胞としてM P C s等を、W n t 5 b タンパク質を発現する細胞としてS C s、M P C s及び／もしくはシュワン細胞等を、並びに／又はW n t 1 1 タンパク質タンパク質を発現する細胞としてM P C s等を、被験物質と接触させてもよく、前記工程（１１）において前記結合の阻害を確認する際に、さらに工程（２）を実施して被験物質がW n t 5 b の発現量を抑制することを確認してもよい。工程（２）は、前記工程（１１）よりも前に行ってもよく、前記工程（１１）と同時に行ってもよく、前記工程（１１）よりも後に行ってもよい。

[0030] 工程（１）において、S C s、M P C s、及びシュワン細胞からなる群より選択される少なくとも１種と、被験物質とを接触させる方法としては特に限定されない。例えば、S C s、M P C s、及びシュワン細胞からなる群より選択される少なくとも１種の細胞と被験物質とを適当な溶媒中に添加してもよく、該細胞を含む培養液に被験物質を添加等してもよい。

適当な溶媒としては、特に限定されず、上述した記載を援用することができる。

S C s、M P C s、及びシュワン細胞は、１種単独で使用してもよく、２種以上を組み合わせ使用してもよい。該細胞の濃度は特に限定されず、被験物質と接触させる際の細胞濃度（細胞合計濃度）として、例えば $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml程度等とすることができる。

被験物質の濃度は、被験物質の種類に応じて、適宜設定することができる。被験物質は、特に限定されず、上述した記載を援用することができる。

接触時の温度は、特に限定されず、例えば、 $25 \sim 40^\circ\text{C}$ 程度、好ましくは $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 程度等とすることができる。

接触時間としては、特に限定されず、例えば、１時間～６時間程度、好ましくは１２時間～４８時間程度等とすることができる。

接触時には、必要に応じて、例えば、攪拌、振盪等とすることができる。

[0031] 工程（２）において、被験物質がWnt 5 bの発現量を抑制することを確認する方法は特に限定されない。Wnt 5 bの発現量は、Wnt 5 b遺伝子の発現量であってもよく、Wnt 5 bタンパク質の発現量であってもよい。Wnt 5 bの発現量を抑制することを確認する方法は、特に制限されず、例えば、定量的R T－P C R法、F l u o r e s c e n c e i n s i t u h y b r i d i z a t i o n法、ウェスタンブロットティング法、免疫染色法、フローサイトメトリー法等が挙げられる。

[0032] 例えば、各種解析手法による発光や蛍光等の分析により、Wnt 5 bの発現量を測定できることを確認した上で、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、Wnt 5 bの発現量が３５％以上減少することが好ましい。当該範囲の上限若しくは下限は、例えば、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、又は１００％程度であってもよい。具体的には、３５～１００％程度であってもよい。

[0033] 本開示の工程（１）及び（２）を含むスクリーニング方法によれば、例えば、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、Wnt 5 bの発現量を抑制し得る物質をスクリーニングすることができる。

[0034] 後述する実施例に示すとおり、Wnt 5 b及びRor 2はp 3 8を介してMPC sの増殖を促進することにより、骨格筋組織中におけるMPC sの過剰な蓄積を誘導し、I M A Tの形成に寄与していると考えられる。

理論に拘束されることを望むものではないが、本開示の工程（１）及び（２）を含むスクリーニング方法により得られるI M A T形成抑制物質は、Wnt 5 bの発現量を抑制することによって、MPC sの過剰な増殖を抑制し、I M A Tの形成を抑制し得ると推測される。

[0035] また、例えばMPC sはWnt 1 1産生細胞でもある。このため、前述のとおり、前記工程（１）において、例えばMPC sと被験物質とを接触させた場合、前記工程（２）は、さらに、被験物質がWnt 1 1の発現量を抑制しないことを確認する工程を含んでもよい。換言すれば、前記工程（２）に

において、被験物質がWnt5bの発現量を抑制すること、かつWnt11の発現量を抑制しないことを確認することができる。

[0036] 被験物質がWnt11の発現量を抑制しないことを確認する方法は特に限定されない。Wnt11の発現量は、Wnt11遺伝子の発現量であってもよく、Wnt11タンパク質の発現量であってもよい。Wnt11の発現量を抑制しないことを確認する方法は、特に制限されず、例えば、定量的RT-PCR法、Fluorescence in situ hybridization法、ウェスタンブロットリング法、免疫染色法、フローサイトメトリー法等が挙げられる。

[0037] 工程(2)において、最初に被験物質がWnt5bの発現量を抑制することを確認し、次に当該被験物質がWnt11の発現量を抑制しないことを確認してもよく、最初に被験物質がWnt11の発現量を抑制しないことを確認し、次に当該被験物質がWnt5bの発現量を抑制することを確認してもよく、被験物質がWnt5bの発現量を抑制し、かつWnt11の発現量を抑制しないことを同時に確認してもよい。

[0038] 本明細書において、「抑制しない」とは、完全に、又は実質的に抑制しないことを意味する。「実質的に抑制しない」とは、例えば、各種解析手法による発光や蛍光等の分析により、Wnt11の発現量を測定可能であることを確認した上で、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、Wnt11の発現量の減少率が30%以下であることを意味する。好ましくは20%程度、より好ましくは10%程度、さらにより好ましくは5%程度、いっそう好ましくは3%程度、特に好ましくは1%程度以下であってもよい。あるいは、Wnt11タンパク質及びRor2タンパク質を共発現する細胞(MPCsなど)において、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、アクチン・ストレスファイバーの形成や核形態の異常などの増加率が30%以下であることを意味する。好ましくは20%程度、より好ましくは10%程度、さらにより好ましくは5%程度、いっそう好ましくは3%程度、特に好ましくは1%程度以下であってもよ

い。

[0039] このことから、本開示の工程（１）及び（２）を含むスクリーニング方法によれば、さらに、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、W n t 5 b の発現量を抑制し得、かつ W n t 1 1 の発現量を抑制し得ない物質をスクリーニングすることができる。

[0040] また、前述のとおり、W n t 5 b 及び R o r 2 は p 3 8 を介して M P C s の増殖を促進することにより、骨格筋組織中における M P C s の過剰な蓄積を誘導し、I M A T の形成に寄与していると考えられる。また、後述する実施例に示すとおり、W n t 1 1 及び R o r 2 は、M P C s におけるストレスファイバーの形成を抑制することで、核形態異常とそれに伴う c G a s - S t i n g 経路の活性化を抑制し、その結果、M P C s の細胞老化を抑制することにより骨格筋の再生や維持に寄与していると考えられる。

理論に拘束されることを望むものではないが、本開示の工程（１）及び（２）を含むスクリーニング方法により得られる I M A T 形成抑制物質は、W n t 5 b の発現量を抑制することによって、M P C s の過剰な増殖を抑制し、I M A T の形成を抑制し得る一方で、W n t 1 1 の発現量を抑制しないことによって、M P C s の細胞老化を抑制し、骨格筋を維持又は再生し得ると推測される。

[0041] また、前述のとおり、W n t 5 b 及び R o r 2 は p 3 8 を介して M P C s の増殖を促進するといえる。このことから、本開示のスクリーニング方法は、前述の W n t 5 b 及び R o r 2 と被験物質との接触の際に、さらに p 3 8 タンパク質を共存させてもよい（以下、これを工程（Ａ）と記載する場合がある）。本開示を制限するものではないが、工程（Ａ）として、例えば、R o r 2 タンパク質及び p 3 8 タンパク質を発現した前記細胞（M P C s 等）と、W n t 5 b タンパク質と、被験物質とを接触させることが好ましく例示できる。工程（Ａ）における接触は、p 3 8 タンパク質を被験物質等と接触させる以外は、前述の工程（１）又は（１）における説明と同様に行えばよい。p 3 8 タンパク質の濃度としては、特に限定されず、例えば 0. 1

～4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度等とすることができる。また、この場合、該方法は、前記被験物質が p38 タンパク質のリン酸化を阻害することを確認する工程（以下、これを工程（B）と記載する場合がある）を含むことができる。

このことから、前記工程（1）及び／又は（1）において、さらに工程（A）が行われてもよい。また、前記工程（11）及び／又は（2）と共に、さらに工程（B）が行われてもよい。工程（B）は、前記工程（11）及び／又は（2）よりも前に行ってもよく、前記工程（11）及び／又は（2）と同時に行ってもよく、前記工程（11）及び／又は（2）よりも後に行ってもよい。

後述の試験例から、p38 タンパク質のリン酸化は、Wnt5b 依存的といえる。このことから、該リン酸化阻害の確認によれば、Wnt5b タンパク質による p38 タンパク質のリン酸化の阻害を確認できるともいえる。

[0042] 前述のとおり、Wnt5b 及び Ror2 は p38 を介して MPCs の増殖を促進するといえることから、Wnt5b 刺激による p38 タンパク質のリン酸化を阻害できる物質も IMAT 形成抑制物質として好ましいといえる。従って、前記結合阻害及び／又は前記発現量抑制が可能であって、かつ p38 タンパク質のリン酸化阻害が可能である候補物質は、Wnt5b タンパク質及び Ror2 タンパク質依存的な p38 タンパク質のリン酸化を阻害し得る物質であり得るといえる。この観点から、被験物質が p38 タンパク質のリン酸化を阻害することを確認する場合、被験物質が、前記工程（11）及び／又は（2）に従って、Wnt5b タンパク質と Ror2 タンパク質との結合を阻害すること及び／又は Wnt5b の発現量を抑制することを予め確認しておいてもよい。このように結合阻害及び／又は発現量抑制が可能であることを予め確認した被験物質を用いた場合に、さらに p38 タンパク質のリン酸化が阻害されたことを確認できた場合も、当該候補物質は、Wnt5b タンパク質及び Ror2 タンパク質依存的な p38 タンパク質のリン酸化を阻害し得る物質であり得るといえる。

[0043] p38 タンパク質は、p38 MAP キナーゼ（Mitogen-acti

vated Protein Kinase、MAPK)とも称され、サイトカインやストレスに対する細胞応答を制御するシグナル伝達カスケードに関与することが知られている。p38タンパク質は、例えば哺乳類において4種類が同定されており、p38- α (MAPK14)、p38- β (MAPK11)、p38- γ (MAPK12/ERK6)、p38- δ (MAPK13/SAPK4)が存在する。当該タンパク質のアミノ酸配列、塩基配列等は、公知のデータベース等から知ることができる。例えば、NCBIにおいて、p38- α (MAPK14)のmRNA配列のアクセッションNo.は、NM_139012.3である。

[0044] 被験物質がp38タンパク質のリン酸化を阻害することを確認する方法は特に限定されない。p38タンパク質のリン酸化を阻害することを確認する方法は、特に制限されず、例えば、ウェスタンブロッティング法、免疫蛍光染色法、フローサイトメトリー法等が挙げられる。後述する実施例に示しており、抗リン酸化p38抗体を利用した手法が好ましく例示される。

[0045] p38タンパク質のリン酸化の阻害の確認は、前記結合阻害の確認及び／又は前記発現量抑制の確認よりも前に行っても良く、同時に行ってもよく、後に行ってもよい。

[0046] 本明細書において、「リン酸化を阻害する」とは、完全に、又は実質的にリン酸化を阻害することを意味する。「実質的に阻害する」とは、例えば、各種解析手法による発光や蛍光等の分析により、p38タンパク質のリン酸化を測定できることを確認した上で、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を添加した場合に、p38タンパク質のリン酸化が35%以上減少することが好ましい。当該範囲の上限若しくは下限は、例えば、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、又は100%程度であってもよい。具体的には、35~100%程度であってもよい。

[0047] このことから、前記工程(A)及び(B)を含む本開示のスクリーニング方法によれば、さらに、被験物質を添加しない場合と比較して、被験物質を

添加した場合に、p38タンパク質のリン酸化を阻害し得る物質をスクリーニングすることができる。

[0048] また、本開示は、Wnt5bタンパク質の中和抗体、又はWnt5b遺伝子の発現を抑制する核酸（siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド等）を有効成分とするIMAT形成抑制用組成物を好ましく包含する。また、本開示は、これら以外に、例えば、低分子化合物、ペプチド、タンパク質等を有効成分として含むIMAT形成抑制用組成物をも包含する。本明細書において、このようなIMAT形成抑制用組成物を「本開示の組成物」等と表記することがある。

[0049] Wnt5bタンパク質の中和抗体は、例えば、Wnt5bタンパク質を認識する抗体を、公知の方法又は公知の方法から容易に想到できる方法によって調製することで得ることもできる。また、Wnt5b遺伝子の発現を抑制する核酸（siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド等）は、例えば、Wnt5b遺伝子配列に基づき、公知の方法又は公知の方法から容易に想到できる方法によって設計して合成することができる。またさらに、このようにして得たWnt5bタンパク質を認識する抗体やWnt5b遺伝子の発現を抑制する核酸について、上述した本開示のスクリーニング方法によりスクリーニングして特に好ましいものを取得することができる。

[0050] 本開示を制限するものではないが、Wnt5b遺伝子の発現を抑制する核酸がsiRNAの場合、Wnt5b遺伝子の発現抑制機能を有する限りにおいて、センス鎖とアンチセンス鎖の塩基数はいずれも制限されず、好ましくはそれぞれ塩基数18～25、より好ましくは塩基数20～22が例示される。また、Wnt5b遺伝子の発現を抑制する核酸がアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合も、Wnt5b遺伝子の発現抑制機能を有する限りにおいて、その塩基数は制限されず、好ましくは塩基数12～28、より好ましくは塩基数15～25が例示される。

[0051] また、本開示を制限するものではないが、Wnt5b遺伝子の発現を抑制する核酸として、例えば、配列番号9及び10で示されるsiRNA、配列

番号 1 1 及び 1 2 で示される s i R N A が例示される。s i R N A は、W n t 5 b 遺伝子の発現抑制機能を有する限りにおいて、その 5' 及び／又は 3' 末端に突出部配列（オーバーハング）を有していてもよく、また、その塩基配列に変異を有していてもよく（例えば 1、2 又は 3 個の塩基配列の置換、欠損又は付加）、また、センス鎖とアンチセンス鎖の塩基の長さは同じであっても異なってもよい。本開示において W n t 5 b 遺伝子の発現抑制機能を有するとは、前述の工程（1）及び（2）に従って、核酸を添加しない場合と比較して、核酸を添加した場合に、W n t 5 b の発現量が 3 5 % 以上減少することが好ましく例示され、発現の抑制等は前述と同様にして説明される。

[0052] 本開示の組成物は、上述した有効成分と、必要に応じて他の成分とを組み合わせることで常法により調製することができる。当該他の成分としては、例えば、薬理学上許容される基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤、コーティング剤、着色料、香料、pH調整剤、胃粘膜保護剤などのその他の薬剤等が例示される。これらの成分は、1 種単独で、又は 2 種以上を組み合わせることで用いることができる。

[0053] なお、本明細書において「含む」とは、「本質的にからなる」と、「からなる」をも包含する（The term “comprising” includes “consisting essentially of” and “consisting of.”）。また、本開示は、本明細書に説明した構成要件の任意の組み合わせを全て包含する。

[0054] また、上述した本開示の各実施形態について説明した各種特性（性質、構造、機能等）は、本開示に包含される主題を特定するにあたり、どのように組み合わせられてもよい。すなわち、本開示には、本明細書に記載される組み合わせ可能な各特性のあらゆる組み合わせからなる主題が全て包含される。

実施例

[0055] 本開示の内容を以下の実験例を用いて具体的に説明する。しかし、本開示はこれらに何ら限定されるものではない。下記において、特に言及する場合を除いて、実験は大気圧及び常温条件下で行っている。また特に言及する場合を除いて、「%」は「容量%」を意味する。

[0056] 動物実験

8～12週齢の雄マウス（C57BL/6N）を日本SLC（静岡）から購入した。Cardiotoxin (Ctx) (Latoxan, Valence, France) 又はGlycerol (Nacalai Tesque, 京都) を用いて前脛骨筋（TA筋）への損傷を誘導した。Ctx (2.5 μ l of 10 μ M Ctx/g body weight) 又はGlycerol (50 μ l of 50% (v/v) Glycerol/TA muscle) をTA筋に注入することでTA筋の損傷を誘導し、2週間後に損傷TA筋を採取し、免疫蛍光染色を行うことで、筋繊維の断面積（CSA: Cross sectional area）とPerilipin陽性領域の割合を解析した。なお、Ctxは、脂肪蓄積を伴わない損傷修復を誘導するのに対して、Glycerolは脂肪蓄積を伴う損傷修復を誘導する。Ror2^{flox/flox}マウスは、以前に記載したように作製した（Endo M. et al., Glia, 2017, 65, 1）。

また、末端シュワン細胞の数を解析する際には、Ctx又はGlycerolを長趾伸筋（EDL）に注入し、蛍光染色法により解析した。

[0057] IMATの蓄積におけるWnt5b及びWnt11の役割を調べるために、Ctx処理後に、組み換えWnt5b（4 μ g/ml, R&D System, Minneapolis, MN）及びWnt11安定発現細胞のConditioned medium（詳細は後述）をTA筋に注入した。

Pdgfra^{CreER/+}マウスはJackson Laboratoryから入手した（ストック番号018280、Bar Harbor, ME）。10～14週齢のRor2^{flox/flox}; Pdgfra^{CreER/+}マウスにタモキシフェン（100 μ g/g 体重）（Sigma-Aldrich, St

、L o u i s , M O) を 1 日 1 回、計 9 日 間 腹 腔 内 注 射 し、M P C s に お け る R o r 2 の 発 現 を 抑 え た。本 研 究 に お け る す べ て の 動 物 実 験 は、神 戸 大 学 動 物 実 験 規 程 に 基 づ き、施 設 動 物 管 理 使 用 委 員 会 (許 可 番 号 : P 1 7 1 0 1 1 - R 1 , P 2 2 0 9 0 4) の 承 認 を 得 て、神 戸 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科 実 験 動 物 研 究 所 で 実 施 し た。

[0058] SCs 及び MPCs の単離

両 側 T A 筋、ヒ ラ メ 筋、腓 腹 筋、大 腿 四 頭 筋 及 び 大 殿 筋 を、0. 5 % (w / v) コ ラ ゲ ナ ー ゼ I I 型 (W o r t h i n g t o n , L a k e w o o d , N J) を 含 む D M E M / F - 1 2 (富 士 フ ィ ル ム 和 光 純 薬 株 式 会 社、大 阪、日 本) 中 で、9 0 分 間 3 7 ° C で 消 化 し た。消 化 し た 骨 格 筋 を 4 0 μ m の ナ イ ロ ン メ ッ シ ュ (p l u r i S e l e c t L i f e S c i e n c e , L e i p z i g , G e r m a n y) で 濾 過 し た。得 ら れ た 細 胞 懸 濁 液 は、2 % ウ シ 胎 児 血 清 (F B S) を 含 む 氷 冷 し た P B S で 洗 浄 し た。抗 C D 3 1、C D 4 5、S c a - 1、及 び S M / C - 2. 6 抗 体 を 用 い て、F A C S A r i a I I I (B D B i o s c i e n c e s , F r a n k l i n L a k e s , N J) に よ り 細 胞 懸 濁 液 か ら S C s 及 び M P C s を 分 離 し た (抗 体 リ ス ト は 表 1 に 記 載)。S C s は、S M / C - 2. 6 陽 性、C D 3 1、C D 4 5、S c a - 1 陰 性 の 細 胞 と し て 同 定 す る こ と が で き る。M P C s は、S c a - 1 陽 性、C D 3 1 -、C D 4 5 -、S M / C - 2. 6 陰 性 の 細 胞 と し て 同 定 さ れ る。

[0059]

[表1]

抗原	購入元	カタログ番号	希釈
Ki67	Thermo Fisher	14-5698-82	IF: 1/200
Laminin	R&D System	MAB4656	IF: 1/200
Perilipin	Cell Signaling	9349	IF: 1/200 WB: 1/500
Ror2	Our laboratory		WB: 1/500
Wnt5b	Abcam	Ab93134	IF: 1/200 WB: 1/500
α Tubulin	MBL	PM054	WB: 1/500
p38	Cell Signaling	8690	WB: 1/500
Phosphorylated p38	Cell Signaling	4511S	WB: 1/500
Lamin B1	Abcam	ab16048	IF: 1/200
Actin	Santa Cruz	sc-8432	WB: 1/500
S100 β	Sigma-Aldrich	S2532	IF: 1/200
CD31-FITC	BioLegend	102406	FCM: 1/200
CD45-FITC	Thermo Fisher	11-0451-85	FCM: 1/200
Scal-APC	BioLegend	108112	FCM: 1/100
SM/C-2.6	Dr. So-ichiro Fukada		FCM: 1/400
二次抗体			
Anti-rabbit HRP	Bio-Rad	1706515	WB: 1/2000
Anti-mouse Alexa 488	Thermo Fisher	A11029	IF: 1/500
Anti-mouse Alexa 546	Thermo Fisher	A11030	IF: 1/500
Anti-rabbit Alexa 488	Thermo Fisher	A11034	IF: 1/500
Anti-rabbit Alexa 546	Thermo Fisher	A11035	IF: 1/500
Anti-rat Alexa 647	Thermo Fisher	A21247	IF: 1/500

IF: Immunofluorescence, FCM: Flow cytometry, WB: Western blotting

[0060] 細胞培養

Cos7細胞は、10%FBS含有DMEMで、5%CO₂及び20%O₂の下で37℃にて培養した。Cos7細胞に、pCMV5-mWnt11とピューロマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミド（pBabe-Puro）を10:1の割合でトランスフェクトし、mWnt11を恒常的に発現するピューロマイシン耐性細胞を選択した（Cos7-Wnt11）。また、pBabe-Puroとともに空ベクター（pCMV5）を導入したCos7細胞もピューロマイシン処理により選択した（Cos7-mock）。Conditioned mediumを調製するために、5×10⁵個のC

os7-Wnt11又はCos7-mockを0%FBS DMEMで4つのφ10ディッシュで2日間培養した。培地を回収し、500×gで5分間遠心分離して死細胞を除去した後、Vivaspin 20-10K (Cytiva, Marlborough, MA) を用いて2000×gで60分間遠心して濃縮した。濃縮したConditioned mediumを損傷したTA筋に投与した。

[0061] Ctx投与3日後の両側TA筋、ヒラメ筋、腓腹筋から上記のようにFACSによりMPCを単離し、10%FBS、50U/ml Penicillin (明治製菓ファルマ、東京、日本)、50μg/ml Kanamycin (富士フイルム和光純薬株式会社)、10ng/ml bFGF (富士フイルム和光純薬株式会社) を含むDMEM (富士フイルム和光純薬株式会社) で、5%CO₂、3%O₂、37℃で3～4日間培養した。その後、MPCを以下のin vitro実験に使用した。MPCsを用いたin vitro実験は、5%CO₂及び20%O₂の下、37℃で行った。

[0062] Ki67陽性MPCsの割合を調べるために、MPCsにsiRNAを導入し (siRNAの配列は表2に記載のRor2#1、Ror2#2)、10%FBSを含むDMEMで3日間培養した。その後、細胞を4% (w/v) パラホルムアルデヒド (PFA) で10分間、室温で固定した。その後、固定したMPCを抗Ki67抗体とDAPIで染色し、Ki67陽性MPCの割合を評価した。

[0063]

[表2]

遺伝子	配列 (5'-3')	siRNA ID	購入元
<i>Ror2</i> #1	(sense) CCCUUGAGCAUGAUCUUCA (配列番号 1) (anti-sense) UGAAGAUC AUGCUCAAGGG (配列番号 2)	s77263	Thermo Fisher
<i>Ror2</i> #2	(sense) CAAUUUUCAGGAUGACGAU (配列番号 3) (anti-sense) AUCGUCAUCCUGAAAAUUG (配列番号 4)	s77264	Thermo Fisher
<i>Wnt11</i> #1	(sense) GAUGCUCUAUGAAGGUGA (配列番号 5) (anti-sense) UCACCUUCAUAGGAGCAUC (配列番号 6)	00179252	Sigma-Aldrich
<i>Wnt11</i> #2	(sense) CUGAUGCGUCUACACAACA (配列番号 7) (anti-sense) UGUUGUGUAGACGCAUCAG (配列番号 8)	00179254	Sigma-Aldrich
<i>Wnt5b</i> #1	(sense) CCGUGUAUAAGAUGGCUGA (配列番号 9) (anti-sense) UCAGCCAUCUUAUACACGG (配列番号 10)	00111083	Sigma-Aldrich
<i>Wnt5b</i> #2	(sense) GUGCCAACACCAGUUUCGA (配列番号 11) (anti-sense) UCGAAACUGGUGUUGGCAC (配列番号 12)	00111084	Sigma-Aldrich

[0064] EdU陽性MPCsの割合を調べるために、MPCsにsiRNA（表2に記載の*Ror2* #1, *Ror2* #2, *Wnt5b* #1又は*Wnt5b* #2）を導入し、10%FBSを含むDMEMで3日間培養した。その後、MPCsをEdU（10 μ M、Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）で30分間処理し、その後4%（w/v）PFAで固定した。EdUの取り込みは、Click-it EdU imaging kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて、製造者の説明書に従って検出した。

[0065] 脂肪分化のために、MPCをAdipogenic induction medium（10%FBS、0.5mM IBMX（Sigma-Aldrich）、0.25 μ Mデキサメタゾン（Sigma-Aldrich）、10 μ g/ml Insulin（Sigma-Aldrich）含有DMEM）で3日間培養した後に、Adipogenic maintenance medium（10%FBS、10 μ g/ml Insulin含有DMEM）で3日間処理した。

[0066] 老化細胞を検出するため、siRNA（表2に記載の*Ror2* #1, *Ror2* #2, *Wnt11* #1又は*Wnt11* #2）を導入したMPCsを10%FBS DMEMで3日間培養した後、製造者の指示に従ってSPiDE

R-βGal（同仁化学研究所、熊本）で染色した。

[0067] オイルレッドO染色

脂肪細胞を染色するために、細胞を4%（w/v）PFAで室温にて10分間処理し、固定した。固定した細胞を60%（v/v）イソプロパノールで洗浄した。次に、オイルレッドO（富士フイルム和光純薬株式会社）で室温にて30分間染色した。染色した細胞を60%（v/v）イソプロパノールで洗浄した後、100%イソプロパノールで20分間処理し、脂肪細胞内に取り込まれたオイルレッドOを抽出した。その後、上清のオイルレッドOの吸光度を490nmで測定した。

[0068] WST-8アッセイ

MPCを96ウェルプレートに播種し（1ウェルあたり1000細胞）、siRNAを導入（表2に記載のWnt5b#1又はWnt5b#2）した。その後、MPCを任意の期間培養し、培地にWST-8試薬（Cell counting kit-8、同仁化学研究所）を加えて90分間インキュベートし、450nmの吸光度を測定した。

Wnt5b誘導性増殖におけるp38の関与を評価するため、96ウェルプレートにMPCを播種した1日後に、p38阻害剤（10μM SB203580, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI）及び組換えWnt5b（200ng/ml, R&D System）を培地に追加した。その後、WST-8アッセイを上記のように実施した。

[0069] 免疫蛍光染色

単離したTA筋を液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結し、クライオスタット（Leica CM1860, Wetzlar, Germany）で切片を作製した。凍結切片を0.2%（v/v）Triton X-100で透過処理を行った。その後、切片を3%（w/v）BSA含有PBSでブロッキングし、一次抗体と4℃で一晩インキュベートした。切片をPBSで洗浄し、二次抗体と室温で1時間インキュベートした後、Fluor-KEMPER（ナカライテスク）を用いて封入した。封入した切片を蛍光顕微鏡

(BZ-X700、キーエンス、大阪、日本)により観察した。TA筋におけるPerilipin陽性領域の割合やCSAについては、ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD)を用いて解析した。

ホルマウント免疫蛍光染色を行うために、単離したEDL筋を4% (w/v) PFAで30分間固定し、その後0.2% (v/v) Triton X-100で透過処理した。PBSで洗浄後、EDL筋を3% (w/v) BSA含有PBSで1時間ブロッキングし、一次抗体と4℃で一晩インキュベートした。その後、EDL筋をPBSで洗浄し、二次抗体と室温で1時間インキュベートした。染色したEDL筋をガラスボトムディッシュ (松浪硝子工業、大阪) の上にのせ、レーザー走査型共焦点イメージングシステム (LSM700、Carl Zeiss、Oberkochen、Germany) を用いて観察した。

培養細胞を4% (w/v) PFAで10分間固定し、その後0.2% (v/v) Triton X-100で透過処理した。PBSで洗浄後、3% (w/v) BSA含有PBSで1時間ブロッキングし、一次抗体と4℃で一晩インキュベートした。次に、細胞をPBSで洗浄し、二次抗体と室温で1時間インキュベートした。染色した細胞をFluor-KEEPER (ナカライテスク社製) で封入した。封入した細胞を、レーザー走査型共焦点イメージングシステム (LSM700、Carl Zeiss) を用いて観察した。

[0070] ウェスタンブロッティング

細胞を溶解バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 μM p-APMSF) で可溶化させた。タンパク質 (1レーンあたり合計10 μg) をSDS-PAGEで分離し、Immobilon-Pメンブレン (Merck

Millipore, Darmstadt, Germany) 上に転写した。メンブレンは1% (v/w) BSA含有TBSTで1時間ブロッキングした後、一次抗体(表1に記載)を用いて4℃で一晩ブロットした。一次抗体で処理した後、メンブレンをTBSTにより室温で30分間洗浄し、その後、二次抗体(表1に記載)を用いて室温で1時間ブロットした。最後に、メンブレンを室温で30分間TBSTによって洗浄した。解析時にはImmunoStar LD (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 及びLAS 1000 (GE Healthcare, Chicago, IL) を使用した。相対的なバンド強度は、ImageJソフトウェアによって決定された。

[0071] 定量的RT-PCR

Sepasol-RNA Isolation SuperG (ナカライテスク) を用いて培養細胞あるいはTA筋からTotal RNAを抽出し、これらのRNAからPrimeScript RT Reagent (タカラバイオ、滋賀) を用いてcDNAを合成した。LightCycler 480 II system (Roche, Basel, Switzerland) を用いて、それぞれの目的遺伝子の発現を定量化した。対象mRNAの量は、18SリボソームRNAの量に対して正規化した。プライマーペアの配列は、表3に記載されている。

[0072]

[表3]

遺伝子	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Ror2</i>	ATGTGGACTCCCTCCAGATG (配列番号 13)	GAAGACGAAGTGGCAGAAGG (配列番号 14)
<i>Wnt5a</i>	CAAATAGGCAGCCGAGAGAC (配列番号 15)	CTCTAGCGTCCACGAACTCC (配列番号 16)
<i>Wnt5b</i>	ATGCCCGAGAGCGTGAGAAG (配列番号 17)	ACATTTCAGGCGACATCAGC (配列番号 18)
<i>Wnt11</i>	CTGAATCAGACGCAACACTGTAAAC (配列番号 19)	CTCTCTCCAGGTCAAGCAGGTAG (配列番号 20)
<i>18S</i>	CGATAACGAACGAGACTCTG (配列番号 21)	GACATCTAAGGGCATCACAG (配列番号 22)

[0073] 統計解析

データは、Bell Curve for Excel (株式会社社会調査研究情報、東京) 及び GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Boston, MA) を用いて分析された。データは、平均値±標準偏差 (S. D.) で示した。有意性は、2つのグループを比較した場合は unpaired two-tailed Student's t test、3つ以上のグループを分析した場合は one-way ANOVA with Holm's test あるいは Dunnett's test を用いて、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 又は *** $P < 0.001$ として決定された。

[0074] マウスの TA 筋、腓腹筋、ヒラメ筋、大腿四頭筋、大殿筋を回収し、FACS Aria III を用いて SCs 及び MPCs を単離し、RNA 抽出後、定量的 RT-PCR 法を用いて発現解析を行った。

[0075] 図1に示すとおり、MPCs において *Ror2* が選択的に発現していることが確認された。

[0076] Ctx を投与した TA 筋から単離した MPCs を 5%CO₂、3%O₂ で 3 日間培養した後、通常酸素濃度下で siRNA (表2に記載の *Ror2* #1

又はR o r 2 # 2) を導入した。翌日培地を新しいものに置換した。s i R N Aを導入して3日後に細胞を固定し、K i 6 7 抗体を用いて染色した。

C t xを投与したT A筋から単離したM P C sを5 % C O₂, 3 % O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でs i R N A (表2に記載のR o r 2 # 1 又はR o r 2 # 2) を導入した。翌日培地を新しいものに置換した。s i R N Aを導入して3日後にA d i p o g e n i c i n d u c t i o n m e d i u mで3日間培養し、続いてA d i p o g e n i c m a i n t e n a n c e m e d i u mで3日間培養することで脂肪細胞への分化を誘導した。分化誘導後、オイルレッドO染色を行った。

C t xを投与したT A筋から単離したM P C sを5 % C O₂, 3 % O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でs i R N A (表2に記載のR o r 2 # 1 又はR o r 2 # 2) を導入した。翌日培地を新しいものに置換した。s i R N Aを導入して3日後にS P i D E R - β G a lを用いて老化細胞を染色した。

[0077] 図2に示すとおり、マウス骨格筋から単離・培養したM P C sにおいてR o r 2の発現を抑制すると、M P C sの増殖能及び脂肪細胞への分化能が低下し、細胞老化が亢進することが確認された。M P C sは細胞老化を起こすと増殖能及び脂肪細胞への分化能が低下することが報告されていることから(非特許文献1、2)、R o r 2はM P C sの細胞老化を抑制することで増殖能や脂肪細胞への分化能を制御している可能性が考えられた。

[0078] 12～16週齢のコントロールマウス及びR o r 2 c K OマウスにT a m o x i f e nを投与した後、半年間飼育し、骨格筋重量を比較解析した。このときのT A筋について、凍結切片を作製し、L a m i n i n抗体で染色し、各筋線維の断面積を測定した。

[0079] 図3に示すとおり、R o r 2 c K OマウスではT A筋、腓腹筋(G a s t r o c n e m i u s m u s c l e)、及びヒラメ筋(S o l e u s)の重量が低下し、T A筋における筋線維が萎縮することが明らかとなった。このことからR o r 2は骨格筋の維持において重要であると考えられる。

[0080] 12～16週齢のコントロールマウス及びRor2cKOマウスにTamoxifenを投与した後、CtxあるいはGlycerolをTA筋に投与した。投与2週間後にTA筋を回収し、Laminin又はPerilipinで染色した。TA筋の各筋線維の断面積を測定した。また、Glycerol投与筋の染色画像を用いて、筋組織断面積におけるPerilipin陽性面積の割合を計測することで、脂肪蓄積の程度を比較解析した。

[0081] 図4に示すとおり、Ctx投与2週間後の筋線維の太さがRor2cKOマウスではコントロールマウスに比べて小さく、骨格筋の再生遅延が示されたことから、Ror2は骨格筋再生に重要であると考えられる。

また、Ror2cKOマウスではGlycerol投与後の脂肪蓄積が減少していたことから、Ror2はIMAT形成においても重要であることが示された。

[0082] Ctxを投与したTA筋から単離したMPCsを5%CO₂, 3%O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でsiRNA（表2に記載のWnt11#1又はWnt11#2）を導入した。翌日培地を新しいものに置換した。siRNAを導入して3日後にRNAを抽出し、定量的RT-PCR法にて発現解析を行った。これと並行して、SPIDER-βGal染色も行い、フローサイトメトリー法にて染色強度を比較解析した。

[0083] 図5に示すとおり、MPCsにおいてWnt11の発現を抑制することにより、MPCsの細胞老化が誘導されることが明らかになった。

[0084] Ctxを投与したTA筋から単離したMPCsを5%CO₂, 3%O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でsiRNA（表2に記載のRor2#1、Ror2#2、Wnt11#1又はWnt11#2）を導入した。翌日培地を新しいものに置換した。siRNAを導入して2日後にPhalloidin及びDAPIで染色した。

Ctxを投与したTA筋から単離したMPCsを5%CO₂, 3%O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でsiRNA（表2に記載のRor2#1、Ror2#2、Wnt11#1又はWnt11#2）を導入した。翌日培

地を新しいものに置換した。s i R N Aを導入して3日後に固定し、L a m i n B 1 及びD A P I で染色した。

[0085] 図6に示すとおり、M P C sにおいてW n t 1 1又はR o r 2の発現を抑制すると、アクチン・ストレスファイバーの形成が促進されることが観察された。また、核形態の異常がみられることも見出された。

核形態の異常に伴い、細胞質中にD N Aが漏出すると、c G a s (c y c l i c G M P - A M P s y n t h a s e) を介したシグナル伝達経路 (c G A S - S t i n g 経路) が活性化することが報告されている (非特許文献3)。これらの知見から、W n t 1 1及びR o r 2はM P C sにおけるストレスファイバーの形成を抑制することで、核形態異常とそれに伴うc G a s - S t i n g 経路の活性化を抑制し、その結果、細胞老化を阻害することにより骨格筋の再生や維持に寄与していると考えられた。

[0086] 次に、R o r 2がI M A Tの形成に関わる分子機構を明らかにすることを目的として、C t x投与筋、及びG l y c e r o l投与筋における遺伝子発現の比較解析を実施した。8～12週齢の野生型マウスのT A筋にC t x又はG l y c e r o lを投与し、0 (投与無し)、3、7日後にT A筋を回収し、R o r 2のリガンドとして機能し得るW n t ファミリー遺伝子について、定量的R T - P C R法にて発現解析を行った。

C t xを投与したT A筋から単離したM P C sを5% C O₂, 3% O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でs i R N A (表2に記載のR o r 2 # 1又はR o r 2 # 2) を導入した。翌日W n t 5 a又はW n t 5 bを含む培地に置換した。3日後にE d UあるいはK i 6 7染色による増殖解析を実施した。

[0087] 図7に示すとおり、W n t 5 bがG l y c e r o l投与後に発現上昇することを見出した。このことからW n t 5 bがI M A T形成に寄与する可能性が考えられた。

さらに、培養M P C sにW n t 5 bを添加することでM P C sの増殖が促進され、他方R o r 2の発現抑制によってW n t 5 b添加による増殖促進が

抑制された。また、R o r 2 のリガンドとして最もよく知られているW n t 5 a の添加ではM P C s の増殖は影響を受けなかった。

[0088] C t x を投与したT A 筋から単離したM P C s を5 % C O₂, 3 % O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でs i R N A (表2に記載のR o r 2 # 1 又はR o r 2 # 2) を導入した。翌日培地を新しいものに置換した。s i R N A を導入して2日後に培地をO P T I - M E M に置換し一晚培養した。その後、W n t 5 b を200 n g / m l で添加し、1時間後に溶解バッファーにて細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットを実施した。

C t x を投与したT A 筋から単離したM P C s を5 % C O₂, 3 % O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でs i R N A (表2に記載のR o r 2 # 1 又はR o r 2 # 2) を導入した。翌日W n t 5 b (200 n g / m l) 又はS B 203580 (10 μM) を含む培地に置換した。このとき、培地置換していない細胞をd a y 0 サンプルとしてW S T - 8 アッセイにより解析した。培地置換して3日後にW S T - 8 アッセイにより各ウェルにおける細胞数を測定した。

[0089] 図8に示すとおり、培養M P C s を用いた解析から、W n t 5 b はR o r 2 依存的にp 38 をリン酸化(活性化を反映)することを見出した。また、p 38 阻害剤であるS B 203580 で処理すると、W n t 5 b 刺激依存的なM P C s の増殖促進が抑制された。以上から、W n t 5 b、R o r 2、及びp 38 がM P C s の増殖を促進することが明らかとなった。

骨格筋でI M A T や線維化などが生じる際には、M P C s が過剰に骨格筋内に蓄積し脂肪細胞や線維芽細胞に分化することが示唆されている(非特許文献4、5)。上記の我々の解析結果から、W n t 5 b、R o r 2、及びp 38 はM P C s の増殖を促進することにより骨格筋組織中におけるM P C s の過剰な蓄積を誘導し、I M A T の形成に寄与している可能性が考えられる。

[0090] C t x 又はG l y c e r o l を投与し3日後のE D L 筋をホルマウント染色した。

[0091] 図9に示すとおり、シュワン細胞（S100β陽性細胞）においてWnt5bが発現しており、Wnt5b陽性シュワン細胞はGlycerol投与時に増殖が亢進することを見出した。このことからWnt5bの産生細胞の一つがシュワン細胞である可能性が示された。

[0092] 8～12週齢の雄マウスのTA筋にCtx又はGlycerolを投与し3日後のTA筋を回収し、FACS AriaIIIを用いてSCs、MPCs、CD31陽性・CD45陽性細胞（造血系細胞と内皮細胞の混合集団）、それ以外の細胞集団をそれぞれ単離し、RNA抽出後、定量的RT-PCR法を用いて発現解析を行った。

[0093] 図10に示すとおり、TA筋ではSCs及びMPCsにおいてWnt5bが発現していることを見出した。このことからTA筋におけるWnt5bの産生細胞はSCs及びMPCsであることが示された。

[0094] Ctxを投与したTA筋から単離したMPCsを5%CO₂, 3%O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でsiRNA（表2に示すWnt5b#1又はWnt5b#2）を導入した。翌日培地を新しいものに置換した。siRNAを導入して3日後にRNAを抽出し、定量的RT-PCR法にて発現解析を行った。

Ctxを投与したTA筋から単離したMPCsを5%CO₂, 3%O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でsiRNA（表2に示すWnt5b#1又はWnt5b#2）を導入した。翌日培地を新しいものに置換した。このとき、培地置換していない細胞をday0サンプルとしてWST-8アッセイにより解析した。培地置換して4日後にWST-8アッセイにより各ウェルにおける細胞数を測定した。

Ctxを投与したTA筋から単離したMPCsを5%CO₂, 3%O₂で3日間培養した後、通常酸素濃度下でsiRNA（表2に示すWnt5b#1又はWnt5b#2）を導入した。翌日培地を新しいものに置換した。3日後にEdUによる増殖解析を実施した。

[0095] 図11に示すとおり、siRNAによりWnt5bの発現が抑制されるこ

とが明らかになった。また、培養MPCsを用いた解析から、siRNAによるWnt5bの発現抑制により、MPCsの増殖能が阻害されることが明らかになった。

- [0096] 以上の結果から、生理的状态ではMPCsにおいてWnt11及びRor2がMPCsの細胞老化を抑制し骨格筋の維持や再生に寄与するが、病的状態ではWnt11に加えてWnt5bもRor2のリガンドとして機能することによってMPCsの過剰な増殖が促進され、IMAT形成が促進される可能性が考えられた。

産業上の利用可能性

- [0097] IMATの蓄積がみられる筋疾患及び／又は症状として、筋ジストロフィー（デュシェンヌ型筋ジストロフィー等）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）をはじめとする筋萎縮症等の各種骨格筋疾患、サルコペニア、フレイル、ロコモティブ症候群等の骨格筋における加齢等に伴う各種症状等が例示される。本開示は、このようなIMATの蓄積がみられる筋ジストロフィーや加齢に伴って見られるサルコペニアなどをはじめとする骨格筋疾患・病態に対して有効かつ副作用の少ない新規治療方法の開発に活用できる。

請求の範囲

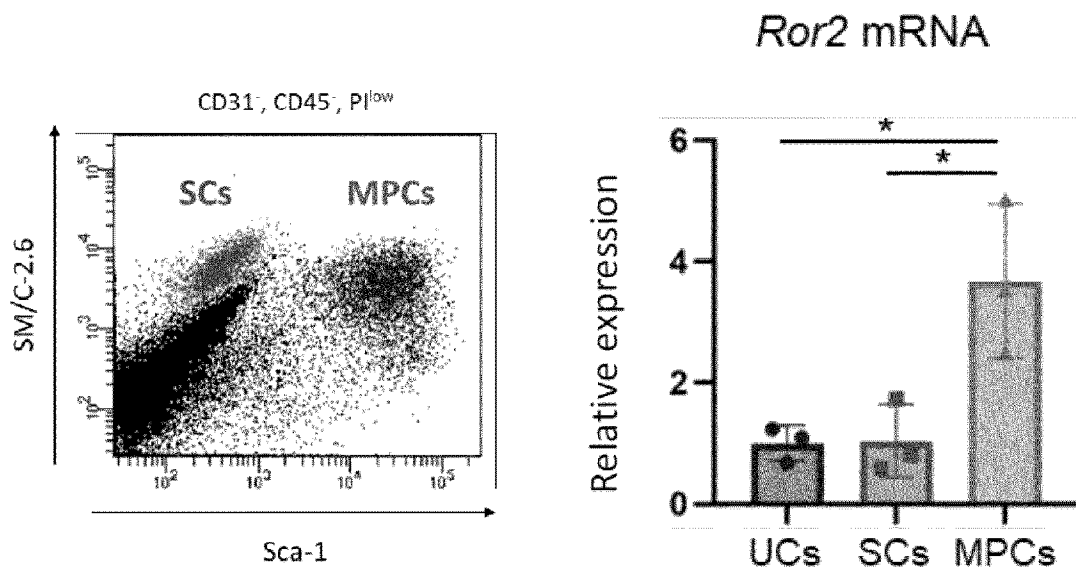
- [請求項1] (1) W n t 5 b タンパク質、R o r 2 タンパク質、及び被験物質を接触させる工程、並びに
- (11) 前記被験物質がW n t 5 b タンパク質とR o r 2 タンパク質との結合を阻害することを確認する工程を含む、
- I M A T 形成抑制物質をスクリーニングする方法。
- [請求項2] 工程 (1) において、さらにW n t 1 1 タンパク質を接触させ、
- 工程 (11) において、さらに前記被験物質がW n t 1 1 タンパク質とR o r 2 タンパク質との結合を阻害しないことを確認する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] (1) S C s、M P C s、及びシュワン細胞からなる群より選択される少なくとも1種と、被験物質とを接触させる工程、
- 並びに
- (2) 前記被験物質がW n t 5 b の発現量を抑制することを確認する工程を含む、
- I M A T 形成抑制物質をスクリーニングする方法。
- [請求項4] 前記工程 (2) において、前記被験物質がW n t 1 1 の発現量を抑制しないことを確認する、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] (A) W n t 5 b タンパク質、R o r 2 タンパク質、p 3 8 タンパク質、及び被験物質を接触させる工程、並びに
- (B) 前記被験物質がp 3 8 タンパク質のリン酸化を阻害することを確認する工程を含む、
- I M A T 形成抑制物質をスクリーニングする方法。
- [請求項6] I M A T 形成抑制が、M P C s の増殖抑制によるものである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] W n t 5 b タンパク質の中和抗体、又はW n t 5 b 遺伝子の発現を抑制する核酸を有効成分とする、I M A T 形成抑制用組成物。
- [請求項8] I M A T の蓄積が認められる筋疾患又は症状の抑制又は治療に使用する

るための、請求項 7 に記載の I M A T 形成抑制用組成物。

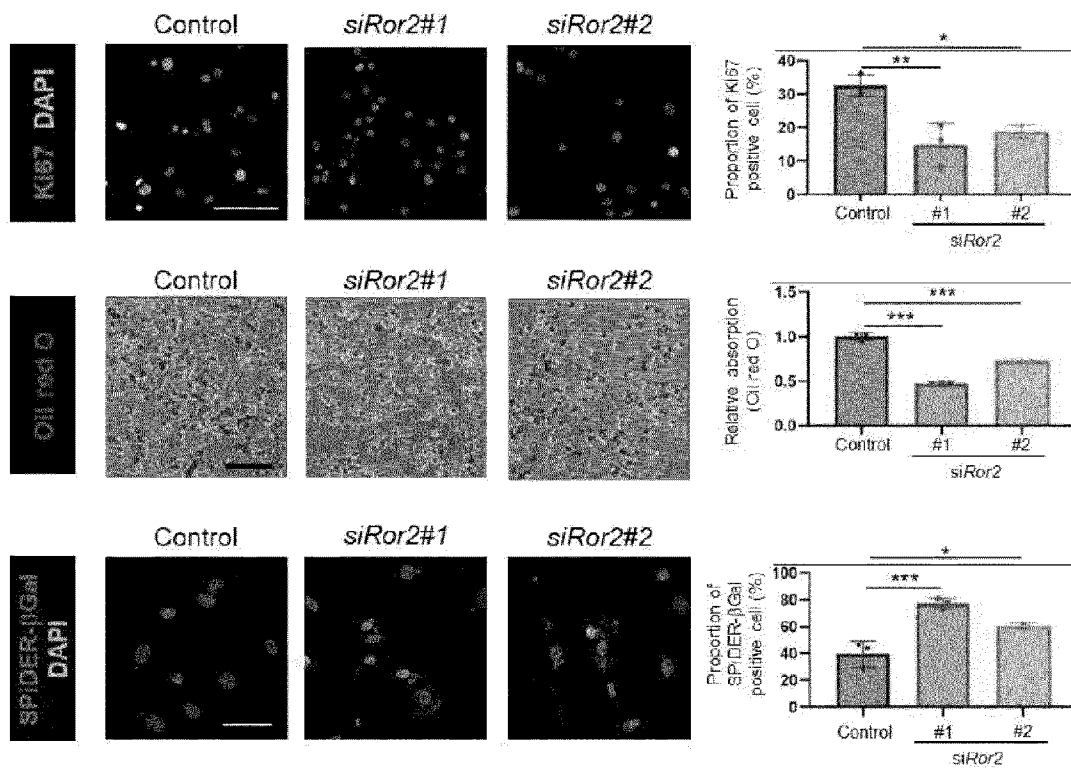
[請求項 9]

前記 I M A T の蓄積が認められる筋疾患又は症状が、筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、サルコペニア、フレイル又はロコモティブ症候群である、請求項 8 に記載の I M A T 形成抑制用組成物。

[図1]



[図2]

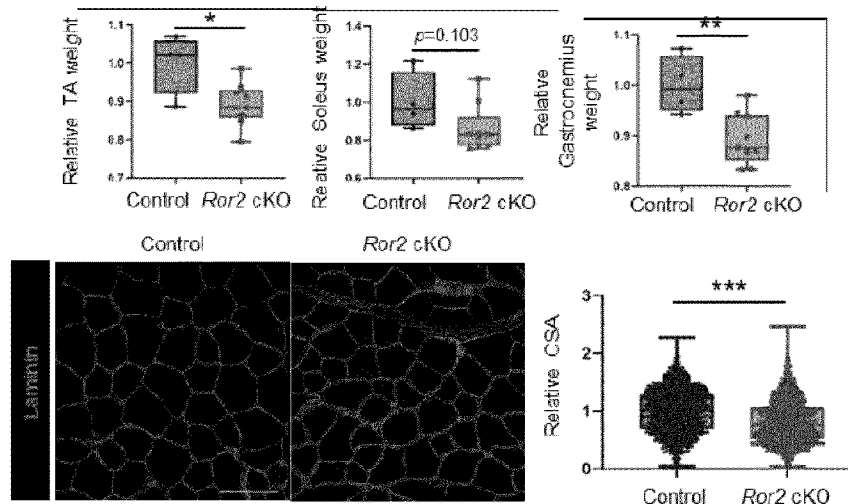


Control *Ror2^{fllox/fllox}*
***Ror2* cKO** *Ror2^{fllox/fllox}; Pdgfra^{CreER/+}*

Timeline (day): 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 (day) 9 months old

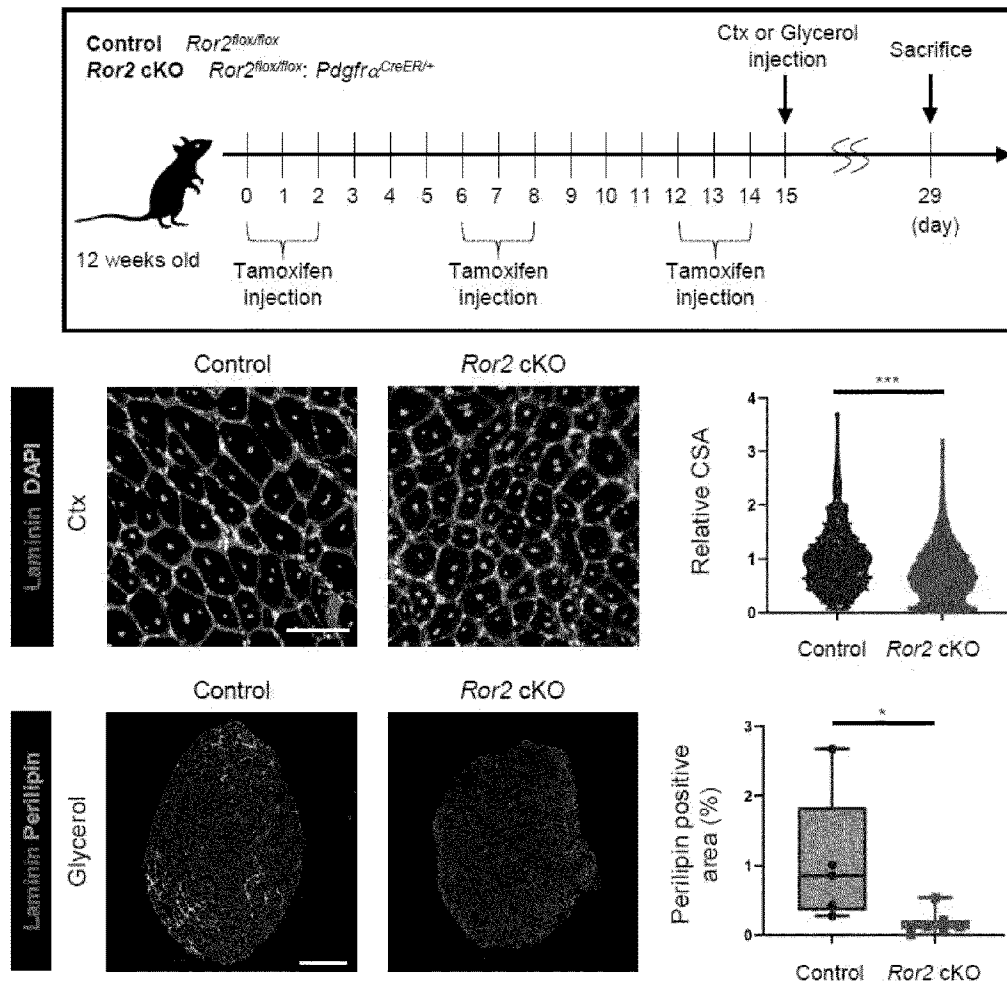
Tamoxifen injection (at days 1-2, 6-7, 12-13)

Sacrifice (at 9 months old)

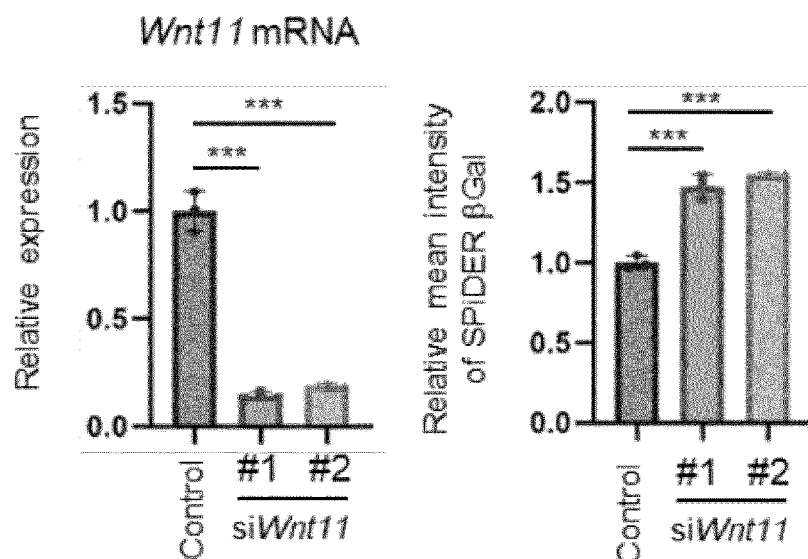


* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$,
Student-t test

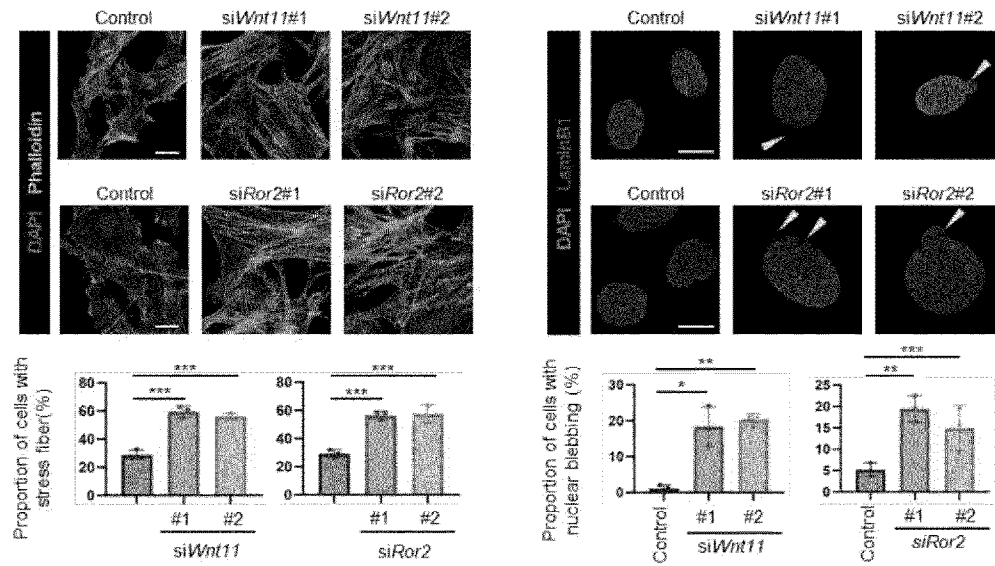
[図4]

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Student-t test

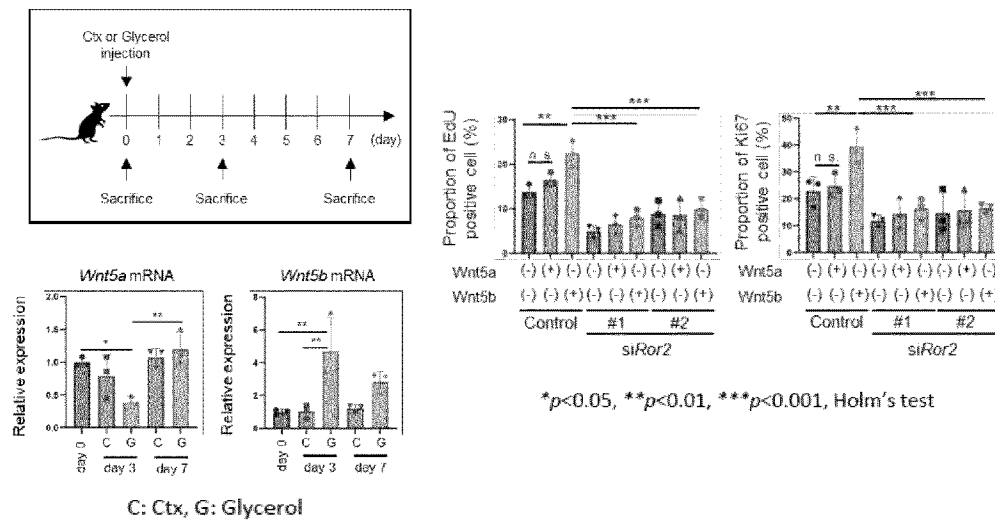
[図5]

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Holm's test

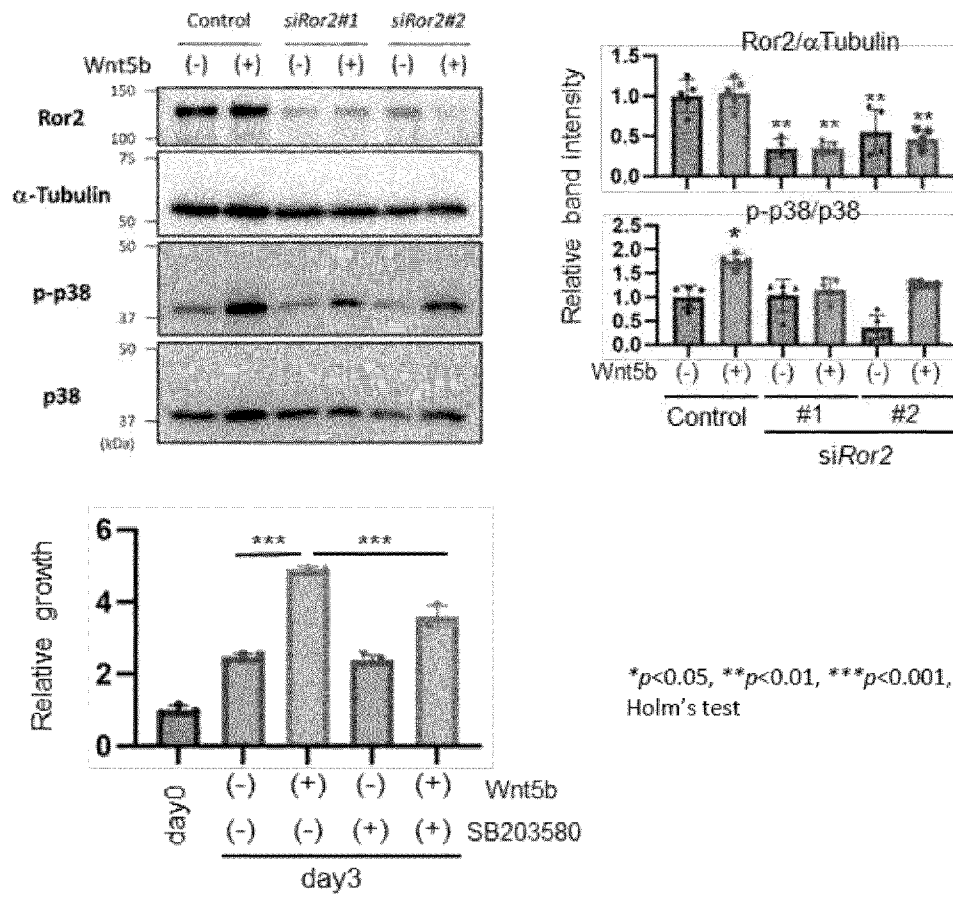
[図6]

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Dunnett's test

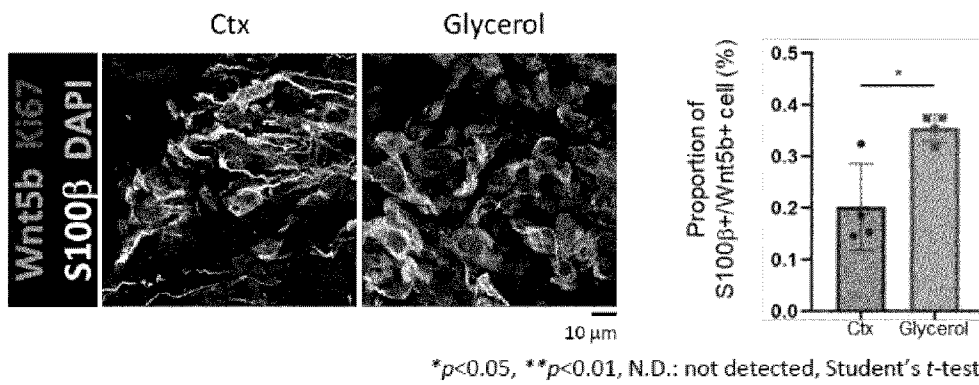
[図7]



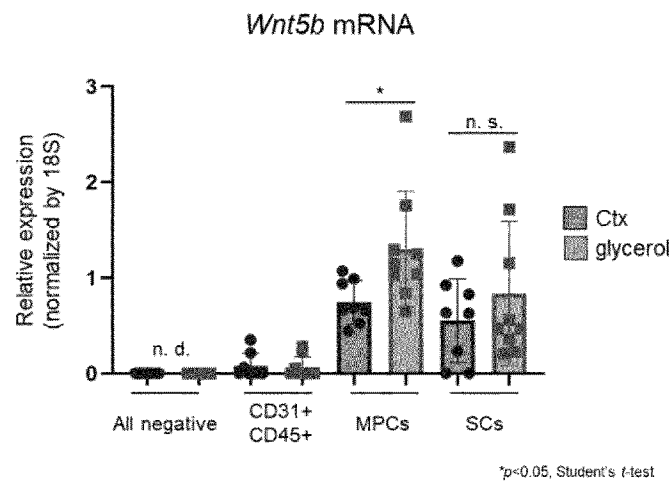
[図8]



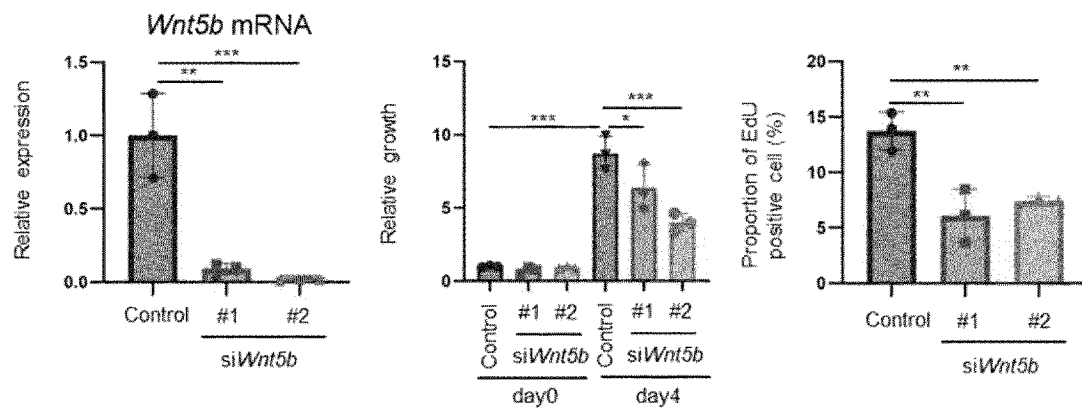
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/022952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i; **A61K 31/7088**(2006.01)i; **A61K 31/7105**(2006.01)i; **A61K 39/395**(2006.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **A61P 21/00**(2006.01)i; **A61P 21/04**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i; **C07K 14/47**(2006.01)i; **C07K 16/18**(2006.01)i; **C12N 15/113**(2010.01)i; **G01N 33/15**(2006.01)i; **G01N 33/50**(2006.01)i

FI: G01N33/68; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K39/395 D; A61K39/395 N; A61K48/00; A61P21/00; A61P21/04; A61P43/00 105; C07K14/47 ZNA; C07K16/18; C12N15/113 Z; G01N33/15 Z; G01N33/50 Z

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)

G01N33/68; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K39/395; A61K48/00; A61P21/00; A61P21/04; A61P43/00; C07K14/47; C07K16/18; C12N15/113; G01N33/15; G01N33/50

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 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAMIZAKI, Koki et al. Role of noncanonical Wnt ligands and Ror-family receptor tyrosine kinases in the development, regeneration, and diseases of the musculoskeletal system. Developmental Dynamics. 2021, vol. 250, no. 1, pp. 27-38	1-9
X	紙崎孝基ほか, Ror2による骨格筋間葉系前駆細胞の機能制御機構, 第8回日本筋学会学術集会 プログラム・抄録集, 05 August 2022, (KAMIZAKI, Koki et al.), non-official translation (The function control mechanism of skeletal muscle mesenchymal progenitor cells by Ror2. Programs and Abstracts of the 8th Annual Meeting of Japan Muscle Society.) entire text	1-4, 6



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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

05 September 2024

Date of mailing of the international search report

17 September 2024

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/JP2024/022952

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	紙崎孝基ほか, Wnt-Ror2シグナルによる間葉系前駆細胞の機能制御, 第9日本筋学会学術集会・第10回筋ジストロフィー医療研究会 合同学術集会 プログラム・抄録集, 18 August 2023, (KAMIZAKI, Koki et al.), non-official translation (Regulation of mesenchymal progenitor cell function by Wnt-Ror2 signaling. Programs and Abstracts of Joint Academic Conference of the 9th Annual Meeting of Japan Muscle Society and the 10th Medical Research Group of Muscular Dystrophy.) entire text	1-4, 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/022952

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.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/022952

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

G01N 33/68(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i;
A61K 48/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A61P 21/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i;
C07K 14/47(2006.01)i; C07K 16/18(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; G01N 33/15(2006.01)i;
G01N 33/50(2006.01)i
FI: G01N33/68; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K39/395 D; A61K39/395 N; A61K48/00; A61P21/00; A61P21/04;
A61P43/00 105; C07K14/47 ZNA; C07K16/18; C12N15/113 Z; G01N33/15 Z; G01N33/50 Z

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））

G01N33/68; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K39/395; A61K48/00; A61P21/00; A61P21/04; A61P43/00;
C07K14/47; C07K16/18; C12N15/113; G01N33/15; G01N33/50

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1971-2024年
日本国実用新案登録公報1996-2024年
日本国登録実用新案公報1994-2024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 (JDreamII), CAplus/MEDLINE/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
A	KAMIZAKI Koki et al., Role of noncanonical Wnt ligands and Ror-family receptor tyrosine kinases in the development, regeneration, and diseases of the musculoskeletal system, Developmental Dynamics, 2021, Vol.250, No.1, P.27-38	1-9
X	紙崎孝基ほか, Ror2による骨格筋間葉系前駆細胞の機能制御機構, 第8回日本筋学会 学術集会 プログラム・抄録集, 2022.08.05 全文	1-4, 6
P, X	紙崎孝基ほか, Wnt-Ror2シグナルによる間葉系前駆細胞の機能制御, 第9日本筋学会 学術集会・第10回筋ジストロフィー医療研究会 合同学術集会 プログラム・抄録 集, 2023.08.18 全文	1-4, 6

☐ 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
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“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
05.09.2024

国際調査報告の発送日
17.09.2024

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）

海野 佳子 2J 3906

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
- ☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ 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、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
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/JP2024/022952

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日