(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-508581
(P2012-508581A)
(43)公表日　平成24年4月12日(2012.4.12)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C07K 14/46	(2006.01)	C07K 14/46		4B063
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q 1/02		4C084
A61K 38/00	(2006.01)	A61K 37/02		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 37 頁）

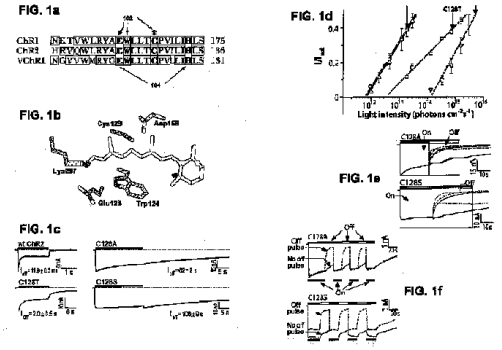
(21)出願番号　特願2011-536505 (P2011-536505)
(86)(22)出願日　平成21年11月13日 (2009.11.13)
(85)翻訳文提出日　平成23年7月19日 (2011.7.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/064355
(87)国際公開番号　WO2010/056970
(87)国際公開日　平成22年5月20日 (2010.5.20)
(31)優先権主張番号　61/114,781
(32)優先日　平成20年11月14日 (2008.11.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　503115205
ボード　オブ　トラスティーズ　オブ　ザ　レランド　スタンフォード　ジュニア　ユニバーシティ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４３０６－１８５０，パロ　アルト，エル　カミーノ　レアル　１７０５
(74)代理人　100079049
弁理士　中島　淳
(74)代理人　100084995
弁理士　加藤　和詳
(74)代理人　100085279
弁理士　西元　勝一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】標的細胞の光学に基づく刺激及びそれに対する改変

(57)【要約】
標的細胞を、光を用いて、例えばｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏにて刺激することを、種々の方法及び装置を用いて実施する。一例として、光により活性化する分子をコードする核酸配列を含む、光により活性化する分子を送達するためのベクターが挙げられる。この光により活性化する分子は、例えば全トランスレチナールシッフ塩基の近くの位置への改変、すなわち開状態の持続時間を延ばすこと、を含む。他の態様及び実施形態は、イオンチャネルまたはポンプのための、または細胞において（例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏ環境及びｉｎ　ｖｉｔｒｏ環境において）電流をコントロールするための、システム、方法、キット、組成物及び分子に向けられる。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｃ１２８及びＤ１５６のうち少なくとも１つが置換されている、配列番号１の分子またはその変異体。
【請求項２】
前記置換が、Ｔ、Ａ及びＳのうち１つによるＣ１２８の置換を含む、請求項１に記載の分子。
【請求項３】
前記置換が、ＡによりＤ１５６を置換することを含む、請求項１に記載の分子。
【請求項４】
Ｅ１２３における置換をさらに含む、請求項１に記載の分子。
【請求項５】
Ｈ１３４における置換をさらに含む、請求項１に記載の分子。
【請求項６】
Ｃ１２８及びＤ１５６のうち少なくとも１つが置換されている、配列番号１の分子をコードする配列またはその変異体。
【請求項７】
前記置換が、Ｔ、Ａ及びＳのうち１つによるＣ１２８の置換を含む、請求項６に記載の配列。
【請求項８】
前記置換が、Ａ及びＮのうち１つによるＤ１５６の置換を含む、請求項６に記載の配列。
【請求項９】
Ｅ１２３における置換をさらに含む、請求項６に記載の配列。
【請求項１０】
Ｈ１３４における置換をさらに含む、請求項６に記載の配列。
【請求項１１】
Ｃ１２３及びＤ１５１のうち少なくとも１つが置換されている、配列番号２の分子。
【請求項１２】
光応答性イオンチャネルを設計する方法であって、
配列番号１の分子またはその変異体を、Ｃ１２８及びＤ１５６のうち１つ以上の近傍にて改変すること、
を含む方法。
【請求項１３】
前記改変に、Ｔ、Ａ及びＳのうち１つによる、配列番号１のＣ１２８の置換が含まれる、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記改変に、Ａ及びＮのうち１つによる、配列番号１のＤ１５６の置換が含まれる、請求項１２に記載の方法。
【請求項１５】
前記改変に、配列番号１の、ＡによるＤ１５６の置換、及び、ＳによるＣ１２８の置換が含まれる、請求項１２に記載の方法。
【請求項１６】
配列番号１を、Ｅ１２３にて、またはその近傍にて、改変する工程をさらに含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１７】
配列番号１を、Ｈ１３４にて、またはその近傍にて、改変する工程をさらに含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１８】
光応答性イオンチャネルを有する分子を設計する方法であって、

配列番号２またはその変異体を、Ｃ１２３及びＤ１５１のうち少なくとも１つの近傍にて改変すること、
を含む方法。
【請求項１９】
前記改変する工程が、Ｔ、Ａ及びＳのうち１つによる、配列番号２のＣ１２３の置換を含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記改変する工程が、Ａ及びＮのうち１つによる、配列番号２のＤ１５１の置換を含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
Ｃ１２８及びＤ１５６のうち１つ以上の近傍にて発現する改変を有する、ＣｈＲ２またはその相同変異体を発現する核酸配列を送達するためのベクター。
【請求項２２】
前記核酸配列が、Ｅ１２３及びＨ１３４のうち少なくとも１つの近傍にて発現する改変をさらに含む、請求項２１に記載のベクター。
【請求項２３】
神経集団内の神経細胞の固有の神経活動を促進する方法であって、：
前記神経細胞において、配列番号１及び配列番号２のうち１つまたはその変異体に一致し、かつ、Ｃ１２８、Ｄ１５６、Ｃ１２３及びＤ１５１のうち１つ以上の近傍に変異を有する、１つ以上の分子を、設計すること；ならびに、
前記１つ以上の分子を、前記神経集団の固有の神経活動に応答して活動電位の発生を促進するのに十分な、光学的な刺激に曝露すること、
を含む方法。
【請求項２４】
前記光学的な刺激が、前記固有の神経活動からのさらなる刺激の非存在下では活動電位を引き起こすのに十分ではない、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
配列番号１及び配列番号２のうち１つまたはその変異体に一致し、かつ、Ｃ１２８、Ｄ１５６、Ｃ１２３及びＤ１５１のうち１つ以上の近傍に変異を有するアミノ酸をコードする分子を、神経学的障害または中枢神経系障害の治療のための医薬の製造において用いること、
を含む方法であって、前記分子が前記アミノ酸を発現可能であり、それにより、電流を生じさせることにより光に応答して、ニューロンの脱分極をもたらす、方法。
【請求項２６】
配列番号１及び配列番号２のうち１つまたはその変異体に一致し、かつ、Ｃ１２８、Ｄ１５６、Ｃ１２３及びＤ１５１のうち１つ以上の近傍に変異を有する分子をコードする前記分子を含有する生成物を含む、神経学的障害またはＣＮＳ障害の疾患の治療における使用のための組み合わせ調製物としての、アセンブリ。
【請求項２７】
光に対する応答性を有する別のオプシン系分子をさらに含む、請求項２６に記載のアセンブリ。
【請求項２８】
前記生成物が、プロモーター＋光遺伝学的プローブを送達するためのウィルス性の運搬システムを含む、請求項２６に記載のアセンブリ。
【請求項２９】
前記生成物が、プロモーター＋光遺伝学的プローブを運搬するためのアデノ随伴ウィルスを含む、請求項２６に記載のアセンブリ。
【請求項３０】
神経疾患モデルの特徴を決定する方法であって、
配列番号１及び配列番号２のうち１つまたはその変異体に一致し、かつ、Ｃ１２８、Ｄ

１５６、Ｃ１２３及びＤ１５１のうち１つ以上の近傍に変異を有する分子であって、標的とする神経集団において発現し、前記神経疾患モデルに対する公知の治療効果を有する分子、を発現させること；

前記発現した分子を刺激すること；及び

前記刺激の効果または効力を、前記神経疾患モデルの機能として評価すること、

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連書類

本特許文書は、米国特許法（３５　Ｕ．Ｓ．Ｃ．）第１１９条（ｅ）に基づき、２００８年１１月１４日に提出された「Ｓｙｓｔｅｍｓ，　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｔａｒｇｅｔ　Ｃｅｌｌｓ　ａｎｄ　ｆｏｒ　Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ　Ｔｈｅｒｅｔｏ」という発明の名称の米国仮特許出願第６１／１１４，７８１号の利益を主張する。この仮文書は、それとともに提出された付属書類を含むものであり、参照により本明細書にその全体が組み入れられる。

【０００２】

電子的に提出した資料の参照による組み入れ

本明細書と同時に提出された、次に示す通りの、コンピュータで読み取り可能なヌクレオチド／アミノ酸配列表は、参照によりその全体が組み入れられる：２００９年１１月１３日に作成された「ｓｔｆｄ２２５ｐｃｔ＿ＳＴ２５」というファイル名の３１，２９８バイトのＡＳＣＩＩ（テキスト）ファイル１点。

【０００３】

本発明は、一般的には、標的細胞を刺激するためのシステム及びアプローチに関し、また、より具体的には、光学を使用して標的細胞を刺激することに関する。

【背景技術】

【０００４】

数々の有益な効果を生み出すために、身体の種々の細胞への刺激が利用されてきた。刺激方法の１つとしては、外部で発生させた信号を細胞中へと導く電極の使用が挙げられる。電極による脳刺激技術が抱える１つの問題は、ある所定の精神的プロセスに関与するニューロンの分布の性質である。反対に言えば、所定のタスクを実行する間、脳のある領域中の特定の細胞のみが活性化されるよう、異なる種類のニューロンが互いに近く存在するということである。言い換えれば、異種の神経路が並行して密接な空間的領域を通って移動しているだけでなく、それらの細胞体が、それ自身、混在してまばらに埋め込まれた配置で存在していることもある。このプロセシング分布様式のために、中枢神経系（ＣＮＳ）内の規範的秩序（ｃａｎｏｎｉｃａｌ　ｏｒｄｅｒ）を理解しようとする最良の試みは拒まれてしまうようであり、また、神経調節することは困難な治療上の努力を要する。脳のこの構造により、電極で刺激することに対して問題が生じる。それは、電極が、電極が刺激するニューロンの基礎的な生理機能に関して比較的無差別であるためである。代わりに、電極の極の、ニューロンへの物理的近接は、しばしば、いずれのニューロンが刺激されることとなるかを決める最も大きな唯一の要因となる。したがって、電極を使用して刺激をたった１種類のニューロンへと絶対的に限定するということは、一般的に実現不可能である。

【０００５】

刺激するための電極の使用に伴うもう１つの問題は、電極の配置によりいずれのニューロンが刺激されることとなるかが決まることから、機械的安定性は、しばしば不十分となり、電極の、標的領域からの移動を引き起こす、ということである。さらに、体内にてある一定期間が経過すると、電極はしばしばグリア細胞によりカプセル化された状態となり、電極の実効電気抵抗が上昇し、ひいては標的とする細胞に達するのに必要な電力供給量

が増加する。しかしながら、電圧、振動数またはパルス幅の代償的な上昇により、電流が広がり、さらなる細胞への意図しない刺激が増加することがある。

【０００６】

もう１つの刺激方法は、感光性の生体分子構造を利用し、光に応答して標的細胞を刺激するものである。例えば、光により活性化するタンパク質を用いて、細胞膜を通るイオンの流れをコントロールしてもよい。細胞膜を通る陽イオンまたは陰イオンの流れを促進または阻害することにより、細胞を一時的に脱分極させてもよく、または、脱分極させかつその状態で維持してもよく、または過分極させてもよい。ニューロンは、脱分極によって生じる電流を利用して通信信号（すなわち神経インパルス）を発生させる種類の細胞の例である。電気的に興奮性の他の細胞としては、骨格筋細胞、心筋細胞、及び内分泌細胞が挙げられる。ニューロンは、急速な脱分極を利用して、信号を全身に、例えば運動制御（例えば、筋肉の収縮）、感覚応答（例えば、触覚、聴覚、及び他の感覚）及び計算的な機能（例えば、脳機能）などの種々の目的のために伝達する。よって、細胞の脱分極のコントロールは、例えば（これに限定されないが）心理療法、筋肉制御及び感覚機能などの数多くの様々な目的のために有益であり得る。

【０００７】

用途に応じて、電気的な刺激及び／又は電流の流れの応答性の特定の特性が重要であり得る。特性の例としては、光刺激が除去された後の電流の持続時間、光刺激とイオンの流れの開始との間の遅延時間、及びイオンの流れを引き起こす（または阻害する）のに必要な光の強度または波長、が挙げられる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本発明の種々の態様は、上記で論じたような課題に対処するよう、光により活性化するタンパク質に関連する装置、方法及びシステムに関する。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

第一の実施形態例によれば、本発明は、第一波長の光に応答して比較的長いオン時間を生じる階段関数オプシン（ｓｔｅｐ－ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｏｐｓｉｎ；ＳＦＯ）に向けられたものである。これらのＳＦＯは、オフにすることにより第二波長の光にも応答することができ、それにより、双安定スイッチとして機能する。

【００１０】

特定の実施形態によれば、１つ以上のＳＦＯは、神経細胞にて発現した場合には、光開口型（ｌｉｇｈｔ－ｇａｔｅｄ）膜チャネルとして機能する。ＳＦＯの活性化により、神経細胞の膜電圧／静止電位は、細胞の活動電位の閾値に向かって動き（例えば、その細胞が脱分極し）、それによりそこでの活動電位の発生を促進する。

【００１１】

具体的な一実施形態によれば、本発明の態様は、神経病学または中枢神経系（ＣＮＳ）に関連する疾患の特徴付けまたは治療のためのＳＦＯの使用に向けられたものである。特定の態様は、疾患の治療または特徴付けのために、神経集団の、標的とする興奮を提供するための、ＳＦＯの使用に関する。他の態様は、神経回路の特徴付けに関するものであり、また、いくつかの場合においては、行動的な応答に関連していた。

【００１２】

一実施形態によれば、本発明の態様は、オプシンのアミノ酸の変異／置換に向けられたものである。これには、変異オプシンをコードする分子及び／又は変異オプシン自体が含まれる。特定の一例では、これらの実施形態には、オプシンのオン時間及び／又はオンの流れ（ｏｎ‐ｃｕｒｒｅｎｔ）に影響を及ぼす置換が含まれる。例えば、置換は、ＣｈＲ２またはＶＣｈＲ１に対してなされてもよい。特定の一実行形態では、これには、ＣｈＲ２を例とすれば、Ｃ１２８及び／又はＤ１５６における置換が含まれてもよい。相同の置換がＶＣｈＲ１に対してなされてもよい。これらの置換及び他の置換は単独で用いられて

もよく、または組み合わせて用いられてもよい。

【００１３】

もう１つの実施形態によれば、本発明の態様は、神経疾患またはＣＮＳ系疾患の治療のための医薬に向けられたものである。この医薬は、患者に変異オプシンを導入するようデザインされる。この導入されたオプシンは、その後、それに対する光の適用を通して、治療計画の一部として制御されてもよい。

【００１４】

特定の実施形態によれば、本発明の態様は、異なる神経集団内及び／又は同一細胞内における複数のオプシンのタイプの発現に向けられたものである。一実行形態では、これらのオプシンのタイプは、それぞれ、光の振動数／波長に対して異なる応答性を有し、それにより、刺激する光の波長のコントロールによる各タイプの個々のコントロールが可能となる。いくつかの実行形態において、これらのオプシンのタイプは、それぞれ、異なる時間的特性、異なる伝導特性を有し、かつ／または、過分極または脱分極する。

【００１５】

もう１つの実施形態は、障害の治療のための方法に向けられた本発明の態様に関する。当該方法は、ＳＦＯと阻害分子の両方を利用して、ニューロンを選択的に助長または阻害する。当該方法は、障害を伴うニューロン群を標的とするものであり、また、この群において、当該方法には、抑制性電流を生じることにより該ニューロンの脱分極を制止するという光応答を、内因性の補因子を利用して行う、阻害タンパク質／分子を、設計する（ｅｎｇｉｎｅｒｒｉｎｇ）ことが含まれる。当該方法には、同じ群の、及び／又は異なる群の、ニューロンにおけるＳＦＯを設計することも含まれる。この設計されたニューロンは、その後、光に曝露され、それにより、そのニューロンの脱分極が制止及び／又は助長される。

【００１６】

上記概要は、本開示の各実施形態またはすべての実行形態を記述するよう意図されたものではない。以下に続く、図及び発明を実施するための形態は、種々の実施形態をより具体的に例示するものである。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

本発明は、以下に続く本発明の種々の実施形態の詳細な説明を考慮し、次の添付の図面と併せて、より完全に理解することができる。

【００１８】

【図１ａ】高度好塩菌（Ｈ．ｓａｌｉｎａｒｕｍ）由来のバクテリオロドプシン（ＢＲ）に比した、いくつかのチャネルロドプシンのヘリックス３のアライメントを示す。保存された残基は強調表示された背景で示されており、発色団と相互作用するアミノ酸は１０２で示されており、また、ＣｈＲ２のＣ１２８はアスタリスク（＊）で印が付けられている。ＲＳＢの脱プロトン化及び再プロトン化のためのＨ＋供与体または受容体として働くアミノ酸は、１０４で示されている。

【図１ｂ】ＢＲのＤ８５、Ｔ９０、及びＤ１１８がＣｈＲ２のＥ１２３、Ｃ１２８、及びＤ１５６で置き換えわったＢＲのＸ線構造（１ＫＧＢ１３）に基づいたＣｈＲ２の発色団モデルを示す。

【図１ｃ】１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４及び５０ｍＶにて、４５０ｎｍの光パルス、２４０ｍＷｃｍ$^{-2}$に応答した、アフリカツメガエル卵母細胞中で発現したＣｈＲ２野生型（ｗｔ）、Ｃ１２８Ｔ、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓから記録された光電流を示す。示されている時定数は、青色光刺激の終了後の電流の減衰に対するものである（平均値±ｓ．ｅ．ｍ．；ｎ＝各トレースについて３個の細胞）。

【図１ｄ】低光強度にて記録した定常状態の光電流の光依存性を示す。Ｃ１２８Ａ及びＳを発現する細胞は、ｗｔのＣｈＲ２を発現する細胞よりも約３００倍感受性が高い。振幅は、飽和光における応答に正規化した（Ｉ／Ｉ飽和）。

【図１ｅ】Ｃ１２８Ａ変異体及びＣ１２８Ｓ変異体から記録した光電流を示す。オフの動

態は、より長い波長を有する第二（オフ）光パルスが興奮（オン）パルスに続いた場合に、加速した（トレース：５３０ｎｍ；５４６ｎｍ；５７０ｎｍ；６００ｎｍ）。
【図１ｆ】Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓを発現する卵母細胞における、４５０ｎｍ及び５４６ｎｍの光パルス（オフのパルス）を交互に発した場合、または４５０ｎｍの光パルスのみを発した場合（オフのパルスなし）の応答を示す。上部及び下部のバーは、それぞれ、交互の青色／緑色（オン／オフ）及び青色のみ（オンのみ）のトレースに対する光刺激プロトコルを示している。
【図２ａ】αＣａＭＫＩＩプロモーターの制御下でｗｔのＣｈＲ２、Ｃ１２８Ｓ、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｔを発現する、培養した海馬ニューロンの共焦点画像を示す。ここでは、強度スケーリング及びピクセルサイズはすべての画像において同一であり、スケールバーは２５μｍである。
【図２ｂ】ｗｔのＣｈＲ２及び変異体を発現するニューロンから記録した光電流の概要を示し、これらは平均値±ｓ．ｅ．ｍとして示される（ｗｔ、Ｃ１２８Ｓ、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｔについて、それぞれ、ｎ＝８、１１、９及び１０）。細胞は、４７０ｎｍの青色光の１０ミリ秒の１回のパルスで刺激した。
【図２ｃ】ＣｈＲ２変異体により誘発される脱分極を示す。電圧の記録は、Ｃ１２８Ｓ、Ａ及びＴを発現するニューロンにて、図２ｂと同一の刺激プロトコルの間に行った。ピーク脱分極レベルは、Ｃ１２８Ｓ、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｔについて、それぞれ、３個、７個及び７個の細胞から平均した。
【図２ｄ】種々の長さの４７０ｎｍの光パルスに応答した、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓ変異体における脱分極の概要を示す（データは、各パルス長について少なくとも３個の細胞から平均されている）。
【図２ｅ】ｗｔのＣｈＲ２、Ｃ１２８Ｓ、Ｃ１２８Ａ、及びＣ１２８Ｔを発現するニューロンにおける４７０ｎｍの青色光の１０ミリ秒のパルスにより誘発された光電流の拡大図を示す。これは、これら変異体のより低いオンの動態を示している。
【図２ｆ】１０ミリ秒の青色光刺激に応答したオンの動態の概要を示す。電流トレースへの指数関数フィット（ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ　ｆｉｔ）からの平均の時定数が示されており、；その一方、Ｃ１２８Ｓ及びＣ１２８Ａのオンセットの（ｏｎｓｅｔ）動態は、図２ｅのトレースが類似しており、Ｃ１２８Ｓは、典型的には、ここに概略されているＣ１２８Ａよりも低かった。
【図２ｇ】Ｃ１２８変異体における、光電流のより低い減衰の時定数を示す。トレースは、各変異体においてピーク光電流に正規化されている。
【図２ｈ】Ｃ１２８変異体におけるオフの動態の概要を示す。平均の時定数は、指数関数フィットから導き出した。
【図３ａ】αＣａＭＫＩＩプロモーター下でＣ１２８Ｓを発現する培養ラット海馬ニューロンからの細胞全体の電流固定記録（ｗｈｏｌｅ－ｃｅｌｌ　ｃｕｒｒｅｎｔ　ｃｌａｍｐ　ｒｅｃｏｒｄｉｎｇ）を示す。閾値下の脱分極（ｓｕｂ－ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ　ｄｅｐｏｌａｒｉｚａｔｉｏｎ）は、４７０ｎｍの光の１０ミリ秒の１回のパルス（上のトレース；囲み表示されていないダッシュ記号（ｕｎｂｏｘｅｄ　ｄａｓｈ）は刺激の時間を示している）により、または４７０ｎｍの光の５ミリ秒の２０回のパルスからなる一連の１００Ｈｚのトレーン（ｔｒａｉｎ）（下のトレース、各トレーンは囲み表示されていないダッシュ記号で示されており、囲み表示されているダッシュ記号（ｂｏｘｅｄ　ｄａｓｈ）は緑色光を示している）により、誘発した。
【図３ｂ】４７０ｎｍと５３５ｎｍとの光刺激の対により刺激した、Ｃ１２８Ｓを発現する海馬ニューロンからの細胞全体の電流固定記録を示す。上のトレースは、１０ミリ秒の青色光（囲み表示されていないダッシュ記号）及び１０ミリ秒の緑色光（囲み表示されているダッシュ記号）への応答を示しており、下のトレースは、１０ミリ秒の青色光及び５０ミリ秒の緑色光への応答を示している。刺激の対と対との間隔は２０秒であり、刺激の各対内の間隔は５秒であった。
【図３ｃ】５０ミリ秒の緑色光による完全な不活性化を示す図３ｂ中の下の刺激対から拡

大したトレースを示す。静止膜電位は破線で示されている。
【図３ｄ】左が、事前に記録したＥＰＳＰトレースで刺激したＣ１２８Ａを発現する海馬ニューロンからの細胞全体の電流固定記録を示す。
【図４ａ】ＣｈＲ２、ＣｈＲ２（Ｃ１２８Ａ／Ｈ１３４Ｒ）、ＶＣｈＲ１及びＶＣｈＲ１（Ｃ１２３Ｓ）の励起スペクトルを示しており、また、特に、図４ｂは、ＣｈＲ２（Ｃ１２８Ａ／Ｈ１３４Ｒ）が、ＶＣｈＲ１（Ｃ１２３Ｓ）に比してシフトしたスペクトルを維持していることを示している。
【図４ｂ】ＣｈＲ２（Ｃ１２８Ａ／Ｈ１３４Ｒ）及びＶＣｈＲ１（Ｃ１２３Ｓ）の不活性化スペクトルを示しており、また、特に、図４ｂは、ＣｈＲ２（Ｃ１２８Ａ／Ｈ１３４Ｒ）が、ＶＣｈＲ１（Ｃ１２３Ｓ）に比してシフトしたスペクトルを維持していることを示している。
【図４ｃ】ＶＣｈＲ１のＳＦＯ及びＣｈＲ２の機能獲得型（ｇａｉｎ－ｏｆ－ｆｕｎｃｔｉｏｎ；ＧＦ）ＳＦＯ（Ｃ１２８Ａ／Ｈ１３４Ｒ）についての、ピーク電流の大きさならびにオン及びオフの動態（例えば、初期光から、対応するこれらチャネルの（非）活性化までの時間）を示す。
【図５ａ】ＣｈＲ２（Ｃ１２８Ａ／Ｈ１３４Ｒ）を発現する細胞からの電流記録を示しており、特に、ゆっくりベースラインへと減衰する、１０ミリ秒のオン／青色光パルスに応答した２００ｐＡの光電流を示している。
【図５ｂ】図５ａと同一の細胞からの電圧記録を示しており、１０ミリ秒の４７０ｎｍの光（オン／青色のパルス）と１００ミリ秒の５６０ｎｍの光（オフ／緑色のパルス）との対の繰り返し供給に対するこの細胞の応答が示されている。
【図６】ＣｈＲ２（Ｃ１２８Ｓ／Ｄ１５６Ａ）を発現する細胞における電流記録を示しており、オンのパルスに応答した遅い動態が示されている。
【００１９】
本発明は種々の改変及び代替形態を受け入れることが可能であるが、その具体例は、これら図面において、例を挙げて示してきた。また、以下、詳細に説明する。しかしながら、その意図は、本発明を、記載した特定の実施形態へと限定するものではないと理解されるべきである。反対に、その意図は、本発明の精神及び範囲の範囲内に収まるすべての変形、代替物、及び代替をカバーしようというものである。
【発明を実施するための形態】
【００２０】
本発明は、種々の感光性の生体分子構造の実際の適用を促進するために有用であると考えられ、また、本発明は、特に、細胞膜の電圧コントロール及び刺激を扱う集成装置（ａｒｒａｎｇｅｍｅｎｔ）及び方法における使用に適しているということが分かっている。本発明は、必ずしもこのような用途に限定されるわけではない。本発明の様々な態様は、この背景を用いた種々の例に関する考察を通して理解され得るものである。
【００２１】
本発明の一実施形態例に一致させて、光応答性タンパク質／分子を、細胞にて設計する。このタンパク質は、光に応答して、細胞膜を横切るイオンの流れに影響を及ぼす。イオンの流れのこの変化により、、細胞において対応する電気的性質（例えば、細胞膜を横断する電圧及び電流の流れ）に、変化が生じる。１つの例においては、このタンパク質は、内因性の補因子を利用してｉｎ　ｖｉｖｏにて機能し、細胞膜を横切るイオンの流れを変更する。他の例においては、このタンパク質は、その細胞における活動電位発火（ａｃｔｉｏｎ　ｐｏｔｅｎｔｉａｌ　ｆｉｒｉｎｇ）を制止するよう、細胞膜を横断する電圧を変化させる。さらにもう１つの例においては、このタンパク質は、その細胞の電気的性質を、光の導入の数ミリ秒以内に変化させる能力を有する。本発明の実施形態は、このような、光により活性化するタンパク質／分子を、特異的に変異させることに関する。これらの変異には、当該タンパク質内の１つ以上のアミノ酸の置換が含まれ、それにより、本明細書において提示された実験データにより証明されるような驚くべき結果が生じる。これらの置換は、タンパク質／分子をコードするヌクレオチド配列を改変することにより実施

されてもよい。特定の実行形態は、哺乳類の神経細胞における発現のために、このヌクレオチド配列をデザインすることに関する。

【００２２】

このようなタンパク質の送達に関する詳細については、２００６年７月２４日に提出された「Ｌｉｇｈｔ‐Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃａｔｉｏｎ Ｃｈａｎｎｅｌ ａｎｄ Ｕｓｅｓ Ｔｈｅｒｅｏｆ」という発明の名称を有する米国特許出願第１１／４５９，６３６号を参照してもよく、この文献は、参照により本明細書にその全体が組み入れられる。

【００２３】

本発明の特定の実施形態の態様は、光開口型チャネルの特定の部分の同定及び改変に向けられたものである。これらの改変には、このチャネルの鍵になる部分を同定することが含まれる。このチャネルは、このチャネルの三次構造の高分解能イメージングにより同定されてもよい。あるいは、類似のチャネルの構造に関する知識を用いてもよい。以下の説明は、ある具体的な実験的実行形態及び方法論の詳細を提示するものである。本発明は、いずれか１つの実行形態に限定されるものではなく、また、本明細書における教示に一致する様々な位置における数多くの様々な分子改変について行われ得る。

【００２４】

本発明の具体的な態様は、神経科学に適した微生物のオプシン遺伝子に関するものであり、これは、無処理の哺乳類の脳内の特定の細胞型において、光パルストレーンをミリ秒のタイムスケールの膜電位変化へと変換することを可能にするものである（例えば、１つの例が配列番号１として提示されているチャネルロドプシン（ＣｈＲ２）、１つの例が配列番号２として提示されているボルボックスのチャネルロドプシン（ＶＣｈＲ１）、及び、１つの例が配列番号３として提示されているハロロドプシン（ＮｐＨＲ））。ＣｈＲ２は、単細胞緑藻である緑藻クラミドモナス（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）由来のロドプシンである。本明細書において用いられる「ロドプシン」という語は、少なくとも２つの構成ブロック（ｂｕｉｌｄｉｎｇ ｂｌｏｃｋ）、すなわち、オプシンタンパク質と、共有結合した補因子（通常はレチナール（レチナールデヒド）である）と、を含むタンパク質を指す。ロドプシン（ＣｈＲ２）は、もともとはクラミドモナスゲノム中のクラミオプシン（Ｃｈｌａｍｙｏｐｓｉｎ）‐４（Ｃｏｐ４）という名前であったチャネルオプシン‐２（Ｃｈｏｐ２）というオプシンに由来するものである。１つの脱分極チャネルロドプシンであるＣｈＲ２の時間的特性としては、活性化及び不活性化が速いという動態が挙げられる。これにより、タイミングが正確な活動電位トレーン（ｔｒａｉｎ）の発生がもたらされる。長いタイムスケールの活性化を求める用途に対しては、このチャネルロドプシンの通常は速いオフの動態を遅くすることが可能であることが見出されている。例えば、チャネルロドプシンの特定の実行形態では、事実上、脱分極が望まれる全時間にわたり、１ｍＷ／ｍｍ２の光が適用される。これは、望ましいよりも少なくてもよい。

【００２５】

本明細書における考察の多くは、ＣｈＲ２に向けられたものである。別途明示されていない限り、本発明には、数多くの類似の変異体が含まれる。例としては、Ｃｈｏｐ２、ＣｈＲ２‐３１０、Ｃｈｏｐ２‐３１０、及び、１つの例が配列番号２として提示されているボルボックスのチャネルロドプシン（ＶＣｈＲ１）、が挙げられるが、これらに限定されない。ＶＣｈＲ１に関するさらなる詳細については、「Ｒｅｄ－ｓｈｉｆｔｅｄ ｏｐｔｏｇｅｎｅｔｉｃ ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ：ａ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｆａｓｔ ｎｅｕｒａｌ ｃｏｎｔｒｏｌ ｄｅｒｉｖｅｄ ｆｒｏｍ Ｖｏｌｖｏｘ ｃａｒｔｅｒｉ」、Ｎａｔ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ. Ｊｕｎｅ ２００８，１１（６）：６３１‐３. Ｅｐｕｂ ２００８ Ａｐｒ ２３、を参照してもよく、これは、参照により本明細書にその全体が組み入れられる。他の実行形態では、類似の改変を、他のオプシン分子に対して行ってもよい。例えば、改変／変異を、ＣｈＲ２またはＶＣｈＲ１変異体に対して行ってもよい。さらに、その改変した変異体を、例えば、これに限定されるものではないが、配列番号３～１３の配列に一致する分子などの、光により活性化するイオンポンプと組み

合わせて用いてもよい。

【００２６】

本発明の実施形態には、天然に存在する配列の、比較的マイナーな（ｍｉｎｏｒ）アミノ酸変異体が含まれる。１つの例においては、これら変異体は、天然に存在する配列のタンパク質配列に対して約７５％よりも大きく相同である。他の変異体においては、その相同性は約８０％よりも大きい。さらに他の変異体は、約８５％よりも大きいか、９０％よりも大きいか、またはさらには約９３％～約９５％と同等の高さか、または約９８％の、相同性を有する。この文脈における相同性とは、配列類似性または同一性を意味するが、同一性の方が好ましい。この相同性は、当該分野において公知の標準的な技術を用いて決定してもよい。本発明の実施形態の組成物には、本明細書において提示されるタンパク質及び核酸配列が含まれるが、例えば、その提示された配列に対する相同性が約５０％より大きいか、その提示された配列に対する相同性が約５５％より大きいか、その提示された配列に対する相同性が約６０％より大きいか、その提示された配列に対する相同性が約６５％より大きいか、その提示された配列に対する相同性が約７０％より大きいか、その提示された配列に対する相同性が約７５％より大きいか、その提示された配列に対する相同性が約８０％より大きいか、その提示された配列に対する相同性が約８５％より大きいか、その提示された配列に対する相同性が約９０％より大きいか、または、その提示された配列に対する相同性が約９５％より大きい、変異体、が挙げられる。

【００２７】

本明細書で用いられているように、一般的には、標的細胞の刺激を用いて、その細胞の性質の改変を説明する。例えば、標的細胞の刺激は、その標的細胞の脱分極または分極を引き起こすことができるような細胞膜の性質の変化をもたらすものであってもよい。特定の１つの例においては、当該標的細胞はニューロンであり、当該刺激は、ニューロンによるインパルス（活動電位）の発生を促進または阻害することにより、インパルスの伝達に影響を及ぼす。

【００２８】

本発明の具体的な一実施形態は、光の、短い１回のパルスによりゲートが開閉して活性状態になり、それと同時に、その光パルスよりも有意に長いある期間にわたり活性状態が維持される、双安定の（例えば、光学的な刺激の非存在下で長期化された伝導状態及び非伝導状態を有する）チャネルロドプシンの産生に関する。そのようなチャネルロドプシンは、光のデルタ関数を効率的に処理して、膜電位の階段関数にする。これらの及び他の特性は、外因性の化学的な補因子が望ましくない用途（例えばｉｎ　ｖｉｖｏでの用途）など、長いタイムスケールの、神経調節性の、開発上の、及び前臨床／臨床の用途に特に有用であり得る。

【００２９】

本発明の特定の実施形態の態様は、特に、脱分極の終了のオフセット（ｏｆｆｓｅｔ）が、当該引き金となった光パルスの終わりから有意に遅延する場合の、結果として生じる安定な脱分極の、指定した時間における、コントロールされた終了、に向けられたものである。例えば、オプシンの活性化により、ニューロンの膜の静止電位が、活動電位の閾値電圧に向かって一時的にシフトし、それによりそこでの活動電位が上昇し得る。その同じオプシンの非活性化により、その活動電位は「正常な」静止電位へと回復する。この不活性化は、適切な振動数及び強度の光学的な刺激によって行われてもよい。

【００３０】

本発明の実施形態は、ＣｈＲ２の１つ以上の改変により、そのタンパク質残基に、そのチャネルの動態に影響を及ぼす様式で、影響を及ぼすことに関する。本発明の実施形態は、光開口型チャネル及びポンプに対する改変のホスト（ｈｏｓｔ）を生じさせるための機構を提供する。その三次構造が高分解能で入手可能な、例えば原核生物のプロトンポンプバクテリオロドプシン（ＢＲ）などの、類似したチャネル／ポンプとの配列比較を用いて、改変のための位置を同定する。例えば、微生物ロドプシンにおける７つの推定上の膜貫通ヘリックスに関するＢＲからの推論によると、ヘリックス３は、当該全トランスレチナ

ールシッフ塩基（ＲＳＢ）発色団と相互作用する可能性のあるほとんどのアミノ酸を含有し、それ故に、チャネルの開閉を支配している可能性があるということが指し示された。これらのアミノ酸のうちの多くがチャネルロドプシンにおいて保存されており（図１ａ）、これは、非伝導状態と伝導状態との相互変換を支配するＲＳＢスイッチも高度に保存されているということを暗示するものである。したがって、当該ＲＳＢに干渉する変異は、色の調整に対してだけでなく、変化する動態及び伝導状態の蓄積に対しての、可能性のある候補である。当該ＲＳＢと相互作用するアミノ酸のうち、ＢＲとＣｈＲ２との間の最も目立つ配列の差は、ＢＲのＴｈｒ９０に相当する、ＣｈＲ２のＣｙｓ１２８残基である。高分解能Ｘ線結晶学では、ＢＲ中のＴｈｒ９０が、当該プロトン化されたＲＳＢのＣ１１／Ｃ１２炭素の近くに位置するということが示されてきた（図１ｂ）。ＢＲにおいてＴｈｒ９０をＡｌａまたはＶａｌへと変異させることにより、チャネルの動態が遅くなり、また、Ｍ及びＯの光サイクル状態の蓄積がもたらされる。よって、本発明の実施形態は、チャネルの動態をコントロールするためのＣ１２８の改変に関する。

【００３１】

一実行形態例では、チャネルロドプシンを、Ｃ１２８をＴｈｒ、Ａｌａ、またはＳｅｒで置き換えることにより改変する。ＣｈＲ２‐Ｃ１２８Ｔ、ＣｈＲ２‐Ｃ１２８Ａ、及びＣｈＲ２‐Ｃ１２８Ｓは、アフリカツメガエルの卵母細胞において発現し、また、４７０ｎｍの青色光のパルスに応答した光電流を記録した。驚いたことに、これらの改変によって、光刺激が終わった後に当該チャネルが閉じるのが、劇的に遅くなった（３～４桁）。したがって、これらの遺伝子を、以下、階段関数オプシン（ＳＦＯ）遺伝子と称する。野生型（ｗｔ）のＣｈＲ２についての１１．９±０．３ミリ秒である閉鎖時時定数（ｃｌｏｓｉｎｇ ｔｉｍｅ ｃｏｎｓｔａｎｔ）に比して、光の除去後の閉鎖時時定数（ｔｉｍｅ ｃｏｎｓｔａｎｔ ｆｏｒ ｃｌｏｓｕｒｅ）は、Ｃ１２８Ｔ、Ｃ１２８Ａ、及びＣ１２８Ｓ変異体について、それぞれ、２．０±０．５秒、５２±２秒、及び１０６±９秒にて測定されたが、これは、伝導状態の存続期間が大幅に長期化されることを明らかにするものであった（図１ｃ）。ある所定の光強度における光電流の振幅は、新たな開状態の動員（ｒｅｃｒｕｉｔｍｅｎｔ）と閉鎖状態への遷移とのバランスにより設定されるので、開状態の蓄積が増加しているのを、より低い光レベルにおける応答性の効率的増加の観点から試験した。定常光電流の光強度依存性は、増加する強度の光パルスに対する応答を記録することによって決定した。その結果は、飽和光パワーにおける応答に正規化した（図１ｄ）。Ｃ１２８Ｓ及びＣ１２８Ａを発現する細胞は、ｗｔのＣｈＲ２を発現する細胞よりも少なくとも３００倍低い強度の光に対して応答性であった。これにより、これらＳＦＯの驚くべきもう１つの特性が明らかとなった。

【００３２】

本発明の態様には、時間的に正確なＳＦＯ電流の停止方法が含まれる。チャネル開状態を反映するＣｈＲ２スペクトル中間体は、暗状態Ｐ４７０に比して赤方にシフトしている５２０ｎｍ（Ｐ５２０）付近を最大限に吸収する。この光中間体（ｐｈｏｔｏ‐ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅ）には、光反応が起こり得、開状態の間に適用した短時間の緑色光のフラッシュにより、時期尚早にチャネルが閉じる。この光中間体は通常は存続期間がとても短いために光化学的な逆反応を効率よく利用することはできないが、これらＣ１２８変異体においてはＰ５２０の存続期間が長期化されているため、当該双安定スイッチを切るための緑色光の使用が可能となる。実際に、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓの不活性化の動態は、より長い波長の第二の光パルスが励起パルスの後に続いた場合に、大きく加速した（図１ｅ、ｆ）。５３０ｎｍの光は「オフの」動態の最も高い加速度を示したが、電流は、暗状態によるこの波長のかなりの量の吸収に起因してゼロをはるかに超えるレベルへと低下した（図１ｅ）。より長い波長の光では、Ｐ４８０によるより低い吸収に起因して、より遅いがより完全な不活性化が示され（ΣＰ５２０のΣＰ４８０に対する比が改善され）、また、５４６ｎｍの光のパルスは、速い完全な不活性化に最適であることが分かった。４５０ｎｍの光と５４６ｎｍの光とを交互に用いることにより、ランダウンなく、可逆的なオン‐オフのスイッチングが可能となり、それにより、ＳＦＯの、速い双安定スイッチン

グ機構が決定された（図１ｆ）。

【００３３】

この、新規の特性の集まりは、これらのチャネルの、複数の次元にまたがる量的な特性の進化における数桁の進歩を示す。多くのオプシン（例えば、チャネルオプシン‐１すなわちＣｈＲ１）は、ニューロン中で発現しない。しかしながら、驚くべきことに、当該３つのＳＦＯ遺伝子（Ｃ１２８Ｔ、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓ）は、ＣａＭＫＩＩαプロモーターにより駆動するレンチウィルスベクターを用いて、海馬ニューロンにおいて、ＥＹＦＰ融合物として発現させることができた。この３つの変異体を発現するニューロンは、ＣｈＲ２‐ＥＹＦＰ（図２ａ）と同様の細胞内分布を示し、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓは、量的に減少したレベルで発現したようであった。４７０ｎｍの光の１０ミリ秒のパルスにより誘発された光電流を記録した。Ｃ１２８Ｔにおいて記録されたピーク光電流は、野生型のＣｈＲ２に類似していた（それぞれ、１８４±３４ｐＡ及び２４０±５９ｐＡ；それぞれ、ｎ＝１０個の細胞及び８個の細胞；図２ｂ）が、一方、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓは、実際に、より小さい光電流振幅を示した（それぞれ、７４±１７ｐＡ及び６１±９ｐＡ；それぞれ、ｎ＝１１個の細胞及び９個の細胞；図２ｂ）。しかしながら、１０ミリ秒までの短時間のフラッシュは、すべての場合において、Ｃ１２８Ａ／Ｓについて、ほぼ最大の電流（図２ｂ）及び電圧変化（図２ｃ、ｄ）を誘発した。これは、暗状態及び伝導状態の平衡が、ある所定の光強度において、数ミリ秒以内に達成されたということを暗示するものである。３つの変異体すべてにおいて、オンの動態（光の第一の適用後のチャネルの応答時間）は、速いままであり、ｗｔのＣｈＲ２よりもわずかに遅いのみであった（ＣｈＲ２、Ｃ１２８Ｔ、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓについて、それぞれ、τ_{on}＝１．７±０．１ミリ秒、１１．６±１．５ミリ秒、７．２±０．８ミリ秒及び２０±１．４ミリ秒；図２ｆ）。卵母細胞のデータに一致して、変異体の光電流は、光の除去後、その差が４桁以下である、より遅い動態を示して減衰した（ｗｔのＣｈＲ２、Ｃ１２８Ｔ、Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓについて、それぞれ、τ_{off}＝１０±０．８ミリ秒、１．８±０．３秒、４９±３．５秒及び１０８±４２秒；図２ｈ）。これらの結果は、階段関数特性がニューロンにおいて保存されていた、ということを示している。

【００３４】

ニューロン中のこれら変異チャネルの、短い光パルスに応答して、長期化された可逆的な膜の脱分極を生じさせる能力について検査した。その結果を図３に示す。Ｃ１２８Ｓを発現するニューロンでは、青色光（４７０ｎｍ）の１０ミリ秒の１回のフラッシュにより、著しく長期化された閾値下の脱分極を誘発することができ（図３ａ、上のトレース）、また、１５秒おきに、たった１回の１０ミリ秒の光パルスからなる長期的な刺激プロトコルにより、５３５ｎｍの光の１回のパルスで迅速に停止し得る数分間にわたる持続性の安定した脱分極が可能となった（図３ａ、下のトレース）。実際に、青色及び緑色の刺激の対を用いて、複数の正確な階段を、同一のニューロンにおいて確実に送達及び停止することができた（図３ｂ）。最適な不活性化は、５３５ｎｍの光の５０ミリ秒の１回のパルスで生じることが分かった（図３ｂ及び３ｃ中の上のトレースと下のトレースとを比較。Ｐ５２０からＰ４８０への遷移に対する低下した量子効率に一致）。同時に、これらのデータは、ニューロンにおける双安定スイッチング挙動を示すものである。

【００３５】

Ｃ１２８ＡまたはＣ１２８Ｓ発現ニューロンの、光刺激によって誘発される安定した閾値下の脱分極は、（ＷＴのＣｈＲ２のように）タイミングが正確なスパイクトレーンを駆動するのに特に有用であり得、また、長期的に上昇した興奮性（ｅｘｃｉｔａｂｉｌｉｔｙ）を送達し、調節された状態またはアップ状態（ＵＰ　ｓｔａｔｅ）（興奮性及び情報スループットを調節する閾値下の５～１０ｍＶの階段上の脱分極）を模倣するのにも特に有用であり得、また、遺伝学的に標的とされたニューロンの、天然の、内因性のシナプス入力に対する感受性を効率的に高めるのに特に有用であり得る。特定の実行形態では、これらの性質により、あるニューロン型の因果関係上の重要性を検査することが容易になる。これは、特定の細胞型がその機能を果たす際の神経スパイクコードが未知であることが

神経科学者にはしばしばあるが、ＳＦＯ遺伝子を発現させ、図３ｄに図示されているように、それらの細胞を通る情報の流れの天然のパターン／固有のパターンを安定かつ可逆的に増強することにより、その細胞型の因果関係上における十分条件を検査することが可能であり得ることによる。

【００３６】

図３ｄは、左が、Ｃ１２８Ａを発現する海馬ニューロンの、細胞全体の電流固定記録を示したものである。天然の興奮性シナプス後電位（ＥＰＳＰ）トレーンを、電流固定記録により、形質導入されていない海馬錐体ニューロンにて収集し、また、２０秒の「アップ状態」が青色光パルス（１０ミリ秒、４７０ｎｍ）によって誘発され、緑色光パルス（５０ミリ秒、５３５ｎｍ）によって停止される前、間、及び後に、そのＥＰＳＰトレーンを、Ｃ１２８ＡまたはＣ１２８Ｓを発現する細胞中で再現した（図３ｄ）。当該アップ状態の前または後では、ＥＰＳＰトレーンはスパイク発生をほとんど生じなかった（２０秒中３±１．１個のスパイク）が、その一方、アップ状態の間には、同一のＥＰＳＰトレーンが、大きく増加したスパイク発生を誘発した（その２０秒の間に１７±３．５個のスパイク；９／９個の細胞でスパイク発生が増加した。ｔ検定：ｐ＝０．０００６）。これは、実験者が正確に定義し得る長いタイムスケールで、実施最中のシナプス活動に対するニューロンの感受性を高める、神経調節性の、またはアップ状態様の光刺激に、これらのＳＦＯ遺伝子を使用することができる、ということを示すものであった。

【００３７】

より具体的には、前期記録されたＥＰＳＰトレースは、５つの同一ブロック（一番下の２つの線）で送達された。ブロック１、３、及び５においては、４７０ｎｍ（オンのパルス）と５３５ｎｍ（オフのパルス）の光刺激の対（それぞれ、１０ミリ秒、５０ミリ秒；それぞれ、囲み表示されているダッシュ記号、囲み表示されていないダッシュ記号で記載されている）が送達され、閾値下の脱分極が誘発された。ブロック２及び４においては、光は送達されなかった。図３ｄの右は、光あり、及び光なしの際のＥＰＳＰに対する応答の拡大図（破線で囲われた黒い四角を重ね合わせたもの）を示しており、光によって誘発されたＥＰＳＰ刺激に対するスパイク発生の増加を示している（下のトレース）。

【００３８】

当該Ｃ１２８Ａ及びＣ１２８Ｓプローブは、神経回路を操作するのに有用なプロパティーを提供する。新規の基礎科学用途を可能にすることに加えて、必要な光が低減されていることは、前臨床及び臨床実験における光学的なハードウェア要件に関して特に有用であり、電源の消費（ｐｏｗｅｒ　ｄｒａｗ）、加熱、及び、長期的な光毒性の危険性、が減少する。さらなる拡張としては、より低いエネルギーの光子でより大きな容量の組織を動員するための赤方にシフトしたＶＣｈＲ１型、及び、ｅＮｐＨＲのような膜輸送増加させるための分子改変、が挙げられる。安定性と光応答性との両方における数桁分の改善は、チャネルロドプシンの正確なオン／オフのスイッチング及び化学的補因子非依存性と共に、協同して、哺乳類の神経回路に関する基礎研究及び前臨床／臨床研究の両方にとって鍵となるプロパティーの一群を提供する。

【００３９】

本発明の実施形態は、ＣｈＲ２における他の部分の改変を含む。上述のようにして、その性質の特徴決定を行ってもよい。例えば、Ｃ１２８の近傍になされた改変は、本発明の範囲内に入る。他に考えられるものとしては、Ｅ１２３及びＨ１３４における改変、該改変とＣ１２８における改変との組み合わせ、Ｅ１２３及びＨ１３４の近傍における改変、該改変とＣ１２８の近傍における改変との組み合わせ、Ｅ１２３及びＨ１３４における改変とＣ１２８の近傍における改変との組み合わせ、Ｅ１２３及びＨ１３４の近傍における改変とＣ１２８における改変との組み合わせ、が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４０】

特定の一実行形態は、Ｃ１２８ＡまたはＣ１２８Ｔの変異を伴うＨ１３４Ｒ変異に関する。これらの変異によりコンダクタンスが増強され、一方、本明細書において言及した変異体に一致する時定数も得られる（Ｃ１２８Ａについては４２秒、Ｃ１２８Ｔについては

２．５秒）ことが観察されている。図４ｃに示すように、電流の大きさは、より大きくなるため、ニューロンをスパイク発生の閾値を超えて脱分極させるのに特に有用であり得る。図４ｃでは、ターンオン時間（右上）、光なしでのターンオフ時間（左下）、及び、光に応答したターンオフ時間（右下）、も示されている。

【００４１】

図５は、ＣｈＲ２（Ｃ１２８Ａ／Ｈ１３４Ｒ）を発現する細胞から記録したサンプル電流を示しており、この変異体の活性化に応答したスパイク発生も示されている。図５ａは、ＣｈＲ２（Ｃ１２８Ａ／Ｈ１３４Ｒ）を発現する細胞からの電流記録を示しており、特に、ゆっくりベースラインへと減衰する、１０ミリ秒のオン／青色光パルスに応答した２００ｐＡの光電流を示している。図５ｂは、図５ａと同一の細胞からの電圧記録を示しており、１０ミリ秒の４７０ｎｍの光（オン／青色のパルス）と１００ミリ秒の５６０ｎｍの光（オフ／緑色のパルス）との対の繰り返し供給へのこの細胞の応答が示されている。

【００４２】

本発明の実施形態は、ＣｈＲ１またはＶＣｈＲ１の改変に向けられたものである。図１ａで示されているように、当該改変は、ＣｈＲ２に関して説明された位置と相同な位置に対してなされてもよい。例えば、ＶＣｈＲ１のＣ１２３に対して改変がなされるが、この改変には、Ｔｈｒ、ＡｌａまたはＳｅｒのうち１つによる置換が含まれる。

【００４３】

本発明の他の実施形態によれば、ＣｈＲ２に対する改変／置換は、Ｄ１５６にて、またはその近くでなされる。例えば、二重変異体Ｃ１２８Ｓ／Ｄ１５６Ａは遅い閉鎖動態を有するということが、実験結果により示されてきた。培養細胞からの記録では、青色光の１０ミリ秒の１回のフラッシュが引き金となった電流は、１３分の記録の後に、その最初の大きさの約９０％へと減衰したのみであった（図６）。この変異体の光感受性は、これまでに検査されたすべてのＳＦＯよりも優れており、また、この変異体は、１μＷ／ｍｍ２までの光の最大光電流に応答し得る。

【００４４】

他の本発明の実施形態には、同じように遅いものの、赤方にシフトしたチャネルを作製するための、ＶＣｈＲ１に対する、類似した変異（１種類または複数種類）が含まれる（例えば、Ｃ１２３Ｓ／Ｄ１５１Ａ）。例えば、ＶＣｈＲ１中のＣ１２３Ｓの置換により、光の除去後のチャネル閉鎖の時定数が約３０秒（図４ｃ）である階段関数オプシンがもたらされ、これは該時定数がおよそ１２０ミリ秒程度である改変されていないＶＣｈＲ１に比して驚くべきものである。

【００４５】

本発明の態様は、（ＣｈＲ２に比して）赤方にシフトしたＶＣｈＲ１の励起（図４ａ）の使用に関する。この赤方シフトは、その比較的長い時定数に関連して、深部組織透過に特に有用であり得る。例えば、ＶＣｈＲ１の階段関数型を用いて、光を、低い強度及び繰り返し率の両方にて送達して、標的とする細胞の長期的な活性化を達成してもよい。もう１つの態様は、ＣｈＲ２及びＣｈＲ２系ＳＦＯからのスペクトル分離に関する（図４ａ、４ｂ）。例えば、改変ＶＣｈＲ１が第一のニューロン集団中で発現し得、その一方で、改変ＣｈＲ２は別のニューロン集団中で発現し得る。そのため、異なる波長の刺激光により、２つの異なるニューロン集団における、興奮性の、デュアル・チャネル制御が可能となり得る。

【００４６】

図６は、本発明の一実施形態に一致する、ＣｈＲ２変異体Ｃ１２８Ｓ／Ｄ１５６Ａの長時間電流記録を示している。ここに示されているように、この変異体は、変異させていないＣｈＲ２及び類似の光応答性チャネルに比して、遅い閉鎖動態を示す。

【００４７】

本発明の実施形態は、それら自体が、広範囲にわたる用途に役立つ。以下、いくつかの例示的用途について論じるが、本発明は、これら具体例に限定されるものではない。これらの例はむしろ、実行形態の例を提示するものであり、また、本発明の態様が、それ自体

、幅広い用途に役立つ、ということを示すものである。

【００４８】

このような用途の１つは、長期化された期間に渡り且つ時間的精度の高い、神経系細胞における固有の活動電位の発生を、促進することに関する。種々の実験結果によって支持されているように、特定のＳＦＯにより、双安定特性を伴う、速いオン／オフのコントロールが可能となる。刺激がニューロンの静止電位を乗り越えるのに十分である場合、固有の神経刺激により、そのニューロンにて活動電位が生じる。そのようなＳＦＯを発現するよう設計された神経集団は、この静止電位の光学的なコントロールを提供し、それにより、自然発生刺激の結果、活動電位の発生が促進される。このコントロールは、特定のＳＦＯが、長期間にわたり持続する速い時間的応答性を有する、という認識により促進され得る。例えば、それらＳＦＯの活性化（伝導応答）は、光学的な刺激の適用後、ミリ秒のオーダーであってもよく、一方、それらＳＦＯはまた、その光学的な刺激が除去された後の数百ミリ秒、またはさらには数百秒、にわたり活性化されたままであってもよい。これは、ＳＦＯの活性化を維持するのに必要な、不利益である可能性のある（例えば、細胞の健康、光学的に発生した熱、及び／又はバッテリー電源の消費（ｂａｔｔｅｒｙ　ｐｏｗｅｒ　ｄｒａｉｎ））光学的な刺激の量を減少させつつ、ＳＦＯの活性化を正確にコントロールするに際して、特に有用であり得る。さらに、種々のＳＦＯは、特定の波長の光に曝露された場合に、比較的速い時間的オフ時間を示した。よって、正確な時間的コントロールは、神経系細胞または神経集団の固有の活動を促進しながら、最小限の光学的な刺激により達成され得る。

【００４９】

本発明のより具体的な一実施形態例に一致させて、さらなる分子、例えばナトロノモナス・ファラオニス（Ｎａｔｒｏｎｏｍｏｎａｓ　ｐｈａｒａｏｎｉｓ）由来のＮｐＨＲなどを、時間的に正確である光学的な神経活動抑制に用いてもよい。ＮｐＨＲにより、速いスパイクトレーン内の単一の活動電位、及び、スパイク発生の、何分間にもわたる持続的な遮断、の選択的な抑制が可能となる。ＮｐＨＲの作用スペクトルは、チャネルロドプシン‐２（ＣｈＲ２）（緑藻クラミドモナス（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）由来）に比して、強く赤方にシフトしているが、同様の光パワーで作動する。また、ＮｐＨＲは、哺乳類において、外因性の補因子なしで機能する。１つの例においては、ＮｐＨＲとＣｈＲ２の両方が標的細胞中で発現してもよい。同様に、ＮｐＨＲ及びＣｈＲ２は、線虫（Ｃ．　ｅｌｅｇａｎｓ）の筋肉及びコリン作動性運動ニューロンを標的として、移動運動を双方向性にコントロールするものであってもよい。この点に関しては、ＮｐＨＲ及びＣｈＲ２は、生きている神経回路についての、マルチモードであり、高速であり、遺伝学的に標的が定められた、全光学的な（ａｌｌ－ｏｐｔｉｃａｌ）調査のための、光遺伝学的システム（ｏｐｔｏｇｅｎｅｔｉｃ　ｓｙｓｔｅｍ）を形成する。

【００５０】

本発明の他の実施形態例によれば、抑制性ニューロンの電流の流れを発生させるための方法には、ニューロンにおいて、抑制性電流を生じることにより該ニューロンの脱分極を制止するという光応答を示すタンパク質を、設計することが含まれる。そのような方法の１つでは、当該タンパク質はハロロドプシンに基づくものであり、また、他の方法では、当該タンパク質は、内因性の補因子を利用する阻害タンパク質である。

【００５１】

他の実施形態例においては、ニューロンの活動電位をコントロールするための方法には、次の工程が含まれる：該ニューロンにおける第一光応答性タンパク質を設計すること；光に応答して、該ニューロン中で、かつ、該第一光応答性タンパク質から、抑制性電流を生じること；該ニューロンにおける第二光応答性タンパク質を設計すること；及び、光に応答して、該ニューロン中で、該第二光応答性タンパク質から励磁電流を生じること。

【００５２】

他の実施形態には、細胞の細胞膜にかかる電圧レベルをコントロールするための方法であって、次のことを含む方法が含まれる：その細胞における第一光応答性タンパク質を設

計すること；その細胞膜にかかる電圧レベルを測定すること；及び、第一波長の光に応答して、かつ、その第一光応答性タンパク質を用いて、その測定された電圧レベルに応答性であるその細胞膜を横切る電流を生じること。

【００５３】

本発明の他の態様は、ｉｎ　ｖｉｖｏにてニューロンの活動電位をコントロールするためのシステムに向けられたものである。このシステムには、運搬装置、光源、及び制御装置が含まれる。この運搬装置は光応答性タンパク質をニューロンへ導入し、この光応答性タンパク質は抑制性電流を生じる。この光源は、当該光応答性タンパク質を刺激するための光を発生させるものであり、また、この制御装置は、この光源による光の発生をコントロールするものである。

【００５４】

より詳細な実施形態では、そのようなシステムをさらに適合させて、当該運搬装置によって、当該光応答性タンパク質が、トランスフェクション、形質導入及びマイクロインジェクションのうちのうち１つにより導入されるようにするか、及び／又は、当該光源により、光が、インプラント型光発生装置及び光ファイバーのうちの１つを介して当該ニューロンへと導入されるようにする。

【００５５】

本発明の具体的な態様は、時間的に正確な、神経活動の光学的抑制のための、古細菌の光駆動クロライドポンプ（例えばナトロノモナス・ファラオニス（Ｎａｔｒｏｎｏｍｏｎａｓ　ｐｈａｒａｏｎｉｓ）由来のハロロドプシン（ＮｐＨＲ）など）の使用に向けられたものである。ＮｐＨＲ系のポンプにより、速いスパイクトレーン内の単一の活動電位のノックアウト、及び、何分間にもわたりスパイク発生を持続的遮断すること、の両方が可能となる。また、このポンプは、ＣｈＲ２またはＶＣｈＲ１に基づくＳＦＯに比べて同様の光パワーにて、ただし、強く赤方にシフトした作用スペクトルで、作動する。このＮｐＨＲポンプは、哺乳類中で、外因性の補因子なしでも機能する。

【００５６】

より詳細な実施形態は、このような技術に広がっている。例えば、本発明の他の態様は、種（例えば、マウス及び線虫（Ｃ．　ｅｌｅｇａｎｓ））の中で、ＮｐＨＲとＳＦＯ（例えば、ＣｈＲ２またはＶＣｈｒ１変異体）とを共発現する。また、ＮｐＨＲ及びＳＦＯは、神経活動の双方向性の光変調及び読出し（ｒｅａｄｏｕｔ）のための哺乳類の脳の急性切片におけるカルシウムイメージングに統合される。同様に、ＮｐＨＲ及びＳＦＯは、線虫（Ｃ．　ｅｌｅｇａｎｓ）の筋肉及びコリン作動性運動ニューロンを標的として、移動運動の双方向性コントロールを提供するものであってもよい。同時に、ＮｐＨＲ及びＳＦＯは、生きている神経回路についての、マルチモードであり、高速であり、遺伝学的に標的が定められた、全光学的な調査のための、完全かつ補完的な光遺伝学的システムとして用いられてもよい。

【００５７】

ＮｐＨＲ、ＣｈＲ２及びＶＣｈＲ１の変異体に加えて、細胞内のイオン流束または二次メッセンジャーを光学的に制御すべく設計可能な数多くのチャネルロドプシン、ハロロドプシン、及び微生物のオプシンが存在する。本発明の種々の実施形態には、そのようなイオンの光学的調節因子の、コドン最適化された、変異させた、切断された（ｔｒｕｎｃａｔｅｄ）、融合タンパク質、標的とされた型、またはそうでなければ改変された型が含まれる。よって、ＣｈＲ２及びＮｐＨＲ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋのアクセッション番号は、当該「哺乳動物化（ｍａｍｍａｌｉａｎｉｚｅｄ）」ＮｐＨＲ配列についてはＥＦ４７４０１８、また、当該「哺乳動物化」ＣｈＲ２（１‐３１５）配列についてはＥＦ４７４０１７である）ならびに変異体は、数多くの種々の実施形態の代表例として使用される。ＳＦＯ、ＣｈＲ２及びＮｐＨＲをを具体的に同定する考察は、本発明を、光学的調節因子のこのような具体的な例に限定することを意味するものではない。前述の配列に関するさらなる詳細については、Ｆｅｎｇ　Ｚｈａｎｇらによる「Ｍｕｌｔｉｍｏｄａｌ　ｆａｓｔ　ｏｐｔｉｃａｌ　ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｎｅｕｒａｌ　ｃｉｒｃｕｉ

ｔｒｙ」、Ｎａｔｕｒｅ（Ａｐｒｉｌ ５，２００７）Ｖｏｌ．４４６：６３３‐６３９、を参照してもよく、この文献は、参照により本明細書にその全体が組み入れられる。本明細書において論じられている様に、これらの配列は、それ故に、所望のチャネル動態を提示するよう改変されてもよい。

【００５８】

本発明の一実施形態例によれば、ｉｎ ｖｉｖｏで標的細胞を刺激するための方法は、感光性イオンチャネル増殖（例えば、ＳＦＯ／ＣｈＲ２系イオンチャネル）を引き起こすことができる遺伝子導入ベクター（例えば、ウィルス）を用いて行われる。当該ベクターは、体の中に植え込まれてもよい。

【００５９】

本発明の特定の一実施形態によれば、タンパク質は、１つ以上の標的細胞に導入される。細胞に導入された場合、そのタンパク質は、ある特定の振動数を有する光に応答して、その細胞の電位を変化させる。これにより、活動電位発火のコントロールに使用可能な、静止電位の変化がもたらされ得る。ある具体例においては、当該タンパク質は、光に応答して、細胞膜を横切って、電荷を移動させるための膜ポンプとして作用するハロロドプシンである。膜ポンプは、電磁エネルギーまたは化学結合エネルギーを膜を横切る特定のイオンの移動のために利用するエネルギー変換器である。ハロロドプシン膜ポンプに関するさらなる情報については、Ｂｒｉｇｉｔｔｅ Ｓｃｈｏｂｅｒｔらによる「Ｈａｌｏｒｈｏｄｏｐｓｉｎ Ｉｓ ａ Ｌｉｇｈｔ‐ｄｒｉｖｅｎ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ Ｐｕｍｐ」、Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｖｏｌ．２５７，Ｎｏ．１７．Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ １０，１９８２，ｐｐ．１０３０６‐１０３１３、を参照してもよく、この文献は、参照により本明細書にその全体が組み入れられる。

【００６０】

当該タンパク質は、細胞の電位を、その細胞の活動電位の引き金となるレベル（ａｃｔｉｏｎ ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｔｒｉｇｇｅｒ ｌｅｖｅｌ）から遠ざけることにより、活動電位の発火を制止する。多くのニューロンにおいて、これは、当該タンパク質により、その細胞膜にまたがって観察される負電圧が増加するということを意味する。ある具体例においては、当該タンパク質は、負に帯電しているクロライドイオンを能動的に細胞中へと移動させるクロライドイオンポンプとして作用する。このようにして、当該タンパク質は、細胞膜を横切る抑制性電流を発生させる。より詳細には、当該タンパク質は、その細胞にかかる電圧を低下させた結果、活動電位または脱分極が生じる可能性が減少することにより、光に応答する。

【００６１】

上記で論じたように、本発明の一実施形態には、細胞中で発現される光学的応答性イオンポンプの使用が含まれる。特定の１つの例では、この細胞は、神経系細胞または幹細胞のいずれかである。具体的な一実施形態には、当該イオンポンプを発現するｉｎ ｖｉｖｏの動物細胞が含まれる。本発明の特定の態様は、時間的に正確な、神経活動の光学的抑制のための、古細菌の光駆動クロライドポンプ、例えばナトロノモナス・ファラオニス（Ｎａｔｒｏｎｏｍｏｎａｓ ｐｈａｒａｏｎｉｓ）由来のハロロドプシン（ＮｐＨＲ）など、の同定及び開発に基づくものである。当該ポンプにより、速いスパイクトレーン内の単一の活動電位のノックアウト、及び、何分間にもわたりスパイク発生を持続的遮断すること、の両方が可能となる。また、このポンプは、ＣｈＲ２系変異体に比べて同様の光パワーにて、ただし、強く赤方にシフトした作用スペクトルで、作動する。このＮｐＨＲポンプは、哺乳類中で、外因性の補因子なしでも機能する。

【００６２】

本発明の一実施形態例によれば、光学的応答性イオンポンプ及び／又はチャネルは、１つ以上の幹細胞、前駆細胞、または幹細胞もしくは前駆細胞の子孫において発現する。光学的な刺激を用いて、発現したポンプ／チャネルを活性化する。この活性化を用いて、その細胞内のイオン濃度（例えば、クロライド、カルシウム、ナトリウム、及びカリウム）

をコントロールしてもよい。これは、生存、増殖、分化、脱分化、またはその細胞における分化の欠如に影響を及ぼすのに特に有用であり得る。よって、光学的な刺激を行って、幹細胞または前駆細胞（の成熟）に対するコントロールを提供する。

【００６３】

特定の一実施形態では、光学的にコントロールされた刺激パターンを、当該幹細胞または前駆細胞に、数時間または数日の期間にわたり適用する。膜電位及びイオン濃度の、そういった細胞への効果に関するさらなる詳細については、Ｋａｒｌ Ｄｅｉｓｓｅｒｏｔｈらによる「Ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ‐Ｎｅｕｒｏｇｅｎｅｓｉｓ Ｃｏｕｐｌｉｎｇ ｉｎ Ａｄｕｌｔ Ｎｅｕｒａｌ Ｓｔｅｍ／Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｎｅｕｒｏｎ（Ｍａｙ ２７, ２００４） Ｎｅｕｒｏｎ, Ｖｏｌ. ４２, ５３５‐５５２、及び、Ｄｅｉｓｓｅｒｏｔｈらによる、２００５年5月１９日に提出された「Ｃｏｕｐｌｉｎｇ ｏｆ Ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎ Ｎｅｕｒａｌ Ｓｔｅｍ／Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」という発明の名称の米国特許公開第２００５０２６７０１１号（米国特許出願第１１／１３４，７２０号）、を参照してもよく、これらの文献は、参照により本明細書にその全体が組み入れられる。

【００６４】

特定の一実施形態では、細胞における分化を駆動する方法を実行する。該細胞は、光により活性化するＮｐＨＲ／ＣｈＲ２系タンパク質を発現させられる。該細胞は、そのＮｐＨＲ／ＣｈＲ２系タンパク質を活性化するべく光に曝露される。この活性化により、その曝露された細胞またはその曝露された細胞の子孫の分化が駆動される。他の実施形態では、当該細胞には、幹細胞が含まれる。

【００６５】

他の実施形態は、障害または回路モデルの治療／評価のための方法に向けられた本発明の態様に関する。そのような方法の１つは、ＳＦＯ及び（ことによると）阻害分子を用いて、ニューロンを選択的に助長または阻害する。この方法は、障害に関係するニューロン群を標的としたものであり、また、該方法には、当該群において、抑制性電流を生じることにより該ニューロンの脱分極を制止するという光応答を行うために内因性の補因子を利用する、阻害タンパク質／分子を、設計することが含まれる。当該方法には、同じ群及び／又は異なる群のニューロンにおいて、ＳＦＯを設計することも含まれる。この設計されたニューロンを、その後、光に曝露させ、それにより、そのニューロンの脱分極を制止及び／又は助長する。次いで、この刺激の推定上の効果を、モニタリングし、評価する。種々の刺激プロファイル及び／又は標的位置について、実行、試験、及び評価してもよい。ＳＦＯの様々なプロパティー（例えば、双安定特性及び速い応答性）は、そのような用途に特に有用であり得る。以下、そのような用途の一部について、より詳細に考察する。

【００６６】

本発明の多くのヒト用途は、それらの使用の前に、政府による承認が必要である。例えば、遺伝子治療のヒト使用には、そういった承認が必要であることがある。しかしながら、ニューロン（新生物になりにくい非増殖性の細胞）における類似の遺伝子治療は急速に進んでおり、ヒトの脳へのウィルス遺伝子運搬に関する活発な、ＦＤＡ承認された臨床試験が既に進行中であり、それにより、本発明の種々の実施形態の、多種多様な用途への使用が促進される。以下は、そういった用途及び実施形態のいくつかの例の非網羅的なリスト（ｎｏｎ‐ｅｘｈａｕｓｔｉｖｅ ｌｉｓｔ）である。

【００６７】

中毒は、報酬（ｒｅｗａｒｄ）及び期待など、様々な脳機能に関係する。加えて、中毒を引き起こす原因は個体間で変動しうる。一実施形態によれば、中毒、例えばニコチン中毒、は、島（ｉｎｓｕｌａ）上の小さな領域の光遺伝学的安定化により治療することができる。所望により、機能的脳イメージング―例えばｃｕｅｄ‐ｓｔａｔｅ ＰＥＴまたはｆＭＲＩ―を用い、島表面上の介入のための正確な標的スポットを決定するべく代謝亢進焦点の位置を決めてもよい。

【００６８】

側坐核及び中隔の光遺伝学的興奮は、物質の使用に頼る必要なく、報酬及び快楽を患者に与えうる。したがって、側坐核及び中隔の光遺伝学的興奮が中毒治療の鍵を握っている可能性がある。逆に言えば、側坐核及び中隔の光遺伝学的安定化を用いて、中毒を背景とする薬物渇望を低下させることができる。代替的な一実施形態においては、前帯状回（ＢＡ３２）の膝（ｇｅｎｕ）にて観察された代謝亢進活性の光遺伝学的安定化を用いて、薬物渇望を低下させることができる。プロオピオメラノコルチン（ＰＯＭＣ）及びコカイン・アンフェタミン調節転写産物（ＣＡＲＴ）のペプチド生成物を含有する視床下部内側部の弓状核内の細胞の光遺伝学的安定化を用いても、薬物中毒行動を減少させることができる。この件に関するさらなる情報については、Ｎａｑｖｉ ＮＨ, Ｒｕｄｒａｕｆ Ｄ, Ｄａｍａｓｉｏ Ｈ, Ｂｅｃｈａｒａ Ａ.「Ｄａｍａｇｅ ｔｏ ｔｈｅ ｉｎｓｕｌａ ｄｉｓｒｕｐｔｓ ａｄｄｉｃｔｉｏｎ ｔｏ ｃｉｇａｒｅｔｔｅ ｓｍｏｋｉｎｇ」、Ｓｃｉｅｎｃｅ. ２００７ Ｊａｎ ２６；３１５（５８１１）：５３１‐５３４、を参照してもよく、この文献は、参照により本明細書にその全体が組み入れられる。

【００６９】

ソマトスタチンを分泌する視床下部室周核（ｈｙｐｏｔｈａｌａｍｉｃ ｐｅｒｉｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ ｎｕｃｌｅｕｓ）の神経内分泌ニューロンの光遺伝学的刺激を用いて、例えば末端肥大症において、下垂体前葉からの成長ホルモンの分泌を阻害することができる。ソマトスタチンまたは成長ホルモンを分泌する神経内分泌ニューロンの光遺伝学的安定化を用いて、成長及び身体的発達を増進することができる。「正常な」老化に伴う変化の中に、３０代及び４０代の後の、血清成長ホルモンレベルの急激な低下がある。したがって、室周核の光遺伝学的安定化により、老化に伴う身体的な衰えを低減し得る。

【００７０】

視床下部の腹内側核の光遺伝学的安定化、特に、弓状核のプロオピオメラノコルチン（ＰＯＭＣ）及びコカイン・アンフェタミン調節転写産物（ＣＡＲＴ）の光遺伝学的安定化を用いて、食欲を増加させることができ、それにより、神経性食欲不振を治療することができる。あるいは、視床下部の外側核の光遺伝学的刺激を用いて、食欲及び摂食行動を増加させ得る。

【００７１】

側頭葉、ＮＢＭ（Ｎｕｃｌｅｕｓ ｂａｓａｌｉｓ ｏｆ Ｍｅｙｎｅｒｔ；マイネルト基底核）及び後帯状回（ＢＡ３１）を含む、冒された領域のコリン作動性細胞における光遺伝学的興奮は、衰えている領域に対し、刺激を与え、ひいては、神経栄養性の動因（ｎｅｕｒｏｔｒｏｐｈｉｃ ｄｒｉｖｅ）を与える。当該冒された領域は脳内で広範囲に広がっているため、埋め込み電極を用いての類似の治療は、光遺伝学的アプローチよりも実現可能性が低いことがある。

【００７２】

不安障害は、典型的には、左側頭及び前頭皮質ならびに扁桃体の活動上昇に関係しており、これは、不安が解消されるにつれ正常に向かう。したがって、この冒された左側頭及び前頭部ならびに扁桃体は、これらの部位の活動を静めるために、光遺伝学的安定化によって治療することができる。

【００７３】

正常な生理機能では、受けた光に応答して脱分極する、網膜の感光性神経系細胞は、その受けた光のパターンの視覚地図を作り出す。光遺伝学的イオンチャネルを用いて、このプロセスを、体の多くの部分にて模倣することができ、眼も例外ではない。網膜損傷に起因する視覚障害または視覚喪失の場合、植え込まれた装置からの閃光パターンよりもむしろ天然の周辺光を利用する、機能的に新しい網膜を成長させることができる。この、成長させた人工網膜は、もともとの網膜の位置に配置し得る（この場所であれば、視覚皮質へと戻る導管として働いている視神経を活用することができる）。あるいは、この人工網膜は、別の位置、例えば前頭など、に置いてもよいが、但し、脱分極信号のための導管が、光遺伝学的センサーマトリックスからの符号化情報を解読する能力を有する皮質組織へと

伝達されることを条件とする。皮質盲も、視覚皮質の下流の視覚経路を刺激することにより、治療可能であろう。当該刺激は、視覚皮質の上流で生成されたか、または人工の光センサーにより生成された視覚的データに基づくであろう。

【００７４】

頻脈の治療は、ＣＮ　Ｘ、すなわち迷走神経、を含む、副交感神経系の線維への光遺伝学的刺激により達成することができる。これは、洞房結節（ＳＡ　ｎｏｄｅ）の速度の減少を引き起こし、それにより、心拍数及び収縮力が減少する。同様に、脊髄神経Ｔ１～Ｔ４の内の交感神経系の線維の光遺伝学的安定化は、心臓を遅くする働きをする。病的な徐脈の治療のためには、迷走神経の光遺伝学的安定化、またはＴ１～Ｔ４の交感神経線維の光遺伝学的刺激が、心拍数を増加させる働きをするであろう。洞房結節より速度が速い、電気的な異常病巣（ａｂｅｒｒａｎｔ　ｅｌｅｃｔｒｉｃａｌ　ｆｏｃｉ）に起因する不整脈は、当該電気的な異常病巣を、中程度の光遺伝学的安定化で治療することにより抑制することができる。これは、治療される組織内の固有の発火速度を減少させ、かつ、当該洞房結節が、心臓の電気的システムのペース調整におけるその役割を取り戻すことを可能にする。同じようにして、あらゆるタイプの心不整脈を治療することができるであろう。心筋症またはうっ血性心不全において起きる心臓組織の変性も、残った組織を本発明の種々の実施形態を用いて興奮させることで治療し得よう。

【００７５】

前頭葉、頭頂葉及び海馬などの脳部位の光遺伝学的興奮刺激により、処理速度を増加させ、記憶力を良くし、また、神経前駆細胞の発生に拍車をかけるなど、ニューロンの増殖及び相互接続を刺激することができる。一例として、本発明のそういった用途の１つは、ほぼ植物（ほとんど意識が無い）状態から患者を抜け出させることを目的とした、視床における標的ニューロンの光遺伝学的興奮刺激に向けられたものである。標的視床ニューロンの膜における光開口型イオンチャネルまたはポンプの増殖がもたらされる。次いで、これら改変されたニューロンは、標的ニューロン及び／又は周囲の細胞の機能を調節するべく、例えば同一通路によってもアクセスすることが可能な光学を用いて、光のフラッシュを向けることにより、刺激する。（電極による治療を用いた）適切な調節技術に関するさらなる情報について、または、そのような患者の関連脳部位に関するさらなる情報については、Ｓｃｈｉｆｆ ＮＤ, Ｇｉａｃｉｎｏ ＪＴ, Ｋａｌｍａｒ Ｋ, Ｖｉｃｔｏｒ ＪＤ, Ｂａｋｅｒ Ｋ, Ｇｅｒｂｅｒ Ｍ, Ｆｒｉｔｚ Ｂ, Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇ Ｂ, Ｏ’Ｃｏｎｎｏｒ ＪＯ, Ｋｏｂｙｌａｒｚ ＥＪ, Ｆａｒｒｉｓ Ｓ, Ｍａｃｈａｄｏ Ａ, ＭｃＣａｇｇ Ｃ, Ｐｌｕｍ Ｆ, Ｆｉｎｓ ＪＪ, Ｒｅｚａｉ ＡＲ.「Ｂｅｈａｖｉｏｒａｌ ｉｍｐｒｏｖｅｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｔｈａｌａｍｉｃ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ ａｆｔｅｒ ｓｅｖｅｒｅ ｔｒａｕｍａｔｉｃ ｂｒａｉｎ ｉｎｊｕｒｙ」、Ｎａｔｕｒｅ. Ｖｏｌ ４４８. Ａｕｇ ２, ２００７ ｐｐ ６００‐６０４、を参照してもよい。

【００７６】

代替的な一実施形態においては、光遺伝学的興奮を用いて、例えばうっ血性心不全などの状況における弱った心筋を治療することができる。心臓壁が薄く伸張した脆弱な状態にあり、また電極と筋肉との間に均等に分布する電気的連結の提供が困難であることから、ＣＨＦの不全心筋の電気的補助は、一般的には実用的でない。こういう理由で、心筋収縮性を増加させるための、従来の好ましい方法には、例えばベータ作動薬などの薬理学的方法、及び例えば心室補助装置などの機械的アプローチ、のいずれもが含まれてきた。本発明の当実施形態においては、光遺伝学的興奮は、心臓の周囲の包被（ｊａｃｋｅｔ）の内部表面上の発光素子により、弱った心筋へと、または、そうでなければ当該冒された心臓壁に対して、送達される。光は、当該分野において周知の手段により拡散させて、筋肉の広い領域を平滑に覆ってもよく、その結果、各光パルスにより収縮が促される。

【００７７】

Ｍａｙｂｅｒｇ ＨＳ ｅｔ ａｌ.,「Ｄｅｅｐ Ｂｒａｉｎ Ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ－Ｒｅｓｉｓｔａｎｔ Ｄｅｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｎ

ｅｕｒｏｎ，Ｖｏｌ．４５，６５１‐６６０，Ｍａｒｃｈ３，２００５，６５１‐６６０、により教示されているものと同様の様式で標的活動を抑制することによって抑うつを治療するために、帯状回（Ｃｇ２５）の膝下（ｓｕｂｇｅｎｕａｌ）部分における光遺伝学的安定化、黄色光が、植え込まれた装置により適用され得る。この文献は、参照により本明細書にその全体が組み入れられるものとする。代替的な一実施形態においては、光遺伝学的興奮刺激法は、Ｓｃｈｌａｅｐｆｅｒ ｅｔ ａｌ．，「Ｄｅｅｐ Ｂｒａｉｎ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｔｏ Ｒｅｗａｒｄ Ｃｉｒｃｕｉｔｒｙ Ａｌｌｅｖｉａｔｅｓ Ａｎｈｅｄｏｎｉａ ｉｎ Ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ Ｍａｊｏｒ Ｄｅｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｎｅｕｒｏｐｓｙｃｈｏｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ２００７１‐１０、により教示されているのと同様の様式で、その部位における活動を増加させることであり、この文献は、参照により本明細書にその全体が組み入れられる。さらなるもう１つの実施形態では、左背側前頭前皮質（ｌｅｆｔ ｄｏｒｓｏｌａｔｅｒａｌ ｐｒｅｆｒｏｎｔａｌ ｃｏｒｔｅｘ；ＬＤＰＦＣ）が、光遺伝学的興奮刺激法による標的となる。５～２０Ｈｚの当該ＬＤＬＰＦＣのペース調整は、連結している回路を介してＣｇ２５の活動を減少させる働きをしているこの構造の基礎代謝レベルを上昇させる働きをし、その結果、当該プロセスにおいて抑うつが改善される。右背側前頭前皮質（ｒｉｇｈｔ ｄｏｒｓｏｌａｔｅｒａｌ ｐｒｅｆｒｏｎｔａｌ ｃｏｒｔｅｘ；ＲＤＬＰＦＣ）の抑制も、効果的な抑うつ治療戦略である。これは、当該ＲＤＬＰＦＣにおける光遺伝学的安定化により達成することができ、あるいは、抑制は、光遺伝学的興奮刺激を用い、かつ、１Ｈｚ以下のゆっくりとした速度でパルスを発することによっても達成することができ、その結果、当該プロセスにおいて抑うつが改善される。迷走神経刺激（ｖａｇｕｓ ｎｅｒｖｅ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ；ＶＮＳ）は、光遺伝学的アプローチを用いて改良することができる。光遺伝学的興奮の使用を、例えば節状神経節及び頚静脈神経節などの、脳への迷走神経求心路のみを刺激するために用いてもよい。脳からの遠心路は、このアプローチによる刺激を受けないであろう。よって、喉の不快感、咳、嚥下困難及び嗄声などの、ＶＮＳの副作用の一部が除去される。代替的な一実施形態においては、海馬を光遺伝学的に興奮させてもよく、これは、樹状突起及び軸索の発芽の増加ならびに海馬の全体的な成長を導く。本発明を用いて治療可能であろう抑うつに関連する他の脳部位としては、扁桃体、側坐核、眼窩前頭皮質及び眼窩内側（ｏｒｂｉｔｏｍｅｄｉａｌ）皮質、海馬、嗅皮質、ならびに、ドーパミン作動性、セロトニン作動性、及びノルアドレナリン作動性の投射路、が挙げられる。光遺伝学的アプローチを用いて、抑うつ症状をコントロールするべく、海馬のような構造を介しての活動の広がりをコントロールし得よう。

【００７８】

生存可能なアルファ及びベータ細胞集団が膵ランゲルハンス島中に存在する限り、糖尿病の治療のために、当該島を標的としてもよい。例えば、（手作業で、または閉ループグルコース検出システムにより決定した）血清グルコースが高い場合には、光遺伝学的興奮を用いて膵臓中のランゲルハンス島のベータ細胞からのインスリン放出を引き起こすことができ、その一方で、光遺伝学的安定化を用いて膵臓中のランゲルハンス島のアルファ細胞からのグルカゴン放出を妨げる。逆に言えば、（手作業で、または閉ループグルコース検出システムにより、決定した）血糖が低すぎる場合には、光遺伝学的安定化を用いてインスリンのベータ細胞分泌を停止させることができ、かつ、光遺伝学的興奮を用いてグルカゴンのアルファ細胞分泌を増加させることができる。

【００７９】

てんかんの治療のために、てんかんを誘発する活動を抑えるかまたはブロックすることは、光遺伝学的アプローチによく適している。ほとんどのてんかん患者は、てんかんを誘発する病巣に起因する決まったパターンの活動の広がりを有するが、光遺伝学的安定化を用いて、広がる前に異常活動を抑制するか、又はその経過の早期にそれを打ち切ることができた。あるいは、光遺伝学的興奮刺激による興奮性組織の活性化を、一連の意図的な非同時的パターンで送達して、出現する発作活動を中断させることができた。別の代替案は、同様の結果を得るためのＧＡＢＡ作動性ニューロンにおける光遺伝学的興奮刺激の活性

化に関連する。視床中継を、異常なＥＥＧパターンが検出される場合に引き起こされる光遺伝学的安定化による標的としてもよい。

【００８０】

もう１つの実施形態は、胃腸障害の治療に関連する。消化器系は、それ自体が、感覚ニューロン、運動ニューロン及び介在ニューロンを含有する半自律神経系を有する。これらのニューロンは、腸内の特定の細胞が酸、消化酵素、ならびに、ガストリン、コレシストキニン及びセクレチンなどのホルモンを放出する引き金を引くだけでなく、ＧＩ管の動きもコントロールする。これらの細胞のいずれかの生成物の分泌不全を含む症候群は、産生細胞型、またはそれらの活動を促進するニューロンの光遺伝学的刺激により治療することができる。逆に言えば、過剰な内分泌生成物及び外分泌生成物を作り出す症候群は、光遺伝学的安定化を用いて治療することができる。便秘（特に、脊髄損傷のある患者の便秘）から巨大結腸症にまで及ぶ、腸運動低下障害（ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ ｏｆ ｌｏｗｅｒｅｄ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ｍｏｔｉｌｉｔｙ）は、腸内の運動ニューロンの光遺伝学的興奮により治療することができる。過敏性腸症候群のいくつかの形態を含む、腸運動過剰障害（ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ ｏｆ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ｈｙｐｅｒｍｏｔｉｌｉｔｙ）は、運動性をコントロールするニューロンの光遺伝学的安定化により治療することができる。神経原性の胃流出路閉塞は、胃の幽門部におけるニューロン及び筋組織の光遺伝学的安定化により治療することができる。運動性低下症候群（ｈｙｐｏｍｏｂｉｌｉｔｙ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）に対する１つの代替的アプローチは、腸壁中の伸張感受性ニューロン（ｓｔｒｅｔｃｈ－ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ ｎｅｕｒｏｎ）に対して光遺伝学的興奮を与え、それにより、その腸がいっぱいになっており、排出（ｅｍｐｔｙｉｎｇ）を必要としているという信号を増加させることであろう。

【００８１】

この同じパラダイムで、腸の運動過剰症候群（ｈｙｐｅｒｍｏｂｉｌｉｔｙ ｓｙｎｄｒｏｍｅｓ ｏｆ ｔｈｅ ｇｕｔ）に対する１つのアプローチは、下部ＧＩ中の伸張受容体ニューロン（ｓｔｒｅｔｃｈ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｎｅｕｒｏｎ）に対して光遺伝学的安定化を提供し、それにより、その腸が空であり、排出を必要としていなかったという「偽の合図（ｆａｌｓｅ ｃｕｅ）」を与えることであろう。明白な（ｆｒａｎｋ）便失禁の場合には、内括約筋及び外括約筋のコントロールを改善することが、当該管全体の運動性を低下させるのに好ましいことがある。患者が便を体内にとどめておく必要がある間は、内肛門括約筋の光遺伝学的興奮は、保持力を提供する。光遺伝学的刺激を外括約筋に与えることにより、さらなる自制を与えることができる。患者が排便する必要があるときには、その光遺伝学的刺激を休止させるか、または光遺伝学的安定化を追加するかのいずれかによって、内肛門括約筋、次いで外肛門括約筋を弛緩させなければならない。

【００８２】

伝音難聴は、光学的蝸牛インプラントの使用により治療することができる。ひとたび当該蝸牛が光遺伝学的刺激に対し準備されてしまえば、閃光を発する蝸牛インプラントを用いてもよい。感音難聴は、聴覚路における下流の標的の光学的な刺激を介して治療することができる。

【００８３】

本発明のもう１つの実施形態は、血圧障害、例えば高血圧など、の治療に向けられたものである。例えば大動脈（大動脈体及び大動脈傍体）及び頸動脈（「頚動脈小体（ｃａｒｏｔｉｃ ｂｏｄｙ）」）などの部位にある圧受容器及び化学受容器は、迷走神経（ＣＮＸ）を介した求心路、及び他の経路を、髄及び橋、特に孤束及び孤束核、へと送ることにより、血圧及び呼吸の調整に関与する。頚動脈小体、大動脈体、大動脈傍体の光遺伝学的興奮を用いて、「高血圧」という偽のメッセージを、孤束核及び孤束へ送り、血圧を低下させるべきであるという報告をさせることができる。脳幹の適切な部分への直接的な光遺伝学的興奮または安定化を用いて血圧を下げることもできる。これと反対のモダリティーは、当該光遺伝学的アプローチを、昇圧作用のあるもの（ｐｒｅｓｓｏｒ）として働かせ、それにより血圧が上昇する。迷走神経の光遺伝学的興奮を介しても、または脊髄神経

Ｔ１～Ｔ４内の交感神経線維の光遺伝学的安定化によっても、同様の効果を達成することができる。代替的な一実施形態においては、高血圧は、心臓の光遺伝学的安定化により治療可能であり、それにより、心拍出量の減少及び血圧の低下がもたらされる。もう１つの実施形態によれば、副腎皮質内のアルドステロン産生細胞の光遺伝学的安定化を用いて、血圧を低下させることができる。さらなるもう１つの代替的な実施形態では、高血圧は、血管平滑筋の光遺伝学的安定化により治療可能である。活性化している光は、末梢血管床へ、経皮的に通過させることができる。

【００８４】

もう１つの実施形態例は、視床下部‐下垂体‐副腎系障害の治療に向けられたものである。甲状腺機能低下症の治療では、視床下部室傍核及び視床下部前核中の小細胞性の神経内分泌、ニューロンの光遺伝学的興奮を用いて、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（ｔｈｙｒｏｔｒｏｐｉｎ‐ｒｅｌｅａｓｉｎｇ　ｈｏｒｍｏｎｅ；ＴＲＨ）の分泌を増加させることができる。ＴＲＨは、今度は、下垂体前葉を刺激し、甲状腺刺激ホルモン（ｔｈｙｒｏｉｄ　ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ　ｈｏｒｍｏｎｅ；ＴＳＨ）を分泌する。逆に言えば、甲状腺機能亢進症は、小細胞性の神経内分泌ニューロンの光遺伝学的安定化により治療することができる。副腎不全またはアディソン病の治療には、視索上核及び室傍核中の小細胞性の神経内分泌ニューロンの光遺伝学的興奮を用いて、バソプレシンの分泌を増加させることができる。バソプレシンは、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（ｃｏｒｔｉｃｏｔｒｏｐｉｎ‐ｒｅｌｅａｓｉｎｇ　ｈｏｒｍｏｎｅ；ＣＲＨ）の助けを借りて、下垂体前葉を刺激して、副腎皮質刺激ホルモン（Ａｄｒｅｎｏｃｏｒｔｉｃｏｔｒｏｐｉｃ　ｈｏｒｍｏｎｅ；ＡＣＴＨ）を分泌する。クッシング症候群は、過剰なＡＣＴＨ分泌によって度々引き起こされるが、上述した同じ生理学的連鎖の効果を介して、視索上核の小細胞性の神経内分泌ニューロンの光遺伝学的安定化により治療可能である。弓状核の神経内分泌ニューロンはドーパミンを産生し、これが、下垂体前葉からのプロラクチンの分泌を阻害する。したがって、高プロラクチン血症は光遺伝学的興奮を介して治療可能であり、それと同時に、高プロラクチン血症は、弓状核の神経内分泌細胞の光遺伝学的安定化により治療可能である。

【００８５】

自律神経過剰（ｈｙｐｅｒａｕｔｏｎｏｍｉｃ）状態、例えば不安障害、の治療では、副腎髄質の光遺伝学的安定化を用いて、ノルエピネフリンの分泌量（ｏｕｔｐｕｔ）を減少させることができる。同様に、副腎髄質の光遺伝学的刺激を、例えば重症喘息を患っている人または慢性的な眠気として現れる障害を有する人など、アドレナリンの急増が必要な人に用いてもよい。

【００８６】

副腎皮質の光遺伝学的刺激は、コルチゾール、テストステロン、及びアルドステロンなどの化学物質の放出を引き起こす。副腎髄質とは違い、副腎皮質は、下垂体及び視床下部、肺、ならびに腎臓から分泌される神経内分泌性ホルモンからの指令を受ける。しかし、副腎皮質は、光遺伝学的刺激に対し従順である。副腎皮質のコルチゾール産生細胞の光遺伝学的刺激を用いて、アディソン病を治療可能である。副腎皮質のコルチゾール産生細胞の光遺伝学的安定化を用いて、クッシング病を治療可能である。テストステロン産生細胞の光遺伝学的刺激を用いて、女性における性的関心の障害を治療可能であり、同細胞の光遺伝学的安定化を用いて、女性における顔ひげを減少可能である。副腎皮質内のアルドステロン産生細胞の光遺伝学的安定化を用いて、血圧を低下させることができる。副腎皮質内のアルドステロン産生細胞の光遺伝学的興奮を用いて、血圧を上昇させることができる。

【００８７】

特定の冒された脳部位の光遺伝学的興奮刺激を用いて、処理速度を増加させ、また、例えば神経前駆細胞の成熟に拍車をかけるなど、ニューロンの増殖及び相互接続を刺激することができる。このような使用は、精神遅滞の治療に特に有用であり得る。

【００８８】

本発明のもう１つの実施形態によれば、種々の筋肉疾患及び損傷を治療することができる。筋損傷、末梢神経損傷及びジストロフィー疾患に関連した麻痺は、収縮を引き起こすための光遺伝学的興奮、及び弛緩を引き起こすための光遺伝学的安定化により治療可能である。後者の、光遺伝学的安定化アプローチを介した弛緩を用いて、筋肉の消耗を防止し、緊張を維持し、また、対立筋群が収縮するので、協調運動が可能となり得る。同様に、明白な痙縮は、光遺伝学的安定化を介して治療し得る。

【００８９】

末梢神経切断、脳卒中発作、外傷性脳損傷及び脊髄損傷などの種々の領域では、新たなニューロンの増殖を促進し、かつ、他のニューロンとの、及びそれらの標的組織との機能的ネットワークの中へそれらが統合されることを助ける必要性がある。新たなニューロン経路（ｎｅｕｒｏｎａｌ　ｔｒａｃｔ）の再成長は光遺伝学的興奮を介して助長することができ、これは、幹細胞に信号を送って、軸索及び樹状突起を発芽させ、かつ、それら自身を当該ネットワークと統合させるのに役立つ。（電極に対立する技術としての）光遺伝学的技術の使用は、損傷を受けていない組織による信号の受け取りを予防し、かつ、電極から発生する電流の様な人工的な信号によって築かれたのではなく、発生中のニューロンによって築かれた連絡網（ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ）による新たな標的組織の成長を確実にするのに役立つ。

【００９０】

肥満は、視床下部の腹内側核への光遺伝学的興奮、特に、弓状核のプロオピオメラノコルチン（ＰＯＭＣ）及びコカイン・アンフェタミン調節転写産物（ＣＡＲＴ）への光遺伝学的興奮により治療できる。代替的な一実施形態においては、肥満は、視床下部の外側核の光遺伝学的安定化を介して治療可能である。別の実施形態では、レプチン産生細胞への光遺伝学的刺激、または視床下部内のレプチン受容体を有する細胞への光遺伝学的刺激を用いて、食欲を低下させ、以って肥満を治療し得る。

【００９１】

前嚢（ａｎｔｅｒｉｏｒ　ｃａｐｓｕｌｅ）への破壊病変、及びその部位に対する類似のＤＢＳ、は、重度の難治性の強迫性障害４８（ｏｂｓｅｓｓｉｖｅ‐ｃｏｍｐｕｌｓｉｖｅ　ｄｉｓｏｒｄｅｒ　４８；ＯＣＤ４８）を治療する、確立された手段である。内包前脚への、またはＯＣＤが軽減するにつれて代謝の低下を示す部位（例えばＢＡ３２及びＣｇ２４など）への、光遺伝学的安定化を用いて、このようなアプローチを模倣してもよい。

【００９２】

慢性疼痛は、本発明のもう１つの実施形態を用いて治療し得る。電気刺激法としては、局所的な末梢神経刺激、局所的な脳神経（ｃｒａｎｉａｌ　ｎｅｒｖｅ）刺激及び「閾値下の」運動皮質刺激が挙げられる。適切な光遺伝学的アプローチには、局所的な有痛性部位における光遺伝学的安定化が含まれる。プロモーター選択に注意することにより、他の感覚及び運動線維への影響を確実に回避し得よう。一次運動皮質における介在ニューロンの選択的な光遺伝学的興奮によっても、効果的に疼痛を軽減し得よう。また、感覚系視床（特に内側視床核）、脳室周囲灰白質（ｐｅｒｉｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ　ｇｒｅｙ　ｍａｔｔｅｒ）、及び腹側縫線核（ｖｅｎｔｒａｌ　ｒａｐｈｅ　ｎｕｃｌｅｉ）における光遺伝学的安定化を用いて、疼痛軽減をもたらすことができる。代替的な一実施形態においては、標的戦略として標的としているパルブアルブミン発現細胞の光遺伝学的安定化を用いて、疼痛を、サブスタンスＰ産生を減少させることにより治療し得る。内因性オピオイドの放出は、光遺伝学的興奮を用いて側坐核の活動を上昇させることにより達成し得る。代替的な一実施形態においては、視床下部内側部の弓状核のＰＯＭＣニューロンを光遺伝学的に興奮させた場合、ベータ・エンドルフィンが増加し、抑うつ及び慢性疼痛に対する実行可能な治療アプローチが提供される。

【００９３】

パーキンソン病は、興奮特異的プロモーター、例えばＣａＭＫＩＩαなど、を用いて、視床下核（ｓｕｂｔｈａｌａｍｉｃ　ｎｕｃｌｅｕｓ；ＳＴＮ）または淡蒼球内節（ｇｌ

ｏｂｕｓ ｐａｌｌｉｄｕｓ ｉｎｔｅｒｎａ；ＧＰｉ）のいずれかにおけるグルタミン酸作動性ニューロンにて光遺伝学的安定化を発現させることにより治療することが可能であり、光遺伝学的安定化に適合しうる。すべての細胞型が影響を受ける電気的な調節とは異なり、グルタミン酸作動性のＳＴＮニューロンのみが抑制されるであろう。

【００９４】

境界性及び反社会性のタイプを含む、特定の人格障害は、「前頭葉機能低下（ｈｙｐｏｆｒｏｎｔａｌｉｔｙ）」などの脳障害における局所的欠陥を示す。これらの部位の直接的または間接的な光遺伝学的興奮は、症状の改善をもたらすことが予想される。扁桃体における活動の異常なバーストが、突然の自発的な激怒：境界性人格障害の１つの症状、ならびに他の状態、を引き起こすことも知られているが、これには、扁桃体の光遺伝学的安定化が有益であり得る。光遺伝学的アプローチは、例えば扁桃体、線条体、及び前頭皮質など、脳の異なる部分同士の連絡及び同期を改善するであろうが、このことは衝動性の軽減及び洞察力の改善に役立つであろう。

【００９５】

外傷後ストレス障害（ｐｏｓｔ‐ｔｒａｕｍａｔｉｃ‐ｓｔｒｅｓｓ ｄｉｓｏｒｄｅｒ；ＰＴＳＤ）の扁桃中心（ａｍｙｇｄａｌｏ‐ｃｅｎｔｒｉｃ）モデルは、それが、内側前頭前皮質（ｍｅｄｉａｌ ｐｒｅｆｒｏｎｔａｌ ｃｏｒｔｅｘ）及び海馬による、不十分なトップダウンコントロール、及び扁桃体の過覚醒、に関連しているということを提起する。したがって、ＰＴＳＤは、扁桃体または海馬の光遺伝学的安定化により治療し得る。

【００９６】

統合失調症は、幻聴などの異常を特徴とする。これらは、光遺伝学的安定化を用いた聴覚皮質の抑制により治療できる可能性がある。統合失調症に付随する前頭葉機能低下は、冒された前頭部における光遺伝学的興奮により治療できる可能性がある。光遺伝学的アプローチは、脳の異なる部分同士の連絡及び同期を改善するであろうが、このことは、自己生成した（ｓｅｌｆ‐ｇｅｎｅｒａｔｅｄ）刺激を外来性のものと解してしまう誤帰属（ｍｉｓａｔｔｒｉｂｕｔｉｏｎ）の軽減に役立つであろう。

【００９７】

プロオピオメラノコルチン（ＰＯＭＣ）及びコカイン・アンフェタミン調節転写産物（ＣＡＲＴ）のペプチド生成物を含有する視床下部内側部の弓状核内の細胞の光遺伝学的安定化を用いて、強迫的性行動を減少させることができる。プロオピオメラノコルチン（ＰＯＭＣ）及びコカイン・アンフェタミン調節転写産物（ＣＡＲＴ）のペプチド生成物を含有する視床下部内側部弓状核内の細胞の光遺伝学的興奮を用いて、性的欲求の障害の症例の治療において、性的関心を増加させることができる。性的欲求低下（ｈｙｐｏａｃｔｉｖｅ ｓｅｘｕａｌ ｄｅｓｉｒｅ）の障害の治療では、精巣及び副腎によるテストステロン産生は、下垂体の光遺伝学的興奮により増加させることができる。側坐核の光遺伝学的興奮は、無オルガスム症の治療に用いてもよい。

【００９８】

視交叉上核は、睡眠／覚醒サイクルを調整する働きをするメラトニンを分泌する。視交叉上核への光遺伝学的興奮を用いて、睡眠など、メラトニン産生を増加させることができ、それにより不眠症を治療することができる。オレキシン（ヒポクレチン）ニューロンは、覚醒状態を促進するべく、多数の脳核（ｂｒａｉｎ ｎｕｃｌｅｕｓ）を激しく興奮させる。オレキシン産生細胞集団の光遺伝学的興奮を用いて、ナルコレプシー及び慢性的な日中の眠気を治療することができる。

【００９９】

視索上核の光遺伝学的刺激を用いてオキシトシンの分泌を誘発することができ、視索上核の光遺伝学的刺激を用いて出産（ｃｈｉｌｄｂｉｒｔｈ）の最中に分娩（ｐａｒｔｕｒｉｔｉｏｎ）を促進してもよく、また、視索上核の光遺伝学的刺激を用いて社会的愛着における障害（ｄｉｓｏｒｄｅｒ ｏｆ ｓｏｃｉａｌ ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ）を治療してもよい。

【０１００】
筋肉の麻痺と同様に、脊髄損傷により求心路遮断されてしまった運動機能は、収縮を引き起こすための光遺伝学的興奮、及び弛緩を引き起こすための光遺伝学的安定化により治療可能である。後者の、光遺伝学的安定化アプローチを介した弛緩を用いて、筋肉の消耗を防止し、緊張を維持し、また、対立筋群が収縮するので、協調運動も可能となる。同様に、明白な痙縮は、光遺伝学的安定化を介して治療することが可能である。新たな脊髄ニューロン路の再成長は光遺伝学的興奮を介して助長可能であり、これは、幹細胞に信号を送って、軸索及び樹状突起を発芽させ、かつ、それら自身を当該ネットワークと統合させるのに役立つ。

【０１０１】
脳卒中発作による欠陥としては、人格変化、運動欠陥、感覚欠陥、認知欠損、及び情緒不安定が挙げられる。脳卒中発作による欠陥の治療のための１つの戦略は、興奮性のつながりから求心路遮断されてしまった脳及び身体構造に、光遺伝学的刺激を与えることである。同様に、抑制性のつながりから求心路遮断されてしまった脳及び身体構造に、光遺伝学的安定化能を与えてもよい。

【０１０２】
トゥレット症候群の根底にある生物病理は、皮質領域及び皮質下領域、視床、大脳基底核ならびに前頭皮質におけるドーパミン伝達の相動性の（ｐｈａｓｉｃ）機能障害である、ということが研究により示されている。治療を施すために、冒された領域を、まず、機能的脳イメージング及び脳磁図（ＭＥＧ）といった技術を用いて同定することが好ましい。具体的に同定されてもされなくても、候補経路の光遺伝学的安定化により、運動性チックを抑制することができる。装置パラメータの、移植後実験的（ｅｍｐｉｒｉｃａｌ）試験により、いずれの部位で光遺伝学的安定化がなされ、またいずれが継続の必要性がないかが明らかとなる。

【０１０３】
尿失禁または便失禁の障害を治療するために、光遺伝学的安定化を、括約筋に対して、例えば膀胱排尿平滑筋の光遺伝学的安定化またはその筋肉の神経支配を介して、用いることができる。排尿が必要なときは、これらの光遺伝学的プロセスをオフにするか、またはあるいは、（外）尿道括約筋への光遺伝学的安定化、及び膀胱排尿筋の光遺伝学的興奮またはその神経支配とともに、逆進させてもよい。膀胱が求心路遮断されている場合、例えば、仙骨背根（ｓａｃｒａｌ　ｄｏｒｓａｌ　ｒｏｏｔ）が、その背根の疾患（例えばヒトにおける脊髄癆など）により切断または破壊されている場合には、膀胱のすべての反射収縮が消失し、膀胱は膨張する。直接的に筋肉の光遺伝学的興奮を用いて、排尿に対する緊張を回復させ、腎臓損傷を防止し、また、排尿プロセスを補助することができる。当該膀胱は、「分散化」され、動きに対して過敏（ｈｙｐｅｒｓｅｎｓｉｔｉｖｅ）になり、ひいては失禁しやすくなるので、当該器官のこの反応性を最小にするべく膀胱筋に光遺伝学的安定化を施してもよい。

【０１０４】
ニューロンの、ある所定の集団、例えばある病気の病状に関連するものなど、を選択的に興奮させる／阻害するのに、いくつかの戦略を用いて、特定の集団に対する光遺伝学的タンパク質／分子を標的としてもよい。

【０１０５】
本発明の種々の実施形態については、遺伝学的なターゲティングを用いて、種々の光遺伝学的タンパク質または分子を発現させることができる。このようなターゲティングには、遺伝学的な制御エレメント、例えばプロモーター（例えば、パルブアルブミン、ソマトスタチン、コレシストキニン、ＧＦＡＰ）、エンハンサー／サイレンサー（例えば、サイトメガロウィルス即時型初期エンハンサー（Ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ　Ｉｍｍｅｄｉａｔｅ　Ｅａｒｌｙ　Ｅｎｈａｎｃｅｒ））、及び他の転写または翻訳調節エレメント（例えば、ウッドチャック肝炎ウィルス転写後調節エレメント（Ｗｏｏｄｃｈｕｃｋ　Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ　Ｖｉｒｕｓ　Ｐｏｓｔ－ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｇ

ｕｌａｔｏｒｙ　Ｅｌｅｍｅｎｔ））など、を介しての光遺伝学的タンパク質／分子の標的発現を用い得る。プロモーター＋エンハンサー＋調節エレメントの組み合わせの入れ替え（ｐｅｒｍｕｔａｔｉｏｎ）により、光遺伝学的プローブの発現を、遺伝学的に定義された集団に限定することができる。

【０１０６】

本発明の種々の実施形態は、空間的／解剖学的なターゲティングを用いて実施してもよい。このようなターゲティングは、ニューロンの投射パターン、ウィルス、または、遺伝情報（ＤＮＡプラスミド、フラグメント等）を運ぶ他の試薬が、ニューロンのある所定の集団が投射する領域へと、局所的に送達されることがある、という事実を巧みに利用したものである。この遺伝物質は、その後、輸送されて該ニューロンの細胞体へと戻され、当該光遺伝学的プローブの発現を仲介する。あるいは、ある局所部位中の細胞を標識することが所望される場合には、ウィルスまたは遺伝物質を、目的の部位へと局所的に送達して、局在化された発現を仲介させてもよい。

【０１０７】

本発明の１つ以上の実施形態を実施する際には、種々の遺伝子運搬システムが有用である。このような運搬システムの１つは、アデノ随伴ウィルス（Ａｄｅｎｏ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　Ｖｉｒｕｓ；ＡＡＶ）である。ＡＡＶを用いて、プロモーター＋光遺伝学的プローブカセットを、目的の特異的部位へと送達することができる。プロモーターの選択により、ニューロンの、ある特定の集団における発現が駆動されることとなる。例えば、ＣａＭＫＩＩａプロモーターを使用することにより、光遺伝学的プローブの、興奮性ニューロン特異的発現が駆動される。ＡＡＶは、少なくとも１年以上にわたる、当該光遺伝学的プローブの長期的な発現を仲介する。より高い特異性を達成するために、ＡＡＶは、異なる細胞型に対する異なる栄養機能（ｔｒｏｐｈｉｓｍ）をそれぞれが有する特異的な血清型１～８を有する偽型（ｐｓｅｕｄｏ‐ｔｙｐｅｄ）であってもよい。例えば、血清型２及び５は、良好なニューロン特異的栄養機能を有することが知られている。

【０１０８】

もう１つの遺伝子運搬機構は、レトロウィルスの使用である。ＨＩＶまたは他のレンチウィルス由来レトロウィルスベクターを用いて、プロモーター＋光遺伝学的プローブカセットを、目的の特異的部位へと送達することができる。レトロウィルスも、細胞を標識するための、それらの軸索の投射パターンに基づく逆行性輸送を達成するべく、狂犬病ウィルスエンベロープ糖タンパク質を有する偽型であってもよい。レトロウィルスは、宿主細胞のゲノム中へと一体化し、以って当該光遺伝学的プローブの永続的発現を仲介し得る。非レンチウィルス由来レトロウィルスベクターを用いて、分裂細胞を選択的に標識してもよい。

【０１０９】

Ｇｕｔｌｅｓｓアデノウィルス及び単純ヘルペスウイルス（Ｈｅｒｐｅｓ　Ｓｉｍｐｌｅｘ　Ｖｉｒｕｓ；ＨＳＶ）は２本鎖ＤＮＡに基づくウィルスであり、これらを用いても、プロモーター＋光遺伝学的プローブカセットを、脳の特異的部位へと送達することができる。ＨＳＶ及びアデノウィルスは、よりずっと大きなパッケージング容量を有しており、よりずっと大きなプロモーターエレメントを収容可能であり、それらを用いることで、光遺伝学的プローブとともに、複数の光遺伝学的プローブまたは他の治療用遺伝子を送達することも可能である。

【０１１０】

局所的エレクトロポレーションを用いて、ニューロンを一時的にトランスフェクションすることもできる。ＤＮＡプラスミドまたはフラグメントは、脳の特異的部位へと局所的に送達することができる。穏やかな（ｍｉｌｄ）電流を印加することにより、周囲の局所細胞は、当該ＤＮＡ物質と当該光遺伝学的プローブの発現とを受けることとなる。

【０１１１】

他の例においては、リポフェクションが、遺伝物質を脂質試薬と混合することにより用いられ、次いで、引き続き脳へと注入されて、局所細胞のトランスフェクトを仲介しても

よい。

【０１１２】

種々の実施形態には、種々の制御エレメントの使用が含まれる。遺伝学的な制御エレメントに加え、他の制御エレメント（特に、化学的な磁気刺激または赤外線照射に対して感受性である活性を有する、プロモーター及びエンハンサー）を用いて、当該光遺伝学的プローブの、時間的に制御された発現を仲介してもよい。例えば、赤外線照射の影響を受けやすい転写活性を有するプロモーターにより、集中的な照射を用いて、所望のときにのみ局所部位において光遺伝学的プローブの発現を微調整することが可能となる。

【０１１３】

本発明の一実施形態によれば、本発明を、ＤＢＳの動物モデル、例えばパーキンソン病様のラット、にて用いて、治療効果に関与する標的細胞型（激しい議論を呼び、かつ臨床上、計り知れないほど重要である領域）を同定することができる。例えば、刺激は、刺激に応答して治療効果が提供されることが知られている、より大きな集団内の、特定の／小さな神経集団を標的とするものであってもよい。これら標的とされた集団をその後刺激して、治療効果の源を定量してもよい。当該ターゲティングは、脳内において、当該タンパク質の、空間的に制御された適用法を用いて、及び／又は、当該タンパク質を、特定の神経系細胞型における発現に適合するようにすることにより、実施してもよい。当該ターゲティングは、空間的位置、波長、強度及び／又は時間的な刺激特性の観点から光の送達を制御することによって行うことも可能である。このような特徴付けにより得た知識を、次いで、ヒトの疾患を治療するための薬理学的戦略及び手術戦略の開発に用いてもよい。こうしたモデリング及び特徴付けは、パーキンソン病に限られるものではなく、無数の疾患及び回路モデリングに対して適用することができる。

【０１１４】

本発明のもう１つの実施形態によれば、遺伝学的に定義された細胞型は、数多くの異なる脳部位における種々の細胞型の、高次生体機能（ｈｉｇｈ‐ｌｅｖｅｌ　ｏｒｇａｎｉｓｍａｌ　ｆｕｎｃｔｉｏｎｉｎｇ）に対する正確な寄与の解明を可能にするべく、複雑系レベルの挙動に関連したものであってもよい。

【０１１５】

他の態様及び実施形態は、イオンポンプのための、または細胞において（例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏ環境及びｉｎ　ｖｉｔｒｏ環境について）抑制性電流を制御するための、システム、方法、キット、組成物及び分子に向けられたものである。特許請求の範囲を含む本開示の全体にわたって記載されているように、このようなシステム、方法、キット、組成物は、本明細書に一致する様式で実現される。例えば、一実施形態では、本発明は、ＮｐＨＲ系分子変異体及び別のオプシン系分子（ＳＦＯ／ＶＣｈＲ１／ＣｈＲ２系及び／又はＮｐＨＲ系）を、（本明細書中で例示したような、ある特定の障害または障害型カテゴリーとしての）神経学的障害またはＣＮＳ障害の疾患の治療における使用のための組み合わせ調製物（ｃｏｍｂｉｎｅｄ　ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ）として含有する生成物を有する、アセンブリまたはキット・オブ・パーツ（ｋｉｔ　ｏｆ　ｐａｒｔｓ）に向けられたものであり、ここでは、少なくともＮｐＨＲ系分子変異体は、抑制性電流を生じた結果として細胞の脱分極を制止するという光応答を示す、光により活性化するＮｐＨＲ系分子を発現するのに有用であり、また、ここでは、当該分子の高発現は、約７５％未満の毒性レベルを表す（例えば配列番号４～１３のうちの１つ以上）。

【０１１６】

本発明のある実施形態では、ｉｎ　ｖｉｖｏ使用において、インプラント型集成装置を採用する。これらの集成装置としては、例えば発光ダイオード、レーザーまたは類似の光源などの光発生装置、及び、標的細胞を改変して、その結果、当該光発生装置により発生させた光に応答してその標的細胞の刺激を促進する生物学的部分、が挙げられる。

【０１１７】

本発明の一実施形態では、生物学的部分は、感光性となるよう改変されている標的細胞で構成されていてもよい。本発明のもう１つの実施形態では、生物学的部分は、標的細胞

を光に対して感受性にする、例えば遺伝子導入ベクターなどの、生物学的素子を含有していてもよい。この一例は、ＳＦＯ（ＣｈＲ２／ＶＣｈＲ１変異体）発現のための遺伝子を運搬するレンチウィルスである。このようにして、標的細胞の刺激は、インプラント型装置により制御することができる。例えば、制御回路を、光源の活性化または非活性化、または、光源に動力を供給するバッテリーの充電により、外部信号に応答するようにしておいてもよい。ある例では、当該外部信号は電磁放射線であり、これは制御回路によって受け取られる。例えば、無線周波数（ｒａｄｉｏ　ｆｒｅｑｕｅｎｃｙ；ＲＦ）信号は、外部ＲＦ送信機によって伝達されて、制御回路によって受け取られてもよい。別の例では、磁場を用いて当該制御回路を活性化するか、及び／又は当該制御回路に動力を供給してもよい。

【０１１８】

制御回路は、様々な程度の複雑度を用いて実施することができる。ある例では、当該回路は、磁場に曝露された場合に電流を発生する単一コイルである。次いで、この電流を用いて、光源に動力を供給する。このような一実行形態は、当該装置の寿命の増加の為のみならず、大きさ及び複雑度を限定するためにも特に有用であり得る。別の例においては、制御回路は、ＲＦアンテナを含んでいてもよい。所望により、バッテリーまたは類似の電源（例えば容量性素子など）は、当該制御回路によって使用されてもよい。充電されている間、当該回路は、当該電源により、体外からの同時的なエネルギー供給を必要とせずに動作し続けることが可能となる。これは、光源によって発せられた光の正確な制御のために特に有用であり得、また、その発せられた光の強度の増加の為にも特に有用であり得る。

【０１１９】

本発明の一実施形態では、光源は、発光ダイオード（ｌｉｇｈｔ‐ｅｍｉｔｔｉｎｇ‐ｄｉｏｄｅ；ＬＥＤ）を用いて実施される。ＬＥＤは、低出力用途に有用であることが立証されており、また、電気的な信号に対して比較的速く応答することも立証されている。

【０１２０】

本発明の別の実施形態では、生物学的部分として、遺伝学的に標的細胞を光感受性にコードする遺伝子導入ベクターを含有するゼラチンまたは類似の物質が挙げられる。１つの例では、当該ベクターは、体内に植え込まれてすぐに放出される。これは、例えば、これらのベクターが、（例えば、脱水された（ｄｅｈｙｄｒａｔｅｄ）材料または水溶性の材料、例えばゼラチンなど、を用いて）水溶液中へと放出されることを可能にする封じ込め材料（ｃｏｎｔａｉｎｍｅｎｔ　ｍａｔｅｒｉａｌ）を用いることにより達成されてもよい。当該ベクターの放出により、標的細胞が改変され、その結果、それらは光源からの光に応答して刺激される。

【０１２１】

本発明の別の実施形態では、生物学的部分としては、感光性細胞を含有する合成メッシュが挙げられる。１つの例では、当該細胞は、感光性であるよう改変されているニューロンである。当該合成メッシュは、ニューロン全体（例えば細胞体）が通るのを許すことなく樹状突起及び軸索がこのメッシュを通過できるよう構成されていてもよい。このようなメッシュの例の１つは、直径がおよそ３～７マイクロメートル程度である細孔を有し、ポリエチレンテレフタレートでできている。もう１つの実施形態例では、当該生物学的部分としては、標的とされる送達のための注入機構が挙げられる。

【０１２２】

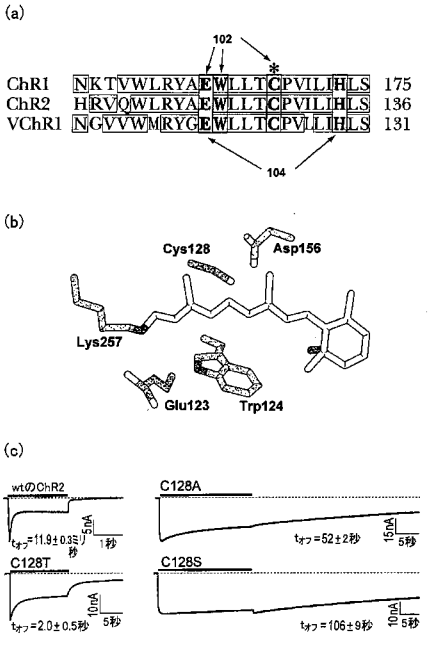
種々の実行形態において、システムを適合させて、当該運搬装置によって、当該光応答性タンパク質が、トランスフェクション、形質導入またはマイクロインジェクションのうちの１つにより導入されるようにするか、及び／又は、当該光源により、光が、インプラント型光発生装置及び光ファイバーのうちの１つを介してＳＦＯ発現ニューロンへ導入されるようにする。

【０１２３】

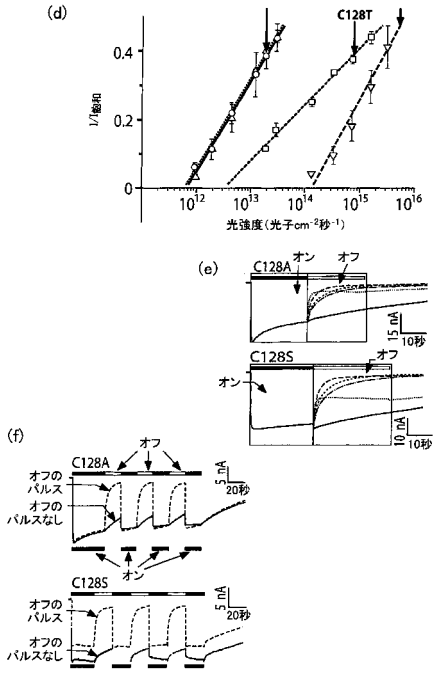
上述の種々の実施形態は、単なる例示として提示されたものであり、本発明を限定する

と解釈されるべきではない。上記の記載及び例示に基づけば、当業者は、本明細書に例示及び記載されている好例の実施形態や適用法に厳密に従わずとも、本発明に対して種々の改変及び変更を行うことが可能であるとのことを容易に理解するであろう。例えば、そのような変更には、本明細書において列挙されている以外のさらなる改変が含まれ得る。そのような改変及び変更は、添付の特許請求の範囲に記載されている本発明の真の精神及び範囲から逸脱しないものとする。

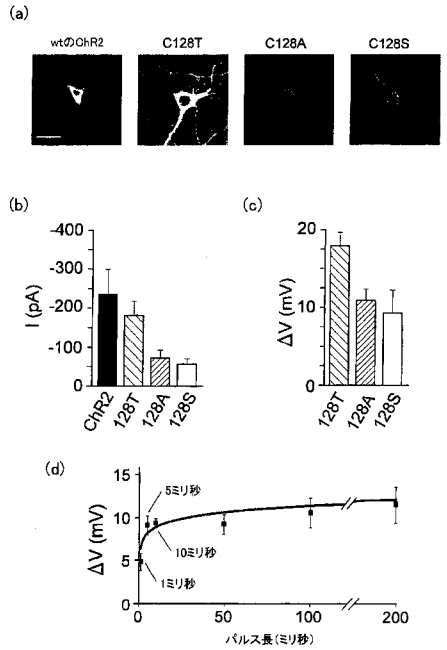
【図１－１】



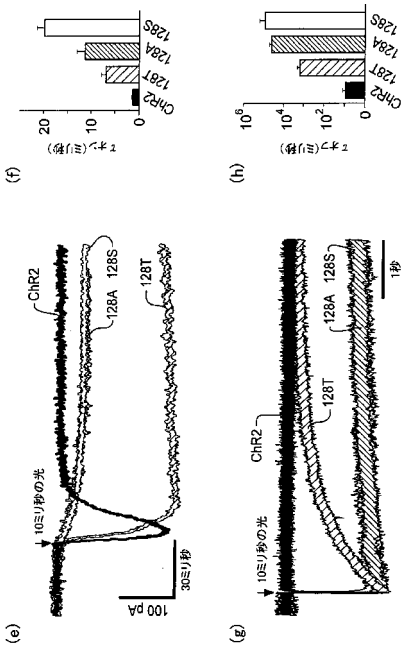
【図１－２】



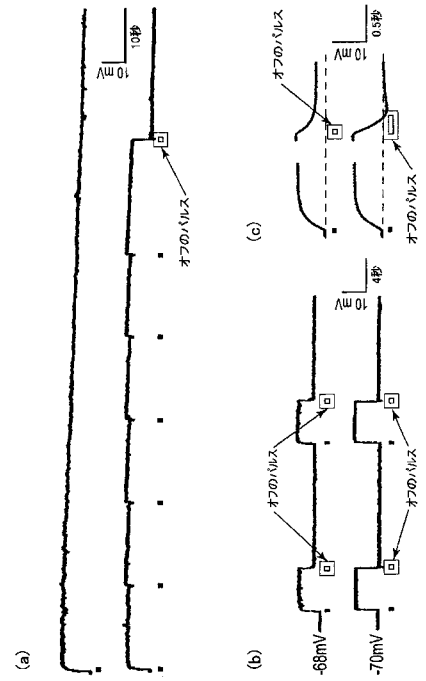
【図２－１】



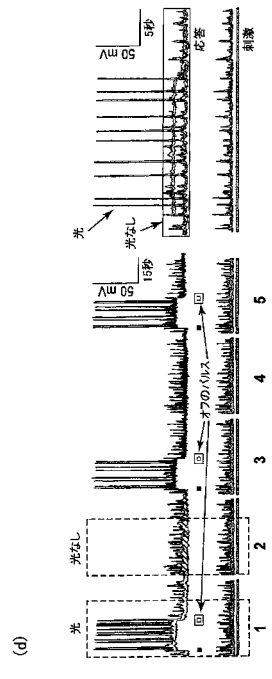
【図２－２】



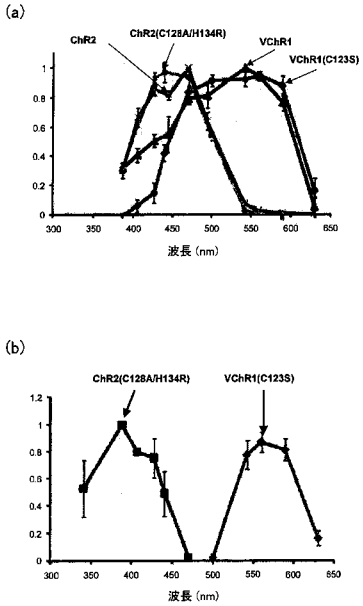
【図３－１】



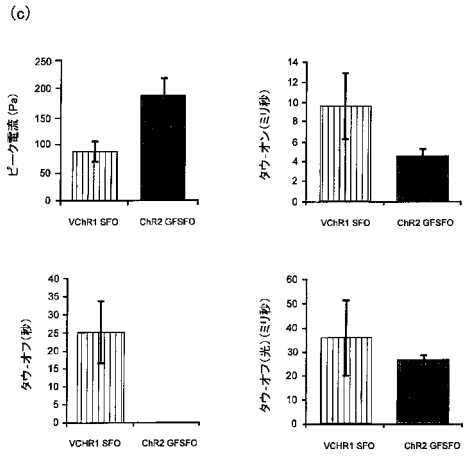
【図３－２】



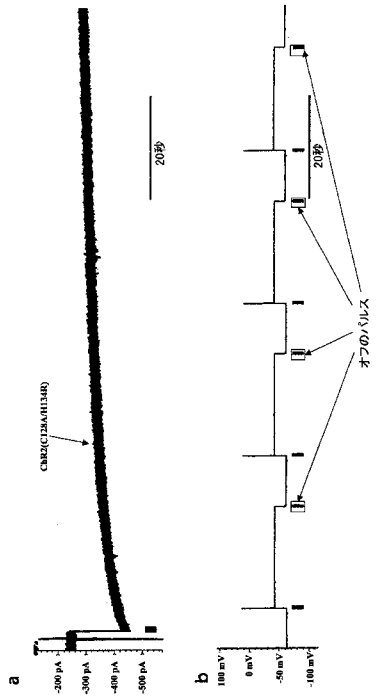
【図４－１】


(a)
ChR2
ChR2(C128A/H134R)
VChR1
VChR1(C123S)
波長 (nm)
(b)
ChR2(C128A/H134R)
VChR1(C123S)
波長 (nm)

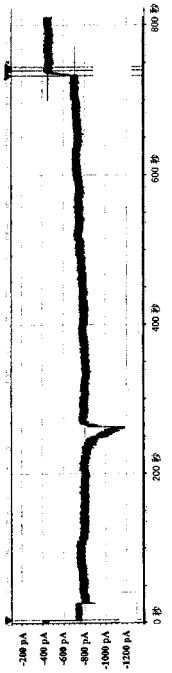
【図４－２】


(c)
ピーク電流 (Pa)
VChR1 SFO
ChR2 GFSFO
タウ-オン(ミリ秒)
VChR1 SFO
ChR2 GFSFO
タウ-オフ(秒)
VCHR1 SFO
ChR2 GFSFO
タウ-オフ(光)(ミリ秒)
VCHR1 SFO
ChR2 GFSFO

【図５】


20秒
20秒
オフのパルス
ChR2(C128A/H134R)
a
b

【図６】


0 秒
200 秒
400 秒
600 秒
800 秒

【配列表】
2012508581000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/64355

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 14/00 (2010.01)
USPC - 530/350
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)
IPC(8) - C07K 14/00 (2010.01)
USPC - 530/350

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Google Scholar; Google: ChR2, channelrhodopsin, channelopsin, chop2, cop4, ChR2-310, Chop-310, opsin, rhodopsin, LACC, sufficien$, minimum, minimal, stimul$, potential, light, activat$, mutat$, mutant, substitut$, amino acid, residue, position, cysteine, aspartic, $C128. GenCore 6.3: SEQ ID NO:1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007/0053996 A1 (BOYDON et al.) 8 March 2008 (08.03.2008); para [0010]-[0013]; [0016]-[0018]; [0020]-[0023]; [0029]; [0048]; [0080]-[0083]; [0087]-[0088]; [0090]-[0092]; [0101]-[0103]; [0117]; [0134]; [0157]; [0192]-[0204]; [0214]-[0216]; [0225]-[0227]; [0244]-[0245]; SEQ ID NO: 1	1-10, 12-17, 21-30
A	RITTER et al. Monitoring Light-induced Structural Changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. JBC 16 October 2008. doi: 10.1074/jbc.M806353200.[retrieved from the Internet 11 May 2010: <http://www.jbc.org/content/283/50/35033.full.pdf+html>]; pg 35039, 5th para	1-10, 12-17, 21-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"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	Date of mailing of the international search report
11 May 2010 (11.05.2010)	27 MAY 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/64355

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I: claims 1-10, 12-17, 21-30, drawn to a molecule of SEQ ID NO:1 with a substitution of at least one of C128 and D156.

Group II+, claims 11, 18-20, 23-30, drawn to a molecule of SEQ ID NO:2 with a substitution of at least one of C123 and D151. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect a substitution(s) of additional SEQ ID NO: 2 to be searched and/or binding moieties to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO(s): and binding moieties.

(continued on first blank supplemental sheet attached)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
claims 1-10, 12-17, 21-30

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/64355

********** Supplemental Box **********

Continuation of Box No III: Observations where unity of invention is lacking:

The inventions listed as Groups I-II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the inventions listed as Groups I and II+ is the specific amino acid sequence recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because Uniprot Direct Submission B4Y103_VOLCA (23-SEP-2008) [Retrieved form the Internet 19 January 2010:< http://www.uniprot.org/uniprot/B4Y103.txt?version=1>] (hereinafter " B4Y103") discloses a polypeptide comprising the claimed SEQ ID NO:2 (amino acids 1-300). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The special technical feature of the inventions listed as Group II+ is the specific amino acid substitution of SEQ ID NO:2. The inventions do not share a special technical feature, because B4Y103 discloses the claimed SEQ ID NO:2 (amino acids 1-300). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I-II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 デイサロス、カール
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４３０５ パロ アルト ピーター クーツ サークル ７０
(72)発明者 イズハル、オフェル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４３０４ パロ アルト クラーク ウェイ ７３５
(72)発明者 ガネイディン、リサ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４３０５ スタンフォード パイン ヒル コート ２１４ ＃３０５
(72)発明者 ヘゲマン、ピーター
ドイツ連邦共和国 Ｄ－１００９９ ベルリン
(72)発明者 ベルント、アンドレ
ドイツ連邦共和国 Ｄ－１００９９ ベルリン

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA06 DA02 GA11 HA11 HA17
4B063 QA18 QQ08 QR77 QS40 QX04
4C084 AA02 BA02 ZA022
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA71 FA74