

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-122094

(P2017-122094A)

(43) 公開日 平成29年7月13日 (2017.7.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 0 7 K 14/195	4 C 0 8 7
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	4 H 0 4 5
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-20030 (P2017-20030)	(71) 出願人	503115205
(22) 出願日	平成29年2月7日 (2017.2.7)		ザ ボード オブ トラストィーズ オブ
(62) 分割の表示	特願2013-537858 (P2013-537858)		ザ レランド スタンフォード ジュニ
	の分割		ア ユニバーシティー
原出願日	平成23年11月4日 (2011.11.4)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 943
(31) 優先権主張番号	61/410,692		06、パロ アルト、エル カミーノ レ
(32) 優先日	平成22年11月5日 (2010.11.5)		アル 3000
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100149294
			弁理士 内田 直人
		(72) 発明者	ウィッテン, イラナ
			アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
			025, メンロ パーク, ロブレイ 83
			7, アパートメント 3
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 報酬関連行動の光遺伝学的制御

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 個体における少なくとも1つの報酬関連行動を妨害するための組成物および方法の提供。

【解決手段】 個体の側坐核または線条体のコリン作動性介在ニューロンの膜分極状態を変化させることが可能な、安定的に発現された光応答性オプシタンパク質を使用する。該タンパク質は、光に応答性であり、介在ニューロンが光で照射される時、介在ニューロンを過分極化することが可能である。一態様では、該タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、個体に投与することを含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、その開示が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2010年11月5日出願の米国仮出願第61/410,692号に対して優先権を請求する。

【0002】

本願は、それらの細胞膜上で光応答性オプシントタンパク質を発現する動物細胞を含む組成物、およびそれを使用して、動物における報酬関連条件付けに関連する1つ以上の行動に影響を及ぼすために、側坐核または背側線条体の超小型回路に存在するコリン作動性介在ニューロンを選択的に過分極化する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

物質乱用および依存性は、世界中で社会に降り懸かる重大な問題である。世界薬物報告2008によれば、世界人口の約5%が不法薬物を使用し、世界人口の約0.6%において、薬物使用は問題である。米国において、2006年の薬物使用と健康に関する薬物乱用・精神衛生サービス局の(SAMHSAの)全米調査によれば、2360万人の12歳以上の人々が、不法薬物またはアルコール乱用問題に対する治療を必要とした(12歳以上の人々の9.6パーセント)。これらのうち、250万人のみ、つまり治療を必要とした人々の10.8パーセントが、専門施設でそれを受容した。物質乱用および依存性は、世界中で生産的な人的資源の莫大な損失をもたらし、治療支援、保険金の支払い、ならびに予防および脱嗜癖プログラムに対する出費の点から、政府および社会に費用を課す。

【0004】

光遺伝学は、機能している無処置の生体系とペースを保つために必要とされる時間精度(ミリ秒の時間スケール)で、自由に移動しているほ乳類および他の動物の体内でさえも、生体組織の標的細胞内の具体的な事象を制御するために使用される、遺伝的および光学的方法の組み合わせである。光遺伝学の特徴は、具体的な標的機構の使用を通じて細胞型分解能を維持しながら、ニューロン膜電位の時間的に正確な操作を可能にする、標的神経細胞の原形質膜への高速光応答性オプシンチャンネルまたはポンプタンパク質の導入である。神経系の機能を調べるために使用することができる微生物オプシンの中には、照射される時に膜過分極を推進するために使用される、ハロロドプシン(NpHR)がある。わずか2~3年の間に、光遺伝学の分野は、具体的な細胞型が、生体内の神経回路等の生物組織の機能にどのように貢献するかという基本的な科学的理解を更に深めてきた。また、臨床側では、光遺伝学によって動かされた研究が、ほ乳類の行動の根底にある神経学的機構への洞察につながってきた。

【0005】

これらの前進にもかかわらず、物質乱用および依存性(嗜癖)等の、複雑なヒトの行動の根底にある神経生理学的基質は、脳の特異的な領域がこれらの行動において果たす役割に関する先端情報にもかかわらず、理解不十分なままである。例えば、側坐核(NAc)は、腹側線条体の主要部を形成するニューロンの集合である。NAcは、報酬、快楽、笑い、嗜癖、攻撃、恐怖、およびプラセボ効果において重要な役割果たすと考えられている。アセチルコリンは、重要かつ幅広く研究される神経伝達物質であり、それは多様な受容体および標的細胞に作用する。いくつかの生体内の薬理学的アプローチは、NAcにおけるコリン作動性伝達が、報酬学習行動に要求されることを示している。NAc内のコリン作動性介在ニューロンは、それらが局所神経細胞集団の1%未満を構成するが、それでもなお、それらがNAcの全体を通じて突出し、その既知のコリン作動性入力のみを提供するため、特に興味深い。当該コリン作動性受容体は、局在的に発現され、ニコチン性およ

10

20

30

40

50

びムスカリン性薬理学的アゴニストは、中型有棘ニューロン（MSN、局所神経集団の95%超に相当し、NAcの出力を構成する）に対する複雑な影響を行使することができる。しかしながら、NAc生理学または報酬関連行動のいずれの側面に対する、コリン作動性介在ニューロンの正味の影響（あるとすれば）は、未知である。

【0006】

したがって、物質依存性等の報酬関連行動においてNAc内のコリン作動性介在ニューロンが果たす因果的役割の調査を可能にするであろう、ツールが必要とされる。嗜癮の根底にある神経経路を理解することは、かかる障害を有する患者を治療するための薬理学的療法の発見およびスクリーニングを補助する一助となり得る他、薬物嗜癮の個体の脳内でこれらの行動を妨害するためにかかるツールを使用する可能性を開く。

10

【0007】

本明細書の全体を通じて、出版物（例えば、科学論文）、特許出願、特許等を参照し、その全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【0008】

個体の側坐核または線条体のコリン作動性介在ニューロンの膜分極状態を変化させることが可能な、安定的に発現された光応答性オプシタンパク質の使用を介して、個体における報酬関連行動を妨害するための組成物および方法が、本明細書に提供され、ここで側坐核または線条体のコリン作動性介在ニューロンの膜分極状態の変化は、動物における1つ以上の報酬関連行動を妨害する。いくつかの実施形態では、報酬関連行動は、嗜癮関連行動である。他の実施形態では、嗜癮関連行動は、コカイン嗜癮である。

20

【0009】

したがって、いくつかの態様では、動物の側坐核または線条体におけるコリン作動性介在ニューロンの細胞膜上で発現された光応答性オプシタンパク質を含む非ヒト動物が、本明細書に提供され、ここでタンパク質は、光に応答性であり、介在ニューロンが光で照射される時、介在ニューロンの膜過分極を誘発することが可能であり、オプシンの照射は、動物の少なくとも1つの報酬関連行動を妨害する。

【0010】

他の態様では、側坐核または線条体の横断面を含む脳切片が、本明細書に提供され、ここで光応答性オプシタンパク質は、コリン作動性介在ニューロンの細胞膜上で発現され、タンパク質は、光に応答性であり、介在ニューロンが光で照射される時、介在ニューロンの膜過分極を誘発することが可能であり、タンパク質の照射は、報酬関連脳機能を妨害する。

30

【0011】

いくつかの態様では、光応答性オプシタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、個体に投与することを含む、個体における報酬関連行動を妨害するための方法が、本明細書に提供され、ここで光応答性オプシタンパク質は、個体の側坐核または線条体におけるコリン作動性介在ニューロンの細胞膜上で発現され、タンパク質は、光に応答性であり、介在ニューロンが光で照射される時、介在ニューロンの膜過分極を誘発することが可能であり、それにより、光によってタンパク質を活性化することは、個体における少なくとも1つの報酬関連行動を妨害する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、個体の側坐核または線条体に投与される。

40

【0012】

依然として他の態様では、光応答性オプシタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、個体に投与することを含む、個体における薬物嗜癮を治療するための方法が、本明細書に提供され、ここで光応答性オプシタンパク質は、個体の側坐核または線条体におけるコリン作動性介在ニューロンの細胞膜上で発現され、タンパク質は、光に応答性であり、介在ニューロンが光で照射される時、介在ニューロンを過分極化することが可能であり、それにより、光によってタンパク質を活性化することは、個体における報酬関連行動を妨害し、個体は、薬物を摂取することをもはや所望しない。いくつかの実施形態では、ポ

50

リヌクレオチドは、個体の側坐核または線条体に投与される。

【0013】

本開示の態様は、本明細書に記載されるように、生存動物における強化された行動の制御または特徴付けに関する。本開示は、これらの文脈において必ずしも限定されないが、本発明の種々の態様は、これらのおよび他の文脈を使用して例の考察を通じて理解されてもよい。

【0014】

本開示の実施形態は、快楽的および／または強化された行動に関連する、特別に標的とされた回路を対象とする。より特定の実施形態は、報酬記憶、快感消失、嗜癖、および／または強化された行動に関連および対応する、具体的な回路標的の間の関連を識別するための、神経回路に対する時空間的な制御に関する。

10

【0015】

本開示の特定の実施形態は、側坐核 (NAc) または背側線条体を含むが、これらに必ずしも限定されない、自然な報酬関連行動に関与するおよび／または報酬学習のための構造内の、標的細胞の抑制を対象とする。特定の例では、NAc内の具体的なコリン作動性ニューロンを標的とすることは、これらのコリン作動性ニューロンによってアセチルコリンの放出を妨害するのに特によく適している。かかる神経抑制は、標的とされる神経抑制に有効であり得、他の行動の強化、例えば、欲求性または嫌悪性反応に対する所望されない効果を低減または排除し得ることが発見されている。本開示の態様は、時間的、空間的、および／または細胞型に特異的である、刺激に関する。ある種の実施形態では、この抑制は、神経回路の細胞内の光応答性オプシンの発現を伴う、光遺伝学的システムを使用して行われる。他の実施形態では、抑制は、直接的電気刺激を使用して行うことができる。依然として他の実施形態は、時間的に正確な医薬品の使用を可能にする。

20

【図面の簡単な説明】

【0016】

種々の例示の実施形態は、以下の説明および添付図面を考慮して、より完全に理解されてもよい。

【図1】 NAcのChAT介在ニューロンにおけるChR2およびeNpHR3.0の特異性、膜標的、および機能性を図示する。(A) Cre依存性AAV (eNpHR3.0-eYFPまたはChR2(H134R)-eYFPのいずれかを発現する)を、NAcの内側部の中へ注射した。(B) 注射された切片の共焦点画像は、4', 6' -ジエチルノ-2-フェニルインドール(DAPI)で共染色された、eYFP発現のChAT抗体との共局在化を示す。(C) YFPを発現したニューロンの91.3±1.3%はまた、ChAT抗体に対して染色され(n=418)、ChAT抗体に対して染色されたニューロンの93.5±2.8%はまた、YFPを発現した(n=413)。エラーバーはSEMを示す。(D) 高倍率図は、ChAT抗体で共染色された、eNpHR3.0-eYFP(左)およびChR2-eYFP(右)の膜局在性を明らかにする。(E) ChR2-eYFP発現ChATニューロンにおける電流注射によって誘発される膜電位変化。 $V_M = -48\text{ mV}$ 。電流段階: -60、-20、+20 pA。(F) eNpHR3.0-eYFP発現ChATニューロンにおける1秒の580 nm光によって誘発される膜電位変化(ピーク過分極: -103 mV)。 $V_M = -49\text{ mV}$ 。(差し込み図) 集団平均化ピーク過分極(平均±標準誤差: -83.8±11.9 mV、n=4)。(G) 470 nmパルス列(5ミリ秒パルス幅、10 Hz)によって誘発される、ChR2-eYFP発現ChATニューロンにおける連続活動電位。(H) 異なる刺激周波数でのChR2-eYFP発現ChATニューロンにおける活動電位の発生についての平均成功確率(n=4、平均±標準誤差、470 nmパルス列、5ミリ秒パルス幅)。

30

40

【図2】 ChATの介在ニューロン光遺伝学的活性化が、抑制性電流の周波数を増加させ、MSN発火を抑制することを図示する。(A) ChR2-eYFPで形質導入されたChATニューロンを、脳切片中、青色光(470 nm)で活性化し、近くのMSN(eYFP-細胞)を、全細胞パッチクランプした。(B) (左) 自発的シナプス電流を、C

50

h A TニューロンにおいてC h R 2 - e Y F Pを発現する、切片中のM S Nにおいて観察した。(中央)シナプス電流は、470nm光パルスにตอบสนองして、周波数が増加した(5ミリ秒パルス幅、10Hz)。(右)これらの電流は、G A B A_A受容体アンタゴニストS R - 9 5 5 3 1 (5mM)によって遮断されたため、I P S Cと見なす。2, 3-ジオヒドロキシ-6-ニトロ-7-スルファモイルベンゾ[f]キノキサリン-2, 3-ジオン(N B Q X) (5mM)および(R S) - 3 - (2-カルボキシピペラジン-4-イル)-プロピル-1-ホスホン酸(R S - C P P) (5μM)が全ての実験において存在した。(C)光パルス(青色縦線バー)およびS R - 9 5 5 3 1(黒色バー)の効果を示す、このM S NについてのI P S C周波数の時間経過。(D)光パルス(n=6)に対する時間の関数としての、光オン期間中のI P S C周波数における平均百分率増加(光オフ期間のそれに対して正規化)。青色破線は、一連の光パルスを示し、エラーバーは、標準誤差を表示する。(E)光パルスは、I P S Cの周波数を525.8±154.3%増加させた(n=6、P=0.01、対応のある両側検定)一方で、自発的I P S Cの平均振幅は、21.3±28.9%変化した(P>0.05)。(F)オプトロード(optrode)(タングステン電極に結合された光ファイバー)を、生体内で、C h A T細胞中、C h R 2 - e Y F Pを発現したN A cの中に、定位的に位置付けた。(G)(最上部)青色光刺激によって抑制される、絶縁ユニットの電圧痕跡。(中央)各活動電位が点によって表される、5回の光刺激の反復に対する同じユニットの応答を表示するラスタプロット。(底部)同じユニットについての経時的な発火率の平均および標準誤差。(H)光刺激によって抑制された対興奮させられた、部位の分率。(I)光によって抑制された(左、n=16のうち13)または興奮させられた(右、n=16のうち3)部位についての、光刺激に対する応答の時間経過の集団要約。実線は、時間の関数としての、部位にわたる平均発火率を表し、各点は、個々の部位の平均発火率を表す。全ての発火率は、光刺激前に、平均±標準誤差率に対して正規化される。(F~I)光刺激の持続期間、10秒;パルス持続期間、5ミリ秒;波長、470nm;周波数、10Hz。光刺激のエポックは、破線によって表される。

【図3】C h A T介在ニューロンの光遺伝学的光抑制が、生体内でM S N発火を強化することを図示する。(A)(最上部)C h A T介在ニューロンのe N p H R 3.0での光遺伝学的光抑制によって興奮させられた、絶縁ユニットの電圧痕跡(生体内のN A cから記録)。(中央)各活動電位が点によって表される、5回の光刺激の反復に対する同じユニットの応答を表示するラスタプロット。(底部)同じユニットについての経時的な発火率の平均および標準誤差。(B)ウェーブレット分析は、(A)の場合と同じユニットについての、周波数および時間の関数(5回の反復にわたる平均)として発火の電力を明らかにする。(C)光刺激によって抑制された対興奮させられた、部位の分率。(D)(A)と同じように、光刺激によって抑制されたユニットについて。(E)光によって抑制された(左、n=17のうち13)または興奮させられた(右、n=17のうち4)部位についての、光刺激に対する応答の時間経過の集団要約。実線は、時間の関数としての、部位にわたる平均発火率を表し、各点は、個々の部位の平均発火率を表す。全ての発火率は、光刺激前に、平均±標準誤差値に対して正規化される。(A~E)光刺激の持続期間、15秒(一定照射);波長、560nm。光刺激のエポックは、バーによって表される。

【図4】C h A T介在ニューロンが、切片中、コカインによって活性化され得、生体内コカイン条件付けのために要求されることを図示する。(A)C h A Tニューロンにおける自発的活動電位の周波数は、コカイン(5μM)の浴液適用の10分後に増加した。A C S F、人工脳脊髄液。(B)このC h A Tニューロンについての経時的な発火率。水平灰色バー、コカインの適用;垂直点線、(A)および(C)において詳細に例証される時点である、コカイン適用の10分後。(C)ベースライン発火率(コカイン適用前の2.5分間にわたって平均化)を、コカイン注入後の率(コカイン適用発生の10~12.5分間で平均化;灰色バー、コカインを受容している細胞;白色バー、A C S Fのみを受容している対照細胞;P<0.005、コカイン前対コカイン後のコカイン処置群についての対応のある両側検定;P<0.05、コカインまたはビヒクル後のコカイン対対照細胞を

比較する、対応のない両側検定)と比較した、ChATニューロンにおける発火の、コカイン誘発型増加を例証する集団データ。(D) eNacの内側部を照射するために二重ファイバーが挿入された、両側性カニューレ系の略図。(左差し込み図)(H)で使用された全てのマウスについての、カニューレ軌道のエンドポイント。(右差し込み図)Cre依存性eNpHR3.0-eYFPを注射されたChAT::Cre⁺マウスのNacにおけるeYFP発現。(E)コカインCPP(H)についての条件付けパラダイム。マウスを、eNpHR3.0(波長:590nm)でのChAT細胞抑制と共に、腹腔内コカイン(20mg/kg)で条件付けた。(F)コカイン条件付け後の試験日(3日目)の、代表的なChAT::Cre⁺およびChAT::Cre⁻マウスからの追跡データ。10
 前日(2日目)に、マウスは、一方の左室内でコカインおよび光を受容した一方で、他方においては、それらは、食塩水を受容した。(ChAT::Cre⁺マウスではなく)ChAT::Cre⁻マウスは、条件付けされた部屋への嗜好を示した。(G)(左)コカインCPP(コカインおよび光での条件付け)の3日目対1日目の、条件付けされた室内における時間の倍率変化。ChAT::Cre⁺およびChAT::Cre⁻同腹子の比較;双方の場合もCre依存性eNpHR3.0を注射された(n=10 ChAT::Cre⁺、n=12 ChAT::Cre⁻、両側t検定についてP<0.01、3つのコホート)。(右)光単独での条件付けについての(コカインなし、n=9 ChAT::Cre、n=7 ChAT::Cre、両側t検定についてP>0.05、3つのコホート)、3日目対1日目の、条件付けされた室内における時間の倍率変化。エラーバーは標準誤差を示す。n.s.、有意差なし。(H)ウイルス注射(Cre依存性eNpHR3.0)および光刺激ChAT::Cre⁺、ならびにオープンフィールドにおけるChAT::Cre⁻マウス(n=10 ChAT::Cre⁺、n=10 ChAT::Cre⁻、両側t検定についてP>0.05、3つのコホート)の速度。20
 (I)(H)と同じように、オープンフィールドにおける軌道長について(n=10 ChAT::Cre⁺、n=10 ChAT::Cre⁻、両側t検定についてP>0.05、3つのコホート)。(J)(H)と同じように、オープンフィールドの中心における時間について(n=10 ChAT::Cre⁺、n=10 ChAT::Cre、両側t検定についてP>0.05、3つのコホート)。(A~J)*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005。

【図5】切片中および生体内の、ChATの介在ニューロン光遺伝学的光活性化を図示する。30
 (A):各痕跡が光パルスと揃えられた、図2Bの場合と同じMSNについての15個の電流痕跡のオーバーレイ。いくつかのIPSCは、光パルスに対して時間的に同期していない一方で、多くは、光パルス発生の約8ミリ秒後のレイテンシと時間的に同期している。(B):同じニューロンについての光パルスに対する時間の関数としてのIPSC出現。中空バーは、光刺激中に記録されたIPSCの数に対応する。灰色バーは、同じ時間的整列を使用してベースライン(光刺激前)中に記録されたIPSCの数に対応する。このニューロンについて、より顕著な同期性の増加に加えて、IPSC周波数における非同期性の強化が明白である。(C):図2Dの大きさを変更された提示、光オフ期間に対する光オンの間の光パルスに対する時間の関数としてのIPSC周波数における集団平均化百分率増加を表示する(n=6)。集団にわたって、より顕著な同期性の増加に加えて、40
 IPSC周波数における非同期性の強化が明白である。パネルA~Cについてのパルスパラメータ:470nm、5ミリ秒パルス持続期間、10Hz。(D):100Hz(底部、470nm光、10秒の総刺激持続期間)ではなく、10Hz(最上部)でパルスされた青色光刺激を追跡する、集団発火(恐らくChR2を発現するChAT細胞によって発生される)を示す、生体内記録からの電圧痕跡。

【図6】ChATニューロン抑制が、コカインの不在下で、CPPに影響を及ぼすことなく、コカインCPPを妨害することを図示する。(A):コカインCPP、図4G(左パネル)と同じデータであるが、倍率変化よりむしろ差異としてプロットされる。左:条件付け後対条件付け前の、コカイン条件付け室内の時間の差異。(n=10 ChAT::Cre⁺、n=12 ChAT::Cre⁻、両側t検定についてp<0.01、3つの50

コホート)。右：条件付け後対条件付け前の、コカイン条件付け室への嗜好における差異（ここで嗜好は、条件付けされた室内対条件付けされていない室内で費やされた時間の差異として定義される）（ $n=10$ ChAT::Cre⁺、 $n=12$ ChAT::Cre⁻、両側 t 検定について $p<0.01$ 、3つのコホート）。（B）：図4G（右パネル）と同じデータおよびAと同じデータ提示である、コカインなしのCPP（両パネルについて、 $n=9$ ChAT::Cre⁺、 $n=7$ ChAT::Cre⁻、両側 t 検定について $p>0.05$ 、3つのコホート）。

【図7】ニコチン性受容体拮抗作用が、MSNにおいて記録されたChAT介在ニューロン誘発型IPSCを減少させることを図示する。（A）：光なし、光パルス（470nm、10Hz、5ミリ秒パルス幅）、および10 μ Mメカミラミンを伴う同一の光パルスの条件下での、急性切片調製物中の典型的なMSNからの代表的なIPSC掃引。（B）：光提示前、光提示を伴う、および光とメカミラミンまたはビヒクルのいずれかとを伴う、MSNsの集団からの、Aにあるように記録されたIPSCの要約グラフ。光は、IPSC周波数を、3.4+/-1.3Hzから10.1+/-1.2Hzまで、安定的に増加させた（ $p<0.05$ 、 $n=7$ 、対応のある t 検定）一方で、メカミラミンは、この増加を5.1+/-1.8Hzまで低減した（同じ細胞内の光単独と比較して $p<0.05$ 、対応のある t 検定、ビヒクル対照と比較して $p<0.05$ 、 $n=5$ 、対応のない t 検定）。

【図8】様々なコカイン-CPPパラメータにわたる、ChAT介在ニューロンの変調を図示する。（A）：ChAT介在ニューロンのeNpHR3.0媒介型抑制中の、コカインCPPについての用量反応曲線コカインCPPは、腹腔内20mg/kgの標準的な報酬用量について、ChAT::Cre⁺マウスにおいて有意に減少させられるが（ $p<0.01$ ）、他の濃度では、不安を惹起するか、または不十分であると考えられる（590nm光、一定照射、下記の表2を参照されたい）。（B）：ChR2でのChATニューロンの刺激は、それ自体では場所嗜好を駆動しない。（470nm光、5ミリ秒パルス幅、30秒毎に10秒の10Hz刺激、 $n=4$ 、 $p>0.05$ 両側 t 検定）。（C）：10HzでChR2によるChATニューロンの刺激は、腹腔内10mg/kgコカインについて、コカインによる場所嗜好を有意に変調しない。（470nm光、5ミリ秒パルス幅、コカイン条件付け中に一定の10Hz刺激、ChAT::Cre⁺ $n=6$ 、ChAT::Cre⁻ $n=6$ 、 $p>0.05$ 両側 t 検定）。（D）：10HzでChR2によるChATニューロンの刺激は、腹腔内20mg/kgコカインについて、コカインによる場所嗜好を有意に変調しない（470nm光、5ミリ秒パルス幅、コカイン条件付け中に一定の10Hz刺激、ChAT::Cre⁺ $n=4$ 、ChAT::Cre⁻ $n=3$ 、 $p>0.05$ 両側 t 検定）。

【図9】eNpHR3.0でのChAT介在ニューロンの抑制が、前後関係上のまたは聴覚合図による恐怖条件付けを損なわないことを図示する。（A）：すくみ状態で費やされた時間百分率を、標準的な前後関係上の恐怖条件付けパラダイムにおいて定量化した。「ベースライン」は、第1のトーンショックペアリング（tones shock pairing）に続く30秒間を指す。「即座」は、第2の（および最後の）トーンショックペアリング直後の30秒間を指す。「前後関係」は、条件付けセッションの翌日の、同じ前後関係に対するすくみを指す。ChAT::Cre⁺マウスは、強化された即座および前後関係のすくみを示した。（ $n=9$ ChAT::Cre⁺、 $n=8$ ChAT::Cre⁻、両側 t 検定、即座および前後関係のすくみについてChAT::Cre⁺とChAT::Cre⁻とを比較して $p<0.05$ ）。（B）：聴覚合図による恐怖条件付けパラダイムについての、すくみ状態で費やされた時間百分率。「プレトーン（Pre-tone）」は、新たな前後関係における、トーンの発生の2.5分前を指し、「トーン」は、トーン中の2.5分間を指す（ $n=9$ ChAT::Cre⁺、 $n=8$ ChAT::Cre⁻、両側 t 検定、ChAT::Cre⁺とChAT::Cre⁻とを比較して $p>0.05$ ）。

【図10】本開示の実施形態と一致する、側坐核（NAc）または背側線条体を制御する

ためのシステムを図示する。

【図11】本開示の実施形態と一致する、アセチルコリンの放出を制御するためのフロー図を図示する。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、とりわけ、側坐核または背側線条体のコリン作動性介在ニューロン細胞の電気膜電位を選択的に変化させることによって、個体における報酬関連行動を妨害するための組成物および方法を提供する。本発明は、光応答性オプシンイオンポンプタンパク質を用いた側坐核のコリン作動性介在ニューロン細胞の選択的過分極が、薬物嗜癖の動物モデルにおける報酬追求行動を妨害するという、発明者らの発見に基づく。

10

【0018】

本開示は、種々の修正および代替形態に従うが、それらの詳細は、一例として図面に示されており、詳細に説明される。しかしながら、本開示を説明される特定の実施形態に限定することを意図しないと理解されたい。逆に、請求項で定義される態様を含む、本開示の範囲内に入る全ての修正、同等物、および代替案を対象とすることを意図する。

【0019】

一般的技術

本発明の実践は、特に指示されない限り、当業者に周知である、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、免疫学、生理学、ならびに病態生理学薬物嗜癖および報酬関連行動の従来技術を用いる。かかる技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) および Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russel, 2001), (共同で「Sambrook」と称される)、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, including supplements through 2001)、PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)、Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York、Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (共同で「Harlow and Lane」と称される)、Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000)、Handbook of Experimental Immunology, 4th edition (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987)、ならびに Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987) 等の文献において十分に説明される。他の有用な参考文献には、Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill; J. Isselbacher et al., eds.)、および Addiction Research Methods, (Miller et al, eds., 2010; Wiley-Blackwell, United Kingdom) が含まれる。

20

30

40

【0020】

定義

本明細書で使用される時、「報酬関連行動」は、行動を強化するプロセス、すなわち、

50

行動を行った直後またはすぐ後の刺激の送達または出現によって、しばしば快楽的な反応の形態で、特定の行動の率、確率、または強度を増加させる何らかのものである。報酬関連行動には、食物の獲得、性行動、賭博行動、および／または薬物関連の嗜癖行動が含まれる可能性があるが、それらに限定されない。

【0021】

「薬物関連嗜癖行動」は、強迫的な物質使用からもたらされる行動であり、物質への明らかな依存性を特徴とする。嗜癖関連行動の症候は、(i) 薬物の使用の圧倒的な関与、(ii) その供給の確保、および (iii) 離脱後の再発の高い確率である。

【0022】

本明細書で言及される時、「薬物」または「麻酔」という用語は、アヘンおよびヘロイン等のオピオイド、メタンフェタミン、コカイン（ベンゾイルメチルエクゴニン）、ケタミン、MDMA（3, 4-メチレンジオキシメタンフェタミン、別名「エクスタシー」）、リゼルギン酸ジエチルアミド（LSD）、またはカンナビノイドを含むことが意図される。加えて、麻酔は、アルコール、ニコチン、または任意の他の規制物質を含むことが意図される。

【0023】

「個体」は、ヒトを含む哺乳動物である。ほ乳類は、家畜、スポーツ用動物、ペット、霊長類、マウス、およびラットを含むが、それらに限定されない。個体はまた、イヌおよびネコを含むが、それらに限定されない、伴侶動物も含む。いくつかの態様では、個体は、ほ乳類等のヒトではない動物である。別の態様では、個体は、ヒトである。

【0024】

本明細書で使用される時、薬物、化合物、または薬学的組成物の「有効投薬量」または「有効量」は、有益なまたは所望の結果を達成するのに十分な量である。予防的使用のために、有益なまたは所望の結果は、危険性を排除することもしくは低減すること、重症度を減らすこと、または疾患、その合併症、および疾患の発達中に呈する中間病理学的表現型の、生化学的、組織学的、および／もしくは行動的症状を含めて、疾患の発症を遅延させること等の結果を含む。治療的使用のために、有益なまたは所望の結果は、疾患からもたらされる1つ以上の症状を減少させること、疾患を患う者の生活の質を増加させること、疾患を治療するために要求される他の薬の用量を減少させること、標的とすることを介して等で別の薬の効果を強化すること、疾患の進行を遅延させること、および／または生存を延長すること等の臨床結果を含む。有効投薬量は、1つ以上の投与として投与することができる。本発明の目的のために、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効投薬量は、直接または間接的のいずれかで、予防的または治療的処置を遂行するために十分な量である。臨床文脈において理解されるように、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効投薬量は、別の薬物、化合物、または薬学的組成物と併せて達成されても、されなくてもよい。故に、「有効投薬量」は、1つ以上の治療剤を投与する前後関係において考慮されてもよく、1つ以上の他の薬剤と併せて、望ましい結果が達成され得るかまたは達成される場合、単一の薬剤が有効量で与えられることを考慮されてもよい。

【0025】

本明細書で使用される時、「治療」または「治療すること」は、好ましくは臨床結果を含む、有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果には、次のうちの1つ以上が含まれるが、それらに限定されない：疾患からもたらされる症状を減少させること、疾患を患う者の生活の質を増加させること、疾患を治療するために要求される他の薬の用量を減少させること、疾患の進行を遅延させること、および／または個体の生存を延長すること。

【0026】

本明細書で使用される時、単数形「a」、「an」、および「the」は、特に指示がない限り、複数形の指示対象を含む。

【0027】

本明細書の全体を通じて挙げられる全ての最大数値制限は、全てのより低い数値制限が

10

20

30

40

50

本明細書で明示的に書かれたかのように、かかるより低い数値制限を含むことが意図される。本明細書の全体を通じて挙げられる全ての最小数値制限は、全てのより高い数値制限が本明細書で明示的に書かれたかのように、かかるより高い数値制限を含む。本明細書の全体を通じて挙げられる全ての数値範囲は、かかるより広い数値範囲内に入る全てのより狭い数値範囲が、本明細書で明示的に書かれたかのように、かかるより狭い数値範囲を含む。

【0028】

側坐核

側坐核 (*accumbens nucleus*) または中隔側坐核 (*nucleus accumbens septi*) としても知られる、側坐核 (*nucleus accumbens*) (NAc) は、腹側線条体の主要部を形成するニューロンの集合である。それは、報酬、快楽、笑い、嗜癖、攻撃、恐怖、およびプラセボ効果において重要な役割を果たすと考えられている。側坐核において見出される主な神経細胞型は、中型有棘ニューロン (MSN) である。これらのニューロンによって産生される神経伝達物質は、中枢神経系の主要な抑制性神経伝達物質のうちの1つである、ガンマーアミノ酪酸 (GABA) である。MSNはまた、側坐核の主要な投射または出力ニューロンである。側坐核におけるニューロンの95%は、中型有棘GABA作動性の投射ニューロンであるが、脳のこの領域における細胞の約1%を構成する、大型無棘コリン作動性介在ニューロン等の、他の神経型もまた見出される。

【0029】

アセチルコリン (ACh) は、最終的に神経伝達物質として知られるようになった、生化学物質のクラスの最初に発見されたメンバーであった。中枢神経系において、AChは、感覚および運動処理、睡眠、痛覚、気分、ストレス反応、注意、覚醒、記憶、動機、ならびに報酬等の、様々な身体機能に重要である。別の神経伝達物質、ドーパミン (DA) もまた、NAcにおいて見出され、その放出は、興奮薬の報酬効果を媒介する必要不可欠な事象である (Sofuoglu & Mooney, 2009, CNS Drugs, 20(11): 939-952)。コリン作動性介在ニューロンは、側坐核においてAChを放出する。MSNの活性は、コリン作動性制御およびドーパミン作動性制御の両方によって変調することができ、それは刺激される受容体亜型に応じて興奮性または抑制性であり得、すなわち、D1ドーパミン作動性およびM1 mAChRは、興奮性である一方で、D2ドーパミン作動性およびM4 mAChRは、抑制性である (Calabresi et al., Lancet Neurol, 2006, 5(11): 974-83)。コリン作動性介在ニューロンは、腹側被蓋野 (VTA) からドーパミン作動性入力を、および主に前頭前皮質、海馬、および扁桃体からグルタミン酸作動性入力を受容する (Sofuoglu & Mooney, 2009, CNS Drugs, 20(11): 939-952)。理論に拘束されることなく、コリン作動性介在ニューロン上のこのDAおよびグルタミン酸塩収束は、DA媒介型報酬がグルタミン酸塩媒介型学習および前後関係情報に関連する機構を提供し得ると考えられる (Berlenga et al., Neuroscience, 2003; 120(4): 1149-56)。したがって、コリン作動性介在ニューロンは、報酬シグナルの前後関係上適切な行動への翻訳を調節すると考えられる。

【0030】

一般的に乱用される薬物および自然の報酬は、NAcにおける神経伝達物質の細胞外濃度を変化させる相互作用を共有する (Di Chiara & Imperato, 1988, PNAS, 85(14): 5274-8, Phaus, Curr Opin Neurobiol, 1999, 9(6): 751-8)。更に、NAcの病変は、種々の刺激薬およびアヘン剤の報酬効果を減少させることが示されている (Kelley et al., Behav Neurosci, 1989, 103(6): 1327-34)。それにもかかわらず、それは、それが報酬関連行動の報酬状態において果たす役割についての最も強固な証拠を提供してきた、NAc中への麻酔の直接的微小注入を包含する実験で

あった。例えば、嗜癖の齧歯類モデルは、N A c 中に直接、アンフェタミン（ドーパミン放出薬剤）、コカイン（ドーパミン再取り込み阻害剤）、およびノミフェンシン（ドーパミン再取り込み阻害剤）等の麻薬を容易に自己投与することになるが、それにより、ドーパミンがN A cにおいて、報酬および動機に基づく行動を調節するための重要な役割を果たすことが実証される（Carlezon & Thomas, *Neuropharmacology*, 2009; 56 (Suppl 1): 122-132）。

【0031】

しかしながら、とりわけ物質乱用および依存性（嗜癖）等の報酬関連行動に関して、ドーパミン等の神経伝達物質の入力に応答した、これらの複雑なほ乳類行動を媒介することにおける、N A cの細胞自体によって果たされる役割は、依然として不明確である。また、N A cを通じて報酬関連行動を引き起こす際の、神経伝達物質ドーパミンおよびアセチルコリンによって果たされる特異的な役割も未知である。報酬は、行動を強化するプロセス、すなわち、提示される時、行動が強度を増す原因となる何らかのものである。報酬は、値個体が対象物、行動的作用（behavioral act）、または内部の生理状態に帰する正值を説明するための使用上の概念である。自然の報酬には、摂食、交配、および闘争等の、種の生存のために必要なものが含まれる。N A cは、薬物嗜癖、性依存症、および賭博嗜癖まで様々な、これらのタイプの報酬関連行動のうちの多くに関連してきた。

【0032】

光応答性オプシントタンパク質

本明細書では、個体における少なくとも1つの報酬関連行動を妨害するために、個体の側坐核および線条体におけるコリン作動性ニューロンを選択的に過分極化するための、光遺伝学的ベースの組成物および方法が提供される。光遺伝学とは、機能している無処置の生体系とベースを保つために必要とされる時間精度（ミリ秒の時間スケール）で、自由に移動しているほ乳類および他の動物の体内でさえも、生体組織の標的細胞内の具体的な事象を制御するために使用される、遺伝的および光学的方法の組み合わせを指す。光遺伝学は、具体的な標的機構の使用を通じて細胞型分解能を維持しながら、ニューロン膜電位の時間的に正確な操作を可能にする、標的神経細胞の原形質膜への高速光応答性オプシントチャンネルまたはポンプタンパク質の導入を必要とする。

【0033】

本発明で使用され得る光応答性オプシンは、光によってニューロンにおける過分極を誘発するオプシンと、光によってニューロンにおける脱分極を誘発するオプシンとを含む。オプシンの例は、下記の表1および2に示される。

表1：可視スペクトルにわたる細胞活性の抑制のための識別されたオプシンを示す：

【表 1】

オプシン型	生物起源	波長感度	定義された動作
<i>NpHR</i>	ナトロノモナス・パラオニス	最大 589nm	抑制（過分極）
<i>BR</i>	ハロバクテリウム・ハロビウム	最大 570nm	抑制（過分極）
<i>AR</i>	アセタブラリアアセタブラム	最大 518nm	抑制（過分極）
<i>GtR3</i>	グイラルディア・セータ	最大 472nm	抑制（過分極）
<i>Mac</i>	レプトスフェリア・マクラン	最大 470～500nm	抑制（過分極）
<i>NpHr3.0</i>	ナトロノモナス・パラオニス	680nm 有用 最大 589nm	抑制（過分極）
<i>NpHR3.1</i>	ナトロノモナス・パラオニス	680nm 有用 最大 589nm	抑制（過分極）

10

表 2：可視スペクトルにわたる興奮および変調のための識別されたオプシンを示す：

【表 2】

20

オプシン型	生物起源	波長感度	定義された動作
<i>VChR1</i>	ボルボックス・カルテリ	589nm 有用 最大 535nm	興奮（脱分極）
<i>DChR</i>	ドナリエラ・サリナ	最大 500nm	興奮（脱分極）
<i>ChR2</i>	コナミドリムシ	最大 470nm 380～405nm 有用	興奮（脱分極）
<i>ChETA</i>	コナミドリムシ	最大 470nm 380～405nm 有用	興奮（脱分極）
<i>SFO</i>	コナミドリムシ	最大 470nm 最大 530nm	興奮（脱分極）不活性化
<i>SSFO</i>	コナミドリムシ	最大 445nm 590nm、390～400nm	段階的活性化（脱分極）不活性化
<i>C1V1</i>	ボルボックス・カルテリおよびコナミドリムシ	最大 542nm	興奮（脱分極）
<i>C1V1 E122</i>	ボルボックス・カルテリおよびコナミドリムシ	最大 546nm	興奮（脱分極）
<i>C1V1 E162</i>	ボルボックス・カルテリおよびコナミドリムシ	最大 542nm	興奮（脱分極）
<i>C1V1 E122/E162</i>	ボルボックス・カルテリおよびコナミドリムシ	最大 546nm	興奮（脱分極）

30

40

【0034】

本明細書で使用される時、光応答性オプシン（*NpHR*、*BR*、*AR*、*GtR3*、*Ma*

50

c、ChR2、VChR1、DChR、およびChETA等）は、自然発生タンパク質および機能的変異形、断片、断片を含む融合タンパク質、または完全長タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、除去されてもよい。変異形は、自然発生タンパク質配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のうちのいずれかで同一である、アミノ酸配列を有してもよい。機能的変異形は、自然発生タンパク質と同じまたは同様の過分極機能または脱分極機能を有してもよい。

【0035】

強化細胞内輸送アミノ酸モチーフ

本開示は、ほ乳類細胞の原形質膜への輸送を強化する、1つ以上のアミノ酸配列モチーフの追加によって、細胞において発現される光応答性オプシントタンパク質の修飾を提供する。進化的により単純な生物に由来する構成要素を有する、光応答性オプシントタンパク質は、ほ乳類細胞によって発現されない、または耐えられなくてもよく、あるいはほ乳類細胞において高レベルで発現される時に低下した細胞内局在性を示してもよい。その結果として、いくつかの実施形態では、細胞において発現される光応答性オプシントタンパク質は、シグナルペプチド、小胞体（ER）移行シグナル、膜輸送シグナル、および／またはN末端ゴルジ移行シグナルから成る群より選択される、1つ以上のアミノ酸配列モチーフに融合させることができる。ほ乳類細胞の原形質膜への光応答性オプシントタンパク質輸送を強化する、1つ以上のアミノ酸配列モチーフは、光応答性オプシントタンパク質のN末端、C末端、またはNおよびC末端の両方に融合させることができる。随意で、光応答性オプシントタンパク質および1つ以上のアミノ酸配列モチーフは、リンカーによって分離されてもよい。いくつかの実施形態では、光応答性オプシントタンパク質は、細胞原形質膜へのタンパク質の輸送を強化する輸送シグナル（ts）の追加によって修飾することができる。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネルKir2.1のアミノ酸配列に由来することができる。他の実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列KSRITSEGEYIPLDQIDINVを含むことができる。

【0036】

細胞の原形質膜への光応答性オプシントタンパク質の輸送を強化することができる、追加的なタンパク質モチーフは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願第12/041,628号で説明されている。いくつかの実施形態では、タンパク質の中のシグナルペプチド配列を削除するか、または異なるタンパク質からのシグナルペプチド配列と置換することができる。

【0037】

光応答性クロライドポンプ

本明細書で提供される方法のいくつかの態様では、光応答性クロライドポンプのハロロドプシンファミリーの1つ以上のメンバーは、側坐核または線条体のコリン作動性介在ニューロンの原形質膜上で発現される。

【0038】

いくつかの態様では、側坐核または線条体のコリン作動性介在ニューロンの神経細胞の原形質膜上で発現される、該1つ以上の光応答性クロライドポンプタンパク質は、ナトロモノナス・パラオニスに由来することができる。いくつかの実施形態では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、琥珀色光ならびに赤色光に応答することができ、光応答性クロライドポンプタンパク質が琥珀色または赤色光で照射される時に、介在ニューロンにおける過分極電流を仲介することができる。光応答性クロライドポンプを活性化することができる光の波長は、約580～630nmであり得る。いくつかの実施形態では、光は、約590nmの波長にあり得るか、または光は、約630nmよりも大きい（例えば、約740nm未満）波長を有することができる。別の実施形態では、光は、約630nmの波長を有する。いくつかの実施形態では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、光の連続パルスに曝露された時に、少なくとも約90分にわたって神経細胞膜を過分極化することができる。いくつかの実施形態では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、配列

番号1に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。加えて、光応答性クロライドポンプタンパク質は、光に対する感受性を増加もしくは減少させ、光の特定の波長に対する感受性を増加もしくは減少させ、および／または細胞の原形質膜の分極状態を調節する光応答性タンパク質の能力を増加もしくは減少させるように、天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および／または挿入を含むことができる。いくつかの実施形態では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、1つ以上の保存アミノ酸置換を含有する。いくつかの実施形態では、光応答性タンパク質は、1つ以上の非保存アミノ酸置換を含有する。天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および／または挿入を含む、光応答性タンパク質は、光に応答して、神経細胞の原形質膜を過分極化する能力を好適に保持する。

10

【0039】

加えて、他の態様では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、配列番号1に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、小胞体（ER）移行シグナルとを含むことができる。このER移行シグナルは、コアアミノ酸配列のC末端に融合させることができ、またはコアアミノ酸配列のN末端に融合させることができる。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、リンカーによってコアアミノ酸配列に結合される。リンカーは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含むことができる。リンカーは更に、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列FXYENEを含むことができ、Xは、任意のアミノ酸となり得る。別の実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列VXXSLを含むことができ、Xは、任意のアミノ酸となり得る。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列FCYENENVを含むことができる。

20

【0040】

他の態様では、本明細書で提供される光応答性クロライドポンプタンパク質は、細胞膜上で発現される光応答性タンパク質を含むことができ、タンパク質は、配列番号1に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、輸送シグナル（例えば、原形質膜への光応答性クロライドポンプタンパク質の輸送を強化することができる）とを含む。輸送シグナルは、コアアミノ酸配列のC末端に融合させることができ、またはコアアミノ酸配列のN末端に融合させることができる。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含むことができる、リンカーによって、コアアミノ酸配列に結合することができる。リンカーは更に、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネルK_{ir}2.1のアミノ酸配列に由来することができる。他の実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列KSRITSEGEYIPLDQIDINNVを含むことができる。

30

40

【0041】

いくつかの態様では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、配列番号1に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、ER移行シグナル、シグナルペプチド、および膜輸送シグナルから成る群より選択される、ほ乳類細胞の原形質膜への輸送を強化する、少なくとも1つの（1つ、2つ、3つ、またそれを超える等

50

）アミノ酸配列モチーフとを含むことができる。いくつかの実施形態では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、N末端シグナルペプチドと、C末端ER移行シグナルと、C末端輸送シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、C末端ER移行シグナルおよびC末端輸送シグナルは、リンカーによって結合することができる。リンカーは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含むことができる。リンカーはまた、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を更に含むこともできる。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、輸送シグナルよりもC末端に位置することができる。他の実施形態では、輸送シグナルは、ER移行シグナルよりもC末端に位置することができる。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、アミノ酸配列MTETLPVTESAVALQAEを含む。別の実施形態では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、配列番号2と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0042】

更に、他の態様では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、配列番号1に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列を含むことができ、配列番号1のN末端シグナルペプチドは、削除または置換される。いくつかの実施形態では、他のシグナルペプチド（他のオプシンからのシグナルペプチド等）を使用することができる。光応答性タンパク質は更に、本明細書に記載されるER移行シグナルおよび／または膜輸送シグナルを含むことができる。いくつかの実施形態では、光応答性クロライドポンプタンパク質は、配列番号3と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0043】

また、本明細書では、配列番号1に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、ER移行シグナルと、膜輸送シグナルとを含む、光応答性タンパク質等の、本明細書に記載される光応答性クロライドイオンポンプタンパク質のうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドも提供される。別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2および配列番号3と少なくとも95%同一であるアミノ酸をコードする、配列を含む。ポリヌクレオチドは、発現ベクター（本明細書に記載されるウイルスベクター等であるが、それに限定されない）の中にあってもよい。ポリヌクレオチドは、NAcまたは線条体のコリン作動性ニューロンにおける光応答性クロライドイオンポンプタンパク質の発現に使用されてもよい。

【0044】

いくつかの実施形態では、光応答性オプシンタンパク質は、配列番号1に示される配列と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、NpHRオプシンタンパク質である。いくつかの実施形態では、NpHRオプシンタンパク質は更に、小胞体（ER）移行シグナルおよび／または膜輸送シグナルを含む。例えば、NpHRオプシンタンパク質は、配列番号1に示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列と、小胞体（ER）移行シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、配列番号1に示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列は、リンカーを通じてER移行シグナルに結合される。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列FXYLENEを含み、Xは、任意のアミノ酸となり得る。別の実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列VXXSLを含み、Xは、任意のアミノ酸となり得る。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列FCYLENEVを含む。いくつかの実施形態では、NpHRオプシンタンパク質は、配列番号1に示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列と、ER移行シグナルと、膜輸送シグナルとを含む。他の実施形態では、NpHRオプシンタンパク質は、N末端からC末端まで、配列番号1に示される配列と少

なくとも95%同一であるアミノ酸配列と、ER移行シグナルと、膜輸送シグナルとを含む。他の実施形態では、NpHRオプシントタンパク質は、N末端からC末端まで、配列番号1に示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列と、膜輸送シグナルと、ER移行シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、膜輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャンネルK_{ir}2.1のアミノ酸配列から導出される。いくつかの実施形態では、膜輸送シグナルは、アミノ酸配列KSRITSEGEYIPLDQIDINVを含む。いくつかの実施形態では、膜輸送シグナルは、リンカーによって、配列番号1に示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列に結合される。いくつかの実施形態では、膜輸送シグナルは、リンカーを通じてER移行シグナルに結合される。リンカーは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含んでもよい。リンカーは更に、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、光応答性オプシントタンパク質は更に、N末端シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、光応答性オプシントタンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、光応答性オプシントタンパク質は、配列番号3のアミノ酸配列を含む。

10

【0045】

光応答性クロライドポンプタンパク質に関係付けられる更なる開示は、米国特許出願公開第2009/0093403号および第2010/0145418号、ならびに国際特許出願第PCT/US2011/028893号で見出すことができ、それらの各々の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0046】

光応答性プロトンポンプ

本明細書で提供される組成物および方法のいくつかの態様では、1つ以上の光応答性プロトンポンプが、側坐核または線条体のコリン作動性介在ニューロンの原形質膜上で発現される。

【0047】

いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、青色光にตอบสนองすることができ、かつグィラルディア・セータに由来することができ、プロトンポンプタンパク質は、細胞が青色光で照射される時に、過分極電流を仲介することが可能となり得る。光は、約450から約495nmの間の波長を有することができ、または約490nmの波長を有することができる。別の実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、配列番号4に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。光応答性プロトンポンプタンパク質は、追加的に、光に対する感受性を増加もしくは減少させ、光の特定の波長に対する感受性を増加もしくは減少させ、および/または細胞の原形質膜の分極状態を調節する光応答性プロトンポンプタンパク質の能力を増加もしくは減少させるように、天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および/または挿入を含むことができる。加えて、光応答性プロトンポンプタンパク質は、1つ以上の保存アミノ酸置換および/または1つ以上の非保存アミノ酸置換を含有することができる。天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および/または挿入を含む、光応答性プロトンポンプタンパク質は、光にตอบสนองして、神経細胞の原形質膜を過分極化する能力を好適に保持する。

30

40

【0048】

本明細書で開示される方法の他の態様では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、配列番号4に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、シグナルペプチド、ER移行シグナル、および膜輸送シグナルから成る群より選択される、ほ乳類細胞の原形質膜への輸送を強化する、少なくとも1つの(1つ、2つ、3つ、

50

またそれを超える等) アミノ酸配列モチーフとを含むことができる。いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、N末端シグナルペプチドと、C末端ER移行シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、N末端シグナルペプチドと、C末端輸送シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、N末端シグナルペプチドと、C末端ER移行シグナルと、C末端輸送シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、C末端ER移行シグナルと、C末端輸送シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、C末端ER移行シグナルおよびC末端輸送シグナルは、リンカーによって結合される。リンカーは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含むことができる。リンカーは更に、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、輸送シグナルよりもC末端に位置する。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ER移行シグナルよりもC末端に位置する。

【0049】

また、本明細書では、配列番号4に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列を含む、光応答性プロトンポンプタンパク質等の、本明細書に記載される光応答性プロトンポンプタンパク質のうちのいずれかをコードする単離ポリヌクレオチドも提供される。また、本明細書では、配列番号4に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列を含む、光応答性プロトンポンプタンパク質等の、本明細書に記載されるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクター（本明細書に記載されるウイルスベクター等）も提供される。ポリヌクレオチドは、神経細胞内の光応答性オブシタンパク質の発現に使用されてもよい（例えば、NACまたは線条体のコリン作動性介在ニューロン）。

【0050】

光応答性プロトンポンプタンパク質に関係付けられる更なる開示は、国際特許出願第PCT/US2011/028893号で見出すことができ、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0051】

光応答性チャネルタンパク質

本明細書で提供される方法のいくつかの態様では、光応答性イオンチャネルのチャネルロドプシンファミリーの1つ以上のメンバーは、側坐核または線条体のコリン作動性介在ニューロンの原形質膜上で発現される。

【0052】

いくつかの態様では、光活性化カチオンチャネルタンパク質は、コナミドリムシに由来することができ、カチオンチャネルタンパク質は、細胞が光で照射される時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能となり得る。別の実施形態では、光応答性カチオンチャネルタンパク質は、配列番号5に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。コナミドリムシに由来する光応答性カチオンチャネルタンパク質を活性化するために使用される光は、約460～約495nmの波長を有することができるか、または約470nmの波長を有することができる。加えて、光は、少なくとも約100Hzの強度を有することができる。いくつかの実施形態では、100Hzの強度を有する光を用いたコナミドリムシに由来する光応答性カチオンチャネルの活性化は、光応答性カチオンチャネルを発現するニューロンの脱分極誘発型シナプス枯渇を引き起こすことができる。光応答性カチオンチャネルタンパク質は、追加的に、光に対する感受性を増加もしくは減少させ、光の特定の波長に対する感受性を増加もしくは減少させ

、および／または細胞の原形質膜の分極状態を調節する光応答性カチオンチャネルタンパク質の能力を増加もしくは減少させるように、天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および／または挿入を含むことができる。加えて、光応答性カチオンチャネルタンパク質は、1つ以上の保存アミノ酸置換および／または1つ以上の非保存アミノ酸置換を含むことができる。天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および／または挿入を含む光応答性カチオンチャネルタンパク質は、光に応答して、神経細胞の原形質膜を脱分極化する能力を好適に保持する。

【0053】

他の実施形態では、光応答性カチオンチャネルタンパク質は、タンパク質のレチナール結合ポケットの全体を通じた主要位置に具体的なアミノ酸置換を有することができる、段階機能オプシン（SFO）タンパク質または安定化段階機能オプシン（SSFO）タンパク質となり得る。いくつかの実施形態では、SFOタンパク質は、配列番号5のアミノ酸残基C128に突然変異を有することができる。他の実施形態では、SFOタンパク質は、配列番号5の中にC128A突然変異を有する。他の実施形態では、SFOタンパク質は、配列番号5の中にC128S突然変異を有する。別の実施形態では、SFOタンパク質は、配列番号5の中にC128T突然変異を有する。いくつかの実施形態では、SFOタンパク質は、配列番号6または配列番号7に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。

【0054】

他の実施形態では、光応答性カチオンチャネルタンパク質は、ボルボックス・カルテリのVChR1タンパク質およびコナミドリムシからのChR1タンパク質に由来するC1V1キメラタンパク質となり得て、タンパク質は、ChR1の第1および第2の膜貫通ヘリックスによって置換される、少なくとも第1および第2の膜貫通ヘリックスを有する、VChR1のアミノ酸配列を含み、光に応答し、細胞が光で照射される時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である。加えて、いくつかの実施形態では、本発明は、置換または変異アミノ酸配列を含む、ポリペプチドを含むことができ、変異ポリペプチドは、前駆体C1V1キメラポリペプチドの特徴的な光応答性を保持するが、また、いくつかの具体的な態様では、変化させられた性質を保有してもよい。例えば、本明細書に記載される変異光応答性C1V1キメラタンパク質は、動物細胞内または動物細胞原形質膜上の両方での増加したレベルの発現、光の異なる波長、特に赤色光に曝露された時の変化させられた応答性、および／または特質の組み合わせを示すことができ、それにより、キメラC1V1ポリペプチドは、低い脱感作、高速脱活性化、他の光応答性カチオンチャネルを用いた最低限の相互活性化のための低い紫色光活性化、および／または動物細胞中での強力な発現という特性を保有する。いくつかの実施形態では、C1V1タンパク質は、配列番号8、9、10、または11に示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。

【0055】

光応答性カチオンチャネルタンパク質に関係付けられる更なる開示は、米国特許出願公開第2007/0054319号ならびに国際特許出願公開第WO2009/131837号および第WO2007/024391号で見出すことができる。SFOまたはSSFOタンパク質に関係付けられる更なる開示は、国際特許出願公開第WO2010/056970号ならびに米国仮特許出願第61/410,704号および第61/511,905号で見出すことができる。C1V1キメラカチオンチャネルならびに同チャネルの突然変異体に関係付けられる更なる開示は、米国仮特許出願第61/410,736号、第61/410,744号、および第61/511,912号で見出すことができる。具体的な光応答性オプシンタンパク質に関係付けられる上述の参考文献の各々の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0056】

ポリヌクレオチド

本開示はまた、本明細書に記載される光応答性オプシントタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドも提供する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、発現カセットを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、上述の核酸を含むベクターである。いくつかの実施形態では、本開示の光応答性オプシントタンパク質をコードする核酸は、プロモータに作動可能に連結される。プロモータは、当該技術分野で周知である。コリン作動性介在ニューロンにおいて機能する任意のプロモータを、本開示の光応答性オプシントタンパク質および／またはその任意の変異形の発現に使用することができる。具体的な動物細胞における光応答性オプシントタンパク質またはその変異形の発現を駆動するのに有用である、開始制御領域またはプロモータは、多数あり、当業者に周知である。これらの核酸を駆動することが可能な事実上いかなるプロモータも使用することができる。いくつかの実施形態では、光応答性タンパク質の発現を駆動するために使用されるプロモータは、コリン作動性介在ニューロンにおける導入遺伝子の強固な発現を駆動することが可能である、コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）プロモータであり得る（例えば、Gong et al., J. Neurosci., 27, 9817-9823 (2007)を参照されたい）。

10

【0057】

また、本明細書では、本明細書に記載される光応答性オプシントタンパク質またはその任意の変異形をコードするヌクレオチド配列を含む、ベクターが提供される。本発明により投与することができるベクターはまた、ベクターのポリヌクレオチドから転写された時に標的動物細胞の原形質膜上で光応答性タンパク質の蓄積をもたらす、RNA（例えば、mRNA）をコードするヌクレオチド配列を含む、ベクターも含む。使用されてもよいベクターは、限定なしに、レンチウイルス、HSV、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含む。レンチウイルスは、HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、およびEIAVを含むが、それらに限定されない。レンチウイルスは、VSV、狂犬病、Mo-MLV、バキュロウイルス、およびエボラを含むが、それらに限定されない、他のウイルスの外膜タンパク質を伴う偽型であってもよい。かかるベクターは、当該技術分野での標準方法を使用して調製されてもよい。

20

【0058】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組み換えAAVベクターである。AAVベクターは、安定した部位特有の様態で、感染する細胞のゲノムに統合することができる、比較的小さいサイズのDNAウイルスである。それらは、細胞成長、形態、または分化にいずれの影響も誘発することなく、広範囲の細胞に感染することができ、ヒトの病理に関与するように思われない。AAVゲノムは、クローン化され、配列決定され、特徴付けられている。それは、約4700個の塩基を包含し、ウイルスの複製起点としての機能を果たす、約145個の塩基の逆方向末端反復（ITR）領域を各端に含有する。残りのゲノムは、ウイルス複製およびウイルス遺伝子の発現に関与するrep遺伝子を含有するゲノムの左側部分、およびウイルスのカプシドタンパク質をコードするcap遺伝子を含有するゲノムの右側部分といった、カプシド形成機能を担持する2つの必須領域に分けられる。

30

【0059】

AAVベクターは、当該技術分野での標準方法を使用して調製されてもよい。任意の血清型のアデノ随伴ウイルスが好適である（例えば、Blacklow, pp. 165-174 of "Parvoviruses and Human Disease" J. R. Pattison, ed. (1988)、Rose, Comprehensive Virology 3:1, 1974、P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" In Parvoviruses (JR Kerr, SF Cotmore, ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p5-14, Huddersfield, London, UK (2006)、およびDE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "The Genus Dependovirus" (JR

40

50

Kerr, S F Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p15-23, Hudder Arnold, London, UK (2006)を参照されたく、それらの各々の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。ベクターを精製するための方法は、例えば、米国特許第6, 566, 118号、第6, 989, 264号、および第6, 995, 006号、ならびに第WO/1999/011764号(標題「Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors」)で見出すことができ、それらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。ハイブリッドベクターの調製は、例えば、PCT出願第PCT/US2005/027091号に記載されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。生体外および生体内で遺伝子を導入するためのAAVに由来するベクターの使用が説明されている(例えば、国際特許出願公開第91/18088号および第WO93/09239号、米国特許第4, 797, 368号、第6, 596, 535号、および第5, 139, 941号、ならびに欧州特許第0488528号を参照されたく、それらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。これらの出版物は、repおよび/またはcap遺伝子が削除され、関心遺伝子によって置換される、種々のAAV由来構築物、および生体外で(クラスタ細胞に)または生体内で(生物に直接)関心遺伝子を導入するためのこれらの構築物の使用を説明する。本発明による複製欠損組み換えAAVは、2つのAAV逆方向末端反復(ITR)領域が両側に並ぶ、関心の核酸配列を含有するプラスミド、およびAAVカプシド形成遺伝子(repおよびcap遺伝子)を担持するプラスミドを、ヒトヘルパーウイルス(例えば、アデノウイルス)に感染した細胞株に共同導入することによって調製することができる。次いで、産生されるAAV組み換え型は、標準技法によって純化される。

10

20

【0060】

いくつかの実施形態では、本発明の方法において使用するためのベクター(複数可)は、ウイルス粒子(例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、およびAAV16を含むが、それらに限定されないAAVウイルス粒子)中でキャプシド形成される。したがって、本発明は、本明細書に記載されるベクターのうちのいずれかを含む、組み換えウイルス粒子を含む(組み換えポリヌクレオチドを含有するため組み換え型である)。かかる粒子を生成する方法は、当該技術分野において既知であり、米国特許第6, 596, 535号に記載され、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0061】

光応答性オプシントタンパク質の送達

いくつかの態様では、本明細書で開示される光応答性オプシントタンパク質をコードするポリヌクレオチド(例えば、AAV1ベクター)は、定位固定注射(例えば、Stein et al., J. Virol., 73:34243429, 1999、Davidson et al., PNAS, 97:3428-3432, 2000、Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993、およびAlisky & Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000を参照されたく、それらの各々の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)または蛍光透視法によるもの等の当該技術分野において既知の神経外科技法を使用した、針、カテーテル、または関連デバイスを使用して、側坐核または線条体のコリン作動性介在ニューロンに直接送達することができる。

40

【0062】

他の態様では、光応答性オプシントタンパク質のうちのいずれかは、トランスジェニック動物の側坐核または線条体のコリン作動性介在ニューロンにおいて発現させることができる。例えば、コリンアセチルトランスフェラーゼ(CHAT)プロモータの制御下でCre-リコンビナーゼを使用して、トランスジェニックマウス株を用いることができる。次

50

いで、光応答性オプシン遺伝子を担持する Cre 誘発性アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを、NAc 中に定位的に注射することができる。

【0063】

イオン脂質またはポリマーを用いたトランスフェクション、エレクトロポレーション、光学トランスフェクション、インペールフェクション、または遺伝子銃を介する等であるが、それらに限定されない、光応答性タンパク質をコリン作動性介在ニューロンへ送達する他の方法も使用することができる。

【0064】

光源

ニューロンにおいて発現される光応答性タンパク質を活性化するための波長を有する光を適用することが可能である任意のデバイスが、ニューロンを脱分極化するおよび／または過分極化するために使用されてもよい。例えば、1つ以上のニューロンの膜電圧に影響を及ぼすためにイオンチャネルおよび／またはイオン性ポンプを活性化するための光送達デバイスが使用されてもよい。光送達デバイスは、脳の標的領域に光刺激を提供するように構成することができる。光送達デバイスは、基部、基部に取り付けられたカニューレガイド、およびカニューレガイドを介して基部に取り付けられた1つ以上の光導管を備えてもよい。基部は、光導管から、側坐核または線条体等の標的組織領域に光を送達するように位置付けられた1つ以上の光送達ポートを備えてもよい。光導管は光ファイバーであってもよく、ファイバーの近位端は光学的光源に取り付けられ、遠位端は光送達ポートと連通している。光学的光源は、連続光および／またはパルス光を提供することが可能であり得、所定のパルス周期で光を提供するようにプログラム可能であり得る。光送達デバイスは、所望されるように、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20個等の任意の数の光導管を有してもよい。光導管は、各々が、同じまたは異なる波長の光を担持してもよい。送達された光は、黄色、緑色、または青色光等の450nm~600nmの波長を有してもよい。光送達デバイスは、所望されるように、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20個等の任意の数の光送達ポートを有してもよい。いくつかの変形においては、光導管と同じ数の光送達ポートが存在してもよい一方で、他の変形においては、異なる数の光導管および光送達ポートが存在してもよい。例えば、2つ以上の光送達ポートに光を伝達する単一の光導管が存在してもよい。代替的にまたは追加的に、単一の光導管が、単一の光送達ポートに接続されてもよい。カニューレガイドは、光導管を光送達ポートに固定して揃える一助となるように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、光送達デバイスは、個体における少なくとも1つの報酬関連行動を妨害するために、光を側坐核または線条体に送達するように構成される。光送達デバイスまた、神経活動を測定するために構成され得る1つ以上の測定電極を備えてもよい。例えば、測定電極は、ニューロンが刺激に応答するときに、膜電位（例えば、活動電位）および／または1つ以上のニューロンの膜を横切る電流における変化を記録してもよい。いくつかの変形においては、測定電極は、1つ以上のニューロンの光刺激に対する電氣的応答を測定してもよい。測定電極は、細胞外電極または細胞内電極であってもよい。

【0065】

他の態様では、光送達デバイスは、外部電源への物理的な繋留を要求しない植え込み型光源であり得る。植え込み型光源は、内側本体を備えることができ、内側本体は、電源であるように構成される光を発生するための少なくとも1つの手段を有する。いくつかの実施形態では、電源は、光発生手段に電力供給するための内部バッテリーとなり得る。別の実施形態では、植え込み型光源は、光発生手段に電力供給するための外部源から無線で伝達された電磁エネルギーを受信するための、外部アンテナを備えることができる。無線で伝達された電磁エネルギーは、電波、マイクロ波、または植え込み型光源の光発生手段に電力供給するために外部源から伝達され得る任意の他の電磁エネルギー源であり得る。一実施形態では、光発生手段は、半導体または当該技術分野において既知の他のプロセスを使用して発生される集積回路によって制御される。

【0066】

いくつかの態様では、光手段は、発光ダイオード（LED）であり得る。いくつかの実施形態では、LEDは、青色および／または緑色光を発生することができる。他の実施形態では、LEDは、琥珀色、黄色、および／または青色光を発生することができる。いくつかの実施形態では、いくつかのマイクロLEDが、植え込み型光源の内側本体内に埋め込まれる。他の実施形態では、光発生手段は、固体レーザーダイオードであるか、または光を発生することが可能である任意の他の手段である。光発生手段は、光源に近位の神経の原形質膜上で発現される光応答性タンパク質を活性化するのに十分な強度を有する光を発生することができる。いくつかの実施形態では、光発生手段によって発生されるNAcまたは線条体のコリン作動性介在ニューロンに到達する光の強度は、約0.05mW/mm²、0.1mW/mm²、0.2mW/mm²、0.3mW/mm²、0.4mW/mm²、0.5mW/mm²、約0.6mW/mm²、約0.7mW/mm²、約0.8mW/mm²、約0.9mW/mm²、約1.0mW/mm²、約1.1mW/mm²、約1.2mW/mm²、約1.3mW/mm²、約1.4mW/mm²、約1.5mW/mm²、約1.6mW/mm²、約1.7mW/mm²、約1.8mW/mm²、約1.9mW/mm²、約2.0mW/mm²、約2.1mW/mm²、約2.2mW/mm²、約2.3mW/mm²、約2.4mW/mm²、約2.5mW/mm²、約3mW/mm²、約3.5mW/mm²、約4mW/mm²、約4.5mW/mm²、約5mW/mm²、約5.5mW/mm²、約6mW/mm²、約7mW/mm²、約8mW/mm²、約9mW/mm²、または約10mW/mm²のうちのいずれかの強度を有する（これらの数の間の値を含む）。

【0067】

いくつかの態様では、光発生手段は、外部コントローラによって外部から起動することができる。外部コントローラは、伝送コイルに載置することができる、発電機を備えることができる。外部コントローラのいくつかの実施形態では、電力を発電機に提供するために、バッテリーをそれに接続することができる。スイッチを発電機に接続することができ、個人が発電機を手動で起動または動作停止することを可能にする。いくつかの実施形態では、スイッチを起動させると、発電機は、外部コントローラ上の伝送コイルと植え込み型光源の外部アンテナとの間の電磁結合を通じて、光源上の光発生手段に電力を提供することができる。伝送コイルは、植え込み型光源の外部アンテナに近位にあるとき、光発生手段に電力を供給するためおよび植え込み型光源に1つ以上の制御シグナルを伝送するために、植え込み型光源の外部アンテナとの電磁結合を確立することができる。いくつかの実施形態では、外部コントローラの伝送コイルと植え込み型光源の外部アンテナとの間の電磁結合は、高周波磁気インダクタンス結合であり得る。高周波磁気インダクタンス結合が使用される時に、電波の動作周波数は、約1から20MHzの間を含めた、これらの数の間の任意の値を含むことができる（例えば、約1MHz、約2MHz、約3MHz、約4MHz、約5MHz、約6MHz、約7MHz、約8MHz、約9MHz、約10MHz、約11MHz、約12MHz、約13MHz、約14MHz、約15MHz、約16MHz、約17MHz、約18MHz、約19MHz、または約20MHz）。しかしながら、受光器、赤外線、または生物医学テレメトリーシステム等の他の結合技法が使用されてもよい（例えば、Kiourtis, "Biomedical Telemetry: Communication between Implanted Devices and the External World, Opticon1826, (8): Spring, 2010を参照されたい）。

【0068】

光源を含む、光刺激デバイスの例は、国際特許出願第PCT/US08/50628号および第PCT/US09/49936号、ならびにLlewellyn et al., 2010, Nat. Med., 16(10):161-165で見出すことができ、それらの各々の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0069】

コリン作動性介在ニューロンにおいて発現される光応答性オプシン

動物の側坐核または線条体におけるコリン作動性介在ニューロンの細胞膜上で発現された光応答性オプシタンパク質を含む非ヒト動物が、本明細書に提供され、ここでタンパク質は、光に応答性であり、介在ニューロンが光で照射される時、介在ニューロンの膜分極状態を変化させることが可能であり、オプシンの照射は、動物の少なくとも1つの報酬関連行動を妨害する。いくつかの実施形態では、光応答性タンパク質は、本明細書に記載されるNpHR、BR、ARおよびGtR3から成る群より選択される。例えば、本明細書に記載されるNpHRタンパク質のうちのいずれかは、標的ニューロンの細胞膜上で発現されてもよい。いくつかの実施形態では、報酬関連行動は、薬物関連嗜癖行動である。薬物は、オピオイド（例えば、アヘンおよびヘロイン）、メタンフェタミン、コカイン、ケタミン、MDMA（3, 4-メチレンジオキシメタンフェタミン）、リゼルギン酸ジエチルアミド、カンナビノイド、アルコール、ニコチン、または任意の他の規制物質等であるが、それらに限定されない、任意の嗜癖薬物であり得る。一実施形態では、薬物は、コカインである。別の実施形態では、報酬関連行動は、コカイン嗜癖である。

10

【0070】

また、本明細書では、側坐核または線条体を含む脳組織切片も提供され、ここで光応答性オプシタンパク質は、側坐核のコリン作動性介在ニューロンの細胞膜上で発現され、タンパク質は、光に応答性であり、介在ニューロンが光で照射される時、介在ニューロンの膜分極状態を変化させることが可能であり、タンパク質の照射は、少なくとも1つの報酬関連行動を妨害する。いくつかの実施形態では、脳組織切片は、本明細書に記載される非ヒト動物から採取された培養組織切片である。いくつかの実施形態では、光応答性タンパク質は、側坐核のコリン作動性介在ニューロンの膜を過分極化することが可能であり、それは本明細書に記載されるNpHR、BR、ARおよびGtR3から成る群より選択される。例えば、本明細書に記載されるNpHRタンパク質のうちのいずれかは、標的ニューロンの細胞膜上で発現されてもよい。他の実施形態では、光応答性タンパク質は、側坐核のコリン作動性介在ニューロンの膜を脱分極化することが可能であり、それは本明細書に記載されるChR2、SFO、SSFO、およびC1V1から成る群より選択される。

20

【0071】

本発明の方法

いくつかの態様では、光応答性オプシタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、個体に投与することを含む、個体における報酬関連行動を妨害するための方法が、本明細書に提供され、ここで光応答性オプシタンパク質は、個体の側坐核または線条体におけるコリン作動性介在ニューロンの細胞膜上で発現され、タンパク質は、光に応答性であり、介在ニューロンが光で照射される時、介在ニューロンの膜過分極を誘発することが可能であり、それにより、光によってタンパク質を活性化することは、個体における少なくとも1つの報酬関連行動を妨害する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、個体の側坐核または線条体に投与される。いくつかの実施形態では、光応答性タンパク質は、本明細書に記載されるNpHR、BR、ARおよびGtR3から成る群より選択される。例えば、本明細書に記載されるNpHRタンパク質のうちのいずれかは、標的ニューロンの細胞膜上で発現されてもよい。いくつかの実施形態では、報酬関連行動は、薬物関連嗜癖行動である。薬物は、オピオイド（例えば、アヘンおよびヘロイン）、メタンフェタミン、コカイン、ケタミン、MDMA（3, 4-メチレンジオキシメタンフェタミン）、リゼルギン酸ジエチルアミド、カンナビノイド、アルコール、ニコチン、または任意の他の規制物質等であるが、それらに限定されない、任意の嗜癖薬物であり得る。一実施形態では、薬物は、コカインである。別の実施形態では、報酬関連行動は、コカイン嗜癖である。いくつかの実施形態では、個体は、非ヒト動物である。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、光応答性オプシタンパク質に作動可能に連結されるプロモータ（例えば、ChATプロモータ）を更に含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ベクターである。

30

40

【0072】

報酬関連行動の妨害を測定するための方法は、多くあり、当該技術分野で周知である（

50

例えば、Addiction Research Methods, (Miller et al, eds., 2010; Wiley-Blackwell, United Kingdom)を参照されたい)。例えば、コカイン嗜癖および薬物関連嗜癖行動の妨害は、場所嗜好条件付け(CPP、環境的场所(environmental place)としても知られる)の条件付けを使用することによって査定することができる。CPPは、正または負の報酬に関連付けられている環境刺激に対する嗜好を評価するために、動物研究において一般的に使用される技法である。技法は、薬物の嗜癖の可能性を決定するためにしばしば使用される。手順は、種々の合図(例えば、触覚、視覚、および/または嗅覚)を含有する特有の環境中の配置と対になって、動物に正の刺激(例えば、食物、神経伝達物質、または乱用薬物の効果)が提示される、複数のトライアルを伴う。後に正常な状態で試験された時、アプローチおよび以前に正の刺激関連付けられた小部屋で費やされた時間量は、嗜好の指標および報酬学習のスケールとしての機能を果たす。

10

【0073】

他の態様では、光応答性オプシントタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、個体に投与することを含む、個体における薬物嗜癖を治療するための方法が、本明細書に提供され、ここで光応答性オプシントタンパク質は、個体の側坐核または線条体におけるコリン作動性介在ニューロンの細胞膜上で発現され、タンパク質は、光に応答性であり、介在ニューロンが光で照射される時、介在ニューロンを過分極化することが可能であり、それにより、光によってタンパク質を活性化することは、個体における報酬関連行動を妨害し、個体は、薬物を摂取することをもはや所望しない。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、個体の側坐核または線条体に投与される。いくつかの実施形態では、光応答性タンパク質は、本明細書に記載されるNpHR、BR、ARおよびGtR3から成る群より選択される。例えば、本明細書に記載されるNpHRタンパク質のうちのいずれかは、標的ニューロンの細胞膜上で発現されてもよい。いくつかの実施形態では、報酬関連行動は、薬物関連嗜癖行動である。薬物は、オピオイド(例えば、アヘンおよびヘロイン)、メタンフェタミン、コカイン、ケタミン、MDMA(3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン)、リゼルギン酸ジエチルアミド、カンナビノイド、アルコール、ニコチン、または任意の他の規制物質等であるが、それらに限定されない、任意の嗜癖薬物であり得る。一実施形態では、薬物は、コカインである。別の実施形態では、報酬関連行動は、コカイン嗜癖である。いくつかの実施形態では、個体は、非ヒト動物である。別の実施形態では、個体は、ヒトである。いくつかの実施形態では、個体は、薬物を使用することの正の強化経験をもはや経験しない。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、光応答性オプシントタンパク質に作動可能に連結されるプロモータ(例えば、ChATプロモータ)を更に含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ベクターである。

20

30

【0074】

例示的实施形態

本開示は、生存動物における強化された行動の制御または特徴付けに有用であると考えられる。本発明の具体的な適用は、生存動物における嗜癖および他の強化された行動の査定を促進する。本明細書で開示される例示的な実施形態の多くの態様は、この分野における以前の開発に関し、またそれらに大いに基づいているため、以下の考察は、かかる以前の開発を要約して、実装形態の詳細および修正が導き出される元となり得る基盤および根底にある教示の確固たる理解を提供する。次の考察は、この文脈に関連して、かつ参照により本明細書に組み込まれる参考文献中のその教示と共に、提供される。本発明は、必ずしもかかる適用に限定されるわけではないが、本発明の種々の態様は、この前後関係を使用して、種々の例の考察を通じて理解されてもよい。

40

【0075】

図10は、本開示の実施形態と一致する、側坐核(NAc)または背側線条体を制御するためのシステムを図示する。刺激の源102は、標的場所106に連結104される。この標的場所は、NAcまたは背側線条体にまたはその近くに位置し、例えば、図示される場所は、一般にNAcと揃っているが、必ずしもそのように限定されない。

50

【0076】

本開示の実施形態と一致して、刺激の源102は、光学的光源を含むことができる。光学的光源は、標的場所106に（例えば、ファイバー光学を使用して）光学的に連結される。標的場所106は、光刺激に応答する細胞を含むように構成される。これらの細胞は、イオンポンプ（例えば、NpHRおよびNpHR変異形）および／またはイオンチャネル（例えば、ChR2／ChR1およびChR2／ChR1変異形）を含むが、それらに限定されない、光応答性オプシンを発現する細胞を含むことができる。

【0077】

本開示の種々の他の実施形態と一致して、刺激の源102は、薬物／薬理学的送達デバイスを含むことができる。送達デバイスは、標的場所に（例えば、送達管腔を使用して）結合される。

10

【0078】

本開示のある種の実施形態は、刺激の源を使用して、自然な報酬関連行動および／または報酬学習に関与する構造（例えば、NAcまたは背側線条体）のコリン作動性ニューロンを標的とすることを対象とする。刺激の源102は、構造内のアセチルコリンの放出を制御する刺激を提供する。ある種の実施形態では、この制御は、他の行動、例えば、欲求性または嫌悪性反応の強化に顕著に影響を及ぼすことなく、物質乱用の嗜癖特性を妨害するのに特に有用であり得る、局在化された時空間的な様態で遂行される。刺激は、いくつかの異なる刺激の源から提供することができる。非限定的例としては、コリン作動性ニューロンにおいて発現される光応答性オプシンを活性化すること、コリン作動性ニューロンの近くに位置付けられた1つ以上の電極を通じて電気パルスを適用すること、コリン作動性ニューロンに近接する場所で薬物を放出すること、コリン作動性ニューロンに近接する場所に磁場を適用すること、および／またはこの理解に基づく外科的改変が挙げられる。

20

【0079】

図11は、本開示の実施形態と一致する、アセチルコリンの放出を制御するためのフロー図を図示する。報酬ベースの事象202は、報酬関連行動の査定もしくは制御についておよび／または報酬学習についての根拠を提供する。それに限定されないが、報酬ベースの事象202は、患者への嗜癖物質の導入であり得る。制御指示204は、時間的属性、空間的場所、および／または細胞型のうちの1つ以上によって定義され得る標的の関数として、どのように刺激の源206が刺激208を適用するかを決定する。刺激208は、アセチルコリンの放出210に対する変化をもたらす。次いで、刺激の効果を監視212することができる。監視を使用して、制御指示を調整し、それにより、意図される結果のために刺激を微調整することができる。本明細書で考察される種々の実施形態は、かかるプロセスに関連して（またはそれに加えて）使用され得る更なる例を提供する。

30

【0080】

本開示の実施形態は、物質の嗜癖特性の査定を対象とする。特別に標的とされた神経細胞構造における（またはそれに由来する）コリン作動性ニューロンの活性の制御および／または監視を使用して、物質の嗜癖性質を予測することができる。例えば、側坐核のコリン作動性ニューロンを、研究中の物質に曝露することができる。次いで、側坐核のコリン作動性ニューロンの活性を、物質への曝露後に監視する。この監視には、電気活性（例えば、活動電位／発火）および／またはアセチルコリンの放出が含まれ得るが、それらに限定されない。

40

【0081】

本開示の他の実施形態と一致して、嗜癖物質に対する処理の効果を査定することができる。例えば、可能性のある治療を、側坐核のコリン作動性ニューロンの物質への曝露に関連して使用することができる。側坐核のコリン作動性ニューロンの活性を処理に関連して監視して、その有効性を査定することができる。

【0082】

本開示の実施形態によれば、物質依存症に対する治療の効果は、動物に条件反応を教示しながら、動物の側坐核のコリン作動性ニューロンを興奮させることによって、動物にお

50

いて物質依存性を人工的に誘発することによって査定される。処理の効果は、次いで処理を適用し、患者の条件反応を監視することによって査定される。

【0083】

本開示の態様は、一連のコリン作動性ニューロンと、薬物を一連のコリン作動性ニューロンに提供するための薬物送達デバイスと、一連のコリン作動性ニューロンに提供されている薬物 (drugs) に応答した、一連のコリン作動性ニューロンの活性を査定するための監視デバイスを含む、システムの実施形態を対象とする。ある種の実施形態と一致して、一連のコリン作動性ニューロンは、光応答性オプシンを含み、そのシステムは、光応答性オプシンを活性化することによって、コリン作動性ニューロンを興奮させるための光学送達系を更に含む。

10

【0084】

本開示の種々の実施形態と一致して、神経回路に対する制御は、抑制または興奮を含むことができ、それは各々、協調された発火、および／または外部回路入力に対する修飾された感受性を含むことができる。例えば、抑制は、イオンポンプ (例えば、NpHRおよびNpHR変異形) 等の光応答性オプシンを使用して遂行することができる。かかるイオンポンプは、ニューロンの膜電位をその閾値電圧から離れて移動させて、活動電位を止めるかまたは抑制する。別の例では、興奮は、イオンチャネル (例えば、ChR2およびChR2変異形) 等の光応答性オプシンを使用して遂行することができる。かかるイオンチャネルは、膜電位が閾値電圧の方向に移動するおよび／またはそれを通り過ぎる原因となり得、それにより、活動電位を興奮させるかまたは助長する。種々の実施形態と一致して、光応答性オプシンを使用して、ニューロンの静止電位を、外部回路入力に対するその感受性を増加または減少させるように、(一時的に) 偏移することができる。これらの種々の選択肢はまた、組み合わせて使用することもできる。

20

【0085】

本開示の種々の実施形態は、時間的神経回路に対する制御を測定可能なメトリクスと相関させる、光遺伝学的システムまたは方法に関する。例えば、特定の記憶機能は、神経障害に関連する可能性がある。光遺伝学的システムは、その選択的制御のために患者の内の神経回路を標的とする。光遺伝学的システムは、神経障害に関連するメトリクス (例えば、症状) について、患者を監視することを伴う。この状態で、光遺伝学的システムは、神経回路、その機能、および／または神経障害についての詳細な情報を提供することができる。

30

【0086】

本開示の実施形態は、報酬関連行動および／または報酬学習に関連する神経構造に対する制御が、報酬関連行動に関連する記憶獲得および回想の妨害と組み合わせて使用される、組み合わされた解決策 (複数可) を対象とする。例えば、コカイン嗜癖は、神経構造がコカインに曝露される時に、報酬関連行動および／または報酬学習に関連する神経構造を抑制することによって、研究および／または治療することができる。更に、コカインに関連する記憶獲得は、コカインが患者に導入される時に妨害することができる。コカイン使用に関連する記憶回想はまた、例えば、コカイン使用に関連する触発事象に応答して妨害することもできる。コカインが例として提示されているが、かかる解決策 (複数可) の適用は、そのようには限定されない。記憶妨害に関する実施形態および実験結果は、これ以降でより詳細に考察される。

40

【0087】

本開示の実施形態は、嗜癖ベースまたは恐怖ベースの記憶等の、記憶獲得、回想、および／または記憶反応と情動反応との間の関連を妨害することを対象とする。特定の実施形態では、具体的な神経回路は、その中での光応答性オプシンの発現を通じて標的とされる。神経回路の機能は、神経回路の機能を抑制することができる (例えば、NpHRまたはNpHR変異形を使用して)、発現されたオプシンの活性化によって妨害される。他の実施形態では、具体的な神経回路は、電極 (複数可) を具体的な神経回路の近くに植え込むことによって標的とされる。神経回路の機能は、電気シグナルの電極 (複数可) への適用

50

を通じて妨害される。他の実施形態では、具体的な神経回路は、速効性医薬品を具体的な神経回路の近くに送達するデバイスを植え込むことによって標的とされる。神経回路の機能は、速効性医薬品を放出し、それにより具体的な神経回路の機能を抑制する、デバイスの作動を通じて妨害される。

【0088】

ある種の実施形態では、この妨害は、記憶作成中に実施することができる。他の実施形態では、この妨害は、記憶回想前または記憶回想中に実施することができる。これは、心的外傷後ストレス障害（PTSD）等の、記憶回想を伴う精神または神経障害記憶に特に有用であり得る。ある種の実施形態と一致して、妨害は、妨害に対して提示されるおよび／または制御される、記憶触発事象または他の外部刺激に応答して触発され得る。例えば、妨害は、触発に応答するように条件付けされた、動物／患者への記憶に対する触発の導入に応答して提供することができる。別の例では、患者は、妨害を能動的に触発し得る。例えば、患者は、PTSDに関連する記憶を経験している時に妨害を触発してもよい。本開示の他の実施形態は、記憶獲得、回想、および／または記憶反応と情動反応との間の関連を助長することを対象とする。例えば、発現されたオプシンを使用して、内因性刺激に対する神経回路の感受性を増加させることができる（例えば、本明細書で考察される安定化された段階機能オプシン（SSFO）を使用して）。助長は、記憶の獲得、形成または回想を強化するために提供することができる。これを使用して、回路の役割を確認するか、記憶障害に関連する障害を治療することができる。背側CA1海馬回路の（時間的）妨害は、前後関係上の恐怖記憶獲得を予防するのに有効であることが発見されている。本明細書と一致して、優勢な神経ネットワーク理論は、記憶固定のプロセスが、海馬と皮質との間の接続における短期的修飾により開始し、それにより海馬が、記憶自体を保管するよりもむしろ、完全な記憶に寄与する関連のある皮質の部位を活性化することが可能となることを示唆する。これらの皮質の痕跡が反復的に共活性化される間、それらの間の接続における段階的な長期持続性変化は、最終的にこれらの接続が、いかなる海馬の関与も伴わずに記憶を支持するのに十分なほど強力になるまで生じる。驚くべきことに、背側CA1海馬回路の妨害は、皮質の再構築が生じたと考えられる後であっても、恐怖記憶の回想を遮断するのに有効であることが発見されている。

【0089】

複数の実験的実施形態の考察を含む次の考察は、これらおよび他の実施形態のいくつかの例を提示する。これらの例は、しかしながら、限定するようには意図されない。1つのかかる実施形態は、レンチウイルスベクターの産生に係る。このレンチウイルスベクターは、興奮性グルタミン酸作動性ニューロンに対して選択的な、カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼHa（CaMKIIa）プロモータの制御下で、強化された黄色蛍光タンパク質（eNpHR3.1-EYFP）にフレーム内で融合される、光活性化可能なeNpHR3.1をコードする遺伝子を担持する。eNpHR3.1は、内因性N末端シグナルペプチドが削除された、eNpHR3.0の切頭バージョンであり、光電流およびそれがニューロン内で誘発する過分極の両方においてeNpHR3.0と同様である。CaMKIIa::eNpHR3.1の定位送達は、その背側セグメント全体を網羅する、CA1特異的発現をもたらした。トランスフェクトされた領域内において、CaMKIIa細胞の94%がeNpHR3.1を発現し、プロモータは、完全な特異性を提供し、つまり、全てのeNpHR3.1-EYFP細胞もまた、CaMKIIa陽性であった（図1B）。麻酔されたマウスにおけるオプトロード記録により、興奮性CA1ニューロンの連続緑色（561nm）光照射が、発火振幅に影響を及ぼすことなくことなく、時間的に正確かつ可逆的様態で、発火を強力に抑制した（73%減少）ことが確認された。光遺伝学的抑制がまた、領域特異的様態で、FCによって誘発される神経活動を遮断し得ることを実証するために、両側性連続緑色光を、背側CA1を標的として、二重カニューレを通じて挿入された2つの光ファイバーを介して訓練中に送達し、シナプス活性化マーカーcFosについて染色した。eNpHR3.1発現マウスは、FCに関与する2つの他の脳領域、つまり扁桃体外側基底部（BLA）および前帯状皮質（ACC）では

なく、C A 1において特異的に、低減されたc F o s発現を示した。

【0090】

光遺伝学的抑制は、両側性連続緑色光を、特化されたF C室において訓練中の自由に移動しているマウスに投与することによって、認知機能を変調することが示された。訓練中、マウスを前後関係Aに導入し、次いでトーン、続いて足部ショックを、連続両側性光送達下で2回提示した。恐怖記憶を次いで、翌日に光なしで査定した。訓練中の背側C A 1の光遺伝学的抑制は、前後関係上の恐怖獲得を予防した。光遺伝学的抑制の効果は、マウスを同じ前後関係で光投与を用いずに再訓練し、翌日に再び試験することによって、可逆的であることが示された。e N p H R 3. 1発現マウスは、訓練中に光が何ら投与されなかった時、無処置の前後関係上の記憶を示した。背側C A 1の光遺伝学的抑制はまた、記憶回想を干渉することが示された。同じマウスを、今度は回想中に光送達を用いて再試験し、前日に存在した記憶が、照射下では回想のために利用不可能となったことが見出された。

10

【0091】

恐怖獲得および恐怖発現機構は、マウスのトーンの記憶についての異なる前後関係における同じマウスの試験を通じて、影響を受けない可能性が高いことが示された。e N p H r 3. 1発現マウスは、訓練中の光抑制後の無処置の聴覚合図による恐怖記憶獲得、ならびに試験中の照射を用いた無処置の合図による恐怖回想を示した。空間探索と前後関係上の恐怖獲得との間の相関を使用して、条件付け室の探索時間を、光刺激下での訓練中に測定した。有意な差異は、e N p H R 3. 1発現マウスとそれらの対照との間で何ら見出されなかった。C A 1光遺伝学的抑制は、マウスを、それらのオープンフィールド探索について、光投与を用いて試験したとき、抗不安効果を有さないと考えられる。経路の長さ、速度、またはフィールドの中央で費やされた時間（不安の徴候としての機能を果たす）のパーセントにおける有意な差異は、e N p H R 3. 1発現マウスと対照マウスとの間で何ら見出されなかった。

20

【0092】

e N p H Rが異なる脳構造において発現される時に、光遺伝学的抑制が異なる行動的表現型をもたらし得るかどうかを試験するために、マウスに、C a M K I I a : : e N p H R 3. 0 - E Y F Pを担持するアデノ随伴ウイルス(A A V 5)を、B L A中に両側性で注射した。恐怖自体の獲得、すなわち嫌悪性刺激と任意の中性刺激との間の関連、ならびに扁桃体に依存する最近の恐怖および遠隔の恐怖の発現、およびB L Aの光遺伝学的活性化は、刺激から恐怖を誘発するのに十分であった。B L Aの光遺伝学的抑制は、前後関係上のF C獲得および聴覚合図によるF C獲得の両方を干渉することが示された。

30

【0093】

したがって、本開示の実施形態は、細胞型および領域特異的様式での第3世代のe N p H Rの導入、ならびに獲得および最近の記憶回想の両方の干渉のためのC A 1光遺伝学的抑制の使用を対象とする。

【0094】

本開示の実施形態はまた、遠隔記憶回想における海馬の役割についての現在の理解を精密化するための、かかる態様の使用を対象とする。本開示の実験的实施形態と一致して、マウスの群を訓練し、次いで4週間後に試験した。回想中のC A I活動停止が、遠隔の恐怖記憶を（完全に）遮断すると思われることが示された。この回想の干渉はまた、マウスを翌日に照射を用いずに再試験した時、それらが対照と同様に恐怖を示すように思われたため、可逆的であることが示された。e N p H r 3. 1発現マウスは、合図試験中の照射を用いた無処置の遠隔聴覚合図による恐怖記憶回想を示し、それらの恐怖発現機構が無処置に留まることを示唆している。驚くべきことに、これは、遠隔の恐怖記憶における海馬の関与を示唆する。

40

【0095】

本開示の実施形態はまた、反復した回想および再固定化後に、長期的記憶をリアルタイムで予防することによって、遠隔の恐怖回想に可逆的に影響を及ぼす、C A 1抑制の能力

50

(光遺伝学的または別の方法で)を対象とする。マウスの別の群を訓練し、次いでそれら5週間後に試験して、記憶痕跡の持続性を(訓練および試験の両方において光を用いずに)検証することによって、実験結果を得た。同様の成果が、両群で見出された。翌日に、同じマウスを照射下で試験し、eNpHR3.1群は、嫌悪性記憶を回想することができないように思われた。この効果は、翌日、光送達を伴わずに試験された時、eNpHR3.1発現マウスが無処置の前後関係上の記憶を示したため、可逆的であることが示された。更に、マウスがすでに嫌悪性前後関係を回想し、恐怖を示した後、恐怖応答は、光が再び送達されるや否や、試験トライアルの最中からそれ以後、迅速に止んだ。

【0096】

本開示の実施形態は、それにより、記憶がすでに想起された後であっても、遠隔の恐怖を引き起こす記憶をリアルタイムで可逆的に干渉することを対象とする。これは、例えば、不穏な記憶が、例えば、PTSD患者において、同じ脳構造で保管される他の記憶に永久的に影響を及ぼすことなく、それが現れる時に停止され得る場合の、治療的処置に特に有用であり得る。

【0097】

遠隔記憶にアクセスする際の海馬の明らかな直接関与は、無処置の海馬が依然として記憶痕跡の既定の活性化因子であるという驚くべき知見を示唆する。実験的試験を行って、抑制の時間的性質および／または分解能の効果を決定した。遠隔記憶実験を、試験(前のように)の持続期間中のみの正確な照射、または光を試験の30分前に、次いで試験の全体を通じて連続的に投与する、持続的な光曝露のいずれかを用いて反復した。正確な光遺伝学的抑制は、遠隔記憶想起を有意に抑制した一方で、持続的な抑制は、遠隔記憶想起に対して何ら有意な効果を有さなかった。持続群のマウスを、翌日に正確な光投与(試験中のみ)を用いて再試験したとき、それらは、抑制された恐怖回想を示した。同じマウスから調製された切片中のeNpHR3.1陽性細胞上の全細胞パッチ記録が、発火を抑制するeNpHRの能力が30分の期間全体を通じて同程度に留まり、また可逆的であったことを示したため、持続的な光投与の効果の欠如は、経時的なeNpHR3.1による減少した抑制、または持続的な光曝露に起因する細胞健康の低減に帰するとは考えられない。このデータは、その不活性化を補償するのに十分な時間を与えられる時、記憶痕跡は、他の脳構造によって依然として想起され得るため、無処置の海馬が、遠隔記憶痕跡の既定の活性化因子である一方で、記憶痕跡は、海馬において保管されないことを示唆する。

【0098】

本開示の実施形態は、前帯状皮質(ACC)の抑制を通じた遠隔記憶の抑制を対象とする。実験を、CaMKIIa::eNpHR3.0-EYFPウイルスによりACCを標的とすることによって行い、ACC光遺伝学的抑制を訓練した1日後および1ヶ月後の両方の光遺伝学的抑制の試験効果は、最近の記憶に対して何ら明らかな効果を有さなかったが、遠隔記憶を有意に損なった。まとめて、これらの知見は、最も効率的な方法で皮質の再構築に従って、記憶痕跡を活性化することでさえも、依然として海馬を伴うことを示唆する。

【0099】

海馬は、皮質に連続入力を提供すると考えられる。したがって、実験を行って、入力が回想タスクと無関係であっても、妨害された遠隔回想が、海馬から皮質へのこの入力の急落の副産物であるのかどうかを決定した。別の主要な皮質の入力源である、嗅球(OB)を、CaMKIIa::eNpHR3.0-EYFPウイルスにより標的とし、光遺伝学的抑制の効果を、最近の恐怖回想中および遠隔の恐怖回想中の両方で試験した。OB光遺伝学的抑制は、いずれの時点でも記憶回想に対して何ら有意な効果を有さず、皮質中へのさなければ無関係な興奮性入力の急落が、回想を干渉するのに十分でないことを示唆している。遠隔記憶が想起される時、それらは再固定化のために利用可能となり、それによりそれらは妨害に対して感受性となるが、これはまた痕跡を強化する場合がある。本開示の態様は、再固定化前および後、またはそれがすでに想起された後にリアルタイムで、遠隔の恐怖を引き起こす記憶をリアルタイムで可逆的に活動停止することによって、繰り返

される不穏な記憶が、それが現れる時に停止され得る、PTSD患者のための療法に関する。

【0100】

本開示の別の実施形態と一致して、乱用薬物に関係付けられる記憶を抑制して、薬物追求行動を低減することができる。他の実施形態は、記憶プロセスにおける特異的神経集団の役割を研究し、それらの根底にある神経回路のより精密な時間的、遺伝的、および空間的解析を可能にするための、異なる脳領域の光遺伝学的変調によって、認知に即座に影響を及ぼす能力を対象とする。

【0101】

本発明の具体的な態様は、神経科学のために適合させられた微生物オプシン遺伝子を使用した記憶切り換えに関し、それは無処置のほ乳類の脳内の具体的な細胞型におけるミリ秒時間スケールの膜電位変化への光パルス列への変換を可能にする（例えば、チャネルロドプシン（ChR2）、ボルボックスチャネルロドプシン（VChR1）、およびハロロドプシン（NpHR））。ChR2は、単細胞緑色藻類コナミドリムシに由来するロドプシンである。本明細書で使用される「ロドプシン」という用語は、少なくとも2つのビルディングブロック、オプシタンパク質、および通常網膜性（レチナールデヒド）である共有結合補因子を含む、タンパク質である。ロドプシンChR2は、元々はクラミドモナスゲノム中のクラミオプシン（Chlamyopsin）-4（Cop4）と名付けられた、チャネルオプシン-2（Chop2）というオプシンに由来する。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、活性化および不活性化が速いという動態が挙げられ、それはタイミングが正確な活動電位列の発生をもたらす。

【0102】

長い時間スケールの活性化を追求する用途については、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ある種の実装形態は、事実上、脱分極が所望される時間全体にわたって1mW/mm²の光を適用し、それは所望されるものよりも少ない可能性がある。本明細書における考察の多くは、ChR2を対象とする。別途定めのない限り、本30発明は、いくつかの同様の変異形を含む。例としては、Chop2、ChR2-310、Chop2-310、およびボルボックスチャネルロドプシンが挙げられるが、それらに限定されない（VChR1）。VChR1についての更なる詳細については、“Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from Volvox carter i,” Nat Neurosci. June 2008, 11(6): 631-3. Epub 2008 Apr 23を参照することができ、それは、参照により本明細書に完全に組み込まれる。他の実装形態では、同様の修飾を、他のオプシン分子に対して行うことができる。例えば、修飾/突然変異を、ChR2またはVChR1変異形に対して行うことができる。更に修飾された変異形を、光で活性化されたイオンポンプと組み合わせて使用することができる。

【0103】

本発明の実施形態は、自然発生配列の比較的小規模なアミノ酸変異形を含む。一例では、変異形は、自然発生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。他の変異形においては、相同性は、約80%よりも大きい。なおも他の変異形は、約85%よりも大きい、90%よりも大きい、または更には約93%～約95%もしくは約98%と同程度に高い相同性を有する。この文脈における相同性は、配列類似性または同一性を意味し、このうち同一性が好ましい。この相同性は、配列分析の分野で既知の標準的な技法を使用して決定することができる。本発明の実施形態の組成物は、本明細書で提供されるタンパク質および核酸配列を含み、それは約50%よりも大きく相同、提供される配列に対して約55%よりも大きく相同、提供される配列に対して約60%よりも大きく相同、提供される配列に対して約65%よりも大きく相同、提供される配列に対して約70%よりも大きく相同、提供される配列に対して約75%よりも大きく相同、提供される

配列に対して約80%よりも大きく相同、提供される配列に対して約85%よりも大きく相同、提供される配列に対して約90%よりも大きく相同、または提供される配列に対して約95%よりも大きく相同である変異形を含む。

【0104】

本明細書で使用される時、標的細胞の刺激とは、一般に、細胞の特性の変更を説明するために使用される。例えば、標的細胞の刺激は、標的細胞の脱分極または分極につながる可能性がある、細胞膜の特性における変化をもたらす場合がある。特定の例では、標的細胞は、ニューロンであり、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抑制することによって、インパルスの伝達に影響を及ぼす。

【0105】

光応答性オプシンに関する更なる詳細については、“Optically-Based Stimulation of Target Cells and Modifications Thereto”と題される、Deisserothらに対するPCT公開第WO2010/056970号を参照することができ、それは、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0106】

本開示の実施形態は、標的とされる集団の興奮性における、双安定の変化の実装形態を対象とする。これには、二重変異ChR2-C128S/D156Aが含まれるが、必ずしもそれに限定されない。この二重変異ChR2-C128S/D156Aは、培養海馬ニューロンにおいて忍容性が良好であることが見出されており、青色光の単一の短いパルスによる迅速な段階様の活性化、および緑色または黄色光による脱活性化という必須のSFO特性を保存した。特に、445nmでのChR2-C128S/D156Aピークの活性化スペクトル。第2の脱活性化ピークは、390~400nmで見出され、その脱活性化は590nm脱活性化ピークと比較してより速いが完成度が低かった。ChR2-C128S/D156Aを発現する細胞中のピーク光電流は、強固であり、ChR2-D156Aのそれらに匹敵することが見出された（それぞれ、標準誤差231.08±31.19、n=9細胞および標準誤差320.96±78.26、n=7細胞）。

【0107】

個々にトランスフェクトされ、パッチクランプされたニューロンを次に、470nm光の100msパルスにより活性化し、電流減衰が細胞ランダウンに帰することがないよう、非常に長い記録にわたって確実にするために、各細胞を持続的な590nm光パルスにより特有の間隔で脱活性化して、各時点における残りのSFO電流の大きさを決定した。驚くべきことに、ChR2-C128S/D156Aを発現するニューロンは、いずれかの単一の変異体のみを発現する細胞からのものよりも安定であった持続性の光電流をもたらした。単一指数的減衰曲線を、I脱活性化/I活性化の比率に経時的に当てはめることにより、ChR2-C128S/D156Aについて29.3分間の自発的な減衰時定数が明らかとなり、C128およびD156突然変異がChR2の開口状態の減衰を遅延されるように相乗的に作用することを示している。

【0108】

複雑なほ乳類行動への予期される適用のために要求される改善と一致して、二重変異SFO電流の有意な部分は、単一の光活性化パルス後、最大20分間依然として存在した。これらの驚くほどに遅い減衰動態に基づいて、二重変異遺伝子は、SFO（安定化された段階機能オプシン）遺伝子と称される。SSFOはまた、活性タンパク質に対する省略表現としても使用される。双方の残基は、ChR2チャネル閉鎖（ゲート開閉）に関与する可能性が高く、双方の突然変異は、チャネルの開口状態の構成を安定化する可能性が高い。理論に制限されることなく、本開示の態様は、SSFOが光サイクル進行において完全に遮断され得、したがって光サイクル操作により可能な最大の安定性を代表し得るという発見に関する。例えば、ChR2-C128XおよびChR2-D156Aとは対照的に、SSFO光サイクルは、この変異体において到達されなかった後期の光サイクル段階で光サイクルを分離する可能性が高い追加的な不活性な脱プロトン化副産物にアクセスする

10

20

30

40

50

ようには思われず、それが今度はSSFOの信頼性を、親の単一の突然変異よりも生体内での反復使用のために更に高める。

【0109】

本開示の実施形態は、SSFOの光に対する感度を対象とする。例えば、遅い減衰定数を有するチャンネルロドプシンは、事実上光子積分器として作用する。これは、光遺伝学的回路変調に対する感度がより高く侵襲性のより低いアプローチに特に有用であり得、それは依然として、光パルス長の変調を介した標的神経集団への容易に滴定可能な作用を有する。並はずれて低い光強度（ 8 pW/mm^2 と同程度に低い）であっても、数百ピコアンプの全細胞光電流は、SSFOを発現するニューロンから得ることが可能であることが発見されており、それは照射の時間全体の中に470nm光に応答して単一指数的動態で増加した。他の態様は、両対数スケール上の活性化光のべき数と線形相関する、活性化時定数の使用に関し、それはべき法則関係の指標であり、SSFOが、その経時的な総光子曝露を光電流の唯一の行列式とする、純粋な積分器であることを示唆している。例えば、と考えられている。光電流が所与の準最大の活性化（Tまでの時間（time to T））に到達するのに要求される膜領域当たりの光子の数は、活性化光のべき数に関わらず一定である。

【0110】

本開示の例示的な実施形態は、ChR2配列を全く含有せず、個々にはよく発現しない2つのオプシン遺伝子に由来し、かつ本明細書でC1V1と称される、ハイブリッドChR1/VChR1キメラの使用に関する。本開示の実施形態はまた、Kir2.1チャンネルに由来する膜輸送シグナルの追加を通じたVChR1の膜標的の改善に関する。VChR1-EYFPを発現する培養ニューロンからの共焦点画像により、ChR2と比較して高い割合の細胞内タンパク質が明らかとなり、したがって、VChR1の膜標的を改善するために、我々は、Kir2.1チャンネルに由来する膜輸送シグナルを追加した。このVChR1-ts-EYFPの膜標的は、VChR1-EYFPと比較して若干強化されたが、VChR1-ts-EYFPを発現する培養海馬ニューロンから記録された平均光電流は、VChR1-EYFPのそれよりも若干大きいにすぎなかった。したがって、本開示の実施形態は、ヘリックスを他のChRからの対応するヘリックスと交換することによって修飾されるVChR1に関する。例えば、ヘリックス1および2がChR1からの相同セグメントと置換された2つのキメラにおいて、強固な改善が発見されている。スプライス部位がヘリックス2および3（ChR1残基A145における）の間の細胞内ループにあるか、またはヘリックス3（ChR1残基Trp163における）内にあるかに関わらず、結果として得られたキメラは、両方とも強固に発現され、同様に強化された光電流およびスペクトル特性を示したことが発見された。ChR1は、ごくわずかに発現されるにすぎず、ほとんどのほ乳類の宿主細胞の膜に不十分に統合されるため、この結果は予想外であった。結果として得られるハイブリッドChR1/VChR1キメラは、本明細書でC1V1と称される。

【0111】

本開示の態様は、培養海馬ニューロンにおけるC1V1の発現に関する。実験的試験は、いくつかの驚くべきかつ有用な結果を示しており、それはこれ以降でより詳細に考察される。C1V1-EYFPは、VChR1-EYFPと比較して驚くほどに改善された平均蛍光を示す。C1V1を発現するニューロンにおける全細胞光電流は、VChR1-EYFPおよびVChR1-ts-EYFPのそれらよりもはるかに大きく、イオン選択性は、ChR2およびVChR1のそれと同様であった。C1V1とYFPとの間のKir2.1輸送シグナルの追加は、光電流を追加的に41%更に強化した（C1V1-ts-EYFP平均光電流は極度に大きく、野生型（WT）VChR1よりも10倍近く大きい）。平均蛍光レベルは、測定された光電流にほぼ合致し（それぞれ、VChR1-EYFP、VChR1-ts-EYFP、C1V1-EYFP、およびC1V1-ts-EYFPについて、平均蛍光 9.3 ± 1.1 、 19.6 ± 3.4 、 19.8 ± 2.8 、および 36.3 ± 3.8 ）、光電流サイズにおける増加が、ほ乳類ニューロンにおけるこれらのチャンネル

の改善された発現から主にもたらされたことを示唆している。総計の神経細胞体の蛍光（積分ピクセル密度として測定された）は、異なる構築物（VChR1、VChR1-ts-EYFP、C1V1、C1V1-ts-EYFP）にわたる、個々に記録された／撮像された細胞中の光電流サイズと線形相関した。これは（理論に制限されることなく）、C1V1の増加した光電流が、ニューロンにおける機能的発現変化からもたらされることを示唆する。

【0112】

本開示の種々の実施形態は、速い減衰定数を有するオプシンに関する。この特性は、例えば、内因性コンダクタンスを最低限に干渉する、光パルス当たりの単一の発火を触発する、および／または光パルス列中のプラトー電位を最小化するために、発火に対する正確な制御を提供するのに特に有用であり得る。実験結果は、C1V1-ts-EYFPにおいて記録された光誘発型光電流が、VChR1の時定数と同様の時定数で減衰したことを示唆する。本開示の態様は、したがって、光サイクル動態の改善、低減された不活性化、および／または可能性のある更なる赤方偏移吸収のための発色団領域における修飾を対象とする。

10

【0113】

一実施形態は、対応するChETA突然変異E162Tを対象とし、その実験による示唆は、加速された光サイクル（例えば、ほぼ3倍）を提供する（Gunaydin, et al., Ultrafast optogenetic control, Nat Neurosci, 2010を参照することができ、それは参照により本明細書に完全に組み込まれる）。驚くべきことに、この突然変異は、作用スペクトル浅色を530nmに偏移することが示された一方で、ChR2または他の微生物ロドプシンにおける類似した突然変異は、赤方偏移を引き起こした。

20

【0114】

別の実施形態は、グルタミン酸塩122のスレオニンへの突然変異（C1V1-E122T）を対象とする。実験的試験は、C1V1-E122Tが、ChR2の46%不活性化と比較して26%のみ不活性化されることを示し、加えて、スペクトルは、546nmに更に赤方偏移された。

【0115】

本開示の別の実施形態は、E122TおよびE162T突然変異の両方を含むC1V1の二重変異体を対象とする。実験的試験は、電流の不活性化が、E122T変異体よりも更に低く、光サイクルが、E162Tと比較してより速いことを示している。これは、個体の突然変異の多数の有用な特性が二重変異体において一緒に保存されることを示唆する。

30

【0116】

本開示の実施形態は、ニューロンにおける種々の光応答性オプシンの発現を含む。ニューロンにおけるC1V1オプシン遺伝子の実験的試験を、C1V1-ts-EYFPをコードするレンチウイルスベクターおよび本明細書で考察される種々の点突然変異の組み合わせを生成することによって行った。オプシンを次いで、培養海馬ニューロンにおいて発現させ、同一の刺激条件下（2msパルス、542nm光、5.5mW/mm²）で全細胞光電流を記録した。C1V1、C1V1-E162T、およびC1V1-E122T/E162Tを発現する細胞中の光電流は、全て強固であり、ChR2-H134Rの光電流よりも大きい傾向があった。実験はまた、C1V1-E122T/E162Tを発現する細胞からと、ChR2-H134Rを発現する細胞からとの、積分神経細胞体のYFP蛍光および光電流の比較も含んだ。驚くべきことに、C1V1-E122T/E162T細胞は、同等の蛍光レベルで、ChR2-H134R細胞よりも強力な光電流を示した。これは、C1V1が、ChR2-H134Rと比較して、より高い単位コンダクタンスを保有する可能性があることを示唆する。試験結果は、C1V1-E122Tの動態が、C1V1-E122T-E162Tの動態よりも遅いこと、およびC1V1-E122Tを発現する細胞が、二重変異体を発現する細胞よりも、赤色光（630nm）に対してより強力

40

50

に応答したことを示唆する。これは、赤色光に応答した光遺伝学的発火を発生するのに特に有用であり得る。

【0117】

本開示の種々の実施形態と一致して、同じ超小型回路内に存在する抑制性および／または興奮性ニューロンは、種々のオプシンの導入により標的とされる。実験的試験を、培養海馬ニューロンにおけるCaMKIIαプロモータの下で別個に発現されたC1V1-E122T/E162TおよびChR2-H134Rによって行った。C1V1-E122T/E162Tを発現する細胞は、紫色光パルス（405nm）ではなく、2ms緑色光パルス（560nm）に応答して発火した。対照的に、ChR2-H134Rを発現する細胞は、2ミリ秒561nm光パルスではなく、2ミリ秒405nm光パルスに応答して発火した。

10

【0118】

本開示の種々の実施形態は、生体脳切片内の2つの神経集団の独立した活性化に関する。実験的試験を、mPFC of PV::CreマウスにおけるCaMKIIα-C1V1-E122T/E162T-ts-eYFPおよびEF1α-DIO-ChR2-H134R-EYFPによって行った。非発現PYR細胞中で、405nm光パルスは、PV細胞の直接的活性化に起因して、強固で速い抑制性シナプス後電流（IPSC）を触発した一方で、561nm光パルスは、局所抑制性ニューロンのC1V1発現錐体細胞駆動から生じる予想された長潜時多シナプス性IPSCのみを触発した。

20

【0119】

上述されるまたは図に示される種々の実施形態は、一緒におよび／または他の様態で実装されてもよい。図面／図に示される項目のうちの1つ以上はまた、特定の用途に従って有用であるように、より分離されたもしくは統合された様態で実装するか、またはある種の場合において除去するおよび／もしくは作動不可能であると見なすことができる。本明細書の説明に照らして、当業者であれば、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、それらに対する多くの変更が行われてもよいことを認識するであろう。

【実施例】

【0120】

神経伝達物質アセチルコリンを用いるニューロンは、広範囲にわたるが、比較的稀有であり、その細胞体および突起は、ほ乳類脳の大部分を通じてわずかに分布している。種々のアセチルコリン受容体の薬理学的変調は、多数の脳プロセスに影響を及ぼすことが知られるが、受容体型および標的細胞集団に対する薬物特異性の限界に起因してしばしば副作用を伴い、その結果、回路機能および行動におけるコリン作動性ニューロンの最終的な因果的役割は、不明確であった。模範的な場合において、側坐核（NAc）の巨大コリン作動性介在ニューロンは、構造的に特有で、低密度に分配されたニューロンの群であり、その機能は、生体組織中でまたは行動している動物においてこれらの細胞を正確に活性化または不活性化する実験能力不足に起因して、定義し難いままである。本明細書において、我々は、自由に移動しているほ乳類の行動、生体内電気生理学、および切片生理学の設定において、複数の光学制御技術を統合して、これらのニューロンの機能を、高い細胞および時間精度での直接的興奮または抑制によって因果的に探索した。著しいことに、局所神経集団のごく僅かな（<1%）分率に相当するにもかかわらず、我々は、NAcにおけるコリン作動性ニューロンが優的な制御役割を有し、周囲の回路における活性の強力な双方向の変調を行使していることを見出した。更に、我々は、これらのニューロンが、コカインによって直接的に活性化されたこと、および自由に行動している哺乳動物において、コカイン曝露中にこの薬物誘発型活性をサイレンシングすることがコカイン報酬を妨害したことを見出した。重要なことに、コリン作動性介在ニューロンの操作は、それ自体嫌悪性でなく、これらの固有の細胞が、NAc回路に対するそれらの強力な影響を介して、乱用薬物と関連のある快楽的行動を具体的に実装することにおいて役割を果たすことを示唆している。

30

40

【0121】

50

アセチルコリンは、莫大に多様な受容体および標的細胞（１～８）に作用する、重要で幅広く研究される神経伝達物質である。先駆的な薬理学的および遺伝的研究は、多数の生物学的プロセスに及ぼす、ムスカリン性およびニコチン性アセチルコリン受容体の個々の亜型の複雑でしばしば相反する影響を解明してきたが（９～１５）、学習、記憶、注意、および報酬におけるこれらのニューロンの仮設的な重要性にも関わらず（１６～２２）、いずれの研究も、ＣＮＳ組織内のコリン作動性ニューロン自体の因果的役割という根本的に特有の課題を未だに解決していない。以前の調査は、特異性および時間的分解能による難題に起因する可能性が高い、矛盾した知見をもたらしているため、かかる課題に取り組むことは、生体は乳類組織内のコリン作動性ニューロンの選択的および時間的に正確な制御（活性化および抑制）に対する新規のパラダイムを要求するであろう。例えば、洗練された生体内薬理学的アプローチは、NAc（コカイン等の薬物に対する自然な報酬関連行動および反応に関与する構造（２７～３３））におけるコリン作動性伝達が、報酬学習のために要求されることを報告しているが（２３～２６）、fNAc内のコリン作動性介在ニューロンの分子アブレーションの新規の研究は、代わりに、強化された報酬学習を報告している（３４）。NAc内のこれらのコリン作動性介在ニューロンは、それらが局所神経集団の１％未満を構成するが（３５）、それでもなおNAc全体を通じて突出し、その唯一既知のコリン作動性入力を提供するため（３６、３７）、特に興味深い。当該コリン作動性受容体は、局在的に発現され、ニコチン性およびムスカリン性薬理学的アゴニストは、中型有棘ニューロン（MSN、局所神経集団の９５％超に相当し、NAcの出力を構成する）に対する複雑な影響を行使することができるが（３８～４１）、NAc生理学または行動のいずれの側面に対する、極めて稀有なコリン作動性介在ニューロンの正味の影響（あるとすれば）は、他の脳領域と同様に、未知である。

【０１２２】

実施例１：側坐核のコリン作動性介在ニューロンにおける光応答性オプシントタンパク質の発現

我々は、高い時間的分解能および高い細胞型特異性の両方を用いて、これらの細胞中の活動電位発火を選択的に駆動または遮断することによって、この課題を解決するために、光遺伝学的アプローチ（４２～４４）に着手した。微生物オプシン遺伝子をコリン作動性介在ニューロンにおいて特異的に発現させるために、我々は、コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）プロモータ下でCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス株を用いた（４５）。我々は、NAc中に（図１Ａ）、強化黄色蛍光タンパク質（eYFP）（４６、４７）に対するコード配列を伴ってフレーム内で融合された、オプシン遺伝子を担持するCre誘発性アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを定位的に注射した。オプシン遺伝子は、青色光ゲートカチオンチャネルチャネルロドプシン-２（ChR2）（４８、４９）または黄色光ゲート第３世代クロライドポンプハロロドプシン（eNpHR3.0）（５０）のいずれかをコードした。

【０１２３】

材料および方法

対象

BACトランスジェニックコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）：：Creマウスを、GENSAT（原液名：Tg（Chat-cre）24Gs at/Mmcd）（Gong et al., J. Neurosci 27, 9817-9823（2007））から得、Charles RiverからのC57BL6マウスと交配させた。実験的マウスは、Cre（+/-）に対する異型接合、あるいは制御同腹子（-/-）のいずれかであった。マウスを、逆行の１２時間明／暗サイクルで維持されたコロニーで群飼し、餌および水を随意に与えた。実験プロトコルは、実験動物の管理と使用に関する、国立衛生研究所の指針のガイダンスを満たすために、Stanford University IACUCによって認可された。

【０１２４】

ウイルス産生

前述のように (Tsai et al., Science 324, 1080-1084 (2009)、Sohal et al., Nature 459, 698-702 (2009))、Cre誘発性組み換えAAVベクターは、オプシン (Chr2 (H134R) または eNpHR3.0 のいずれか) が逆配向で lox 部位の間に挿入された、2 対の不適合な lox 部位 (loxP および lox2722) を担持する DNA カセットに基づいた。この二重フロックス (double-floxed) 逆オプシンカセットを、発現を強化するための pEF-1 α プロモータおよび Woodchuck 肝炎ウイルス転写後調節要素 (WPRE) を担持する AAV2-MCS ベクターのバージョン中にクローン化した。Cre 誘発性 Chr2 AAV 構築物、ならびに eNpHR3.0 導入遺伝子の完全なマップは、www.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/sequence_info.html にて入手可能である。組み換え AAV ベクターを、AAV5 コートタンパク質で血清型別し、University of North Carolina にてウイルスベクターコアによってパッケージングした。最終ウイルス濃度は、Chr2 ウイルスについて 3×10^{12} 粒子/mL、および NpHR3.0 ウイルスについて 1.5×10^{12} 粒子/mL であった。

【0125】

定位ウイルス注射、カニューレ／パッチコード植え込み、および光送達

マウスを、ケタミン／キシラジンで麻酔し (60 μ L／マウス、80 mg/mL ケタミンおよび 12 mg/mL キシラジンの混合物の使用)、次いで定位ヘッド器具中に配置した。手術を、生理学実験のために 4～6 週齢マウスに、および行動実験のために 8～12 週齢マウスに行った。眼が乾燥することを予防するように、眼軟膏を塗布した。頭皮の正中切開、続いて開頭術を行い、次いで、ウイルスを、10 μ L シリンジおよび 34 ゲージ金属針を用いて注射した。注射量および流速 (0.15 μ L／分で 1 μ L) を注入ポンプによって制御した。各 NAc は、2 回の注射 (注射 1: AP 1.15 mm、ML 0.8 mm、DV -4.8 mm、注射 2: AP 1.15 mm、ML 0.8 mm、DV -4.2 mm) を受容した。ウイルス注射および線維位置を、事実上殻全体が刺激されるように選定した。マウスの殻の小さいサイズを考慮すると、ウイルス拡散および光を内殻に完全に限定することは不可能であり、コアの内側部を含めた (前交連に対して内側)。注射後、針を更に 5 分間定置に残し、次いで非常にゆっくりと回収した。行動実験のために、マウスに両側性で注射し、次いで 1.5 mm の中心間距離を有する両側カニューレを、注射部位の上部に配置した (AP 1.15 mm、DV -3.8 mm)。行動中の神経活動を操作するために、ファイバーがカニューレの末端を超えて 200～300 μ m 突出するようにカニューレを通じて挿入された 2 つの 300 μ m 直径光ファイバー (0.37 N.A.) を通じて、光を両側性で送達した。

【0126】

免疫組織化学

ChAT ニューロンにけるオプシン発現の特異性を決定するために、最初に PBS を用いて、次いでリン酸緩衝食塩水 (PBS、pH 7.4) 中に溶解させた 4% パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて、マウスを、ボタナシア (beuthanasia) で麻酔し、経心的に灌流させた。脳を除去し、4% PFA 中に一晩 4℃ で後固定し、次いで PBS 中の 30% ショ糖中で平衡化した。40 μ m 厚の冠状片を、凍結ミクロトーム (Leica) 上で調製し、凍結保護物質中 (PBS 中 25% グリセロールおよび 30% エチレングリコール) 4℃ で保管した。自由に浮動する薄片を PBS 中で洗浄し、次いで 30 分間、0.3% Triton X-100 (Tx100) および 3% 正常ロバ血清 (NDS) 中でインキュベートした。切片を、4℃ で一晩、3% NDS (ヤギ抗 ChAT 1:200、Millipore) 中の一次抗体を用いてインキュベートした。薄片を次いで PBS で洗浄し、2 時間室温で二次抗体 (Cy3 または Cy5 に共役させたロバ抗ヤギ、Jackson Laboratories) を用いてインキュベートした。切片を次いで洗浄し、DAPI (1:50,000) を用いて 20 分間インキュベートし、再び洗浄し、PVA-DABCO でスライド上に載置した。共焦点蛍光画像を、レーザー走査型顕微鏡

上で、5 Xもしくは10 X空気対物、または40 X油浸対物を使用して得た。

【0127】

結果

我々は、この生体内標的化戦略の特異性および機能性を検証し、eYFP発現が、ChATを発現したニューロンに対して高度に特異的であることを見出し、更に、ChATを発現したニューロンの大多数はまた、eYFPも発現した（図1B、C）。任意の所与の細胞がChAT介在ニューロンであるという前試験確率は非常に低く、したがって稀有な標的化の漏れでさえも標的化特異性を劇的に減少させたであろうため、観察された特異性は、そのようなまばらな神経集団について特に印象的であった。双方のオプシンは、ChATニューロンの表面膜上で発現され（図1D）、標的ニューロンは、背側線条体におけるコリン作動性介在ニューロンの以前に確立された応答に対応する状態で、電流注射に対して応答した（図1E）（51）。背側線条体生理学と更に一致するように、静止電位および入力抵抗の両方は、ChATニューロン（YFP+ニューロン）について、MSN（YFP-ニューロンとして識別される、表S1、 V_M について $p < 10^{-4}$ および R_{input} について $p = 0.004$ 、両側t検定）よりも高かった。最後に、eNpHR3.0は、莫大な過分極を駆動し（図1F；平均±標準誤差： -83.8 ± 11.9 mV、 $n = 4$ ）、ChR2は、最大20～30 Hzの発火を確実に駆動したため（図1G、H）、双方のオプシンは、ChAT細胞において強力に機能的であった。

表3：ChR2-eYFPを発現するChATニューロンの、およびフルオロフォアを発現しなかったMSNの、脳切片中の膜電圧（VM）および入力抵抗（RINPUT）。VMおよびRINPUTの両方は、ChATニューロンについて、MSNよりも高かった。（VMについて $p = 0.00003$ 、RINPUTについて $p = 0.002$ 、両側t検定、平均±標準誤差）

【表3】

ChAT (ChR2-eYFP) (n=19)		MSN (n=13)	
VM (mV)	RINPUT (MΩ)	VM (mV)	RINPUT (MΩ)
-49.47±1.07	382.02±47.30	-65.43±2.88	223.64±31.92

【0128】

実施例2：コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）介在ニューロン脱分極の効果

ChAT介在ニューロンは、生体内において持続的に活性であると考えられるが（3～10 Hz（52、53））、まばらなChAT細胞中のこの種の遅い活性が、局所回路活性または行動に影響を及ぼすことに関与し得る様子（または更に関与し得るかどうか）は、謎のままである。我々は、光遺伝学的制御を生かして、薄片電気生理学、生体内電気生理学、および自由移動行動の組み合わせを用いて、この課題に取り組んだ。

【0129】

材料および方法

急性脳切片生理学

冠状脳切片を、ウイルスを事前（切片作製の2週間よりも前）に注射した成体マウスから、標準的な技法を使用して、Stanford Universityの動物実験委員会によって認可されたプロトコルに厳格に従って調製した。冠状切片250 μm厚を、135 mM NMDG、1 mM KCl、1.2 mM KH_2PO_4 、20 mM コリンビカルボナート、10 mM ブドウ糖、1.5 mM $MgCl_2$ 、および0.5 mM $CaCl_2$ を含有する、氷冷N-メチル-D-グルカミン（NMDG）ベースの切断溶液中、サファイア刃を使用するビブラトームで切断した。切片を、それ以降、119 mM NaCl、2.5 mM KCl、2.5 mM $CaCl_2$ 、1.3 mM $MgCl_2$ 、1 mM NaH_2PO_4 、26.2 mM $NaHCO_3$ および11 mM ブドウ糖を含有する、人工脳脊髄液（ACSF）中で維持した。切片を、ACSF中で、30分間37℃で、およびそれ以降、室温で維持した。ACSFに、95% O_2 / 5% CO_2 で一定して気泡を注入し

、全ての実験のために34℃まで加熱した。ニューロンを、eYFPを可視化するためにDIC光学およびフィルターセットの両方を装着した正立顕微鏡（Leica DM-LFSA）上で、40倍水浸漬対物および電荷結合素子（CCD）カメラを使用して可視化した。ニューロンから全細胞記録を、120mMグルコン酸カリウム、20mM HEPES、10mM EGTA、1mM $MgCl_2$ 、2mM Na-ATP、および0.2mM Na-GTP（pH7.3、290mOsm/L）を含有する電極溶液を使用して行った。IPSCを記録する実験においては、KClを使用してグルコン酸カリウムを置き換えた。ピペット抵抗は3~5MΩであり、記録を、直列抵抗補償を用いずに行った。膜電位は、液界電位からもたらされる誤差に対して補正した。電圧クランプ実験についての保持電位（VM）は、-70mVであった。次の薬剤を示されるように添加した：5μM SR-95531、5μM 2,3-ジヒドロキシ-6-ニトロ-7-スルファモイル-ベンゾ（F）キノキサリン（NBQX）、5μM（R,S）-CPP、メカミラミン（10μM）、5μMコカイン塩酸塩。5μMのコカイン濃度を、複数の基準によって注意深く選定した。最初に、それは以前の切片作業の選定と一致していた（Thompson et al., *Neuropharmacology* 49, 185-194 (2005)）。第2に、有意に高い濃度は、局所麻酔効果をもたらすであろう（Thompson et al., *Neuropharmacology* 49, 185-194 (2005)）。最後に、マウスにおけるコカイン薬物動態の研究によれば、行動実験で使われたレベルに匹敵して、10mg/kgの腹腔内注射は、脳内で15分後に4.7μMのコカインを産出し、20mg/kgは、9.4μMを産出するであろう（Shah et al., *Toxicology and Applied Pharmacology* 53, 279-284 (1980)）。光電流を、光学スイッチを使用して、300Wキセノンランプおよび470±20nmまたは580±20nmいずれかのバンドパスフィルターを用いて誘発させた。検体における光パワーは、11.52mWmm⁻²（470nm）または10.64mWmm⁻²（580nm）であった。電流を2kHzでフィルターし、50kHzでデジタル化し、pClamp10ソフトウェア（Axon Instruments）を使用してディスクに記録した。データは、平均±平均値の標準誤差として表され、統計的有意性を、適宜、対応のあるまたは対応のないt検定を使用して決定した。MSNにおけるIPSC測定については（図2B~Eおよび図5A~B）、光を用いずに10回反復し、その後、光を用いて10回反復前した。各反復は、5秒間の長さであり、5秒間の休息期間によって分離された。細胞切片中のChATのコカイン応答を試験するために（図4A~C）、全細胞記録を、発火の上昇が図4に要約されるように可変であったが、対照条件における発火の典型的なランダウンと対照をなした、内殻の腹側部分から得た。探索的研究は、コアおよび殻中のその他の場所におけるChAT細胞がコカインに対して応答性がより低かったことを示唆した。

【0130】

生体外オプトロード記録

同時光刺激および細胞外電氣的記録を、以前に記載されたように行った（Gradinaru et al., *J. Neurosci* 27, 14231-14238 (2007)）。オプトロードは、電極の先端がファイバーを超えて300~500μm突出した、光ファイバー（300μmコア直径、0.37N.A.）に接着されたタングステン電極（1MΩ、0.005in、パリレン絶縁）からなっていた。電極を、NAcを通じておよそ100μmの増分で低下させ、光学応答を、各増分につき記録した。光ファイバーは473nmまたは560nmレーザーに連結させた。パワー密度は、双方の波長について、ファイバー先端で約140mW/mm²であり、それは、470nm光について約7~17mW/mm²および560nm光について約10~22mW/mm²である、電極の先端における密度に対応した。シグナルを増幅し、バンドパスフィルター（300Hz低域カットオフ、10kHz高域カットオフ）処理した後、デジタル化およびディスクへの記録を行った。各部位につき、5回の刺激反復を提示し、保存した。各刺激エポックは、各反復の開始時間の間で80~90秒間の回復期間を用いながら10~15秒間持続し

、各反復について50秒のデータをディスクに記録した。

【0131】

結果

最初に、MSNにおけるシナプス後電流を、急性NAc切片において、図1にあるように標的とされた、ChR2-eYFPを発現するChAT細胞の光遺伝学的光刺激中に監視した（ChR2-eYFP非発現細胞）（図2A）この設定においてChATニューロンを刺激することにより、MSNにおいて記録されたγ-アミノ酪酸A型（GABA_A）受容体媒介型抑制性シナプス後電流（IPSC）の周波数は強固に増加された（図2BおよびC）。誘発抑制性電流は、一般に、6msのモダルレイテンシ（modal latency）を伴って光パルスと同期し（図2D）、非同期性IPSCのより小さい強化を伴った（図5A～C）。全ての記録された細胞にわたって、MSNにおいて観察されたIPSCの平均周波数は、ChATニューロンの光刺激中に $525.8 \pm 154.3\%$ 増加した（ $n=7$ 、平均±標準誤差、 $P=0.01$ 、対応のあるt検定）一方で、平均IPSC振幅は、影響を受けなかった（ $P>0.05$ 、対応のあるt検定、 $n=7$ 、図2E）。この効果は、ニコチン性アンタゴニストメカミラミンによって減弱された（図7、 $n=5$ 、 $P<0.05$ 、対応のあるt検定）。

【0132】

次に、抑制性電流周波数におけるこれらの劇的な変化が、生体内でMSN発火における変化に変換されるかどうかおよびその様子が問われた。我々は、生体内のChAT介在ニューロンの光遺伝学的活性化中のNAcにおけるオプトロードにより、細胞外で神経活動を記録した（図2F）。単一のユニットが絶縁されなかった部位において、我々は、100Hzではなく10Hzで光刺激を追跡した、神経集団発火を観察し（図5D）、それは電極の近傍においてまばらであるが同期性に活性化されたChAT細胞にわたる集団発火を表す可能性が高い。これらの集団発火とは対照的に、NAcにおける絶縁ユニットは、光遺伝学的光刺激に対して顕著に異なる応答を示した。切片中のMSNにおける、IPSC周波数の観察された増加と一致して、我々は、生体内で、生体内ChAT細胞（代表的な細胞、図2G）の刺激中にバックグラウンド発火のプラウド抑制（proud inhibition）を観察した。集団にわたって、最も有意に変調された部位は、バックグラウンド発火の抑制を示したが、発火の増加により応答したものは少数であり（図2HおよびI）、それはChATニューロン駆動中の、より広範なMSN集団によって以前に行使された、MSNの間の既知の反回性抑制および抑制からの対応する放出と一致する。

【0133】

実施例3：コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）介在ニューロンの過分極の効果

次に、生体内Cre依存性eNpHR3.0を発現を用いて、ChAT介在ニューロンを特異的に抑制することの結果を探索した。

【0134】

材料および方法

マウス、オプトロード記録、および脳切片を、上記のように調製した。

【0135】

結果

ChATニューロン興奮で観察されたものとは対照的に、NAcニューロンの発火は、典型的に、ChAT細胞の光遺伝学的抑制によって、MSNにおいて高い可能性で増加した。代表的な細胞は図3Aに示される）。パワースペクトル分析により、これらの生体内記録において、約4Hzの発火パターンにおけるストライキング周波数ピークが明らかとなった（図3B）。要約データは、図3Cに提示される。有意に変調された部位の集団にわたって、ほとんどのニューロンは、ChATニューロンの光遺伝学的抑制によって興奮させられた（ $n=17$ ）。我々は、稀有な推定ChAT介在ニューロンから単一ユニット記録を得ることができ、それはeNpHR3.0によって完全にシャットダウンされ（図3D）、ChAT介在ニューロン（37）の長い活動電位持続期間特性を示した（この細

10

20

30

40

50

胞については2.0 msであるが、我々の記録におけるMSNについての発火持続期間は1.1~1.7 msの範囲であった）。要約データ（図3E）は、全ての記録された部位についての興奮および抑制の力学を示し、それは興奮の優性パターンを例証している（発火は、光によって興奮させられた部位において130.5+/-17.5%増加した）。まとめると、ChATニューロンの体内光遺伝学的興奮および抑制からの結果は、切片生理学からの我々の知見と一致し、これらの稀有な細胞についての、NAcにおける局所回路活性を制御することにおける驚くほどに強力な役割を指摘している。

【0136】

実施例4：自由に移動しているマウスにおける報酬行動に対するコリン作動性介在ニューロン操作の効果

この強力なNAc制御機構が、自由に移動しているマウスにおける側坐依存性報酬行動と関連するかどうかを試験することを決定した。急性NAc切片におけるこれらの識別されたChATニューロンの活性に対する、急性投与されたコカインの最初の効果を試験した。次に、eNpHR3.0を使用して、動物が環境とコカインを関連付けることを学習する、コカイン場所嗜好条件付け（CPP）の報酬関連行動における、ChAT細胞のこのコカイン誘発型活性またはベースライン活性のいずれかにおける因果的役割について試験した。

【0137】

材料および方法

場所嗜好条件付け

全ての行動実験を、動物の暗（活動）サイクル中のウイルス注射の4~6週間後に行った。場所嗜好条件付け（CPP）プロトコルは、不偏の、平衡のとれた場所嗜好の以前の報告からのものと同様であった（Bardo et al., Neurosci Biobehav Rev 19, 39-51 (1995)）。CPP器具は、一方の側面のコンパートメントが23 cm x 26 cmの寸法で、黒色壁および格子の床を備え、中央コンパートメントが23 cm x 11 cmの寸法で、透明プレキシガラス壁およびプレキシガラス床を備え、他方の側面のコンパートメントが23 cm x 26 cmの寸法で、白色壁および穴のあいた金属床を備えた、長方形の部屋からなっていた。各試験日のマウス位置を、ビデオトラッキングシステムを使用して監視した。床は、マウスが特定の部屋に対する平均ベースライン偏りを示さないように選択し、ある部屋への強力な初期嗜好を有する（1日目に部屋の中で費やされた差異が5分間を超える）いずれのマウスも排除した。CPP試験は、次のものからなっていた。1日目、各マウスを中央室に配置し、器具全体を20分間自由に探索させた（前試験）。2日目は、条件付けからなっていた。朝に、各マウスを、側面室のうちの一方に閉じ込め、午後に、他方の側面室に同じ期間にわたって閉じ込めた。コカインCPP実験のために、対象に腹腔内コカイン注射を受容させた（別途明記されない限り20 mg/kg）後、一方の部屋に配置した一方で、対象に同等量の腹腔内食塩水注射を受容させた後、他方の部屋に配置した。（この濃度のコカインは、対照動物において1日の訓練で強固な条件付けを可能にし、光遺伝学的介入を促進する）。マウスに、それらがコカイン注射と対になった部屋を探索した20分間中、黄色光または青色光のいずれかを受容させた一方で、それらに、他方の部屋を探索している時に光を発光していない「模造の」ファイバーを接続した。青色光（470 nm）の強度を、ファイバー先端で140~200 mW/mm²のパワー密度を発生するように選定したが、それはNAcの中央における約4~7 mW/mm²のパワー密度に対応するはずである。黄色光（590 nm）の強度を、ファイバー先端で70~140 mW/mm²のパワー密度が存在するように選定したが、それはNAcの中央における約3.5~7 mW/mm²のパワー密度に対応するはずである。3日目、1日目と全く同様に、マウスを中央室に配置し、器具全体を20分間自由に探索させた（後試験）。コカインを伴わなかったCPP実験を同一に行ったが、コカインまたは食塩水の腹腔内注射を省略したことを例外とする。

【0138】

オープンフィールド

オープンフィールド試験を、オーブンプラスチックアリーナで行った（50 cm長さ×50 cm幅×40 cm深さ）。マウスを、部屋の中心に個々に配置し、3分間自由に探索させた。自動ビデオトラッキングシステム（Viewer II, Bioobserve）を使用して、フィールドの中心および周辺両方における活動を測定した。中心における時間は、マウスが、オープンフィールドの中心35×35 cm領域で費やした時間を指す。

【0139】

恐怖条件付け

恐怖条件付け器具は、ショック発生器およびスクランブラに配線された格子床を備え、音響室によって囲まれた、正方形条件付けケージ（18×18×30 cm）からなっていた。部屋の最上部を、ファイバーのための開口部を導入することによって、訓練中に光送達を可能にするように修正した。全てのマウスに、訓練中、連続黄色光を受容させたが、翌日の試験中には受容させなかった（590 nm、CPP実験の場合と同じパワー密度）。恐怖条件付けを誘発するために、マウスをケージに120秒間配置し、純粋なトーン（2.9 kHz）を次いで20秒間再生し、続いて即座に2秒間の足部ショック（0.5 mA）を行った。この手順を反復し、第2のショックの30秒後、マウスをそれらのホームケージに戻した。すくみ（完全な不動）を、条件付け日の最初のトーン前に30秒間定量化して、ベースラインすくみを査定し、同様に条件付け日の最後のショック直後に30秒定量化して、即座のすくみを査定した。前後関係上のおよび聴覚合図による恐怖条件付けを、条件付けの翌日に査定した。前後関係上の恐怖条件付けを試験するために、マウスを元の条件付けケージに配置し、すくみを5分間測定した。聴覚合図による恐怖条件付けを試験するために、マウスを、異なる前後関係、すなわちプレキシガラス床を備えるピラミッド形のケージに配置した。新規の環境の影響に対する対照として、すくみをこの新たなケージ中で2.5分間測定し、次いで2.9 kHz トーンを2.5分間再生し、その間、条件付けされたすくみを測定した。

【0140】

結果

腹側内側NAc ChAT細胞中で、コカインは、自発的発火を顕著に増加させることが見出された（代表的なChATニューロンは、図4、AおよびBに示される）。要約データにより、コカインが、ChATニューロンにおいて、10分時点で発火率を0.60±0.41 Hzから1.74±0.56 Hzまで増加させた一方で（n=7、P<0.005、対応のあるt試験）、ビヒクルのみを受容する細胞の対照群においては、発火率は、同じ時間枠にわたって0.69±0.24 Hzから0.09±0.09 Hzまで減少したことが明らかとなった（n=6、2つの群を比較してP<0.05、両側t検定）（図4C）。

【0141】

我々は、次に、eNpHR3.0を使用して、動物が環境をコカインと関連付けることを学習する、場所嗜好条件付け（CPP）の報酬関連行動における、このコカイン誘発型活性、またはChAT細胞のベースライン活性のいずれかの因果的役割を試験した。ウイルスを注射し、カニューレを両側性で植え込みして（図4D）、コカイン曝露中のChATニューロンをサイレンシングした後（図4E）、我々は、ChAT細胞中でeNpHR3.0を発現したマウスが、同じウイルス、手術、および光送達プロトコルを受容したそれらの対照（Creリコンビナーゼ陰性）同腹子が示したものよりも有意に低いコカイン誘発型場所嗜好条件付け（CPP）を示したことを見出した〔20 mg/kg腹腔内（ip）、図4FおよびG；n=10 ChAT::Cre⁺、n=12 ChAT::Cre⁻（左パネル）、両側t検定についてP<0.01、3つのコホート、図6Aもまた参照されたい。我々は、コカインの不在下で、ChAT細胞を抑制する行動的效果を何ら観察せず、ChATニューロン抑制は、eNpHR3.0単独での条件付けが場所嗜好に影響を及ぼさなかったように、それ自体、嫌悪性でなかった（図4G、右パネル、n=9 ChAT::Cre⁺、n=7 ChAT::Cre⁻、両側t検定についてP>0.05、3つのコホート、図6B、コカイン用量反応曲線について図8Aもまた参照されたい）

。10 Hz の ChR2 による細胞の活性化は、それ自体で場所嗜好を駆動するのに、またはコカイン場所嗜好を強化するのに十分でなく（10 および 20 mg/kg 腹腔内、図 8 B～D、表 4）、ChAT 細胞抑制からの我々のデータは、代わりにこれらの細胞の必要性を実証した。最後に、対照実験において、我々は、ChAT ニューロン抑制がそれ自体、オープンフィールドにおける移動度または不安に対して何ら効果を有さないこと（図 4 H および J）、ならびに前後関係上のおよび聴覚合図による恐怖条件付けが、ChAT 細胞の抑制によって妨害されないこと（図 9）を見出した。

表 4：ChAT ニューロンの抑制（eNpHR3.0 での）がコカイン曝露と対にされた時の、コカイン場所嗜好パラダイム（種々のコカイン濃度について）の試験日に、コカインと対にされた側面上で費やされた総時間。

【表 4】

	mg/kg	0	10	20	40
ChAT::Cre+	<i>N</i>		11	10	4
	条件付けされた側面（分間）		10.3	10.7	10.5
ChAT::Cre-	<i>N</i>		12	12	3
	条件付けされた側面（分間）		8.5	14.2	9.2

【0142】

考察

まとめて、ChAT ニューロン集団の特異的および急性光遺伝学的制御からのこれらの結果は、自由に移動している哺乳動物において、局所回路活性を制御することおよび報酬関連行動を実施することにおける、これらの稀有かつまばらに分布したニューロンについての強力な役割を指摘する。ChAT 介在ニューロンの急性サイレンシングが、薬物の不在下で、場所嗜好に影響を及ぼすことなく薬物関連学習を妨害するという事実は、この超小型回路に対する制御を使用して、一般に欲求性または嫌悪性反応に影響を及ぼすことなく、乱用薬物の嗜癖特性を選択的に妨害することが可能であるという興味深い可能性、つまり莫大な臨床的便益となる可能性を示唆する。興味深いことに、行動的結果は、コリン作動性介在ニューロンの慢性から生じる結論を支持しないが（34）、代わりに、NAc におけるより速いがより低い細胞標的型の薬理学的変調から生じる解釈とより一致している（23～26）。コリン作動性介在ニューロンのアブレーションは、NAc におけるドーパミンの代償性増加等の間接的な効果につながる可能性があり、それが今度はコカイン報酬を強化する可能性がある。実際、急性操作と慢性操作との間の基本的な差異は、ニコチンにおける急性増加（恐らく、コリン作動性受容体に作用する）が、ドーパミンにおける対応する急性増加を引き起こす（54、55）一方で、ドーパミンまたはアセチルコリンレベルにおける慢性変化が、例えば、パーキンソン病のドーパミン枯渇において見られるような（57）、他の神経変調物質のレベルにおける対向する変化を引き起こすことができる（56）という知見等の、脳内のアセチルコリン／ドーパミンバランスの我々の理解における、臨床的に関連する明らかな矛盾を説明し得る。

【0143】

このアプローチの速さおよび特異性は、神経系の他の領域においても同様に、健康なおよび罹患した神経回路の両方における、アセチルコリンニューロンの因果的役割の解明を可能にし得る。例えば、線条体に対して突出するドーパミンニューロンとよく類似して（58、59）、背側線条体における ChAT 介在ニューロンは、報酬および報酬を予測する刺激についての情報を担持すると考えられる（60）。かかる刺激は、しばしば興奮性の活性バーストに先行しかつそれが後に続く、霊長類における線条体の持続性で活性なニューロンの活性における短い休止を発生する（16、17）。背側線条体と腹側線条体との間の構造的相同性は、NAc について本明細書で概説されるものと同様の原則が、背側

線条体におけるC h A T細胞活性に拡張し得ることを示唆し、それは実際に当てはまるように思われる（E n g l i s hら、添付の原稿）。これらの結果は、N A cにおけるこれらの細胞の活性が、強力な時間的に同期した抑制を駆動し、報酬学習行動を制御するという我々の知見と合わせて、C h A Tニューロンが、ほ乳類脳内の回路活性および行動の多方面にわたる神経変調調節のための、強力な制御ノードとしての機能を果たすことを示唆する。

【0144】

本発明を純粹に例示することを目的とし、したがって、決して本発明を限定すると見なされるべきではない、実施例はまた、上記で論議される本発明の態様および実施形態を説明および詳述する。先述の実施例および詳細な説明は、限定ではなく例証として提供される。本明細書で引用される出版物、特許出願、および特許は、各個別出版物、特許出願、または特許が、参照することにより組み込まれると特異的および個別に示されたかのように、参照することにより本明細書に組み込まれる。具体的には、本明細書で引用される全ての出版物は、本発明と関連して使用され得る組成物および方法を説明および開示する目的で、参照することにより本明細書に明示的に組み込まれる。先述の発明は、理解を明確にする目的で、例証および一例として、いくらか詳細に説明されているが、本発明の教示に照らして、添付の請求項の精神または範囲から逸脱することなく、ある変更および修正が行われてもよいことが、当業者に容易に明らかとなるであろう。

【0145】

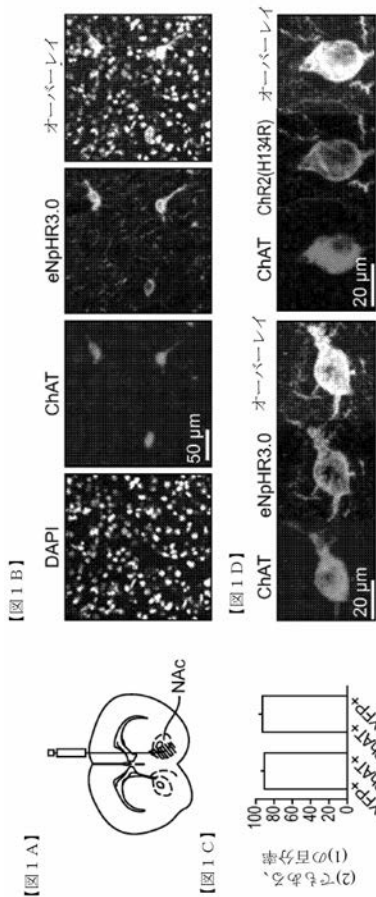
参考文献

1. S. Ikemoto, R. A. Wise, *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 190-201 (2004).
2. J. Changeux, C. R. Biol 332, 421-425 (2009).
3. M. P. Kilgard, M. M. Merzenich, *Science* 279, 1714-1718 (1998).
4. J. S. Bakin, N. M. Weinberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 11219-11224 (1996).
5. M. E. Hasselmo, L. M. Giocomo, *I MoL Neurosci* 30, 133-135 (2006).
6. U. Maskos, *Br. J. Pharmacol* 153 Suppl 1, S438-445 (2008).
7. M. R. Picciotto et al., *Nature* 391, 173-177 (1998).
8. J. M. Fellous, T. J. Sejnowski, *Hippocampus* 10, 187-197 (2000).
9. J. P. Changeux et al., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 61, 343-362 (1996).
10. J. P. Changeux et al., *Brain Res. Brain Res. Rev* 26, 198-216 (1998).
11. A. Kamsler, T. J. McHugh, D. Gerber, S. Y. Huang, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 1618-1623 (2010).
12. S. J. Moore, D. C. Cooper, N. Spruston, *Neuron* 61, 287-300 (2009).
13. P. H. Tiesinga, J. M. Fellous, J. V. Jose, T. J. Sejnowski, *Hippocampus* 11, 251-274 (2001).
14. B. J. Everitt, T. W. Robbins, *Annu. Rev. Psychol.* 48, 649-684 (1997).
15. Z. Wang et al., *Neuron* 50, 443-452 (2006).
16. G. Morris, D. Arkadir, A. Nevet, E. Vaadia, H. Bergman, *Neuron* 43, 133-143 (2004).
17. T. Aosaki et al, *J. Neurosci* 14, 3969-3984 (1994).
18. M. L. Furey, P. Pietrini, J. V. Haxby, W. C. Drevets, *Neuropsychopharmacology* 33, 913-923 (2008).
19. S. G. Anagnostaras et al., *Nat. Neurosci* 6, 51-58 (2003).
20. S. Ikemoto, B. S. Glazier, J. M. Murphy, W. J. McBride, *Physiol. Behav* 63, 811-814 (1998).
21. M. J. Williams, B. Adinoff, *Neuropsychopharmacology* 33, 1779-1797 (2008).
22. A. Vale-Martinez, M. G. Baxter, H. Eichenbaum, *Eur. J Neurosci* 16, 983-998 (2002).

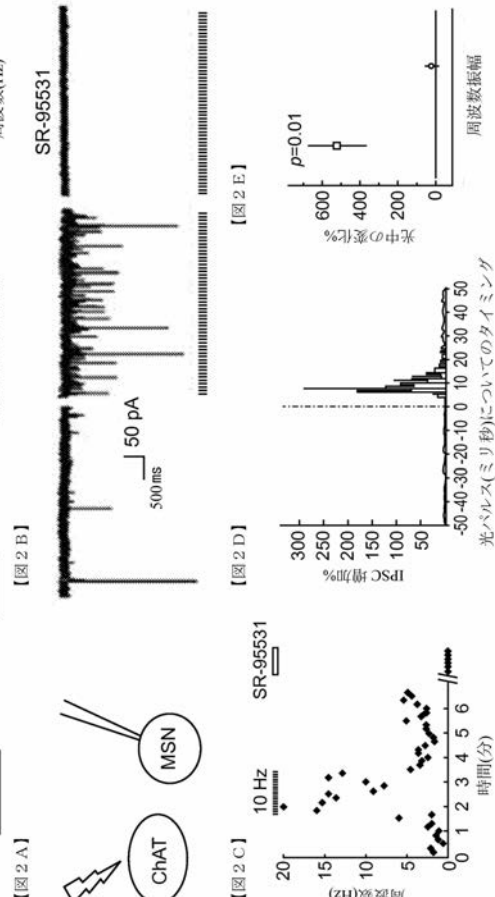
23. V. Zachariou et al., *Neuropsychopharmacology* 24, 576-589 (2001).
24. W. E. Pratt, R. C. Spencer, A. E. Kelley, *Behav. Neurosci* 121, 1215-1223 (2007).
25. J. A. Crespo, K. Sturm, A. Saria, G. Zernig, *J. Neurosci* 26, 6004-6010 (2006).
26. W. E. Pratt, A. E. Kelley, *Behav. Neurosci* 118, 730-739 (2004).
27. F. E. Pontieri, G. Tanda, F. Orzi, G. Di Chiara, *Nature* 382, 255-257 (1996).
28. M. B. Kelz et al., *Nature* 401, 272-276 (1999).
29. B. T. Chen, F. W. Hopf, A. Bonci, *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1187, 129-139 (2010).
30. R. A. Wise, *NIDA Res. Monogr* 50, 15-33 (1984). 10
31. A. A. Grace, C. R. Gerfen, G. Aston-Jones, *Adv. Pharmacol* 42, 655-670 (1998).
32. T. W. Robbins, K. D. Ersche, B. J. Everitt, *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1141, 1-21 (2008).
33. E. J. Nestler, G. K. Aghajanian, *Science* 278, 58-63 (1997).
34. T. Hikida et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 13351 -13354 (2001).
35. V. V. Rymar, R. Sasseville, K. C. Luk, A. F. Sadikot, *J. Comp. Neurol* 469, 325-339 (2004).
36. J. M. Tepper, J. P. Bolam, *Curr. Opin. Neurobiol* 14, 685-692 (2004).
37. F. Zhou, C. J. Wilson, J. A. Dani, *J. Neurobiol* 53, 590-605 (2002). 20
38. F. Zhou, C. Wilson, J. A. Dani, *Neuroscientist* 9, 23-36 (2003).
39. T. Koos, J. M. Tepper, *J. Neurosci* 22, 529-535 (2002).
40. M. de Rover, J. C. Lodder, K. S. Kits, A. N. M. Schoffelman, A. B. Brussaard, *Eur. J. Neurosci* 16, 2279-2290 (2002).
41. N. Uchimura, R. A. North, *J. Physiol. (Lond.)* 422, 369-380 (1990).
42. Y. Zhang, T. G. Oertner, *Nat. Methods* 4, 139-141 (2007).
43. F. Zhang et al., *Nat Protoc* 5, 439-456 (2010).
44. A. R. Adamantidis, F. Zhang, A. M. Aravanis, K. Deisseroth, L. de Lecea, *Nature* 450, 420-424 (2007).
45. S. Gong et al., *J. Neurosci* 27, 9817-9823 (2007). 30
46. H. Tsai et al., *Science* 324, 1080-1084 (2009).
47. D. Atasoy, Y. Aponte, H. H. Su, S. M. Stemson, *J. Neurosci* 28, 7025-7030 (2008).
48. G. Nagel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 13940-13945 (2003).
49. E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci* 8, 1263-1268 (2005).
50. V. Gradinaru et al., *Cell* 141, 154-165 (2010).
51. Y. Kawaguchi, *J. Neurosci* 13, 4908-4923 (1993).
52. C. J. Wilson, H. T. Chang, S. T. Kitai, *J. Neurosci* 10, 508-519 (1990).
53. H. Inokawa, H. Yamada, N. Matsumoto, M. Muranishi, M. Kimura, *Neuroscience* (2010) www.ncbi.nlm.nih.gov/laneproxy.stanford.edu/pubmed/20371269. 40
54. M. Nisell, M. Marcus, G. G. Nomikos, T. H. Svensson, *J Neural Transm* 104, 1-10 (1997).
55. R. Exley, M. A. Clements, H. Hartung, J. M. McIntosh, S. J. Cragg, *Neuropsychopharmacology* 33, 2158-2166 (2008).
56. A. Hrabovska et al., *Chem. Biol. Interact* 183, 194-201 (2010).
57. B. G. Hoebel, N. M. Avena, P. Rada, *Curr Opin Pharmacol* 7, 617-627 (2007).
58. W. Schultz, *J Neurophysiol* 80, 1-27 (1998).
59. W. Pan, R. Schmidt, J. R. Wickens, B. I. Hyland, *J. Neurosci* 25, 6235-6242 (2005). 50

60. M. Kimura, J. Rajkowski, E. Evarts, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 81, 4998-5001 (1984).

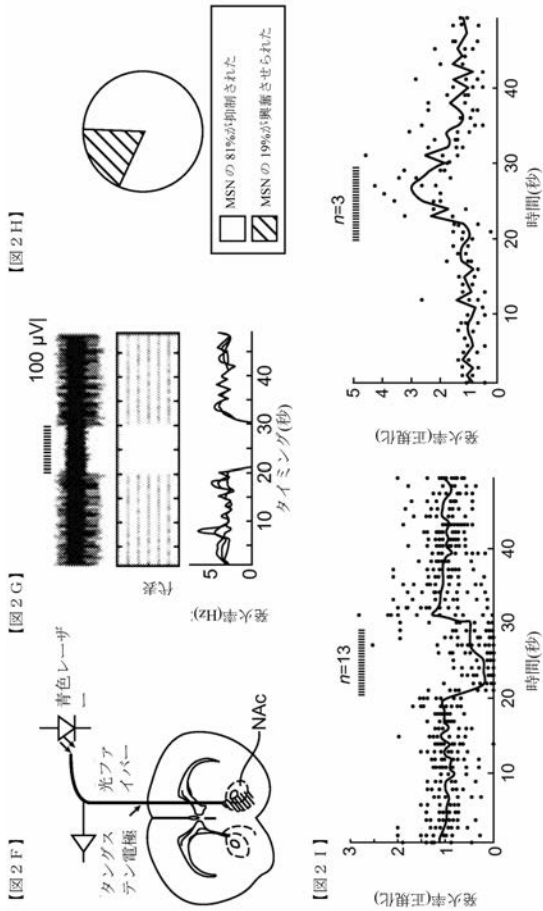
【図 1】



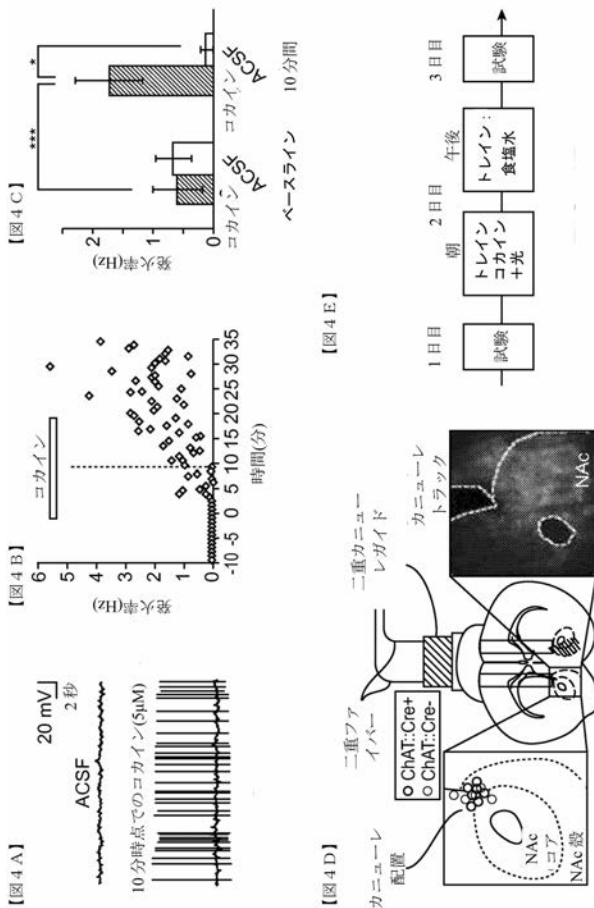
【図 2 i】



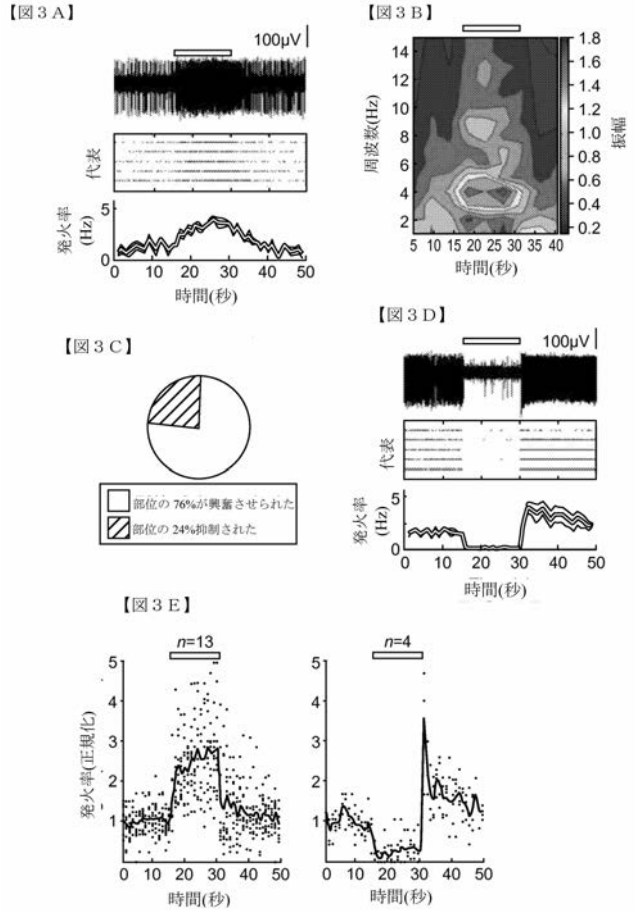
【図 2 i i】



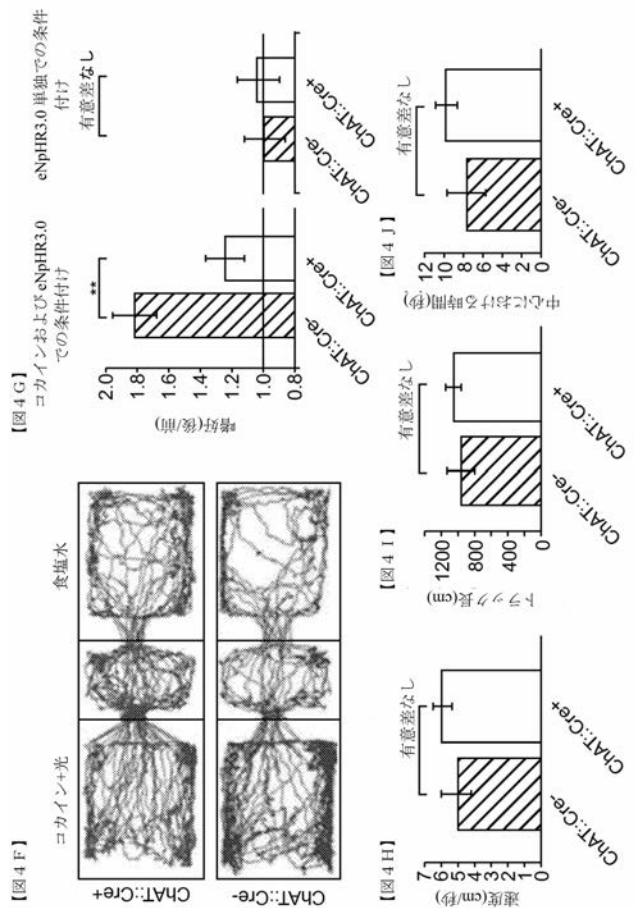
【図 4 i】



【図 3】

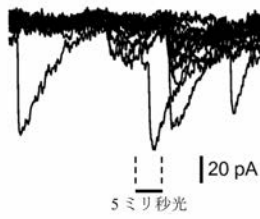


【図 4 i i】

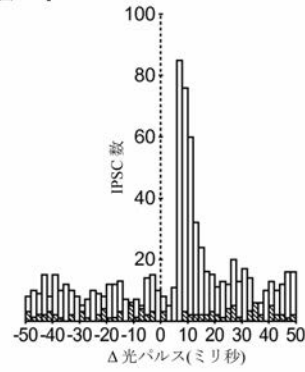


【図 5】

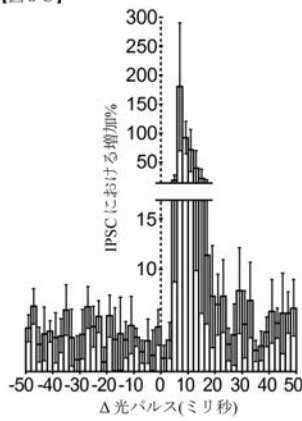
【図 5 A】



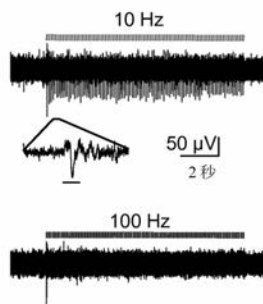
【図 5 B】



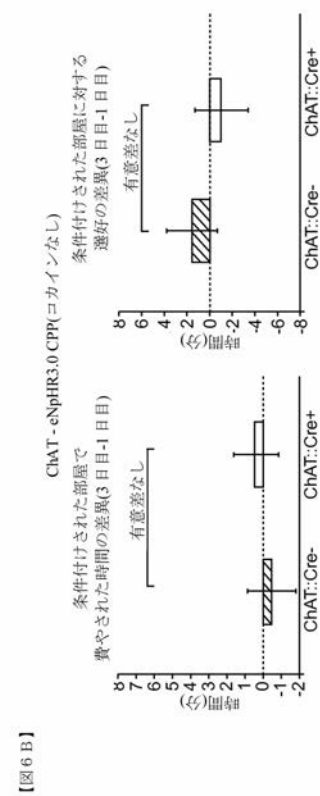
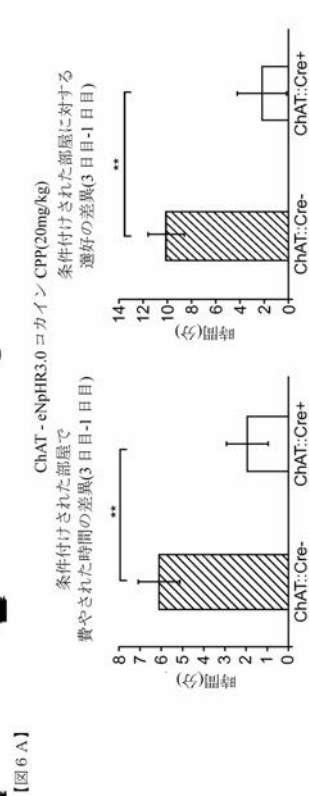
【図 5 C】



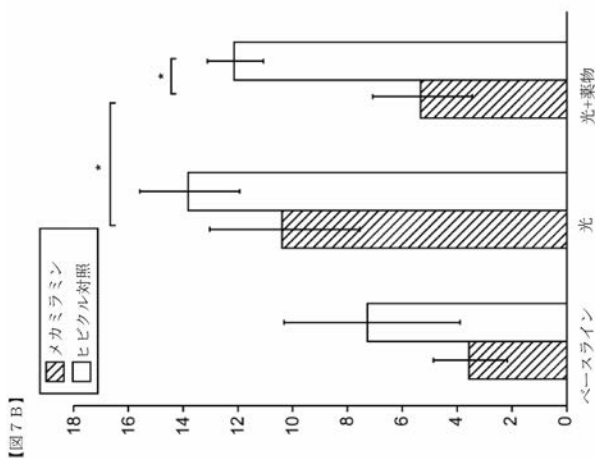
【図 5 D】



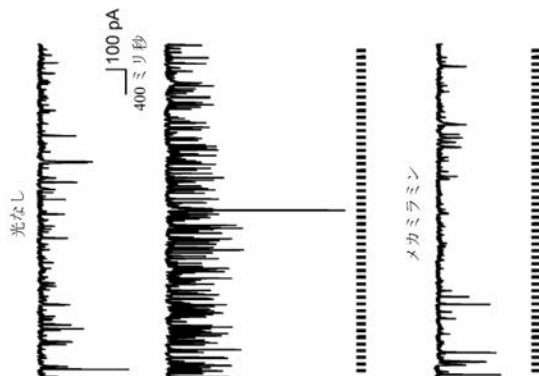
【図 6】



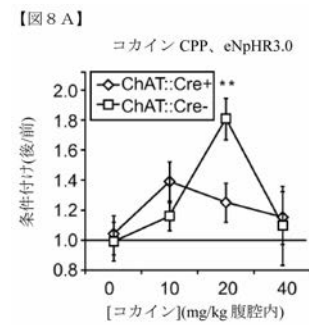
【図 7】



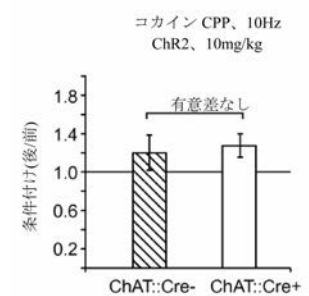
【図 7 A】



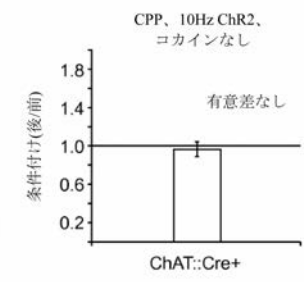
【図 8】



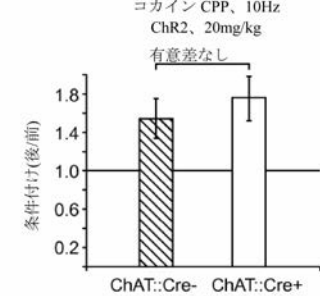
【図 8 C】



【図 8 B】

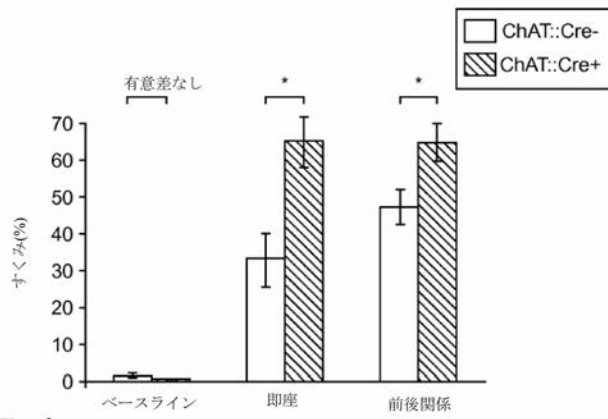


【図 8 D】

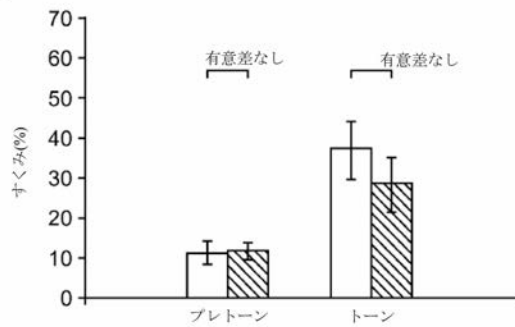


【図 9】

【図 9 A】

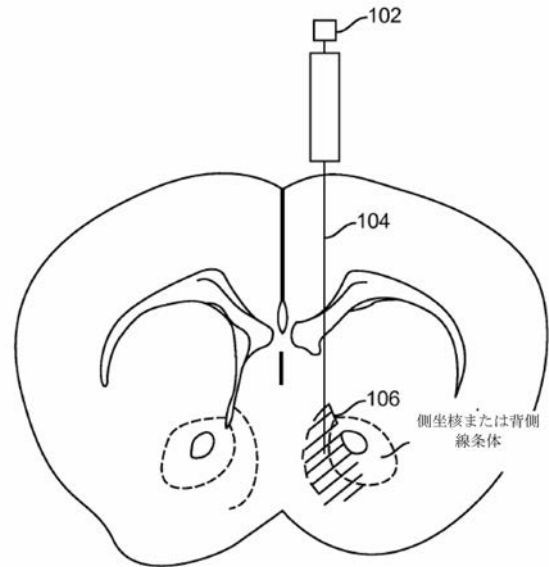


【図 9 B】



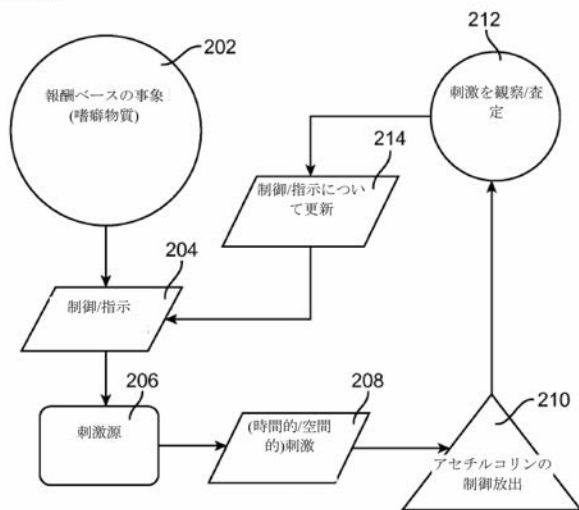
【図 10】

【図 10】



【図 11】

【図 11】



【配列表】

2017122094000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/36 (2006.01)	A 6 1 P 25/36	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

(72)発明者 ダイスロス, カール
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 5, パロ アルト, ピーター カッツ サークル
 7 0

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA01Y AA90X AA95X AB01 AC14 BA01 CA16 CA27 CA29
 CA44 CA46
 4C084 AA11 AA13 NA13 NA14 ZA02 ZC39
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 ZA02 ZC39
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA13 NA14 ZA02 ZC39
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA11 DA89 EA20 EA50 FA74