

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7204192号
(P7204192)

(45)発行日 令和5年1月16日(2023.1.16)

(24)登録日 令和5年1月5日(2023.1.5)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 N 5/06 (2006.01)

A 6 1 N

5/06

Z

A 6 1 M 21/00 (2006.01)

A 6 1 M

21/00

Z

A 6 1 N 1/36 (2006.01)

A 6 1 N

1/36

A 6 1 N 5/067(2006.01)

A 6 1 N

5/067

請求項の数 72 (全124頁)

(21)出願番号 特願2018-525754(P2018-525754)

(86)(22)出願日 平成28年11月23日(2016.11.23)

(65)公表番号 特表2019-502429(P2019-502429
A)

(43)公表日 平成31年1月31日(2019.1.31)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/063536

(87)国際公開番号 WO2017/091698

(87)国際公開日 平成29年6月1日(2017.6.1)

審査請求日 令和1年11月25日(2019.11.25)

審判番号 不服2021-15910(P2021-15910/J
1)

審判請求日 令和3年11月19日(2021.11.19)

(31)優先権主張番号 62/259,187

(32)優先日 平成27年11月24日(2015.11.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 596060697

マサチューセッツ インスティテュート
オブ テクノロジーアメリカ合衆国マサチューセッツ州02
139ケンブリッジ, マサチューセッツ
・アヴェニュー・77

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

(74)代理人 100182305

弁理士 廣田 鉄平

(74)代理人 100096482

弁理士 東海 裕作

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 認知症の予防、軽減、及び／または治療のためのシステムならびに方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

その必要がある対象において認知症を治療するための装置であって、
前記装置は、

約35Hz～約45Hzの間の周波数で非侵襲的刺激を放出することができ、及び、
前記対象に前記非侵襲的刺激を投与して、前記対象の少なくとも1つの脳領域において、
周波数約35Hz～約45Hzを有する同期ガンマ振動を誘導することにより、前記対象
における認知症を治療することができる、
前記装置。

【請求項2】

前記同期ガンマ振動が、周波数約40Hzを有する、請求項1に記載の装置。

【請求項3】

前記対象に前記非侵襲的刺激を投与して認知症を治療することが、前記同期ガンマ振動を
細胞型特異的に誘導することを含む、請求項1に記載の装置。

【請求項4】

前記対象に前記非侵襲的刺激を投与して認知症を治療することが、ファスト・スパイクン
グ・パルプアルブミン(FS-PV)介在ニューロンの同期的活動化を誘導することを含
む、請求項3に記載の装置。

【請求項5】

前記対象に前記非侵襲的刺激を投与して認知症を治療することが、前記同期ガンマ振動を

脳領域特異的に誘導することを含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記対象に前記非侵襲的刺激を投与して認知症を治療することが、海馬領域及び感覚野領域の少なくとも一方において同期的活動化を誘導することを含む、請求項 5 に記載の装置。

【請求項 7】

前記認知症が、アルツハイマー病、血管性認知症、前頭側頭認知症、レビー小体認知症、及び加齢関連認知低下のうちの少なくとも 1 つと関連する、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 8】

前記対象がヒトである、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 9】

前記装置が、触覚装置、発光装置、及び放音装置のうちの少なくとも 1 つである、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 10】

その必要がある対象において認知症を治療するための装置であって、

前記装置は、

約 3.5 Hz ～ 約 4.5 Hz の間の周波数で刺激を放出することができ、及び、

前記対象に、前記対象の少なくとも 1 つの脳領域において周波数約 3.5 Hz ～ 約 4.5 Hz を有する同期ガンマ振動を誘導するために少なくとも 1 つの刺激を投与して、前記対象の少なくとも 1 つの脳領域におけるアミロイド β ($A\beta$) ペプチド量を維持又は低減し、それによって前記対象における認知症を治療することができる、

前記装置。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの刺激を投与して認知症を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域において $A\beta$ ペプチドの生産を低減することを含む、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの刺激を投与して認知症を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域においてアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の C 末端断片 (CTF) 及び N 末端断片 (NTF) の少なくとも一方の量を低減することを含む、請求項 11 に記載の装置。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 つの刺激を投与して認知症を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域において β セクレターゼ 1 (BACE1) 及び γ セクレターゼの少なくとも一方による APP の CTF 及び NTF への切断を低減することを含む、請求項 12 に記載の装置。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの刺激を投与して認知症を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域においてエンドソームの数を低減することを含む、請求項 11 に記載の装置。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つの刺激を投与して認知症を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域において $A\beta$ ペプチドのクリアランスを促進することを含む、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つの刺激を投与して認知症を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域においてミクログリアによる $A\beta$ ペプチドの取り込みを増大することを含む、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 17】

その必要がある対象においてアルツハイマー病を治療するための装置であって、

前記装置は、

10

20

30

40

50

前記対象に周波数約 35 Hz ～ 約 45 Hz を有する視覚又は聴覚信号を非侵襲的に送出して、前記対象の少なくとも 1 つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導することにより、前記対象におけるアルツハイマー病を治療することができる、
前記装置。

【請求項 18】

前記同期ガンマ振動が、周波数約 40 Hz を有する、請求項 17 に記載の装置。

【請求項 19】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記同期ガンマ振動を細胞型特異的に誘導することを含む、請求項 17 に記載の装置。

【請求項 20】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、ファスト・スパイクング・パルプアルブミン (FS-PV) 介在ニューロンの同期的活動化を誘導することを含む、請求項 19 に記載の装置。

【請求項 21】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記同期ガンマ振動を脳領域特異的に誘導することを含む、請求項 17 に記載の装置。

【請求項 22】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、海馬領域及び感覚野領域の少なくとも一方における同期的活動化を誘導することを含む、請求項 21 に記載の装置。

【請求項 23】

前記感覚野領域が、視覚野又は聴覚野を含む、請求項 22 に記載の装置。

【請求項 24】

前記対象が、ヒトである、請求項 17 に記載の装置。

【請求項 25】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の少なくとも 1 つの脳領域におけるアミロイド β ($A\beta$) ペプチド量を維持及び低減することを含む、かつ前記 $A\beta$ ペプチドが、アイソフォーム $A\beta_{1-40}$ ペプチド及びアイソフォーム $A\beta_{1-42}$ ペプチドの少なくとも一方を含む、請求項 17 に記載の装置。

【請求項 26】

前記 $A\beta$ ペプチドが、可溶性 $A\beta$ ペプチド及び不溶性 $A\beta$ ペプチドの少なくとも一方を含む、請求項 25 に記載の装置。

【請求項 27】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域において $A\beta$ ペプチドの産生を低減することを含む、請求項 17 に記載の装置。

【請求項 28】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域においてアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の C 末端断片 (CTF) 及び N 末端断片 (NTF) の少なくとも一方の量を低減することを含む、請求項 27 に記載の装置。

【請求項 29】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域において、 β セクレターゼ 1 (BACE1) 及び γ セクレターゼの少なくとも一方による APP の CTF 及び NTF への切断を低減することを含む、請求項 28 に記載の装置。

【請求項 30】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域におけるエンドソームの数を低減することを含む、請求項 27 に記載の装置。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

前記エンドソームが、初期エンドソーム抗原 1（E E A 1）及び R A B 5 A 遺伝子（R a b 5）がコードする R a s 関連タンパク質の少なくとも一方に対して陽性である、請求項 3 0 に記載の装置。

【請求項 3 2】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域における A β ペプチドのクリアランスを促進することを含み、請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 3 3】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域において、ミクログリアによる A β ペプチドの取り込みを増大することを含む、請求項 3 2 に記載の装置。

10

【請求項 3 4】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の前記少なくとも 1 つの脳領域において ミクログリア細胞の活性に関与する少なくとも 1 つの差次的に発現される遺伝子を上方制御することを含み、前記差次的に発現される遺伝子が、マウスに対する刺激の違いによって差次的に発現される遺伝子である、請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 3 5】

前記少なくとも 1 つの差次的に発現される遺伝子が、N r 4 a 1、A r c、N p a s 4、C d 6 8、B 2 m、B s r 2、I c a m 1、L y z 2、I r f 7、S p p 1、C s f 1 r、及び C s f 2 r a のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 3 4 に記載の装置。

20

【請求項 3 6】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の少なくとも 1 つの脳領域における、ミクログリア細胞数を増大すること、神経保護状態と一致する前記ミクログリア細胞における形態学的変化を誘導すること、又は前記ミクログリア細胞の活性を促進することを含み、前記神経保護状態と一致する前記ミクログリア細胞における前記形態学的変化が、細胞体のサイズの増加及び過程の長さの減少の少なくとも一方を含む、請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 3 7】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出することが、
前記対象を複数の光パルスで刺激し、それにより前記対象の視覚野に同期ガンマ振動を誘導すること；又は前記対象を複数の音パルスで刺激し、それにより前記対象の海馬及び／又は聴覚野に前記同期ガンマ振動を誘導することを含む、請求項 1 7 に記載の装置。

30

【請求項 3 8】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出することが、前記視覚又は聴覚信号を約 1 時間送出することを含む、請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 3 9】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出することが、前記視覚又は聴覚信号をある期間にわたって少なくとも 1 日 1 回繰り返し送出することを含み、前記期間が、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、1 週間、2 週間、3 週間、及び 1 か月のうちの少なくとも 1 つである、請求項 1 7 に記載の装置。

40

【請求項 4 0】

前記装置が、
信号を生成する信号生成器；及び
前記信号生成器に結合され、前記信号生成器により生成された前記信号に基づき、対象に刺激を非侵襲的に投与して、前記対象の少なくとも 1 つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する、放出体
を含む、請求項 1 7 ～ 3 9 のいずれかに記載の装置。

【請求項 4 1】

50

前記放出体が、触覚装置、発光装置、及び放音装置のうちの少なくとも1つを含む、請求項40に記載の装置。

【請求項42】

前記放出体が、発光装置、及び放音装置のうちの少なくとも1つを含み、前記発光装置が、前記対象の少なくとも一方の目に対する周囲光を低減するための光閉塞装置を含み、前記光閉塞装置が、前記対象の前記少なくとも一方の目に前記視覚信号を放出して、前記対象の視覚野及び海馬の少なくとも1つに同期ガンマ振動を誘導するための発光ユニットを含み、かつ

前記放音装置が、前記対象の少なくとも一方の耳に対する周囲騒音を低減するための雑音消去装置を含み、前記雑音消去装置が、前記対象の前記少なくとも一方の耳に前記聴覚信号を放出し、前記対象の聴覚野及び海馬の少なくとも1つに同期ガンマ振動を誘導するためのスピーカユニットを含む、

請求項41に記載の装置。

【請求項43】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、前記対象の少なくとも1つの脳領域におけるタウリン酸化を低減することを含む、請求項17に記載の装置。

【請求項44】

前記対象に前記視覚又は聴覚信号を送出してアルツハイマー病を治療することが、

a) 前記対象の少なくとも1つの脳領域におけるアミロイドβ (Aβ) ペプチド量を維持又は低減すること；

b) 前記対象の少なくとも1つの脳領域における、ミクログリア細胞数を増大すること；神経保護状態と一致する前記ミクログリア細胞の形態学的変化を誘導すること；及び前記ミクログリア細胞の活性を促進すること；及び

c) 前記対象の少なくとも1つの脳領域におけるタウリン酸化を低減することの1又は2以上を含む、請求項40に記載の装置。

【請求項45】

対象に周波数約35Hz～約45Hzを有する非侵襲的刺激を非侵襲的に投与して、前記対象の少なくとも1つの脳領域において、同期ガンマ振動を誘導することができる、アルツハイマー病及び／又は認知症の治療のための装置。

【請求項46】

前記同期ガンマ振動が、周波数約40Hzを有する、請求項45に記載の装置。

【請求項47】

前記対象が、ヒトである、請求項45に記載の装置。

【請求項48】

前記対象に前記非侵襲的刺激を投与して、前記対象の少なくとも1つの脳領域において、同期ガンマ振動を誘導することを介して、前記対象における記憶の連合を維持又は強化することができる、請求項45に記載の装置。

【請求項49】

前記対象に前記非侵襲的刺激を投与して、前記対象の少なくとも1つの脳領域において、同期ガンマ振動を誘導することを介して、前記対象における認識の柔軟性を維持又は強化することができる、請求項45に記載の装置。

【請求項50】

前記対象に前記非侵襲的刺激を投与して、前記対象の少なくとも1つの脳領域において、同期ガンマ振動を誘導することを介して、前記対象における不安を低減することができる、請求項45に記載の装置。

【請求項51】

周波数約35Hz～約45Hzを有する信号を生成する、信号生成器；及び

前記信号生成器に結合され、前記信号生成器により生成された前記信号に基づき、対象に刺激を非侵襲的に投与して、前記刺激に応答して前記対象の少なくとも1つの脳領域にお

10

20

30

40

50

いて同期ガンマ振動を誘導する、放出体を含む、アルツハイマー病及び／又は認知症の治療のための装置。

【請求項 5 2】

前記放出体が、発光体である、請求項 5 1 に記載の装置。

【請求項 5 3】

前記発光体が、光ファイバー系放出体及び固体光源からなる群から選択される、請求項 5 2 に記載の装置。

【請求項 5 4】

前記発光体が、固体光源であり、少なくとも 1 つの発光ダイオード（LED）を含む、請求項 5 3 に記載の装置。

【請求項 5 5】

前記放出体が、表示画面を含む、請求項 5 2 に記載の装置。

【請求項 5 6】

前記放出体が、放音体である、請求項 5 1 に記載の装置。

【請求項 5 7】

前記刺激が、所定の頻度の一連のクリックにより構成される音刺激を含む聴覚クリック・トレインである、請求項 5 6 に記載の装置。

【請求項 5 8】

前記放出体が、触覚装置であり、前記刺激が、触覚刺激である、請求項 5 1 に記載の装置。

【請求項 5 9】

前記装置が、

信号を生成する信号生成器；及び

前記信号生成器に結合され、前記信号生成器により生成された前記信号に基づき、対象に前記非侵襲的刺激を非侵襲的に投与して、前記対象の少なくとも 1 つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する、放出体；

を含む、請求項 4 5 ～ 5 0 のいずれかに記載の装置。

【請求項 6 0】

前記放出体が、発光体である、請求項 5 9 に記載の装置。

【請求項 6 1】

前記発光体が、光ファイバー系放出体及び固体光源からなる群から選択される、請求項 6 0 に記載の装置。

【請求項 6 2】

前記発光体が、固体光源であり、少なくとも 1 つの発光ダイオード（LED）を含む、請求項 6 1 に記載の装置。

【請求項 6 3】

前記放出体が、表示画面を含む、請求項 5 9 に記載の装置。

【請求項 6 4】

前記放出体が、放音体である、請求項 5 9 に記載の装置。

【請求項 6 5】

前記刺激が、所定の頻度の一連のクリックにより構成される音刺激を含む聴覚クリック・トレインである、請求項 6 4 に記載の装置。

【請求項 6 6】

前記刺激が、触覚刺激である、請求項 4 5 ～ 5 0 のいずれかに記載の装置。

【請求項 6 7】

対象の少なくとも 1 つの脳領域において同期ガンマ振動が誘導されるように、放出体を制御して、対象を、前記放出体から生成され、周波数約 3 5 Hz ～ 約 4 5 Hz を有する非侵襲的刺激に曝露することができる、アルツハイマー病及び／又は認知症の治療のための装置。

【請求項 6 8】

前記放出体が、発光体であり、

10

20

30

40

50

前記発光体を制御して、前記対象を前記非侵襲的刺激としての光刺激に曝露することができる、請求項 6 7 に記載の装置。

【請求項 6 9】

前記放出体が、放音体であり、
前記放音体を制御して、前記対象を前記非侵襲的刺激としての音刺激に曝露することができる、請求項 6 7 に記載の装置。

【請求項 7 0】

前記放出体が、触覚装置であり、
前記触覚装置を制御して、前記対象を前記非侵襲的刺激としての触覚刺激に曝露することができる、請求項 6 7 に記載の装置。

【請求項 7 1】

1 又は 2 以上のコンピュータ実行可能な指示を実行して、前記放出体を制御することができる、請求項 6 7 に記載の装置。

【請求項 7 2】

前記装置が、
信号を生成する信号生成器；及び
前記信号生成器に結合され、前記信号生成器により生成された前記信号に基づき、対象に刺激を非侵襲的に投与して、前記対象の少なくとも 1 つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する、放出体
を含む、請求項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

政府支援に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた認可番号 R F 1 A G 0 4 7 6 6 1 の下、政府支援を受けてなされた。政府は本発明に所定の権利を有する。

【0 0 0 2】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条 (e) の定めにより、2 0 1 5 年 1 1 月 2 4 日に出願された「System and Methods for Preventing, Mitigating, and/or Treating Dementia」と題する米国出願第 6 2 / 2 5 9 , 1 8 7 号の優先権の利益を主張する。当該出願の開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 3】

本開示は、概して、対象における認知症を予防、軽減、及び／または治療するためのシステムならびに方法に関する。より具体的には、本開示は、対象の少なくとも 1 つの脳領域において、同期ガンマ振動を誘導するためのシステム及び方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

アルツハイマー病 (A D) は、記憶力、見当識、及び論理的思考の低下を特徴とする進行性の神経変性疾患である。これは、世界における認知症の最も一般的な形であり、6 5 歳以上の約 8 人に 1 人を侵し、米国では死因の第 6 位である。この進行性の神経変性疾患の患者数は、今後 1 0 年で 4 0 % 増加すると推定される。

【0 0 0 5】

病理組織学的には、A D は、アミロイド β ($A \beta$) ペプチドを含むアミロイド斑及びタウタンパク質からなる神経原線維変化 (N F T) の蓄積を特徴とし得る。 $A \beta$ ペプチドは、3 6 ~ 4 3 アミノ酸のタンパク質であり、その正常な生理的機能はいまだ不明である。 $A \beta$ ペプチドは、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) の β セクレターゼ 1 (B A C E 1) 及び γ セクレターゼによる一連のタンパク質分解的切断によって形成される。C 末端断片 β (β -C T F) は、B A C E 1 による A P P のアミロイド形成的切断の過程で産生

10

20

30

40

50

されるAPP誘導体であり、ひいてはA β ペプチド産生の別の指標である。正常な状態では、可溶性のA β ペプチドはニューロンによって産生及び分泌され、その後、脳脊髄液（CSF）経路を介して脳から除去される。しかしながら、ADの対象では、A β ペプチドは、より高次の種に凝集し、可溶性のオリゴマーと不溶性の斑を濃度依存的に形成すると思われる。この凝集は、脳代謝の破壊、神経炎症、機能的結合の低下、シナプス及びニューロンの損失、及び／またはNFTの形成を含めた多くの神経毒性事象を引き起こす場合がある。

【0006】

A β 濃度とニューロンの活動の間の基本的関係は証明されている。第一に、APPを過剰発現するトランスジェニック（Tg）マウスから調製した器官型海馬スライスのテトロドトキシンでの処理で、ニューロンの活動が低下し、それに続いてA β レベルが低下した。その後、逆の効果、すなわち、ニューロンの活動の増加がピクロトキシンでの処理で観察された。A β ペプチド濃度及び最終的な斑沈着のインビボでの動的調節もまた、ニューロンの活動を用いて証明されている。ヒトAD患者では、神経系の画像化で、最も深刻な斑沈着が、「デフォルトモードネットワーク」として知られる最も一貫して活発な脳領域と一致し得ることが示される。

【0007】

これまでのところ、ADは治療法がなく、治療選択肢は、ADの病理学的進行を抑制せず、主に姑息的であり、及び／または複数の厄介な副作用を有する場合もある。例えば、A β ペプチド及び／またはその前駆体を標的とする予防及び／または治療戦略（例えば、A β 免疫療法ならびに β セクレターゼ及び γ セクレターゼの阻害）は、臨床試験では、ADの病変の低減において害があり、及び／または効果がないとされている。アミロイドベータワクチン（例えば、バピネオズマブ）を使用する臨床試験は、認知機能に関する効果の不足のために失敗している。ガンマセクレターゼ阻害剤（例えば、セマガセスタット）は、対象における認知障害の悪化のため、臨床試験に失敗している。アセチルコリンエステラーゼ阻害剤（例えば、ドネペジル及びリバスチグミン）ならびにN-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体アンタゴニスト（例えば、メマンチン）等の既存薬でさえ、認知機能に関する軽度の効果しか示さない。

【発明の概要】

【0008】

ADの重要な微視的病理学的特徴としては、アミロイド斑、NFT、及び広範囲に及ぶニューロンの欠損の存在が挙げられる。このニューロンの損傷の蓄積は、長い時間をかけて生じ、脳内の巨視的な回路の機能不全、とりわけ、記憶と集中の作業の過程でガンマパワー不足を誘導する。これらのガンマ振動（例えば、約20Hz～約100Hz、約20Hz～約80Hz、または約20Hz～約50Hz）は、主にファスト・スパイクング・パルブアルブミン（FS-PV）介在ニューロンを生じ、これにより調節される。

【0009】

一態様において、本開示は、当該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導することを含む、対象における認知症を予防、軽減、及び／または治療するための装置、方法、ならびにシステムを提供する。いくつかの実施形態では、該認知症は、AD、血管性認知症、前頭側頭認知症、レビー小体認知症、及び／または加齢関連認知低下と関連する。該対象は、ヒトの場合も動物の場合もある。

【0010】

いくつかの実施形態では、該同期ガンマ振動は、周波数約20Hz～約50Hz、例えば、約40Hzを有する。該同期ガンマ振動は、細胞型特異的に誘導され得る。例えば、該振動は、FS-PV介在ニューロンの同期的活動化と調和し得る。該同期ガンマ振動は、脳領域特異的に誘導され得る。例えば、該振動は、海馬領域及び感覚野領域の少なくとも一方における同期的活動化と調和し得る。

【0011】

1つの実施形態では、対象における認知症を予防、軽減、及び／または治療するための

10

20

30

40

50

方法は、刺激放出装置を制御して刺激を放出するステップ、ならびに該対象を該刺激に曝露するステップ、及び／または該対象に該刺激を投与するステップを含み、それにより、該対象の少なくとも1つの脳領域においてインビボで同期ガンマ振動を誘導する。該刺激は、周波数約35 Hz～約45 Hz、例えば、周波数約40 Hzを有し得る。該刺激放出装置は、触覚装置、発光装置、及び／または放音装置であり得る。例えば、該発光装置は、光ファイバー装置であり得る。該刺激への該対象の曝露期間及び／または該対象への該刺激の投与期間は、約1時間でよい。該刺激への該対象の曝露及び／または該対象への該刺激の投与は、ある期間にわたって繰り返してもよい。例えば、該刺激への該対象の曝露及び／または該対象への該刺激の投与は、該期間にわたって少なくとも1日1回繰り返してよい。該期間としては、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、及び／または1か月（またはより長期間、例えば、当該対象の生涯にわたり、1日1回）を挙げることができるがこれに限定されない。

10

【0012】

一態様において、対象の少なくとも1つの脳領域においてAβペプチドのレベル（例えば、量または割合）を低減するための方法は、該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導することを含む。該Aβペプチドとしては、Aβペプチドの1つ以上のアイソフォーム（例えば、アイソフォームAβ₁₋₄₀、アイソフォームAβ₁₋₄₂、及び／またはアイソフォームAβ₁₋₄₃）、可溶性Aβペプチド、及び／または不溶性Aβペプチドを挙げることができる。

【0013】

20

いくつかの実施形態では、該同期ガンマ振動は、例えば、該対象の該少なくとも1つの脳領域においてAPPのC末端断片（CTF）及び／またはN末端断片（NTF）のレベル（例えば、量または割合）を低減することにより、該対象の該少なくとも1つの脳領域においてAβペプチドの産生を低減する。該同期ガンマ振動は、該対象の該少なくとも1つの脳領域においてBACE1及び／またはγセクレターゼによるAPPのCTF及びNTFへの切断を低減し得る。該同期ガンマ振動は、該対象の該少なくとも1つの脳領域においてエンドソームのレベル（例えば、数または割合）を低減し得る。例えば、該エンドソームは、初期エンドソーム抗原1（EEA1）及び／またはRAB5A遺伝子（Rab5）がコードするRas関連タンパク質に対して陽性であり得る。いくつかの実施形態では、該同期ガンマ振動は、該対象の該少なくとも1つの脳領域においてAβペプチドのクリアランスを促進する。該同期ガンマ振動は、該対象の該少なくとも1つの脳領域においてミクログリアによるAβペプチドの取り込みを増加させ得る。

30

【0014】

一態様における、対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導することを含む、対象の少なくとも1つの脳領域におけるミクログリア細胞のレベル（例えば、数または割合）、神経保護状態と一致するミクログリア細胞の形態学的変化、及び／または該ミクログリア細胞の活性を増加させる方法。該同期ガンマ振動は、少なくとも1つの差次的に発現される遺伝子、例えば、該対象の該少なくとも1つの脳領域においてミクログリアの活性に関与する、Nr4a1、Arc、Npas4、Cd68、B2m、Bsr2、Icam1、Lyz2、Irf7、Spp1、Csfr1、及び／またはCsfr2aを上方制御し得る。該神経保護状態と一致するミクログリア細胞の形態学的変化は、細胞体のサイズの増加及び／または過程の長さの減少を含み得る。

40

【0015】

一態様において、対象の海馬においてAβペプチドのレベル（例えば、量または割合）を低減するための方法は、該海馬において光遺伝学的にFS-PV介在ニューロンを、複数の光パルスで刺激すること含み、該FS-PV介在ニューロンは、光遺伝学的アクチュエータを発現し、それにより、該海馬におけるAβペプチドのレベルを低減する興奮性ニューロン（例えば、FS-PV介在ニューロン）における局所電場電位によって測定されるインビボ同期ガンマ振動に同調する。該光パルスは、パルス周波数約40パルス／秒を有し得る。各光パルスは、持続時間約1ミリ秒を有し得る。少なくとも1つの光パルスは

50

、波長約 473 nm を有し得る。該光遺伝学的アクチュエータは、チャンネルロドプシン、ハロロドプシン、及び／またはアーキロドプシンを含み得る。例えば、該光遺伝学的アクチュエータは、チャンネルロドプシン 2 (ChR2) であり得る。

【0016】

一態様において、対象の視覚野における可溶性及び／または不溶性 A β ペプチドのレベル（例えば、量または割合）を低減するための方法は、該対象を複数の光パルスでパルス周波数約 40 パルス／秒にて刺激することを含み、それにより、該視覚野において同期ガンマ振動をインビボで誘導し、これが該視覚野における可溶性及び／または不溶性 A β ペプチドのレベルを低減する。

【0017】

一態様において、対象の視覚野におけるタウリン酸化のレベル（例えば、量または割合）を低減するための方法は、該対象を複数の光パルスでパルス周波数約 40 パルス／秒にて刺激することを含み、それにより、該視覚野において同期ガンマ振動をインビボで誘導し、これが該視覚野におけるタウリン酸化を低減する。

【0018】

一態様において、対象の海馬及び／または聴覚野における A β ペプチドのレベル（例えば、量または割合）を低減するための方法は、該対象を複数の音波パルスでパルス周波数約 40 パルス／秒にて刺激することを含み、それにより、該海馬及び聴覚野の少なくとも一方において同期ガンマ振動をインビボで誘導し、これが該海馬及び聴覚野の少なくとも一方における A β ペプチドのレベルを低減する。

【0019】

一態様において、対象における A β ペプチド、神経炎症、及び／または認知機能のレベル（例えば、量または割合）または変化を予防、低減、及び／または治療するためのシステムは、当該対象の脳領域のインビボでの同期的活動化のための刺激放出装置、刺激パラメータ及びプロセッサの実行命令を保存するための少なくとも 1 つのメモリ、ならびに該刺激放出装置及び該少なくとも 1 つのメモリに伝達可能に接続された少なくとも 1 つのプロセッサを具備する。該プロセッサの実行命令の実行時、該少なくとも 1 つのプロセッサは、該刺激放出装置を制御して該刺激パラメータに従う刺激を放出し、該パラメータは、当該周波数で該脳領域を同期的に活動化する周波数を含み、それにより、該対象における A β ペプチド、神経炎症、及び／または認知症が予防、低減、及び／または治療される。該周波数は、約 3.5 Hz ～ 約 4.5 Hz、例えば、約 4.0 Hz でよい。該インビボでの同期的活動化は、酵素によって調節される場合があり、及び／または特定の細胞型、例えば、免疫反応性 FS-PPV 介在ニューロンで生じる場合もある。該酵素としては、光遺伝学的活性化剤、微生物オプシン、ChR2、及び／またはベクター AAV-DIO-ChR2-EYFP を挙げることができる。

【0020】

一態様において、対象における A β ペプチド、神経炎症、及び／または認知機能のレベル（例えば、量または割合）または変化を予防、低減、及び／または治療するためのシステムは、該対象の少なくとも一方の目に対する周囲光を低減するための光閉塞装置及び／または該対象の少なくとも一方の耳に対する周囲騒音を低減するための雑音消去装置を具備する。該光閉塞装置は、該対象の視覚野及び海馬のうちの少なくとも一方のインビボでの同期的活動化のため、該少なくとも一方の目に対して、光刺激を放出するための発光ユニットを具備してもよい。該雑音消去装置は、該対象の聴覚野及び海馬のうちの少なくとも一方のインビボでの同期的活動化のため、該少なくとも一方の耳に対して、音刺激を放出するためのスピーカーユニットを具備してもよい。該システムはまた、プロセッサの実行命令を保存するための少なくとも 1 つのメモリ、ならびに該光閉塞装置及び／または該雑音消去装置ならびに該少なくとも 1 つのメモリに伝達可能に接続された少なくとも 1 つのプロセッサを具備する。該プロセッサの実行命令の実行時、該少なくとも 1 つのプロセッサは、該発光ユニットが、当該周波数で視覚野及び海馬の該少なくとも一方を同期的に活動化する周波数にて該光刺激を放出するように、該光閉塞装置を制御する場合がある。

10

20

30

40

50

代替的に、またはさらに、該少なくとも1つのプロセッサは、該スピーカユニットが、当該周波数で聴覚野及び海馬の少なくとも一方を同期的に活動化する周波数にて該音刺激を作動させるように、該雑音消去装置を制御する場合がある。

【0021】

一態様において、対象における認知機能を改善するための方法は、少なくとも1つの電気音響変換器を制御し、電気的音声信号を対応する音刺激に変換することを含む。いくつかの実施形態では、該音刺激としては、クリック頻度約35クリック/秒～約45クリック/秒のクリック・トレインが挙げられる。該方法はさらに、該対象を該音刺激に曝露し、及び/または該対象に対して該刺激を投与し、該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導することを含み、該同期ガンマ振動が、該対象における認知機能の改善をもたらす。該認知機能としては、認識、識別、及び/または空間記憶を挙げることができる。

10

【0022】

一態様において、対象におけるAβペプチド、神経炎症、及び/または認知機能のレベル（例えば、量または割合）または変化を予防、低減、及び/または治療するための方法は、少なくとも1つの電気音響変換器を制御し、電気的音声信号を、対応する音刺激、すなわち、クリック頻度約35クリック/秒～約45クリック/秒のクリック・トレイン等の音刺激に変換すること、ならびに該対象を該音刺激に曝露し、及び/または該対象に対して該刺激を投与し、該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導することを含み、該同期ガンマ振動が、該対象におけるAβペプチド、神経炎症、及び/または認知症のレベルの予防、低減、及び/または治療をもたらす。

20

【0023】

該Aβペプチドとしては、Aβペプチドの1つ以上のアイソフォーム（例えば、アイソフォームAβ₁₋₄₀、アイソフォームAβ₁₋₄₂、及び/またはアイソフォームAβ₁₋₄₃）、可溶性Aβペプチド、及び/または不溶性Aβペプチドを挙げることができる。該同期ガンマ振動は、当該対象の少なくとも1つの脳領域におけるミクログリア細胞の数を増加させること、及び/または、該少なくとも1つの脳領域における該ミクログリア細胞によるAβペプチドの取り込みを増加させることによって、該対象におけるAβペプチド、神経炎症、及び/または認知症のレベルを予防、低減、及び/または治療し得る。該少なくとも1つの脳領域としては、聴覚野及び/または海馬を挙げることができる。

30

【0024】

該クリック頻度は、約40クリック/秒でよい。該クリック・トレインの各クリックは、持続時間約1ミリ秒を有し得る。該クリック・トレインの各クリックは、周波数約10Hz～約100kHz、約12Hz～約28kHz、約20Hz～約20kHz、及び/または約2kHz～約5kHzを有し得る。該クリック・トレインの各クリックは、音圧レベル約0dB～約85dB、約30dB～約70dB、及び約60dB～約65dBを有し得る。

【0025】

該少なくとも1つの電気音響変換器としては、少なくとも1つのヘッドホンを挙げることができ、この場合、該方法は、当該対象の少なくとも一方の耳の周囲に、耳の上に、及び/または耳の中に該少なくとも1つのヘッドホンを使用し、該対象の該少なくとも一方の耳に音刺激を向けることを含み得る。該方法としてはまた、受動的雑音遮断及び/または能動的雑音消去を用いた周囲騒音の低減を挙げることができる。

40

【0026】

一態様において、対象におけるAβペプチド、神経炎症、及び/または認知機能のレベル（例えば、量または割合）または変化を予防、低減、及び/または治療するためのシステムは、電気的音声信号を、対応する音刺激、すなわち、クリック頻度約35クリック/秒～約45クリック/秒のクリック・トレイン等の音刺激に変換するための少なくとも1つの電気音響変換器、該電気的音声信号及びプロセッサの実行命令を保存するための少なくとも1つの記憶装置、ならびに該少なくとも1つの電気音響変換器及び該少なくとも1

50

つの記憶装置に伝達可能に接続された少なくとも1つのプロセッサを具備する。該プロセッサの実行命令の実行時、該少なくとも1つのプロセッサは、該電気音響変換器を制御し、該対象の少なくとも一方の耳に音刺激を出力し、該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導し、該同期ガンマ振動が、該対象におけるAβペプチド、神経炎症、及び／または認知症のレベルの予防、低減、及び／または治療をもたらす。

【0027】

該システムは、固定式でも携帯式でもよい。該少なくとも1つの電気音響変換器が、当該対象の少なくとも一方の耳の周囲に、耳の上に、及び／または耳の中に着用するための該少なくとも1つのヘッドホンを具備し、該対象の該少なくとも一方の耳に音刺激を向け、かつ周囲騒音を低減する場合、該システムは、さらに、該電氣的音声信号を該少なくとも1つのヘッドホンに伝達するためのヘッドホンインタフェースを具備してもよい。代替的に、またはさらに、該システムは、該音刺激の出力の前、最中、及び／または後に、該対象の該少なくとも1つの脳領域の機能を監視する神経画像装置を具備してもよい。

【0028】

一態様において、対象における認知症を予防、軽減、及び／または治療するための方法は、該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する装置を提供することを含む。

【0029】

一態様において、対象におけるストレス反応に関与する糖質コルチコイドの血中レベル（例えば、量）を維持及び／または低減するための方法は、該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する装置を提供することを含む。

【0030】

一態様において、対象における不安を予防及び／または低減するための方法は、該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する装置を提供することを含む。

【0031】

一態様において、記憶の連合を維持及び／または強化するための方法は、当該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する装置を提供することを含む。該記憶の連合は、空間記憶に基づきうる。

【0032】

一態様において、認識の柔軟性を維持及び／または強化するための方法は、当該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する装置を提供することを含む。

【0033】

一態様において、対象の少なくとも1つの脳領域において、生体構造及び／または形態に関する変化を維持及び／または低減するための方法は、該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する装置を提供することを含む。該生体構造及び／または形態としては、脳重量、側脳室サイズ、皮層の厚さ、ニューロン層の厚さ、及び／または血管径を挙げることができる。該少なくとも1つの脳領域としては、該対象の視覚野、体性感覚皮質、及び／または島皮質を挙げることができる。

【0034】

一態様において、対象の少なくとも1つの脳領域において、ニューロンの数、該ニューロンのDNAの質、及び／またはシナプス点密度に関する変化を維持及び／または低減するための方法は、該対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する装置を提供することを含む。該少なくとも1つの脳領域としては、該対象の視覚野、体性感覚皮質、島皮質、及び／または海馬を挙げることができる。

【0035】

一態様において、対象の少なくとも1つの脳領域において同期ガンマ振動を誘導する装置は、該対象における認知症及び／または不安を予防、軽減、及び／または治療すること、該対象の記憶の連合及び／または認識の柔軟性を維持及び／または強化すること、及び／または該対象の少なくとも1つの脳領域において生体構造、形態、細胞、及び分子に関する変化を維持及び／または低減することができる。

【0036】

前述の概念及び以下により詳細に論じられるさらなる概念のすべての組合せ（ただし、かかる概念が互いに矛盾しないことを条件とする）は、本明細書に開示の本発明の主題の一部であるとして企図されることを理解されたい。特に、本開示の最後に現れる請求項に記載の主題のすべての組合せは、本明細書に開示の本発明の主題の一部であるとして企図される。また、参照により組み込まれる任意の開示にも同様に現れる場合がある本明細書で明示的に使用される用語は、本明細書に開示の特定の概念と最も一致する意味を与えられるべきであることも理解されたい。

【0037】

他のシステム、過程、及び特徴は、以下の図面及び詳細な説明を検討することにより、当業者には明らかになるであろう。すべてのかかる追加のシステム、過程、及び特徴は、本説明に含まれ、本発明の範囲内であり、添付の特許請求の範囲によって保護されることが意図される。

【0038】

当業者には、図面は主に説明のためのものであり、本明細書に記載の本発明の主題の範囲を限定するものではないことが理解されよう。図面は必ずしも縮尺通りではなく、いくつかの例では、本明細書に開示の本発明の主題の様々な態様は、異なる特徴の理解を容易にするために、図面に誇張されて示される場合、または拡大されて示される場合がある。図面において、同類の参照符号は、概して、例えば、同類の特徴（例えば、機能的に同類及び/または構造的に同類の要素）を参照する。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】いくつかの実施形態に従って、球状トレッドミル上の仮想直線迷路を走るマウスを示す概略図である。

【図2】図2A及び2Bは、いくつかの実施形態に従って、海馬CA1から記録された、シータ振動及び鋭波リップル（SWR）を示す電気トレースである。

【図3】図3A及び3Bは、いくつかの実施形態に従って、3か月齢のTg 5XFAD及び野生型（WT）マウスのシータ周期中の正規化されたパワースペクトルならびに正規化されたパワースペクトル密度の平均及び標準偏差を示すプロットである。

【図4】図4A及び4Bは、いくつかの実施形態に従って、WTマウス及び5XFADマウスのSWRを示すスペクトログラムである。

【図5】図5A～5Cは、いくつかの実施形態に従って、SWR中の瞬時ガンマ周波数の分布を示すプロットである。

【図6】図6Aは、いくつかの実施形態に従って、5XFAD及びWTマウスにおけるSWRのピークからの時間の関数としてZスコアのガンマパワーを示す一連のグラフである。図6Bは、いくつかの実施形態に従って、5XFAD及びWTマウスにおけるSWR中のガンマパワーの累積分布を示すプロットである。図6C及び6Dは、いくつかの実施形態に従って、WT及び5XFADマウスのSWRのピークを中心にして100ミリ秒の間のZスコアのガンマパワーの累積分布を示すプロットである。図6Eは、いくつかの実施形態に従って、5XFAD及びWTマウスにおける大きなSWR中のガンマパワーの累積分布を示すプロットである。

【図7】いくつかの実施形態に従うSWR中、図7Aは、ガンマ振動位相の関数としてのスパイクの割合を示すプロットであり、図7Bは、スパイキングの変調の深さを示すプロットである。図7C及び7Dは、いくつかの実施形態に従って、ガンマ振動位相の関数としてのSWR中の海馬CA1におけるスパイクの割合を示すプロットである。いくつかの実施形態に従う大きなSWR中、図7Eは、ガンマ振動位相の関数としてのスパイクの割合を示すプロットであり、図7Fは、スパイキングの変調の深さを示すプロットである。

【図8】図8A及び8Bは、いくつかの実施形態に従って、5XFAD及びWT動物で、各動物及び合わせたすべての動物に関する非シータ周期当たりのSWR率を示すプロットである。

10

20

30

40

50

【図 9】いくつかの実施形態に従って、対象の脳における特定の細胞型の活性化を調節するためのウイルスベクターを示す概略図である。

【図 10】図 10 A 及び 10 B は、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬の CA1 領域に対する信号送出を示す概略図である。

【図 11】いくつかの実施形態に従って、ChR2 及び DAPI を有する対象における神経組織の免疫染色を示す免疫蛍光画像である。

【図 12】図 12 A は、いくつかの実施形態に従って、PV+ 介在ニューロンで発現された ChR2-EYFP を示す免疫蛍光画像である。図 12 B は、いくつかの実施形態に従って、抗 EYFP 及び抗 PV 抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。

【図 13】図 13 A 及び 13 B は、いくつかの実施形態に従って、FS-PV 介在ニューロンの試験の概略図、局所電場電位の電気トレース、及びパワースペクトル密度を含む。

10

【図 14】図 14 A 及び 14 B は、いくつかの実施形態に従って、1 ミリ秒のレーザーパルス開始後の生の電気トレース、光遺伝学的刺激後のスパイクに対してフィルターをかけた後のトレース、及びスパイクの確率のプロットを含む。

【図 15】図 15 A は、いくつかの実施形態に従って、40 Hz の刺激周期とランダム刺激周期の間の発火率の差を示すヒストグラムである。図 15 B は、いくつかの実施形態に従って、各動物について、40 Hz の刺激、ランダム刺激、及び無刺激周期当たりのマルチユニット発火率を示す棒グラフである。

【図 16】図 16 A は、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬の CA1 領域における特定の細胞型の刺激の周波数特異的な増加の過程での対象の海馬から記録した電気トレースである。図 16 B は、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬の CA1 領域における特定の細胞型の刺激における局所電場電位パワーの周波数特異的な増加を示すパワースペクトル密度のプロットである。

20

【図 17】図 17 A 及び 17 B は、いくつかの実施形態に従って、一元配置分散分析による 5XFAD/PV-Cre CA1 の相対的 A β ₁₋₄₀ 及び A β ₁₋₄₂ レベルを示す棒グラフである。

【図 18】図 18 A 及び 18 B は、いくつかの実施形態に従って、一元配置分散分析による 5XFAD/ α CamKII-Cre CA1 の相対的 A β ₁₋₄₀ 及び A β ₁₋₄₂ レベルを示す棒グラフである。

【図 19】図 19 A は、いくつかの実施形態に従って、海馬 CA1 領域における抗 A β 及び抗 EEA1 抗体による免疫組織化学を示す一連の画像である。図 19 B は、いくつかの実施形態に従って、EYFP に対して正規化された A β の相対的免疫反応性を示す一連の棒グラフである。

30

【図 20】図 20 A は、いくつかの実施形態に従って、5XFAD/PV-Cre の海馬 CA1 領域における抗 A β 抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。図 20 B は、いくつかの実施形態に従って、EYFP に正規化された A β の相対的免疫反応性を示す棒グラフである。

【図 21】図 21 A は、いくつかの実施形態に従って、CA1 における APP (CT695)、APP NTF (A8967)、APP CTF (CT695)、及び β アクチン (A5316) (負荷対照) のレベルを示す代表的なウェスタンブロットである。図 21 B は、いくつかの実施形態に従って、EYFP 及びランダム条件に対する 40 Hz における APP CTF の相対的 (アクチンに対して正規化) 免疫反応性を示す棒グラフである。図 21 C は、いくつかの実施形態に従って、CA1 における完全長 APP 2106 (CT695)、APP CTF 2108 (CT695)、及び β アクチン 2112 (A5316、負荷対照) のレベルを示す一連のウェスタンブロットである。

40

【図 22】図 22 A は、いくつかの実施形態に従って、EYFP 及びランダム条件に対する 40 Hz における APP NTF の相対的 (アクチンに対して正規化) 免疫反応性を示す棒グラフである。図 22 B は、いくつかの実施形態に従って、EYFP、ランダム、及び 40 Hz 条件における完全長 APP の相対的 (アクチンに対して正規化) 免疫反応性を示す棒グラフである。

50

【図23】いくつかの実施形態に従って、抗Rab5 (ADI-KAp-GP006-E) による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。

【図24】いくつかの実施形態に従うEYFP、40Hz、及びランダム刺激条件下、図24Aは、EYFPに対して正規化されたEEA1の相対的免疫反応性を表す棒グラフであり、図24Bは、5XFAD/PV-CreからのCA1の相対的Rab5強度レベルを示す棒グラフである。

【図25】図25Aは、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬のCA1領域の異なる型の刺激後のAβペプチドアイソフォームAβ₁₋₄₀のレベルを示す棒グラフである。図25Bは、いくつかの実施形態に従って、ガンマ振動での対象の海馬のCA1領域における特定の細胞型の刺激後のAβペプチドアイソフォームAβ₁₋₄₂の減少を示す棒グラフである。図25Cは、いくつかの実施形態に従って、ガンマ振動での対象の海馬のCA1領域における特定の細胞型の刺激後のCTF (例えば、β-CTF) のレベルの減少及び完全長APP (アクチンに対して正規化) のレベルの増加を示す一連の画像である。

【図26】図26A~26Bは、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬のCA1領域の異なる型の刺激後のエンドソームレベル (EEA1レベルに基づく) を示す免疫蛍光画像である。

【図27】いくつかの実施形態に従って、対象の海馬のCA1領域の異なる型の刺激後の図6A~6Bの免疫蛍光画像に対する平均強度値 (FADに対して正規化) を示す棒グラフである。

【図28】いくつかの実施形態に従って、40Hzの刺激の有無でのマウス海馬CA1領域の全トランスクリプトームリボ核酸シーケンシング (RNA-seq) によって決定された差次的に発現される遺伝子を示すヒートマップである。

【図29】いくつかの実施形態に従って、EYFP及び40Hz条件における上方ならびに下方制御された遺伝子のFPKM値を示す箱ひげ図である。

【図30】いくつかの実施形態に従って、40Hzの刺激後の特定された上方制御された遺伝子の細胞型特異的発現パターンを示す円グラフである。

【図31】いくつかの実施形態に従って、RNA-seqデータセットにおける特定の遺伝子標的のRT-qPCR検証を示す棒グラフである。

【図32】図32A及び32Bは、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅を見せながら脳の上で再コード化された局所電場電位のパワースペクトル密度を示すプロットである。

【図33】いくつかの実施形態に従って、RNA-seqデータセットにおける特定の遺伝子標的のRT-qPCR検証を示す棒グラフである。

【図34】いくつかの実施形態に従って、EYFP、40Hz、及びランダム刺激条件における5XFAD/PV-Creマウスの海馬CA1領域での抗Iba1 (019-19741) 及び抗Aβ (12F4) 抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。

【図35】図35Aは、いくつかの実施形態に従って、EYFP及び40Hz条件でのミクログリアの数を示す棒グラフである。図35Bは、いくつかの実施形態に従って、EYFP、40Hz、及びランダム刺激条件におけるEYFPに対して正規化されたミクログリア細胞体の直径を示す棒グラフである。図35Cは、いくつかの実施形態に従って、EYFP、40Hz、及びランダム刺激条件におけるEYFPに対して正規化されたミクログリアの一次過程の平均長さを示す棒グラフである。図35Dは、いくつかの実施形態に従って、EYFP及び40Hzの刺激条件におけるAβ陽性でもあるIba1陽性 (ミクログリア) 細胞体の割合を示す棒グラフである。

【図36】いくつかの実施形態に従って、図34の免疫蛍光画像を統合して形成された一連の3Dレンダリングである。

【図37】図37Aは、いくつかの実施形態に従って、5XFAD/PV-Creの海馬CA1領域におけるHoechstによる免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。図37Bは、いくつかの実施形態に従って、EYFP及び40Hzの刺激条件における

10

20

30

40

50

5 X F A D / P V - C r e の推定される C A 1 厚さを示す棒グラフである。

【図 3 8】図 3 8 A は、いくつかの実施形態に従って、4 0 H z の F S - P V + 刺激または対照の刺激時の海馬 C A 1 のゲノムワイド R N A - s e q によって決定された差次的に発現される遺伝子 (D E G) を示すヒートマップである。図 3 8 B は、いくつかの実施形態に従って、図 3 8 A の処理条件において上方制御された D E G 間の重なりを示す図である。

【図 3 9】いくつかの実施形態に従って、図 3 8 A の R N A - s e q データセットにおける特定の遺伝子標的の R T - q P C R 検証を示す棒グラフである。

【図 4 0】いくつかの実施形態に従って、図 3 8 A の上方制御された遺伝子が関連する生物学的過程を示すプロットである。

10

【図 4 1】いくつかの実施形態に従って、図 3 8 A の下方制御された遺伝子が関連する生物学的過程を示すプロットである。

【図 4 2】図 4 2 A は、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬の C A 1 領域の異なる型の刺激後の I b a 1 のレベルを示す一連の免疫蛍光画像である。図 4 2 B は、いくつかの実施形態に従って、図 4 2 A の免疫蛍光画像に対する平均強度値を示す棒グラフである。

【図 4 3】図 4 3 A は、いくつかの実施形態に従って、光の点滅刺激に曝露されたマウスを示す概略図である。図 4 3 B は、いくつかの実施形態に従って、4 0 H z の光の点滅の前及び最中の視覚野における局所電場電位トレースならびにパワースペクトル密度のプロットを含む。図 4 3 C ~ 4 3 F は、いくつかの実施形態に従って、視覚野における局所電場電位のパワースペクトル密度を示すプロットである。

20

【図 4 4】図 4 4 A は、いくつかの実施形態に従って、4 サイクルの 4 0 H z の光の点滅に関する時間の関数及びランダムな光の点滅に関する同等の期間の関数としての視覚野におけるスパイクの割合を示す一連のヒストグラムである。図 4 4 B は、いくつかの実施形態に従って、光の点滅を見ている間の脳の上で記録された局所電場電位の一連の電気トレースである。

【図 4 5】図 4 5 A は、いくつかの実施形態に従って、4 0 H z の光の点滅及びランダムな光の点滅の間の発火率の差を示すヒストグラムである。図 4 5 B は、いくつかの実施形態に従って、視覚野におけるマルチユニット発火率を示すプロットである。

【図 4 6】図 4 6 A は、いくつかの実施形態に従って、実験的パラダイムを示す概略図である。図 4 6 B ~ 4 6 C は、いくつかの実施形態に従って、図 4 6 A の実験的パラダイム後、それぞれ、A β ペプチドアイソフォーム A β ₁₋₄₀ 及び A β ₁₋₄₂ のベースラインレベルの変化をさらに示すプロットである。

30

【図 4 7】図 4 7 A 及び図 4 7 B は、いくつかの実施形態に従って、5 X F A D の視覚野におけるそれぞれ、A β ₁₋₄₀ 及び A β ₁₋₄₂ のベースラインレベルの変化を示す棒グラフである。

【図 4 8】図 4 8 A は、いくつかの実施形態に従って、暗及び 4 0 H z の点滅条件下での 5 X F A D のバレル皮質における A β ₁₋₄₀ 及び A β ₁₋₄₂ のベースラインレベルの変化を示す棒グラフである。図 4 8 B は、いくつかの実施形態に従って、暗及び 4 0 H z の点滅条件下での A P P / P S 1 の視覚野における A β ₁₋₄₀ 及び A β ₁₋₄₂ のベースラインレベルの変化を示す棒グラフである。図 4 8 C は、いくつかの実施形態に従って、暗及び 4 0 H z の点滅条件下での W T の視覚野における A β ₁₋₄₀ 及び A β ₁₋₄₂ のベースラインレベルの変化を示す棒グラフである。

40

【図 4 9】いくつかの実施形態に従って、暗及び 4 0 H z の点滅条件下での 5 X F A D の視覚野における抗 I b a 1 (0 1 9 - 1 9 7 4 1) 及び抗 A β (1 2 F 4) 抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。

【図 5 0】図 5 0 A は、いくつかの実施形態に従って、I b a 1 陽性細胞 (ミクログリア) の数を示す棒グラフである。図 5 0 B は、いくつかの実施形態に従って、暗及び 4 0 H z の点滅条件下での対照に対して正規化されたミクログリア細胞体の直径を示す棒グラフである。図 5 0 C は、いくつかの実施形態に従って、暗及び 4 0 H z の点滅条件下での対照に対して正規化されたミクログリアの一次過程の平均長さを示す棒グラフである。図 5

50

ODは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件下でのAβ陽性でもあるミクログリアのパーセンテージを示す棒グラフである。

【図51】いくつかの実施形態に従って、CLARITY処理された100μmの組織片からの暗及び40Hzの点滅条件下でのIba+ミクログリアの一連の3Dレンダリング（免疫蛍光画像から）である。CLARITYは、例えば、組織内で構成され、組織に結合されたアクリルアミド系ヒドロゲルを用いて脳組織を透明にする方法である。

【図52】図52Aは、いくつかの実施形態に従って、蛍光活性化細胞分類（FACS）を用いて視覚野からミクログリアを単離する方法を示す流れ図である。図52Bは、いくつかの実施形態に従って、図52Aの方法を用いて3か月齢の5XFAD及びWT対照動物の視覚野から単離されたミクログリアにおけるAβ₁₋₄₀のレベルを示す棒グラフである。

10

【図53】図53Aは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件下での3か月齢の5XFADの視覚野におけるシナプトフィジンを検出するためのSVP38抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。図53Bは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件後の5XFADの視覚野の相対的なSVP38の強度レベルを示す棒グラフである。

【図54】図54Aは、いくつかの実施形態に従って、ガンマ振動での対象の視覚野の刺激後のAβペプチドアイソフォームAβ₁₋₄₂の減少を示す棒グラフである。図54Bは、いくつかの実施形態に従って、ガンマ振動での対象の視覚野の刺激後、及びさらに刺激後24時間のAβペプチドアイソフォームAβ₁₋₄₂のレベルを示す棒グラフである。

20

【図55】図55Aは、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅の前及び最中での海馬における局所電場電位の電気トレースならびにパワースペクトル密度のプロットを含む。図55Bは、いくつかの実施形態に従って、それぞれ、4サイクルの40Hzの光の点滅に関する時間の関数及びランダムな光の点滅に関する同等の期間の関数としての海馬におけるスパイクの割合の一連のヒストグラムである。

【図56】図56Aは、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅及びランダムな光の点滅の間の発火率の差を示すヒストグラムである。図56Bは、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅の間のCA1におけるマルチユニット発火率を示すプロットである。

【図57】図57Aは、いくつかの実施形態に従って、5XFADの視覚野における相対的なAβ₁₋₄₀のレベルを示す棒グラフである。図57Bは、いくつかの実施形態に従って、5XFADの視覚野における相対的なAβ₁₋₄₂のレベルを示す棒グラフである。

30

【図58】図58Aは、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅後の回復を伴う5XFADの視覚野における相対的なAβ₁₋₄₀のレベルを示す棒グラフである。図58Bは、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅後の回復を伴う5XFADの視覚野における相対的なAβ₁₋₄₂のレベルを示す棒グラフである。

【図59】図59Aは、いくつかの実施形態に従う試験を示す概略図である。図59Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗または40Hzの点滅条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野における相対的なAβ₁₋₄₂のレベルを示す棒グラフである。図59Cは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗または40Hzの点滅条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野における相対的なAβ₁₋₄₀のレベルを示す棒グラフである。

40

【図60】図60Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗または40Hzの点滅条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野における抗Aβ抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。図60Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗または40Hzの点滅条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野におけるAβ陽性斑の沈着数を示す棒グラフである。図60Cは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗または40Hzの点滅条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野におけるAβ陽性斑の面積を示す棒グラフである。

【図61】図61Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗または40Hzの

50

点滅条件下での7日後の4か月齢のP301Sマウスにおける抗ホスホTau (S202) 及び抗MAP2抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。図61Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後のP301Sの視覚野の相対的なホスホTau (pTau) (S202) の強度レベルを示す棒グラフである。図61Cは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後のP301Sの視覚野の相対的なMAP2強度レベルを示す棒グラフである。

【図62】図62Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後の4か月齢のP301Sマウスにおける抗pTau6202 (S404) 抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。図62Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後のP301Sの視覚野の相対的な抗pTau (S400/T403/S404) の蛍光強度レベルを示す棒グラフである。

10

【図63】図63Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後の4か月齢のP301Sマウスにおける抗pTau6302 (S396) 抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。図63Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後のP301Sの視覚野の相対的なpTau (S396) の蛍光強度レベルを示す棒グラフである。

【図64】いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後の4か月齢のP301Sマウスにおける抗Iba1抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。

20

【図65】図65Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後のミクログリアの数を示す棒グラフである。図65Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後の対照に対して正規化されたミクログリア細胞体の直径を示す棒グラフである。図65Cは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40Hzの点滅条件下での7日後の対照に対して正規化されたミクログリアの一次過程の平均長さを示す棒グラフである。

【図66】いくつかの実施形態に従って、視覚のガンマ刺激の有無での対象の視覚野における可溶性及び不溶性のAβペプチドのアイソフォームAβ₁₋₄₀ならびにAβ₁₋₄₂のレベルを示すプロットである。

30

【図67】図67A～67Bは、いくつかの実施形態に従って、対象の経頭蓋ガンマ刺激の有無での全脳Aβペプチドのレベルを示すプロットである。

【図68】図68Aは、いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び/または投与が対象にストレスを引き起こすかどうかを調べるために実施した試験を示す流れ図である。図68Bは、当該対象におけるストレス反応を示すコルチコステロンのレベルを示す棒グラフである。

【図69】図69Aは、いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び/または投与が対象の不安を低減するかどうかを調べるために実施した試験を示す流れ図である。図69Bは、高架式十字迷路装置を示す画像である。図69C及び69Dは、高架式十字迷路期間中の当該対象の代表的な軌跡を示す画像である。

40

【図70】高架式十字迷路期間中、対象が壁なし走路及び壁あり走路で探索に費やした平均時間を示す棒グラフである。

【図71】図71Aは、いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び/または投与が対象のストレス及び/または不安を低減するかどうかを調べるために実施した試験を示す流れ図である。図71Bは、オープン・フィールド・アリーナを示す画像である。図71C及び図71Dは、オープン・フィールド試験中の対象の代表的な軌跡を示す画像である。

【図72】図72Aは、オープン・フィールド試験の毎分、オープン・フィールドの中心で対象が費やした平均時間を示すプロットである。図72Bは、オープン・フィールド試験中、オープン・フィールドの周辺で対象が費やした平均合計時間を示す棒グラフである。

【図73】図73A及び73Bは、いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び/または投

50

与が対象の生得新奇探索行動を変更するかどうかを調べるために実施した試験を示す概略図である。図 7 3 C は、図 7 3 A の概略図に従って、対象が第二の新奇物体と比較して第一の新奇物体を探索するのに費やした平均時間を示す棒グラフである。

【図 7 4】図 7 3 B の概略図に従って、対象が新奇物体を探索するのに費やした毎分の平均時間を示すプロットである。

【図 7 5】図 7 5 A は、いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与が対象の学習及び記憶に影響を与えるかどうかを調べるために恐怖条件付けパラダイムを用いて実施した試験を示す流れ図である。図 7 5 B は、時間の関数としての文脈の変更を伴うトーン試験を示す刺激図である。

【図 7 6】図 7 6 A 及び 7 6 B は、いくつかの実施形態に従って、対象の記憶の強化を示す棒グラフである。

10

【図 7 7】図 7 7 A は、いくつかの実施形態に従って、ガンマ曝露及び／または投与が対象の記憶を改善するかどうかを調べるために実施した試験を示す流れ図である。図 7 7 B は、目標象限に隠された台を備えた Morris 水迷路を示す図である。図 7 7 C 及び 7 7 D は、Morris 水迷路プローブ試験中の対象の代表的な軌跡を示す画像である。

【図 7 8】図 7 8 A は、各日の Morris 水迷路試験において、対象が隠された台を見つけるのに費やした平均時間を示すプロットである。図 7 8 B は、各 30 秒間に対象が目標象限内で除去された台を探すのに費やした平均時間を示すプロットである。図 7 8 C は、各 30 秒間に対象が逆の象限内で除去された台を探すのに費やした平均時間を示すプロットである。

20

【図 7 9】図 7 9 A は、第一象限に隠された台を備えた Morris 水迷路試験を示す図である。図 7 9 B は、逆転学習のため、第二象限、すなわち、第一象限の反対側に隠された台を備えた Morris 水迷路試験を示す図である。図 7 9 C は、各日の Morris 水迷路逆転学習試験において、対象が隠された台を見つけるのに費やした平均時間を示すプロットである。

【図 8 0】図 8 0 A は、いくつかの実施形態に従って、長期的なガンマ曝露及び／または投与が対象の空間学習及び記憶に影響を与えるかどうかを調べるために実施した試験を示す流れ図である。図 8 0 B は、各日の Morris 水迷路試験において、対象が隠された台を見つけるのに費やした平均時間を示すプロットである。図 8 0 C は、30 秒の試験中に対象が目標象限内で除去された台を探すのに費やした平均時間を示す棒グラフである。

30

【図 8 1】図 8 1 A は、逆転学習を含むように拡張した図 8 0 A の試験を示す流れ図である。図 8 1 B は、各日の Morris 水迷路逆転学習試験において、対象が隠された台を見つけるのに費やした平均時間を示すプロットである。

【図 8 2】図 8 2 A は、30 秒の試験中に対象が目標象限内で除去された台を探すのに費やした平均時間を示す棒グラフである。図 8 2 B は、対象が逆の象限内で除去された台を探すのに費やした平均時間を示す棒グラフである。

【図 8 3】いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与が対象の視覚野においてデオキシリボ核酸 (DNA) 損傷ならびにニューロンの損失に与える影響を調べるために実施した試験のスケジュール図である。

【図 8 4】いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与の影響を調べるために実施した試験の対象の群を示す図である。

40

【図 8 5】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる脳重量の変化を比較する棒グラフである。

【図 8 6】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる側脳室の発現比を比較する棒グラフである。

【図 8 7】図 8 7 A ～ 8 7 E は、いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群の代表的な側脳室を示す画像である。

【図 8 8】図 8 8 A ～ 8 8 C は、いくつかの実施形態に従って、目的の脳領域を示す脳解剖図である。

【図 8 9】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる V1 皮層の平

50

均厚さを示す棒グラフである。

【図 9 0】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる V 1 - N e u N 陽性細胞層の平均厚さを示す棒グラフである。

【図 9 1】図 9 1 A ~ 図 9 1 E は、いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群の代表的な H o e c h s t 標識及び／または N e u N 標識を有する細胞を示す画像である。

【図 9 2】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる S S 1 皮層の平均厚さを示す棒グラフである。

【図 9 3】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる S S 1 - N e u N 陽性細胞の平均厚さを示す棒グラフである。

10

【図 9 4】図 9 4 A ~ 9 4 E は、いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる H o e c h s t 標識及び／または N e u N 標識を有する細胞を示す画像である。

【図 9 5】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる島皮質の皮層の平均厚さを示す棒グラフである。

【図 9 6】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる島皮質の N e u N 陽性細胞層の平均厚さを示す棒グラフである。

【図 9 7】図 9 7 A ~ 9 7 E は、いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群の代表的な H o e c h s t 標識及び／または N e u N 標識を有する細胞を示す画像である。

【図 9 8】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる視覚野の N e u N 陽性細胞の量を比較する棒グラフである。

20

【図 9 9】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる視覚野の γ H 2 A X 陽性細胞の量を比較する棒グラフである。

【図 1 0 0】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群の代表的な視覚野の試料を示す一連の画像である。

【図 1 0 1】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる体性感覚皮質の N e u N 陽性細胞の量を比較する棒グラフである。

【図 1 0 2】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる体性感覚皮質の γ H 2 A X 陽性細胞の量を比較する棒グラフである。

【図 1 0 3】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群の代表的な体性感覚皮質の試料を示す一連の画像である。

30

【図 1 0 4】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる島皮質の N e u N 陽性細胞層の量を比較する棒グラフである。

【図 1 0 5】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる島皮質の γ H 2 A X 陽性細胞層の量を比較する棒グラフである。

【図 1 0 6】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群の代表的な島皮質の試料を示す一連の画像である。

【図 1 0 7】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる海馬の N e u N 陽性細胞の量を比較する棒グラフである。

【図 1 0 8】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる海馬の γ H 2 A X 陽性細胞の量を比較する棒グラフである。

40

【図 1 0 9】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群の代表的な海馬の試料を示す一連の画像である。

【図 1 1 0】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる視覚野の点密度を比較する棒グラフである。

【図 1 1 1】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる体性感覚皮質の点密度を比較する棒グラフである。

【図 1 1 2】いくつかの実施形態に従って、図 8 4 における対象の群にわたる島皮質の点密度を比較する棒グラフである。

【図 1 1 3】図 1 1 3 A ~ 1 1 3 D は、いくつかの実施形態に従って、代表的な試料における H o e c h s t 染色、V G l u T 1 マーカー、及び／または G A D 6 5 マーカーを示

50

す画像である。図 1 1 3 E 及び 1 1 3 F は、いくつかの実施形態に従って、点の定量化方法を示す画像である。

【図 1 1 4】いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激を示す刺激図である。

【図 1 1 5】いくつかの実施形態に従う聴覚のガンマ曝露及び／または投与が対象の聴覚野においてミクログリアの活性化を誘導するかどうかを調べるために実施した試験を示す流れ図である。

【図 1 1 6】図 1 1 6 A は、いくつかの実施形態に従って、対象の聴覚野における平均ミクログリア数を示す棒グラフである。図 1 1 6 B は、いくつかの実施形態に従って、対象の聴覚野におけるミクログリアの突起の長さの比を示す棒グラフである。

【図 1 1 7】図 1 1 7 A 及び 1 1 7 B は、いくつかの実施形態に従って、対象の聴覚野におけるミクログリアの代表的な画像である。

【図 1 1 8】図 1 1 8 A 及び 1 1 8 B は、いくつかの実施形態に従って、図 1 1 7 A 及び 1 1 7 B からのミクログリアの突起の長さの拡大画像である。

【図 1 1 9】図 1 1 9 A 及び 1 1 9 B は、いくつかの実施形態に従って、図 1 1 7 A 及び 1 1 7 B からのミクログリアの細胞サイズの拡大画像である。

【図 1 2 0】図 1 2 0 A は、いくつかの実施形態に従って、対象の聴覚野における画像フィールド当たりの平均ミクログリア数を示す棒グラフである。図 1 2 0 B は、いくつかの実施形態に従って、対象の聴覚野におけるミクログリアの細胞サイズの平均比を示す棒グラフである。

【図 1 2 1】図 1 2 1 A 及び 1 2 1 B は、いくつかの実施形態に従って、対象の聴覚野におけるミクログリアの代表的な画像である。

【図 1 2 2】図 1 2 2 A ～ 1 2 2 D は、いくつかの実施形態に従って、対象の聴覚野及び海馬における可溶性 A β アイソフォーム A β ₁₋₄₀ ならびに A β ₁₋₄₂ のレベルを示す棒グラフである。

【図 1 2 3】図 1 2 3 A ～ 1 2 3 D は、いくつかの実施形態に従って、対象の聴覚野及び海馬における不溶性 A β アイソフォーム A β ₁₋₄₀ ならびに A β ₁₋₄₂ のレベルを示す棒グラフである。

【図 1 2 4】図 1 2 4 A ～ 1 2 4 D は、いくつかの実施形態に従って、対象の聴覚野におけるミクログリアの代表的な画像である。

【図 1 2 5】図 1 2 5 A は、新奇物体認識試験を示す流れ図である。図 1 2 5 B は、いくつかの実施形態に従って、記憶の改善を示す棒グラフである。

【図 1 2 6】図 1 2 6 A は、新奇位置認識試験を示す流れ図である。図 1 2 6 B は、いくつかの実施形態に従って、記憶及び／または識別の改善を示す棒グラフである。

【図 1 2 7】図 1 2 7 A は、各日の Morris 水迷路試験において、対象が隠された台を見つけるのに費やした平均時間を示すプロットである。図 1 2 7 B は、プローブ試験中に対象が目標象限内で除去された台を探すのに費やした平均時間を示す棒グラフである。

【図 1 2 8】図 1 2 8 A は、いくつかの実施形態に従って、視覚野における拡大した脈管構造を示す一連の代表的な免疫蛍光画像である。図 1 2 8 B は、いくつかの実施形態に従って、視覚野における血管径を示し、かつガンマ曝露後の血管径の増大を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0040】

詳細な説明

一態様において、本開示は、対象における脳障害または認知機能障害／認知障害を予防、軽減、及び／または治療するための方法、装置、ならびにシステムを提供する。いくつかの実施形態では、該脳障害は認知症である。

【0041】

認知機能は、ニューラルネットワーク活動における、特にガンマ周波数の振動の正確なタイミング、すなわち、集中と作業記憶に関係しているリズム（例えば、約 20 Hz ～ 約 100 Hz、約 20 Hz ～ 約 80 Hz、または約 20 Hz ～ 約 50 Hz）に大いに依存し

10

20

30

40

50

ている。これらの振動はシナプス活動から生じるため、それらはニューロンの分子特性と高レベルの首尾一貫した脳活動の間の直接的なつながりを提供する。重要なことには、ガンマ振動活性は、ADにおける分子神経病理によって損なわれた神経回路で中断され、当該疾患における記憶障害の主な決定要因を象徴し得る。病理と脳の振動の障害との間に因果関係があるかどうかはまだ確定していない。しかしながら、脳のリズムを操縦することは、AD等の認知症の治療に対する複数標的療法として働くことができ、かつ、これは非侵襲的治療によって達成することができる。

【0042】

一態様において、本開示は、ガンマ振動を増強するための、または誘導するための装置、方法、及びシステムを提供する。いくつかの実施形態では、ガンマ振動の該増強または誘導は、光遺伝的方法による。他の実施形態では、ガンマ振動の該増強または誘導は、行動的方法による。本開示は、光遺伝学的、行動的、もしくは他の方法によるガンマ振動の該増強及び／または誘導が、ADの病変を低減すると定めている。

【0043】

一態様において、本開示は、認知症を有する対象におけるガンマ振動リズムの回復または誘導のための装置、システム、及び方法を提供する。いくつかの実施形態では、該認知症は、AD、血管性認知症、前頭側頭認知症（FTD）、及び／またはレビー小体認知症である。従って、いくつかの実施形態では、本開示は、認知症を治療するための装置、システム、及び方法を提供する。

【0044】

本明細書で使用される、「treatment（治療）」または「treating（治療）」という用語は、治療的な治療及びprophylactic（予防的）もしくはpreventive（予防的）措置の両方を指す。いくつかの実施形態では、治療を必要とする対象には、当該疾患もしくは状態をすでに有する対象だけでなく、当該疾患もしくは状態を発症し得る対象であり、目的が該疾患もしくは状態を予防、遅延、または減少させることである該対象が含まれる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に開示の装置、方法、及びシステムは、当該対象が遺伝的にかかりやすい疾患もしくは状態、例えばADを予防、遅延、または軽減するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の装置、方法、及びシステムは、当該対象がすでに診断されている疾患もしくは状態、例えば、ADの症状を治療、軽減、低減、及び／またはその進行を遅延するために使用され得る。

【0045】

本明細書で使用される、「対象」という用語は、哺乳類、例えば、げっ歯類、ネコ、イヌ、または霊長類を意味する。好ましくは、本発明の対象はヒトである。

【0046】

本明細書で使用される、「約」という用語は、「約」が修飾するもののプラスマイナス10パーセントを指す。

【0047】

認知症は、知的能力の損失及び／または記憶障害を特徴とする疾患である。認知症としては、例えば、AD、血管性認知症、レビー小体認知症、ピック病、前頭側頭認知症（FTD）、エイズによる認知症、加齢関連認知機能障害、及び加齢関連記憶障害が挙げられる。認知症はまた、神経学的及び／または精神状態、例えば、脳腫瘍、脳障害、てんかん、多発性硬化症、ダウン症候群、レット症候群、進行性核上まひ、前頭葉症候群、統合失調症、及び外傷性脳損傷とも関連している場合がある。

【0048】

ADは、先進国において最も頻度の高い神経変性疾患である。ADは、A β ペプチドからなるアミロイド斑及びタウタンパク質からなるNFTの蓄積を特徴とし得る。臨床的に、ADは、記憶、機能、言語能力、判断、及び実行機能の損失を特徴とする進行性認知障害と関連している。ADは、多くの場合、その後期に深刻な行動上の症状をもたらす。

【0049】

血管性認知症は、脳血管性認知症とも呼ばれる場合があり、概して改善期間及び段階的悪化を伴う変動する経過を有する脳血管障害（例えば、大脳半球の梗塞）を指す。血管性認知症は、見当識障害、記憶障害、及び／または判断力の低下の1つ以上の症状を含む場合がある。血管性認知症は、別々の複数の梗塞によって引き起こされる可能性も、他の血管要因、例えば、自己免疫性血管炎、例えば、全身性エリテマトーデスに見られるもの、感染性血管炎、例えば、ライム病、再発性脳内出血、及び／または脳卒中等によって引き起こされる可能性もある。

【0050】

前頭側頭認知症（FTD）は、進行性の神経変性障害である。FTDの対象は、一般に顕著な行動変化及び人格変化を示し、多くの場合言語機能障害を伴う。

10

【0051】

レビー小体認知症は、ADのものと重複する特徴を有する認知症発現、パーキンソン病の特徴の発現、及び／または幻覚の早期発現の1つ以上の症状を特徴とする。レビー小体認知症は、一般に症状の重症度の日々の変動を特徴とする。

【0052】

いくつかの態様において、本開示は、当該対象の脳において同期ガンマ振動を誘導することを含む、対象における認知症を予防、軽減、及び／または治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、神経疾患もしくは障害または加齢に伴う低下を抱える対象におけるガンマ振動の誘導は、該疾患もしくは障害または加齢に伴う低下の結果として、またはそれに関連して該対象において破壊されたガンマ振動リズムを回復するように作用する。

20

【0053】

いくつかの実施形態では、ガンマ振動の誘導は、アイソフォーム $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ の産生を低減する。いくつかの実施形態では、ガンマ振動の誘導は、対象の脳からの $A\beta$ （例えば、アイソフォーム $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ ）のクリアランスを高める。いくつかの実施形態では、ガンマ振動の誘導は、対象の脳において $A\beta$ の蓄積を防止する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する方法は、対象の脳における $A\beta$ のレベルを、治療前の該対象の脳における $A\beta$ のレベルと比較して、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、またはそれ以上低減する。いくつかの実施形態では、対象の脳における $A\beta$ のレベルは、治療前の該対象の脳における $A\beta$ のレベルと比較して、少なくとも約50%低減される。

30

【0054】

いくつかの実施形態では、対象の脳における $A\beta$ のレベルは、該対象の脳におけるAPPの切断の減少によって低減される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する方法は、対象の脳におけるAPPの切断を、治療前の該対象の脳におけるAPP切断のレベルと比較して、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、またはそれ以上低減する。いくつかの実施形態では、対象の脳におけるAPP切断のレベルは、治療前の該対象の脳におけるAPP切断のレベルと比較して、少なくとも約50%低減される。いくつかの実施形態では、APP切断のレベルは、対象の脳におけるC末端断片 β （ β -CTF）のレベルによって測定される。いくつかの実施形態では、脳におけるAPP切断のレベルは、 β 及び／または γ セクレターゼの阻害によって、例えば、 β 及び／または γ セクレターゼ活性の阻害のレベルを増大させることによって低減される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する方法は、対象の脳における $A\beta$ 斑の凝集を低減する。

40

【0055】

いくつかの実施形態では、該方法は、対象における認知能力及び／または記憶を改善する。

【0056】

別の態様において、本開示は、当該対象の脳において同期ガンマ振動を誘導することを含む、対象の脳における神経保護プロファイルまたは神経保護環境を誘導するための方法

50

を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、該神経保護プロファイルは、神経保護ミクログリア細胞プロファイルと関連している。さらなる実施形態では、該神経保護プロファイルは、M-C-S-F経路の活性の増加によって誘導されるか、または、これと関連している。いくつかの実施形態では、該神経保護環境は、抗炎症シグナル伝達経路と関連している。例えば、いくつかの実施形態では、該抗炎症シグナル伝達経路は、抗炎症ミクログリアシグナル伝達経路である。

【0057】

いくつかの実施形態では、該神経保護プロファイルは、炎症性グリア細胞活性の減少または不足と関連している。炎症性グリア細胞活性は、ミクログリアのM1表現型と関連し、酸素の反応種(ROS)、神経分泌タンパク質クロモグラニンA、分泌補助因子シスタチンC、NADPHオキシダーゼ、一酸化窒素シンターゼ酵素、例えばiNOS、NF-κB依存性炎症応答タンパク質、ならびに炎症性サイトカイン及びケモカイン(例えば、TNF、IL-1β、IL-6、及びIFNγ)の産生を含む。

【0058】

対照的に、ミクログリアのM2表現型は、炎症の下方制御及び炎症誘発損傷の修復と関連している。抗炎症性サイトカイン及びケモカイン(IL-4、IL-3、IL-10、及び/またはTGFβ)ならびに食作用活性の増大は、M2表現型と関連している。従って、いくつかの実施形態では、本明細書に提供する方法は、ミクログリアにおける神経保護M2表現型を誘発する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する方法は、対象の脳における食作用活性を増大する。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に提供する方法は、Aβのクリアランスが増加するようにミクログリアの食作用活性を増大する。

【0059】

ガンマ振動は、約20Hz～約100Hzを含み得る。従って、いくつかの実施形態では、本開示は、当該対象の脳において、約20Hz～約100Hz、もしくは約20Hz～約80Hz、もしくは約20Hz～約50Hz、もしくは約30～約60Hz、もしくは約35Hz～約45Hz、または約40Hzのガンマ振動を誘導することを含む、対象における認知症を予防、軽減、または治療するための方法を提供する。好ましくは、該ガンマ振動は、約40Hzである。

【0060】

刺激は、少なくとも1つの脳領域においてガンマ振動を直接または最終的に誘導する、対象の内部もしくは外部環境における検出可能な変化を含み得る。例えば、刺激は、電磁放射線受容器(例えば、光受容器、赤外線受容器、及び/または紫外線受容器)、機械受容器(例えば、機械的ストレス及び/または歪)、侵害受容器(例えば、痛み)、音受容器、電気受容器(例えば、電場)、磁気受容器(例えば、磁場)、水受容器、化学受容器、温度受容器、浸透圧受容器、及び/または自己受容器(すなわち、位置感覚)を刺激するように設計され得る。受容器からの反応を誘発するために必要な感覚の絶対閾値または最小量は、刺激のタイプと対象によって異なり得る。いくつかの実施形態では、刺激は、個々の感度に基づいて適応される。

【0061】

いくつかの実施形態では、ガンマ振動は、脳領域特異的に誘導される。例えば、いくつかの実施形態では、ガンマ振動は、海馬、視覚野、バレル皮質、聴覚野、またはそれらの任意の組み合わせにおいて誘導される。一例として、いくつかの実施形態では、ガンマ振動は、閃光を用いて視覚野において誘導され、他の実施形態では、ガンマ振動は、特定の周波数の聴覚刺激を用いて聴覚野において誘導される。いくつかの実施形態では、ガンマ振動は、視覚、聴覚、及び/または他の刺激の組合せを用いて複数の脳領域で同時に誘導される。いくつかの実施形態では、ガンマ振動は、仮想現実システムで誘導される。

【0062】

いくつかの実施形態では、対象は、ガンマ振動を誘導するように構成された環境、例えば、無関係の刺激を受動的または能動的に遮断する(例えば、遮光もしくは雑音消去)チャンバーを介して刺激を受ける。代替的に、またはさらに、対象は、例えば、遮光または

10

20

30

40

50

雑音消去の特徴を含むシステムを介して刺激を受けてもよい。いくつかの実施形態では、対象は、刺激放出装置、例えば、刺激を送るように設計された眼鏡類を介して視覚刺激を受ける。該装置は、他の光を遮断し得る。いくつかの実施形態では、対象は、刺激放出装置、例えば、刺激を送るように設計されたヘッドホンを通じて聴覚刺激を受ける。該装置は、他の雑音を除去し得る。

【0063】

刺激を放出するための少なくとも1つのインタフェースに加えて、いくつかの実施形態は、少なくとも1つのプロセッサ（例えば、刺激を生成させ、該刺激の放出を制御し、該刺激の放出／結果を監視し、及び／または該刺激／結果に関するフィードバックを処理する）、少なくとも1つのメモリ（例えば、プロセッサが実行可能な命令、少なくとも1つの刺激、刺激生成指針、フィードバック、及び／または結果を保存する）、少なくとも1つの通信インタフェース（例えば、当該対象、ヘルスケア提供者、介護者、臨床研究調査員、データベース、監視アプリケーション等と通信する）、及び／または検出装置（例えば、該刺激及び／または該対象を検出し、ガンマ振動が誘導されているかどうか、対象の感受性、認知機能、物理的もしくは化学的变化、ストレス、安全性等を含む、該刺激及び／または該対象に関するフィードバックを与える）を具備する場合がある。

【0064】

いくつかの実施形態では、ガンマ振動は、約20Hz～約100Hzの閃光等の視覚刺激によって誘導される。特定の実施形態では、ガンマ振動は、約20Hz～約50Hzの閃光によって誘導される。さらなる実施形態では、ガンマ振動は、約35Hz～約45Hzの閃光によって誘導される。さらに別の実施形態では、ガンマ振動は、約40Hzの閃光によって誘導される。いくつかの実施形態では、対象は、約20Hz～約100Hzの閃光、もしくは約20Hz～約50Hzの閃光、もしくは約35Hz～約45Hzの閃光、または約40Hzの閃光を（例えば、発する遮光装置を備えたチャンバー内に配置されて、または、発する遮光装置を身に着けて）受ける。

【0065】

いくつかの実施形態では、ガンマ振動は、周波数約20Hz～約100Hz、もしくは約20Hz～約80Hz、もしくは約20Hz～約50Hz、もしくは約35Hz～約45Hz、または約40Hzの音波等の聴覚刺激によって誘導される。いくつかの実施形態では、対象は、約20Hz～約100Hz、約20Hz～約80Hz、約20Hz～約50Hz、約35Hz～約45Hz、または約40Hzの聴覚刺激を（例えば、発する雑音消去装置を備えたチャンバー内に配置されて、または、発する雑音消去装置を身に着けて）受ける。

【0066】

いくつかの実施形態では、対象は、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、またはそれ以上の間、視覚及び／または聴覚刺激を（例えば、発する遮光装置を備えたチャンバー内に配置されて、または、発する遮光装置を身に着けて）受ける。いくつかの実施形態では、対象は、約6時間未満、約5時間未満、約4時間未満、約3時間未満、約2時間未満、または約1時間未満刺激を（例えば、発する遮光装置を備えたチャンバー内に配置されて、または、発する遮光装置を身に着けて）受ける。いくつかの実施形態では、対象は、1時間未満刺激を（例えば、発する遮光装置を備えたチャンバー内に配置されて、または、発する遮光装置を身に着けて）受ける。

【0067】

いくつかの実施形態では、対象は、本明細書に提供する方法を受ける。他の実施形態では、対象は、複数の別々の機会に本明細書に提供する方法で治療を受ける。対象は、定期的なスケジュールで、または症状が生じた時点もしくは悪化した時点で治療され得る。いくつかの実施形態では、長期的な治療は、可溶性のA β ペプチド及び／または不溶性のA β ペプチド（すなわち、斑）を低減するのに有効であり得る。

【0068】

いくつかの実施形態では、ガンマ振動は、細胞型特異的に誘導される。いくつかの実施

10

20

30

40

50

形態では、ガンマ振動は、F S - P V 介在ニューロンにおいて誘導される。「ファスト・スパイクング」(F S)という用語は、ニューロンのクラスを説明するために用いられる場合、スパイクの高さにおいてスパイク周波数の適応や減衰がほとんどなく長期間高率でニューロンが放電する能力を指す。従って、これらのニューロンは、大幅な調節なしに持続する高周波数(例えば、約100Hzまたは約150Hzに等しいかそれより高い)の放電が可能である。F Sニューロンのこの特性は、それらの、高速の遅延整流性チャンネル、すなわち、非常に迅速に活性化及び不活性化するチャンネルの発現に大部分起因する。

【0069】

一態様において、刺激は非侵襲的であり得る。本明細書で使用される、「非侵襲的」という用語は、組成物もしくは装置の注入または移植等、身体の外科的介入または処置を必要としない装置、方法、及びシステムを指す。例えば、該刺激は、視覚(例えば、点滅光)、聴覚(例えば、音の振動)、及び/または触覚(力、振動、または動きを伴う機械的刺激)であり得る。

【0070】

別の態様において、刺激は侵襲的であるか、または少なくとも部分的に侵襲的であり得る。例えば、視覚、聴覚、及び/または触覚刺激は、組成物(例えば、感光性タンパク質)もしくは装置(例えば、集積光ファイバー及び固体光源)の注入または移植と組み合わせてもよい。

【0071】

実験データ

ガンマ振動は、5XFADマウスにおいて疾患早期の海馬SWR中に低下する。

ガンマの障害は、いくつかの神経及び精神障害における複数の脳領域で、ADのヒト患者における自発的ガンマ同期の低下を含め、観察されている。興味深いことに、自発的ガンマの低下はまた、2つのADのマウスモデル(ヒトアミロイド前駆体タンパク質(hAPP)Tgマウス及びアポリポタンパク質E4対立遺伝子(APOE4)ノックインマウス)においてインビボで、ならびにインビトロスライス試験では別のマウスモデル(TgCRND8マウス)で見出されている。しかしながら、他のADのマウスモデルでガンマ振動が変化するかどうか、それが疾患の進行の早期に生じるかどうか、及びガンマの乱れが疾患の進行に影響を与えるかどうかは不明である。

【0072】

これらの問題に対処するため、覚醒行動5XFADマウス、すなわち、5つの家族性AD変異を有する確立されたADモデルからの神経活動を記録した。特に、5XFADマウスは、APP KM670/671NL(スウェーデン型)、APP I716V(フロリダ型)、APP V717I(ロンドン型)、PSEN1 M146L(A>C)、及びPSEN1 L286Vを含む家族性ADの5つの異なる対立遺伝子を発現する。従って、5XFADマウスを、ADのアミロイド病理のモデルとして用いた。いくつかの実施形態では、該神経活動は、ほぼ3か月齢のマウスから記録し、この時、それらはAβ値が上昇しているが、主要な斑の蓄積の開始ならびに学習及び記憶障害の発現の前である。図1は、いくつかの実施形態に従って、球状トレッドミル上の仮想直線迷路を走行するマウスを示す概略図である。摂食制限マウスは、球状トレッドミル上の仮想直線迷路を歩き来することで報酬を得ることができる。

【0073】

海馬小領域CA1から神経活動が記録され得る。図2A及び2Bは、いくつかの実施形態に従って、海馬CA1から記録された、シータ振動及び鋭波リップル(SWR)を示す電気トレースである。いくつかの実施形態では、CA1におけるガンマ振動は、図2Aに示すように、シータ振動(4~12Hz)が観察される走行中等の明らかな活動周期中、ならびに、図2Bに示すように、SWRが生じる静止及び探索行動中に存在し得る。

【0074】

シータ振動中のパワースペクトル密度を調べたところ、5XFADマウスとWTの同腹仔間で低速ガンマパワー(20Hz~50Hzの範囲)において明らかな差は見られな

10

20

30

40

50

った。図3 A及び3 Bは、いくつかの実施形態に従って、3か月齢のTg 5XFAD及びWTマウスのシータ周期中の正規化されたパワースペクトルならびに正規化されたパワースペクトル密度の平均ならびに標準偏差を示すプロットである。図3 Aは、3か月齢の5XFAD (n=6マウス) 及びWT (n=6マウス) マウスのシータ周期中の正規化されたパワースペクトルの平均ならびに標準偏差を示す。いくつかの実施形態では、各動物のパワースペクトル密度は、そのピーク(シータ中)に正規化される場合がある。図3 Bは、3か月齢の5XFAD (n=6マウス) 及びWT (n=6マウス) マウスのシータ周期中の正規化されたパワースペクトル密度を示す。

【0075】

次のステップとして、いくつかの実施形態では、SWR中のガンマ振動、すなわち、約50~100ミリ秒続く150~250Hzの高周波振動を調べた。SWRは、スパイク活動のパターンが海馬をわたってリプレイされる集団的活動のバーストと関連している。先行研究で、低速ガンマは、SWR中に上昇し、CA3とCA1の間同期していることが示されている。結果として、これらの海馬小領域をわたるニューロンは、ニューロンがガンマに位相同期されて発火する可能性が高いため、SWR中に共に発火する傾向にある。SWR(約150Hz~約250Hzであるリップルバンドにおけるパワーが平均の上側4標準偏差を超えた時の周期として定義される)を特定し、これらSWR中に周波数の範囲をわたるパワーを調べるためにスペクトログラムをプロットした。スペクトログラムにおいて、SWRの特徴である高周波振動を示す100Hzより上のパワーの上昇、ならびに、ガンマパワーの同時に起こる上昇を示す約50Hz未満のパワーの上昇が観察され得る。

【0076】

図4 A及び4 Bは、いくつかの実施形態に従って、WTマウス及び5XFADマウスのSWRを示すスペクトログラムである。図4 Aは、1匹のWTマウスの平均SWRトリガスペクトログラムが、右側のプロットにおいて拡大された周波数80Hz未満のSWR404中、ガンマ帯域402の増加を示すことを示している。図4 Bは、1匹の5XFADマウスの平均SWRトリガスペクトログラムが、SWR中にガンマ帯域の増加を示すが、この増加は、図4 Aで示されるWTマウスにおけるよりも低いことを示している。

【0077】

いくつかの実施形態では、本試験は、これらの低速振動(10~50Hzの範囲、本明細書でさらに説明される通り)の瞬時周波数が、40Hzを中心とする単峰型分布であることを見出した。図5 A~5 Cは、いくつかの実施形態に従って、SWR中の瞬時ガンマ周波数の分布を示すプロットである。図5 Aは、40Hz付近の図4 Aのピークで示された同じマウスのSWR中の瞬時ガンマ周波数の分布を示す(n=370SWR)。図5 Bは、5XFAD及びWTマウスのSWR中の瞬時ガンマ周波数の分布が、各記録期間について40Hz付近の分布を示すことを示し、図5 Cは、平均及び動物間の平均の標準誤差(SEM)を示す(6匹の5XFAD動物では、期間当たりガンマサイクルn=820、800、679、38、1875、57、及び6匹のWT動物では、期間当たりガンマサイクル181、1075、919、1622、51、1860、1903)。

【0078】

いくつかの実施形態では、WTマウスのSWR中のこれらガンマ振動を、その後5XFADの同腹仔におけるものと比較したところ、SWR中のガンマにおいて障害が見出された。5XFADマウスにおいてSWR中にベースラインからガンマパワーは増加したが、本明細書でさらに説明する通り、SWR中のガンマパワーは、5XFADでは、WTマウスより有意に小さかった。

【0079】

図6 Aは、いくつかの実施形態に従って、それぞれ、5XFAD及びWTマウスにおけるSWRのピークからの時間の関数としてzスコアのガンマパワーを示す一連のグラフである。図6 Aは、平均及びSEMを示し、SWR中のガンマパワーの増加をベースラインに対して示している。

【0080】

図6Bは、いくつかの実施形態に従って、5XFAD及びWTマウスにおけるSWR中のガンマパワーの累積分布を示すプロットである。SWR中のガンマパワーの累積分布は、5XFADにおいて、WTマウスよりも有意に小さい増加を示す（順位和検定、 $p < 10^{-5}$ 、6匹の5XFADマウスで $n = 2166$ SWR及び6匹のWTマウスで 3085 SWR、5XFADマウスのzスコア中央値 1.02 （ $0.39 \sim 1.87$ 、第一四分位数～第三四分位数）及びWTマウスのzスコア中央値 1.18 （ $0.53 \sim 2.15$ 、第一四分位数～第三四分位数））。

【0081】

図6C及び6Dは、いくつかの実施形態に従って、WTマウス606及び5XFADマウス608のSWRのピークを中心にして100ミリ秒の間のzスコアのガンマパワーの累積分布を示すプロットならびに平均及び動物間のSEM（網掛け）である（6匹の5XFAD動物では、期間当たりSWR $n = 514$ 、 358 、 430 、 22 、 805 、 37 及び6匹のWT動物では、期間当たりSWR 82 、 311 、 370 、 776 、 18 、 710 、 818 ）。

【0082】

図6Eは、いくつかの実施形態に従って、WTマウス614及び5XFADマウス616における大きなSWRのピークを中心にして100ミリ秒の間のzスコアのガンマパワーの累積分布を示すプロットである（検知閾値は平均の上側6標準偏差を上回る）。本明細書でさらに説明する通り、正規分布しなかったデータに対して順位和検定を通して行った。図6Eは、WTマウス614及び5XFADマウス616において有意に小さい増加を示す（順位和検定、 $p < 10^{-5}$ 、6匹の5XFADマウスでは $n = 1000$ SWR及び6匹のWTマウスでは 1467 SWR）。

【0083】

いくつかの実施形態では、スパイクングは、両群においてこれらのガンマ振動によって位相変調されたが、ガンマ位相によるスパイクングの変調は、5XFADではWT動物よりも弱かった。本試験は、変調の深さが、5XFADでWT動物よりも有意に小さい可能性があることを示した。

【0084】

いくつかの実施形態に従って、3か月齢の5XFAD（ $n = 6$ マウス）及びWT（ $n = 6$ マウス）マウスのSWR中、図7Aは、ガンマ振動位相の関数としてのスパイクの割合を示すプロットであり、図7Bは、ガンマ位相の関数としてのSWR中のスパイクングの変調の深さを示すプロットである（順位和検定、ブートストラップ法、 $p < 10^{-5}$ 、これは多重比較の調節の際に重要である。5XFADスパイクーガンマ位相分布 $n = 2500$ 及びWT分布 3000 、5XFADマウスの変調の深さの中央値 0.35 （ $0.21 \sim 0.44$ 、第一四分位数～第三四分位数）ならびにWTマウスの変調の深さの中央値 0.38 （ $0.29 \sim 0.47$ 、第一四分位数～第三四分位数））。エラーバーは、平均 $\pm$ SEMを示す。プロット704は、スパイクングの変調の深さのヒストグラムを示す。

【0085】

図7C及び7Dは、いくつかの実施形態に従って、5XFAD及びWT動物の各動物についてのガンマ振動の位相の関数としてのSWR中の海馬CA1におけるスパイクの割合ならびに平均及び動物間のSEMを示すプロットである（6匹の5XFAD動物では、SWR中、期間当たりスパイク $n = 2475$ 、 1060 、 3092 、 25 、 6521 、 123 及び6匹のWT動物では、SWR中、期間当たりスパイク 360 、 4741 、 1564 、 2961 、 88 、 3058 、 4270 ）。

【0086】

いくつかの実施形態に従って、3か月齢の5XFAD（ $n = 6$ マウス）及びWT（ $n = 6$ マウス）マウスの大きなSWR（検知閾値は平均の上側6標準偏差を上回る。本明細書でさらに説明される）中、図7Eは、ガンマ振動の位相の関数としてのスパイクの割合を示すプロットであり、図7Fは、スパイクングの変調の深さを示すプロットである（順位

10

20

30

40

50

和検定、ブートストラップ法、1つのアスタリスクは $p < 10^{-10}$ を示し、5XFADスパイクーガンマ位相分布 $n = 2500$ 及びWT分布 3000 ）。エラーバーは、平均 $\pm$ SEMを示す。

【0087】

本試験はまた、非シータ周期において、5XFADマウスではWTと比較して時間当たりのSWRが少ない可能性があることも見出した（順位和検定、 $p < 10^{-5}$ 、6匹の5XFADでは非シータ周期 $n = 634$ 及び6匹のWTマウスでは非シータ周期 750 、5XFADマウスの中央値 0.07 Hz （ $0 \sim 0.17$ 、第一四分位数 $\sim$ 第三四分位数）ならびにWTマウスの中央値 0.12 Hz （ $0 \sim 0.24$ 、第一四分位数 $\sim$ 第三四分位数）、上述したように、ガンマパワーが上昇する場合さらに該周期は減少する）。

10

【0088】

図8A及び8Bは、いくつかの実施形態に従って、5XFADマウス802及びWTマウス804の動物で、各動物（図8A）及び合わせたすべての動物（図8B）に関する非シータ周期当たりのSWR率を示すプロットである（順位和検定、 $p < 10^{-10}$ 、6匹の5XFAD動物では、期間当たり非シータ周期 $n = 117$ 、 210 、 151 、 55 、 100 、 1 及び6匹のWT動物では、期間当たり非シータ周期 80 、 68 、 115 、 95 、 15 、 159 、 218 ）。これらの結果は、主要なアミロイド斑の蓄積の発達及び認知障害の証拠の前のADのマウスモデルにおいて、ガンマ振動及び海馬CA1スパイクングの変調の障害を明らかにする。

【0089】

ガンマ周波数でのFS-PV介在ニューロンの光遺伝学的刺激は、海馬のCA1領域においてガンマ振動を駆動した。

20

ADの本マウスモデルにおける当該疾患の進行の初期のSWR中のガンマ障害の所見で、ガンマ振動がADの分子及び細胞病態生理に影響を与え得るかどうかがという疑問が生じる。それを試験するため、2.5か月齢の5XFAD/PV-Cre二重トランスジェニックマウスの海馬CA1のFS-PV介在ニューロンにおいて、二重floxed逆方向オープン・リーディング・フレーム(DIO)ChR2-EYFPアデノ随伴ウイルス(AAV)を用い、Cre依存的にChR2を発現させることによって、ガンマ振動を光遺伝学的に駆動した。試験を実施し、マウスの海馬ガンマ振動の遺伝子誘導がADのマウスモデルの分子病理に影響を与えるかどうかを確認した。海馬ガンマ振動は、覚醒行動WT及び5XFADマウスにおいて遺伝子学的に誘導された。

30

【0090】

EF1 α プロモーターによって駆動される高感度黄色蛍光タンパク質(EYFP)に結合された二重floxed、逆方向オープン・リーディング・フレーム(DIO)ChR2を備えたアデノ随伴ウイルス（すなわち、AAV5ウイルス）を作製した。図9は、いくつかの実施形態に従って、対象の脳における特定の細胞型の活性化を調節するためのウイルスベクター（すなわち、AAV5-DIO-ChR2-EYFP）を示す概略図である。ウイルス発現は、細胞型特異的に海馬のCA1領域を標的とした。Creリコンビナーゼの存在下、2つの不和合性loxPバリエーションのうちの1つが反転してChR2の発現を可能にする。

40

【0091】

5XFADマウスの海馬のCA1領域は、ウイルス感染の正確な局所的標的化を可能にする定位ウイルス注入法を用い、AAV-DIO-ChR2-EYFPまたはEYFP単独構築物のいずれかで感染させた。1つの実施形態では、注入時、光ファイバーケーブル（白色バー）を含むフェールを、標的とする脳領域の上側約 0.3 mm に設置した。マウスが回復し、PV細胞でウイルスが発現する時間を与えた2週間後、CA1介在ニューロンを、光遺伝学的に操作した。

【0092】

図10A及び10Bは、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬のCA1領域に対する信号送出を示す概略図である。図10Aでは、いくつかの実施形態に従って、海馬にお

50

いて光遺伝学によるガンマ刺激を受けながら、ボール上を走行して迷路を抜けるマウスが示されている。図10A及び10Bに示す矢印1000は、約40Hzで点滅して脳領域を活性化する青色光を示す。

【0093】

この例では、200mWの493nmのDPSSLレーザを、各端にファイバー・チャンネル／身体的接触コネクタを備えたパッチ・コードに接続した。実験中、約1mWの光刺激を約1時間送った。より具体的には、青色光（例えば、473nm）を、シータ（例えば、約8Hz）、ガンマ（例えば、約40Hz）を含む各種周波数で、また、ランダムに約40Hzで、海馬のCA1領域の直上に配置した光ファイバーを介して送った。いくつかの実施形態では、刺激条件を試験しなかった。いくつかの実施形態に従って、シータ条件は周波数対照の役割を果たし、ランダム条件は周期性の特異性を調整した。

【0094】

1時間の刺激の完了後、脳組織を切断し、染色及び酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）分析用に-80℃で凍結した。図11は、いくつかの実施形態に従って、ChR2及びDAPIを有する対象における神経組織の免疫染色を示す免疫蛍光画像である。この例では、図11は海馬においてDAPI（核）及びChR2染色を示している。

【0095】

図12Aは、いくつかの実施形態に従って、PV+介在ニューロンで発現されたChR2-EYFPを示す免疫蛍光画像である。図12Aは、ChR2-EYFPが、3か月齢の5XFAD/PV-CreマウスのCA1のPV+介在ニューロンで強く発現したことを示している（スケールバー=100μm）。図12Bは、EYFP発現をPV+細胞でのみ示す、AAV-DIO-ChR2-EYFPを発現する3か月齢の5XFAD/PV-Cre CA1における抗EYFP及び抗PV抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である（スケールバー=50μm）。5XFADとWTマウスを比較するため、ChR2を5XFAD陰性同腹仔のFS-PV介在ニューロンで発現させた。光刺激の非特異的な影響に対する対照のため、EYFPのみを含む、AAV-DIOを発現する5XFAD/PV-Cre二重トランスジェニックマウスを用いた。これらのマウスでは、同一の遺伝的背景及び光送達条件で、光送達は光遺伝学的刺激をもたらさない。いくつかの実施形態では、40HzでのFS-PV介在ニューロンを2つの理由で選択した。第一に、先行研究では、40HzでのFS-PV介在ニューロンの駆動が、最大のLFP反応を引き起こしたことが示されている。第二に、いくつかの実施形態では、SWR中のガンマ障害が見出され、図5A～5Cに示すように、SWR中の瞬時ガンマ周波数が、40Hzを中心とした分布を形成した。いくつかの実施形態では、電気生理学的記録用に、40Hzの刺激周期を、無刺激の周期または本明細書でさらに説明する40Hzを中心としたポアソン分布から選択されるランダム化間隔で送られる刺激の周期とともに交互配置した。

【0096】

図13A及び13Bは、いくつかの実施形態に従って、FS-PV介在ニューロンの試験の概略図、局所電場電位の電気トレース、及びパワースペクトル密度を含む。図13Aを参照すると、1302は、FS-PV介在ニューロンの40Hzの光遺伝学的駆動の前及び最中のCA1における局所電場電位の電気トレースである。プロット1304は、CA1におけるFS-PV介在ニューロンの40Hzの刺激、ランダム刺激（40Hzを中心としたポアソン分布から選択されるランダム化間隔での刺激）、または無刺激の間のパワースペクトル密度の平均と標準偏差を示す（5XFADマウスn=4及びWTマウス3）。図13Bは、各マウスについて、CA1におけるFS-PV介在ニューロンの40Hzの刺激1306、ランダム刺激1308、または無刺激1310の間のパワースペクトル密度を示す（5XFADマウスn=4、動物当たり169、130、240、73の40Hz、143、129、150、72のランダム、及び278、380、52、及び215の無刺激周期、ならびにWTマウスn=3、動物当たり65、93、91の40Hz、64、93、90のランダム、及び187、276、270の無刺激周期）。40Hzでの1ミリ秒の473nmの光パルスの送達で、図13A及び図13Bのプロット130

6に示す通りLFPで40Hzでのパワーの増加をもたらした一方、ランダム刺激は、図13A及び図13Bのプロット1308に示す通り、40Hzでのパワーの増加をもたらさなかった。

【0097】

さらに、いくつかの実施形態では、光パルスは、光開始から2〜3ミリ秒後、効果的にスパイクを駆動し、パルス当たりのスパイクは、ランダム及び40Hzの条件の両方で同様であった。図14A及び14Bは、いくつかの実施形態に従って、1ミリ秒のレーザパルスの開始後の生の電気トレース、光遺伝学的刺激後のスパイクに対してフィルターをかけた後のトレース、及びスパイクの確率のプロットを含む。図14Aは、例示的な生のトレース1402及び光遺伝学的刺激1406の後のスパイク(300〜6000Hz)1404に対してフィルターをかけたトレースを示す。プロット1408は、40Hzの刺激、ランダム刺激、または無刺激の間に、1ミリ秒のレーザパルスの開始後、パルス当たりのスパイクのヒストグラムを示す(4匹の5XFAD及び3匹のWTマウスにおいて、40Hzの刺激 $n=345762$ 、ランダムパルス刺激301559、及び無刺激32350の回数、552の40Hzの刺激、543のランダム刺激、及び1681の無刺激周期から少なくとも500ミリ秒離す)。図14Bは、レーザパルス開始の約2〜3ミリ秒後のスパイクの増加を伴う40Hzの刺激1412、ランダム刺激1414、または無刺激1410に反応する1ミリ秒のレーザパルスの開始後のスパイクの確率を示す(5XFAD $n=4$ 、動物当たり87、130、8、73の40Hzの刺激、85、129、5、72のランダム刺激、及び251、379、15、215の無刺激周期、ならびにWT $n=3$ 、動物当たり65、93、91の40Hzの刺激周期、動物当たり64、93、90のランダム刺激周期、及び動物当たり187、277、270の無刺激周期)。エラーバーは平均+/-SEMを示す。

【0098】

従って、CA1における40Hzの振動は、FS-PV介在ニューロンの光遺伝学的刺激によって効果的に駆動された。先行研究では、A β ペプチドのレベルが、神経活動の増加の後に上昇し、神経活動の静止の後に減少することが示されている。いくつかの実施形態では、該ランダム刺激条件を用いて、刺激が引き起こすスパイク活動の全体的な変化を調整した。いくつかの実施形態では、マルチユニット発火率を、40Hzとランダム刺激の交互配置された周期中で比較し、これらの条件において、発火率に有意な差は見られなかった。

【0099】

図15Aは、いくつかの実施形態に従って、40Hzの刺激周期とランダム刺激周期の間の発火率の差を示すヒストグラムである。図15Aは、両方のタイプの刺激が同様の量のスパイク活動を誘発することを示す(中央値ゼロに対するウィルコクソンの符号順位検定、 $p>0.6$ 、4匹の5XFAD及び3匹のWTマウスから刺激周期 $n=538$ 、「n.s.」は有意でないことを示す)。すべてのマウスを合わせた40Hz及びランダム刺激中の発火率の差の分布の中央値ゼロに対するウィルコクソンの符号順位検定 $p>0.6$:中央値-1.75 $\times 10^{-5}$ Hz(-1.28-1.18Hz、第一四分位数〜第三四分位数)刺激周期 $n=538$ 。

【0100】

図15Bは、各動物について、40Hzの刺激1512、ランダム刺激1514、及び無刺激1510周期当たりのマルチユニット発火率を示す棒グラフである(3匹のWT及び4匹の5XFADマウスの各動物に対する順位和検定、 $p>0.09$ 、中央値と四分位数を図に示す、マウス当たりの40Hzの刺激周期 $n=87$ 、130、8、65、93、91、73及びランダム刺激周期85、129、5、64、93、90、72)。箱ひげ図は、中央値(箱内の白線)及び四分位数(箱の上下)を示す。すべての動物で、40Hz及びランダム刺激間の発火率には有意な差はなく、このランダム刺激条件がスパイク活動の対照としての役割を果たすことを示した(3匹のWT及び4匹の5XFADマウスの各動物に対する順位和検定、 $p>0.09$ 、中央値と四分位数を図に示す、動物当た

りの40Hzの刺激周期 $n=87$ 、 130 、 8 、 65 、 93 、 91 、 73 及びランダム刺激周期 85 、 129 、 5 、 64 、 93 、 90 、 72)。無刺激に対して40Hzの刺激がニューロンの活動過剰を引き起こすかどうかを調べた。ほとんどの動物で、40Hzまたはランダム刺激と無刺激の間の発火率に有意な差はない(2匹のWT及び2匹の5XFADの各動物に対する順位和検定、 $p>0.25$ 、動物当たりの40Hzの刺激周期 $n=8$ 、 93 、 91 、 73 及びベースライン周期 15 、 277 、 270 、 215)か、または、40Hzもしくはランダム刺激中の発火率は、無刺激中よりも低く(1匹のWT及び1匹の5XFADの各動物に対する順位和検定、 $p<10^{-5}$ 、これは、多重比較の実施に対して補正された場合に有意であり、動物当たりの40Hzの刺激周期 $n=130$ 、 65 及びベースライン周期 379 、 187)、40Hzの刺激はニューロンの活動過剰を引き起こさなかったことを示した。1匹の動物において、40Hzまたはランダム刺激でベースライン中より活動が有意に高かった(1匹の5XFADマウスに対する順位和検定、 $p<10^{-5}$ 、動物当たりの40Hzの刺激周期 $n=87$ 及びベースライン周期 251)。従って、7匹中6匹の動物で、FS-PV介在ニューロンの40Hzの光遺伝学的刺激が活動過剰を引き起こす証拠はない。従って、いくつかの実施形態では、図15Aに示すように、このランダム条件はガンマ振動を誘導しなかったが、同様の量のマルチユニットスパイク活動をもたらした。

【0101】

図16Aは、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬のCA1領域における特定の細胞型の刺激の周波数特異的な増加の過程での対象の海馬から記録した電気トレースである。より具体的には、図16Aは、いくつかの実施形態に従って、FS-PV+(すなわち、ガンマ条件)の刺激の周波数特異的な増加の過程での対象の海馬から記録した。

【0102】

図16Bは、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬のCA1領域における特定の細胞型の刺激における局所電場電位パワーの周波数特異的な増加を示すパワースペクトル密度のプロットである。特に、図16Bのパワースペクトル密度のグラフは、刺激の特異性を検証する。局所電場電位(LFP)パワーは、FS-PV+が40Hzの青色光パルスで活性化された場合に、ガンマ刺激条件中に40Hz帯域1600においてのみ高まった(1群当たりのマウス $n=4$)。ベースラインもランダム刺激条件もこの周波数1600での増強を示さなかった。

【0103】

ガンマ刺激は、海馬のCA1領域におけるA β 産生を低減した。

A β の蓄積は、ADの病変に典型的な複数の神経毒性事象を引き起こすことがある。従って、いくつかの実施形態では、5XFADマウスの全般的なA β ペプチドのレベルにおけるガンマ刺激の影響を調べた。3か月齢のマウスには、この段階で海馬に斑が存在しないためにこれらを用い、斑負荷と無関係の可溶性A β の動態を調べられるようにした。いくつかの実施形態では、FS-PV介在ニューロンの1時間の刺激が、A β ELISA分析で測定した、海馬のCA1領域におけるEYFP対照群と比較して、40Hz群において、A β_{1-40} を53.22%及びA β_{1-42} を44.62%低減したことが見出された。

【0104】

図17A及び17Bは、いくつかの実施形態に従って、すべてのマウスをまとめた一元配置分散分析による5XFAD/PV-Cre CA1の相対的A β_{1-40} 及びA β_{1-42} レベルを示す棒グラフである(A β_{1-40} についてはEYFPマウス $n=8$ 及び40Hzマウス7、A β_{1-42} については1群当たりのマウス $n=4$)。図17Aの棒グラフは、各刺激条件における5XFAD/PV-Cre CA1の相対的なA β_{1-40} のレベルを表す。棒グラフのバーに重ねられた円1702は、各群の個々のデータ点を示す(1群当たりの5XFAD/PV-Creマウス、EYFP $n=8$ 、40Hz $n=7$ 、8Hz $n=4$ 、ランダム $n=6$)。この図では、すべての棒グラフについて一元配置分散分析により、注記「n.s.」1704は有意でないことを示し、アスタリスク1706は

$p < 0.05$ を示し、二重アスタリスク1708は $p < 0.01$ を示す。図17Bは、各刺激条件における5XFAD/PV-Cre CA1の相対的な $A\beta_{1-42}$ のレベルを表す（1群当たりの5XFAD/PV-Creマウス、EYFP $n=4$ 、40Hz $n=4$ 、8Hz $n=3$ 、ランダム $n=3$ ）。図17A及び17Bは平均及びSEMを示す。

【0105】

表1（下記）は、異なる条件を受ける同腹仔由来のマウスを比較した場合のシュューデントt検定による有意差がある $p < 0.05$ 、生の濃度（pg/ml）の値を示す。表1は、各実験群について、ELISA希釈での生の $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のレベルを示す。

表1

処理	希釈比	平均 $A\beta_{1-40}$ 濃度 (pg/ml)	平均 $A\beta_{1-42}$ 濃度 (pg/ml)
光遺伝学			
PV-Cre EYFP	1:2	100.01, 61.598, 65.462, 82.509, 69.023, 70.831, 82.152, 74.314	58.777, 54.546, 30.585
PV-Cre 40 Hz	1:2	46.604, 31.041, 26.639, 55.612, 69.326, 17.711, 3.9951	27.271, 41.950, 18.790, 18.262
PV-Cre 8 Hz	1:2	101.268, 54.283, 90.190, 151.690	50.699, 122.85, 35.507
PV-Creランダム	1:2	235.68, 89.962, 157.37, 323.902, 451.78, 241.63	54.029, 137.78, 144.63
α CaMKII-Cre EYFP	1:2	45.813, 59.069, 40.404, 66.810	72.052, 36.573, 67.243, 59.295
α CaMKII-Cre 40 Hz	1:2	55.942, 44.270, 57.498, 47.382, 115.08, 75.673	70.847, 79.683, 61.429
α CaMKII-Cre 8 Hz	1:2	52.829, 46.604, 57.720	95.939, 21.640, 102.987
α CaMKII-Creランダム	1:2	218.00, 191.72, 159.07	66.203, 168.867, 176.404
光の点滅			
暗1時間VC	1:2	343.8, 245.3, 210.6, 343.8, 588.4, 394.9, 151.5, 334.4, 301.1, 185.6	449.5, 320.7, 275.2, 449.5, 769.2, 516.2
明1時間VC	1:2	366.9, 632.4, 378.2, 314.1, 266.9, 264.1	616.4, 592.3, 802.9, 394.5, 330.7, 337.8
20 Hz 1時間VC	1:2	944.4, 313.2, 595.9, 530.9, 456.5, 289.9	1624, 302.4, 816.9, 687.2, 676.6, 343.0
40 Hz 1時間VC	1:2	146.4, 143.6, 104.9, 99.6, 179.7, 219.8, 100.4, 98.46, 71.96, 68.31, 123.3, 150.7	191.4, 187.7, 137.2, 130.2, 234.9, 287.3

10

20

30

40

50

処理	希釈比	平均 $A\beta_{1-40}$ 濃度 (pg/ml)	平均 $A\beta_{1-42}$ 濃度 (pg/ml)
80 Hz 1 時間VC	1:2	332.5, 328.7, 363.5, 390.6, 530.0, 673.3	558.3, 418.9, 510.7, 609.5, 1186, 921.9
40 Hz + PTX 1 時間VC	1:2	367.2, 431.4, 445.2, 392.4, 386.7, 445.2	396.6, 540.5, 532.7, 705.0, 104.5, 104.5
ランダム 1 時間VC	1:2	461.8, 100.2, 9.819, 416.6	423.9, 157.9, 389.9, 841.5
暗 1 時間HPC	1:2	97.949, 107.33, 119.92, 139.33	499.30, 355.13, 469.53, 598.03
40 Hz 1 時間HPC	1:2	88.136, 104.78, 161.52, 197.36	364.53, 408.41, 436.62, 873.83
ランダム 1 時間HPC	1:2	95.816, 136.77, 70.004, 125.47	466.39, 500.87, 311.26, 582.355
暗 7 日間 可溶性	1:50	1216.9, 1181.3, 1173.4, 1199.5, 134.73, 151.34, 113.26, 145.14, 127.91, 127.48, 143.02, 127.48, 141.07	5217.2, 8057.9, 9051.3, 6773.7, 244.11, 236.96, 235.38, 240.62, 286.19, 8.382, 11.21, 14.03, 13.56
暗 7 日間 不溶性	1:100	1173.2, 1208.2, 1205.3, 1214.6, 994.86, 1059.2, 1176.6, 1065.4, 1002.9, 306.16, 690.70, 3442.7, 152.73	8572.7, 9127.1, 6349.3, 10138, 6852.2, 7056.7, 7039.7, 7094.2, 7289.0, 748.21, 1117.1, 1055.5, 504.95
40 Hz 7 日間 可溶性	1:50	476.71, 283.83, 336.87, 237.22, 7.0175, 4.1480, 4.0580, 1.5205, 91.864, 152.73, 148.84, 141.07, 162.44	419.7, 248.1, 242.7, 90.974, 95.626, 56.936, 67.577, 47.586, 200.87, 13.56, 9.794, 15.44, 3.677

10

20

30

40

50

処理	希釈比	平均 $A\beta_{1-40}$ 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	平均 $A\beta_{1-42}$ 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
40 Hz 7日間 不溶性	1:100	281.97, 270.37, 86.199, 239.71, 23.557, 15.166, 22.714, 1038.9, 1099.8, 1760.8, 1558.8, 187.69, 22.64	202.96, 130.71, 195.73, 193.70, 1646.89, 1579.1, 503.44, 1400.0, 7536.62, 955.23, 1208.8, 694.57, 784.91
暗 1 時間BC	1:2	81.874, 18.343, 86.554	391.95, 883.69, 604.97
40 Hz 1 時間BC	1:2	81.307, 27.986, 30.113	300.34, 1152.5, 616.92
40 Hz 1 時間 待機4 時間	1:2	91.06, 141.8, 111.2, 12.30	108.0, 168.1, 157.3, 35.158
40 Hz 1 時間 待機12 時間	1:2	167.2, 101.6, 89.31, 119.9	236.1, 134.6, 124.8, 152.4
40 Hz 1 時間 待機24 時間	1:2	246.7, 177.6, 281.2, 175.0, 257.3, 204.2	231.8, 107.0, 402.7, 184.6, 245.1, 179.7
暗APP/PS1	1:2	1050.16, 1085.25, 1522.45, 1153.69, 1750.77	19.22, 30.68, 28.08, 14.25, 25.30
40 Hz APP/PS1	1:2	512.42, 947.80, 850.45, 793.63	18.85, 15.58, 18.92, 11.44
暗WT	1:1	0.038, 0.813, 2.016, 1.913, 0.313, 4.11, 7.23, 20.2, 40.4, 38.7, 11.9	N/A
40 Hz WT	1:1	0.139, 0.325, 0.346, 0.390, 8.92, 12.1, 6.34, 12.4, 13.1	N/A

10

20

30

【0106】

いくつかの実施形態では、包括的な一連の対照実験を実施し、効果が周波数、細胞型、及び／または周期性に対して特異的であるかどうかを判定した。周波数特異性を判定するため、8 Hzにおける5XFAD/PV-Cre二重トランスジェニックマウスのFS-PV介在ニューロンを駆動したところ、 $A\beta$ レベルの変化は認められなかった。次に、FS-PV介在ニューロンをランダムで駆動したところ、その効果は周期的刺激に特異的であった。実際、ランダム刺激後にアミロイドレベルは減少せず、それどころか、代わりに $A\beta_{1-40}$ は230.1%増加し、 $A\beta_{1-42}$ は133.8%増加した（例えば、図17A及び17B参照、すべてのマウスをまとめた一元配置分散分析による $p < 0.01$ 、 $A\beta_{1-40}$ に対してEYFPマウス $n=8$ 及びランダムマウス $n=4$ 、 $A\beta_{1-42}$ に対して1群当たりのマウス $n=3$ 。異なる条件を受けた同腹仔由来のマウスを比較したとこ

40

50

ろ、スチューデント t 検定による有意差がある $p < 0.01$ が認められた。

【0107】

最後に、5XFAD/ α CamKII-Cre二重トランスジェニックマウスを用いた海馬CA1におけるCamKII+興奮性ニューロンでの8Hz及び40Hzの刺激による効果の細胞型特異性を試験した。図18A及び18Bは、いくつかの実施形態に従って、一元配置分散分析による5XFAD/ α CamKII-Cre CA1の相対的な $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ レベルを示す棒グラフである。図18Aは、各刺激条件における5XFAD/ α CamKII-Cre CA1の相対的な $A\beta_{1-40}$ レベルを表す。棒グラフのバーに重ねられた円1802は、各群の個々のデータ点を示す（1群当たりの5XFAD/ α CamKII-Creマウス、40Hz $n=6$ 、8Hz $n=3$ 、ランダム $n=3$ 、一元配置分散分析により、注記「n.s.」1804は有意でないことを示し、アスタリスク1806は $p < 0.001$ を示す）。

【0108】

図18Bは、各刺激条件における5XFAD/ α CamKII-Cre CA1の相対的な $A\beta_{1-42}$ レベルを表す（1群当たりの α CamKII-Creマウス $n=3$ ）。いくつかの実施形態では、8Hzまたは40HzでCamKII+興奮性ニューロンを駆動することでは、 $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のレベルに有意差は生じないことが見出された（例えば、図18A及び18B参照、右、一元配置分散分析による $p > 0.05$ 、40Hzマウス $n=6$ 及び8Hzマウス3（ $A\beta_{1-40}$ ）、1群当たりのマウス $n=3$ （ $A\beta_{1-42}$ ）。異なる条件を受けた同腹仔由来のマウスを比較した場合、それらはスチューデント t 検定による有意差がない $p > 0.05$ である）。5XFAD/PV-Creマウスと同様に、ランダム刺激でのCamKII+ニューロンの駆動もまた、 $A\beta_{1-40}$ の257.6%の増加及び $A\beta_{1-42}$ の133.3%の増加をもたらした（例えば、図18A及び18B参照、右、一元配置分散分析による $p < 0.001$ 、 $A\beta_{1-40}$ に対して40Hzマウス $n=5$ 及びランダムマウス3、 $A\beta_{1-42}$ に対して1群当たりのマウス $n=3$ 。異なる条件を受けた同腹仔由来のマウスを比較した場合、 $A\beta_{1-40}$ は、スチューデント t 検定による有意差がある $p < 0.001$ であり、 $A\beta_{1-42}$ は、スチューデント t 検定による $p = 0.13$ である）。

【0109】

従って、40Hzの刺激後の $A\beta$ ペプチドレベルの低下は、FS-PV介在ニューロンの駆動に特異的であり得る。いくつかの実施形態では、これらELISAの所見を免疫組織化学で確認するため、CA1におけるAPPと交差反応しない β アミロイドのC末端特異抗体を用いて $A\beta$ の標識を実施した。

【0110】

図19Aは、いくつかの実施形態に従って、海馬CA1領域における抗 $A\beta$ 及び抗EEA1抗体による免疫組織化学を示す一連の画像である。具体的には、図19Aは、EYFP、40Hz、及びランダム刺激条件における5XFAD/PV-Creの海馬のCA1領域での抗 $A\beta_{1902}$ （D54D2）ならびに抗EEA1 1904（610457）抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である（スケールバー=50 μ m）。図19Bは、いくつかの実施形態に従って、EYFPに対して正規化された $A\beta$ の相対的免疫反応を示す一連の棒グラフである。具体的には、図19Bは、EYFPに対して正規化された $A\beta$ の相対的免疫反応性を示す（1群当たりのマウス $n=4$ 、一元配置分散分析により、1908は $p < 0.05$ を示し、1920は $p < 0.01$ を示す）。

【0111】

図20Aは、いくつかの実施形態に従って、5XFAD/PV-Creの海馬CA1領域における抗 $A\beta$ 抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。具体的には図20Aは、EYFP、40Hz、及びランダム刺激条件における5XFAD/PV-Creの海馬CA1領域での抗 $A\beta_{2002}$ （12F4）抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である（スケールバー=50 μ m）。図20Bは、いくつかの実施形態に従って、EYFPに正規化された $A\beta$ の相対的免疫反応性を示す棒グラフである。具体

的には、図20Bは、EYFPに対して正規化されたA β の相対的免疫反応性を示す（1群当たりのマウスn=4、一元配置分散分析により、2004はp<0.05を示し、2006はp<0.001を示す）。A β 標識の強度は、EYFP群と比較した場合、3か月齢の5XFAD/PV-Cre二重トランスジェニックマウスにおけるFS-PV介在ニューロンの40Hzの刺激後に39.5%減少し、ランダム刺激後は有意に187.0%増加した（例えば、図19A、19B、20A、及び20B参照、一元配置分散分析によるp<0.05及びp<0.01、1群当たりのマウスn=4）。

【0112】

脳のアミロイド濃度は、A β の産生及びクリアランス率に依存し得る。いくつかの実施形態では、A β ペプチドは、APPの β 及び γ セクレターゼによる一連のタンパク質分解的切断によって産生される。BACE1がAPPホロタンパク質を切断する場合、APPのCTF及びNTFが産生され得る。いくつかの実施形態では、40Hzの刺激がどのようにしてA β レベルを低減したかを明らかにするため、FS-PV介在ニューロンの刺激後、APPの切断中間体であるCTF及びNTFのレベルを測定することによりガンマに影響されたAPP切断を調べた。40Hzの刺激後、CTFの有意な減少が、EYFP群と比較して40Hzの刺激後18.6%、及びランダム群と比較して19.7%見られた（一元配置分散分析によるp<0.05及びp<0.01、1群当たりのマウスn=6）。

【0113】

図21Aは、いくつかの実施形態に従って、1レーン当たり1匹のマウス、各条件の2つの生物学的反復で、EYFP、ランダム、及び40Hzの刺激条件における、CA1でのAPP(CT695)、APP NTF(A8967)、APP CTF(CT695)、及び β アクチン(A5316)（負荷対照）のレベルを示す代表的なウェスタンブロットである。図21Bは、いくつかの実施形態に従って、APP CTFの相対的免疫反応性を示す棒グラフである。具体的には、図21Bは、EYFP及びランダム条件に対する40HzにおけるAPP CTFの相対的（アクチンに対して正規化）免疫反応性を示す（1群当たりのマウスn=6、一元配置分散分析により、1つのアスタリスク2102はp<0.05を示し、2つのアスタリスク2104はp<0.01を示す）。図21Cは、いくつかの実施形態に従って、CA1における完全長APP2106(CT695)、APP CTF2108(CT695)、及び β アクチン2112(A5316、負荷対照）のレベルを示す一連のウェスタンブロットである。具体的には、図21Cは、1レーン当たり1匹のマウス、各条件の2つの生物学的反復で、EYFP、ランダム、及び40Hzの刺激条件における、CA1での完全長APP2106(CT695)、APP CTF2108(CT695)、及び β アクチン2112(A5316、負荷対照）のレベルを示す。

【0114】

図22Aは、EYFP及びランダム条件に対する40HzにおけるAPP NTFの相対的（アクチンに対して正規化）免疫反応性を示す棒グラフである（1群当たりのマウスn=6、一元配置分散分析により、注記「n.s.」2204は有意でないことを示し、2202はp<0.05を示す）。図22Bは、EYFP、ランダム、及び40Hz条件における完全長APPの相対的（アクチンに対して正規化）免疫反応性を示す棒グラフである（一元配置分散分析による、1群当たりのマウスn=6）。

【0115】

いくつかの実施形態では、40Hzの刺激後、APP NTFレベルの有意な低下が、EYFP群と比較して28.5%、及びランダム群と比較して28.2%見られた（例えば、図21A、22A、及び21C参照、一元配置分散分析によるp<0.05、1群当たりのマウスn=6）。さらに、完全長APPのレベルは、様々な群間で類似しているようであり、A β の低下は、前駆体レベルの変化によるものではないことを示した（例えば、図21A、22B、21C参照、APP実験の1群当たりのマウスn=6）。いくつかの実施形態では、本マウスモデルにおいて、その切断産物と比較して相対的に多量のAPPのため、完全長APPの変化は、検出が困難であり得る。

10

20

30

40

50

【0116】

いくつかの実施形態では、A P Pのプロセッシングは、小胞輸送経路内で行われ、先行研究では、活動刺激後、A P Pは回収エンドソームに輸送されることが示されている。さらに、A D患者由来の脳組織及びA D患者由来のヒトニューロンにおいて、拡大された初期エンドソームが認められている。いくつかの実施形態では、ガンマ刺激が実験動物においてエンドソームの存在量に影響を与えるかどうかを試験するため、2つのマーカー、すなわちE E A 1（初期エンドソーム抗原1）及びR a b 5（R A B 5 A遺伝子がコードするR a s関連タンパク質）を用いて、40 H z及びランダム刺激後のC A 1における初期エンドソームが特徴づけられている。図23は、3か月齢の5 X F A D / P V - C r eマウスにおいてE Y F P、40 H z、及びランダム刺激条件で、抗R a b 5（A D E - K A p - G P 0 0 6 - E）抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である（スケールバー=50 μ m）。

10

【0117】

図24Aは、いくつかの実施形態に従って、E Y F Pに対して正規化されたE E A 1の相対的免疫反応性を表す棒グラフである（1群当たりのマウスn=4、一元配置分散分析により、1つのアスタリスク2402は $p < 0.05$ を示し、2つのアスタリスク2402は $p < 0.01$ を示す）。図24Bは、いくつかの実施形態に従って、E Y F P、40 H z、及びランダム刺激条件下での5 X F A D / P V - C r eからのC A 1の相対的R a b 5強度レベルを示す棒グラフである（1群当たりのマウスn=3、一元配置分散分析により、3つのアスタリスク2408は $p < 0.001$ を示す）。いくつかの実施形態では、E E A 1染色は、ニューロン細胞体において初期エンドソームに典型的な点状の細胞質及び膜近傍パターンを生じた（例えば、図19A参照）。いくつかの実施形態では、R a b 5標識は、大部分細胞体及び原形質膜に限局されており、エンドソーム及び膜区画内に集中した小さいまばらな点で表される（例えば、図23参照）。全体として、C A 1ニューロンの初期エンドソーム標識は、E Y F P対照と比較して、40 H zの刺激後、E E A 1（39.7%）及びR a b 5（40.1%）染色強度の両方に有意な低下を示した（例えば、図19A、23、24A参照、一元配置分散分析による $p < 0.05$ 及び $p < 0.001$ 、1群当たり3匹のマウスから切片n=2）。対照的に、F S - P V介在ニューロンのランダム刺激は、E Y F P対照と比較して、E E A 1染色強度を122%増加させた（例えば、図19A及び24A参照、一元配置分散分析により $p < 0.01$ 、1群当たり3匹のマウスから切片n=2）。いくつかの実施形態では、E E A 1染色強度の処理依存的な変化は、C A 1のA β のそれに匹敵した（例えば、図19A~B、20A~B、23、及び24A~B参照、一元配置分散分析により $p < 0.05$ 、1群当たり3匹のマウスから切片n=2）。これらの結果は、C T Fで認められた変化に加えて、40 H zの刺激がE E A 1及びR a b 5を変化させること示唆し、一般的なエンドソームプロセッシングの差を示している。

20

30

【0118】

図25Aは、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬のC A 1領域の異なる型の刺激後のA β ペプチドアイソフォームA β_{1-40} のレベルを示す棒グラフである。この実験では、約40 H zでのF S - P V+の1時間の光遺伝学的刺激502が、海馬C A 1におけるA β_{1-40} レベルを低下させた。8 H zでの興奮性錐体刺激506及び40 H zでの興奮性錐体刺激508は、A β_{1-40} のレベルに有意な影響を及ぼさなかった。ランダムな40 H zの刺激504、及びとりわけランダムな興奮性錐体刺激510は、A β_{1-40} のレベルを有意に増加させた（1群当たりの動物n=4~9）。

40

【0119】

図25Bは、いくつかの実施形態に従うガンマ振動での対象の海馬のC A 1領域における特定の細胞型の刺激後のA β ペプチドアイソフォームA β_{1-42} の減少を示す棒グラフである。この実験では、約40 H zでのF S - P V+の1時間の光遺伝学的刺激516が、海馬C A 1におけるA β_{1-42} レベルを低下させた（1群当たりの動物n=2~4）。8 H zでの刺激520、40 H zでの興奮性錐体刺激522、及び8 H zでの興奮性錐体

50

刺激 5 2 4 は、 $A\beta_{1-42}$ のレベルを増加させた。ランダムな 4 0 H z の刺激 5 1 8、及びとりわけランダムな興奮性錐体刺激 5 2 6 は、 $A\beta_{1-42}$ のレベルを有意に増加させた）。

【0 1 2 0】

図 2 5 C は、いくつかの実施形態に従うガンマ振動での対象の海馬の C A 1 領域における特定の細胞型の刺激後の完全長 A P P 5 2 8、5 3 4（アクチン 5 3 2 に対して正規化）のレベルの増加及び C T F（例えば、 β -C T F）5 3 0、5 3 6（アクチン 5 3 2 に対して正規化）のレベルの低下を示す一連の画像である。ランダムな 4 0 H z の対象条件と比較して、4 0 H z での F S - P V + 刺激は、A P P の β -C T F レベルを低下させ、完全長 A P P レベルを増加させた（1 群当たりの動物 $n = 4 \sim 6$ ）。 β -C T F は B A C E 1 による A P P のアミロイド形成的切断の過程で生成する A P P 誘導体であるため、 β -C T F の高レベルは、 $A\beta$ 産生の増加を表す。

【0 1 2 1】

図 2 6 A ~ 2 6 B は、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬の C A 1 領域の異なる型の刺激後のエンドソームレベル（E E A 1 レベルに基づく）を示す免疫蛍光画像である。具体的には、免疫蛍光によって測定される、図 2 6 B の図 2 6 A に対する比較で、F S - P V + の 4 0 H z の刺激を介したガンマ振動の誘導が、ランダムな F S - P V + の刺激 9 0 0 と比較して、E E A 1 レベル（エンドソームレベルのマーカー）を低減することが示される（1 群当たりのマウス $n = 3$ 、 $p = 0.007$ ）。これら細胞におけるエンドソームレベルの低下は、A P P と β セクレターゼ間の相互作用の低下を示し、これが A P P の切断及び $A\beta$ 産生の低下をもたらす。従って、本試験は、エンドソームレベルの増加が A P P プロセッシング、ひいては $A\beta$ 産生の増加を示すことから、ガンマ振動が A D マウスモデルにおいて A P 産生を低減することを示した。

【0 1 2 2】

図 2 7 は、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬の C A 1 領域の異なる型の刺激後の図 2 6 A ~ 2 6 B の免疫蛍光画像に対する平均強度値（F A D に対して正規化）を示す棒グラフである。

【0 1 2 3】

ガンマ刺激はミクログリアの形態変換を誘導した。

いくつかの実施形態では、さらに 4 0 H z の刺激の細胞及び分子効果を不偏的に検討するため、5 X F A D / P V - C r e 二重トランスジェニックマウスの 4 0 H z の F S - P V 介在ニューロン刺激、または無刺激（E Y F P）1 時間後の海馬 C A 1 組織のゲノムワイド R N A - s e q を実施した。R N A - s e q 実験では、平均 2 6, 5 1 8, 3 4 5 のシーケンシングリードが 3 匹の刺激及び 3 匹の無刺激マウスから得られた。データの Q C 分析で、エクソン / イントロン比の平均値 1 8 3、エクソン / 遺伝子間比の平均値 2 7 2、及びリボソーム R N A リードのパーセンテージの平均値 3.6 % が明らかになった。この分析は、5 2 3 の差次的に発現される遺伝子（D E G）を特定し、このうち 1 3 0 が 4 0 H z の刺激に応答して上方制御され、3 9 3 が下方制御された。

【0 1 2 4】

図 2 8 は、4 0 H z の刺激の有無でのマウス海馬 C A 1 領域の全トランスクリプトーム R N A - s e q によって決定された差次的に発現される遺伝子を示すヒートマップである。正規化された z スコア値を、各差次的に発現される遺伝子について算出した（列）。色は、遺伝子発現の低及び高レベルを相対的に表す。表 2（下記）は、4 0 H z の F S - P V 介在ニューロンの刺激によって上方制御された 1 3 0 の遺伝子を示す（C u f f l i n k s 2.2 ソフトウェア（ワシントン大学 T r a p n e l l L a b、ワシントン州シアトルより入手可能、R N A - s e q 試料における転写産物の組み立て、それらの存在量の推定、ならびに差次的発現及び調節のための試験用）を用いて $p < 0.05$ ）。

表 2

10

20

30

40

50

40 Hz の FS - PV 介在ニューロンの刺激によって上方制御された遺伝子	
2010002N04Rik	Junb
2010300C02Rik	Kcnc4
2410018L13Rik	Kcnh3
Adra2c	Kcnj4
Agfg2	Klf16
Agxt2I1	Lag3
Arc	Lcat
Atf3	Lefty1
B2m	Lgals3bp
BC018242	Lingo3
Beta-s	Lrg1
Bst2	Ltbp4
Clga	Lyz2
Clgb	Metrn
Clgc	Mmp12
Clql2	Mpped1
Clqtnf4	Mtl
C3ar1	Mt2
C4b	Mtap1s
Car7	Npy
Card10	Nr1d1
Cd68	Nr4a1
Cebpb	Oasl2
Cebpd	Palm
Cirbp	Parp14
Cnn2	Pcsk1n
Cotl1	Pdzd2
Crip2	Pgls
Cst3	Phyhd1
Ctxn1	Pitpnm2
Cyp2d22	Plekhg5
Dcakd	Pnpla7
Egr4	Pou3f1
Erf	Ppp1r1a
F730043M19Rik	Prr7
Fam107a	Prrt1
Fam163b	Rab40b
Fmo2	Rara

10

20

30

40

50

40 Hz の FS-PV 介在ニューロンの刺激によって上方制御された遺伝子	
Fnl	Rasl11b
Gbp3	Rbm3
Gldc	Rpph1
Gm129	Rprml
Gm2115	Sbk1
Gng7	Scara3
Gpnmb	Sh3bgrl3
Gpr25	Slc12a9
Gpr3711	Slc25a34
Grm2	Slc29a4
Gstm1	Spp1
Gstm6	Spsb1
Hlfx	Ssbp4
H2-D1	Sstr4
H2-k1	Tfcp2l1
Hipk4	Thbs4
Hmox1	Thrsp
I830012016Rik	Tmem198
Icam1	Tpst2
Icam5	Trim30a
Ifit1	Ttr
Ifit3	Unc5a
Igfbp4	Ugcr11
Igfbpl1	Usp18
Irf7	Vwf
Irf9	Wfs1
Itpka	Xdh

【0125】

表3（下記）は、40 Hz の FS-PV 介在ニューロンの刺激によって下方制御された393の遺伝子を示す（Cufflinks 2.2ソフトウェア（ワシントン大学 Trapnell Lab、ワシントン州シアトルより入手可能）により $p < 0.05$ ）。

表3

10

20

30

40

50

40HzのFS-PV介在ニューロンの刺激によって下方制御された遺伝子		
1700003M02Rik	Galnt13	Prkcg
1700007K13Rik	Gap43	Prkg2
1700009P17Rik	Gatm	Prokr2
1700026D08Rik	Gdpd5	Prr5l
1700027A23Rik	Gfra1	Prrg4
1700028P14Rik	Gm6300	Ptgds
1700040L02Rik	Gm7609	Ptpn14
1700094D03Rik	Gm973	Pvrl2
1810041L15Rik	Gng8	Pyrl3
2310039L15Rik	Gpr115	Rab37
2410004P03Rik	Gpr123	Ramp3
3110047P20Rik	Gpr139	Ranbp3l
3632451006Rik	Gpr151	Rap1gap
4930451C15Rik	Gpr153	Rasgef1b
4932411L15	Gpr26	Rassf9
4932425I24Rik	Gpr4	Rbms3
5730508B09Rik	Gprasp2	Resp18
6330406I15Rik	Gpx3	Ret
A2m	Grb10	Rgs16
A330021E22Rik	Gria4	Rgs3
A630089N07Rik	Grid2ip	Rgs4
AF529169	Grin3a	Rgs6
AU021034	Grk4	Rims3
AW551984	Grm4	Rit2
Adamts15	Gucyla3	Rnf152
Adamts9	Hcn4	Robo1
Adbyp1	Hdc	Rorb
Adra1b	Hhip	Ros6ka6
Aebp1	Hivep1	Rsph1
Agt	Hs6st2	Rsph4a
Aif1l	Hsp90aa1	Rspo2
Ak4	Hsp90b1	Scn1a
Ak7	Hspa4l	Scubel
Akap12	Htr2c	Scube3
Amigo2	Htr5b	Sema3d
Amot1l	Htr7	Sema6a
Ankrd29	Hydin	Serpinf1
Ankrd34c	Inadl	Sgpp2
Anol	Igca	Sh3bgrl2

10

20

30

40

50

40 Hz の FS-PV 介在ニューロンの刺激によって下方制御された遺伝子		
Agp4	Igub	Shox2
Arhgap24	Irx1	Shroom3
Asb2	Irx2	Slc12a2
Aspa	Irx3	Slc17a6
Baiap3	Itga3	Slc38a1
Bbox1	Kcnc2	Slc39a4
Bmp7	Kcng4	Slc5a3
Btbd11	Kenip1	Slc5a7
C530008M17Rik	Kcni12	Slc6a9
Cacna2d2	Kcni16	Slc7a11
Calb2	Kcnma1	Slc9a4
Calr3	Kcnn3	Slco2a1
Camk2d	Kcnglot1	Slit2
Car10	Kctd12b	Slitrk6
Cast	Kctd8	Sneg
Cbln1	Kif9	Sntn
Cbln2	Kit	Socs2
Cbln4	Kit1	Sox5
Ccdc108	Klhl1	Spag16
Ccdc135	Lars2	Spata18
Ccdc136	Lbh	Spock1
Ccdc141	Lbp	Spock3
Ccdc153	Ldhd	Srgap1
Ccdc19	Lect1	St8sia2
Ccdc3	Lef1	Strbp
Ccdc40	Lhfp11	Sv2b
Ccdc81	Lhfp13	Synpo2
Cd109	Lhx9	Syt15
Cd24a	Lrguk	Syt4
Cdh26	Lrrc23	Syt6
Cdhr3	Lrrc48	Syt9
Cdr1	Lrrc55	Tac1
Cdr2	Malat1	Tac2
Chat	Mcf2	Tacr1
Chgb	Megf11	Tcf712
Chrd11	Mgat4c	Tekt1
Chrna3	Mlf1	Tex15
Chrna4	Mme	Tex9
Chrn3	Mob3b	Tgfb2
Chrn4	Mreg	Th

10

20

30

40

50

40HzのFS-PV介在ニューロンの刺激によって下方制御された遺伝子		
Cit	Mrvi1	Timp2
Cited2	Msi2	Tm4sf1
Clec18a	Mtfr1	Tmem130
Clic6	Mum1I1	Tmem132c
Cntn6	Musk	Tmem163
Cntnap4	Myb	Tmem176a
Cobl	Mycbpap	Tmem212
Coch	Myoc	Tmem56
Coll2a1	Ndn	Tnc
Col8a2	Necab1	Tnnt1
Cpne4	Necab2	Trhde
Cpne9	Necab3	Trim36
Dach1	Nexn	Trim66
Dcn	Nfam1	Trpc3
Dcd	Ngb	Trps1
Dnahc5	Nhlh2	Tsku
Dnahc6	Nppa	Ttc18
Dpp10	Npr1	Ttc21a
Dpy19l1	Nr4a2	Ttc39a
Dvnlrb2	Nrip3	Tyrp1
Ebfl	Nrp2	Ubxn10
Edil3	Nrsn2	Ugt8a
Efcab1	Ntng1	Unc13c
Efna5	Nudt4	Vangl1
Eif5a2	Olfm3	Vat1
Elavl2	Optn	Vat1l
Elavl4	Otx2	Vav2
Elfn1	Pamr1	Vav3
Emb	Pbx3	Vwa5b1
Enkur	Pcp4	Wbscr27
Eno4	Pesk1	Wdr16
Enox2	Pdp1	Wdr52
Epha8	Peg10	Wdr6
Epn3	Pgap1	Wdr78
Ermn	Pgbd1	Wdr96
Etv1	Phactr2	Wfikkn2
Exph5	Pirt	Wif1
Fabp7	Pkib	Wls
Fam149a	Plagl1	Wnt3
Fam196b	Plcb4	Ysk4

10

20

30

40

50

40 Hz の F S - P V 介在ニューロンの刺激によって下方制御された遺伝子		
Fam198b	Plch1	Zcchc12
Fam19a4	Plch2	Zdbf2
Fbln7	Plcx2	Zdhc22
Fgf1	Pld5	Zfhx3
Fgf10	Plekha7	Zfp474
Fhdc1	Plxnc1	Zfp618
Foxj1	Popdc3	Zfp941
Foxp2	Pou4f1	Zic1
Frem3	Ppp1r32	Zic2
Fstl5	Ppp1r36	Zic3
Fzd1	Prkcd	Zic4
Fzd10	Prkch	Zic5

10

【0126】

いくつかの実施形態では、上方制御された遺伝子は、下方制御された遺伝子より一般に高い発現値を有していた。図29は、いくつかの実施形態に従うEYFP及び40 Hz条件における上方ならびに下方制御された遺伝子のFPKM値を示す箱ひげ図である。箱は、中央値（箱内の黒線）及び四分位数（箱の上下）を示し、ひげは最小値及び最大値を表し、円は外れ値を表す。上方制御された遺伝子は、ミクログリアにおいて高度に濃縮された可能性がある。具体的には、すべての上方制御された遺伝子の約35%が、ミクログリアでそれらの最も高い発現を有していた（ニューロンで約19%、内皮細胞で約17%、星状細胞で約14%、髄鞘形成乏突起膠細胞で約9%、乏突起膠細胞前駆細胞で約5%、及び新たに形成された乏突起膠細胞で約1%）。

20

【0127】

図30は、いくつかの実施形態に従って、40 Hzの刺激後の特定された上方制御された遺伝子の細胞型特異的発現パターンを示す円グラフである。遺伝子FPKM値は、星状細胞、内皮細胞、ミクログリア、髄鞘形成乏突起膠細胞（MO）、ニューロン、新たに形成された乏突起膠細胞（NFO）、及び乏突起膠細胞前駆細胞（OPC）を含む様々な脳細胞型からの公開されているRNA-seqデータから算出した。従って、RNA-seq分析は、FS-PV介在ニューロンの1時間の40 Hzの刺激が、ミクログリアの細胞状態の変化を引き起こしたことを強く示唆しており、これは、これらの細胞がADの病変において役割を果たすという累積証拠を考慮すると重要である。

30

【0128】

いくつかの実施形態では、40 Hzの刺激がミクログリアに与える潜在的影響をさらに検討するため、異なる化学的及び遺伝的摂動下でミクログリア、末梢マクロファージ、ならびにニューロンからの一連の公開されているRNA-seqデータセットを、遺伝子セットエンリッチメント解析を用いて、本明細書のいくつかの実施形態に記載の特徴づけからの遺伝子リストと比較した。表4（下記）は、40 Hzの刺激による上方または下方制御された遺伝子と、異なる化学的及び遺伝的摂動下で公開されているニューロン、ミクログリア、及びマクロファージに特異的なRNA-seqデータの間の相関のGSEAに基づく統計的有意性を示す。

40

表4

50

振動トランスクリプトーム名	N E S	名目上の p 値	F D R q 値
MCSF処理ミクログリア	1.76	0.000	0.000
NMDA処理ニューロン	1.62	0.000	0.000
IL34処理ミクログリア	1.59	0.000	0.000
GMCSF処理ミクログリア	1.49	0.005	0.004
ビククリン処理ニューロン	1.49	0.016	0.013
ALS SOD1変異型ミクログリア	-1.26	0.050	0.028
LPS及びIFNg処理マクロファージ(M1)	1.18	0.122	0.081
MeCP2ヌルミクログリア	1.16	0.164	0.127
IL4処理マクロファージ(M2)	-1.19	0.101	0.147
ハンチントンHTT変異型ミクログリア	1.03	0.371	0.361
無菌ミクログリア	0.94	0.604	0.667
テトロドトキシン処理ニューロン	-0.76	0.941	0.970

10

【0129】

興味深いことに、40 Hzの刺激後のトランスクリプトームの変化は、神経活動の増加（NMDA及びビククリンによる）によるものと似ており、静止活動（テトロドトキシンによる）によるものとあまり似ていなかった。これらの知見は、FS-PV介在ニューロンの40 Hzの刺激がニューロンの活動を低下させないという観察をさらに支持する。さらに、ニューロンの活動によって上方制御されることが知られている前初期遺伝子Nr4a1、Arc、及びNpas4は、RNA-seq及びRT-qPCRの両方によって示される1時間の40 Hzの刺激後に上昇した。図31は、いくつかの実施形態に従って、RNA-seqデータセットにおける特定の遺伝子標的のRT-qPCR検証を示す棒グラフである。この棒グラフは、EYFP3102、及び40 Hzの刺激3104条件からの相対的なRNAレベル（発現比）を示す（スチューデントt検定により、1つのアスタリスクは $p < 0.05$ を示し、2つのアスタリスクは $p < 0.01$ を示し、3つのアスタリスクは $p < 0.001$ を示す。1群当たりのマウス $n = 3$ ）。最大の方制御された遺伝子は、Grin4及びCamk2dであった（例えば、図31参照、 $p < 0.05$ 、1群当たりのマウス $n = 3$ ）。

20

30

【0130】

加えて、このトランスクリプトームの結果は、ミクログリアのより多くの食作用状態を示唆する。いくつかの実施形態では、上方制御された遺伝子は、いずれもミクログリアのAβの取り込みを促進することが知られているマクロファージコロニー刺激因子（MCSF）及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GMCSF）によって誘導されるゲノム変化と正の相関があった。図32A及び32Bは、いくつかの実施形態に従って、40 Hzの光の点滅を見せている間に脳の上で再コード化された局所電場電位のパワースペクトル密度を示すプロットである。図32A及び32Bは、40 Hzでのパワーの増加を示さず、従って、この効果は記録機器に対する光電効果や電氣的雑音によるものではない（視覚野の記録を受ける3匹の5XFAD動物で4つの記録期ならびに海馬の記録を受ける2匹の5XFAD及び3匹のWTマウスで5つの記録期からの40 Hzの点滅周期 $n = 4$ 、2、1、1、17、42、36、55、53）。記録間の平均（実線）及び標準偏差（網掛け領域）を左側（図32A）及び動物ごとのものを右側（図32B）に示す。3未満の点滅周期の記録3202は、より多いデータの記録3204よりも雑音の多いパワースペクトル密度となったが、どれも40 Hzのピークの証拠を見せなかった。いくつかの実施形態では、RT-qPCRを実施し、既知のミクログリアの機能に關与する上方制御された遺伝子を検証した。ミクログリアの貪食に関連するCd68、B2m、Bst2、I

40

50

c a m 1、及び L y z 2 等の遺伝子が、40 Hz の刺激後、海馬 C A 1 領域で上方制御されることが確認された。

【0131】

図33は、いくつかの実施形態に従って、RNA-seqデータセットにおける特定の遺伝子標的のRT-qPCR検証を示す棒グラフである。図33は、EYFP3302及び40 Hz の刺激3304条件における相対的なRNAレベル（発現比）を示す（スチューデントt検定により1つのアスタリスクは $p < 0.05$ を示し、2つのアスタリスクは $p < 0.01$ を示し、1群当たりのマウス $n = 6$ ）。他の注目に値する上方制御された遺伝子には、ミクログリアに富んだ転写調節因子Irf7、細胞接着及び遊走調節因子Spp1、ならびにミクログリア増殖マーカーCsflr及びCsfr2aが含まれる（例えば、図33参照、スチューデントt検定により $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$ 、1群当たりのマウス $n = 6$ ）。RT-qPCRはまた、炎症性遺伝子Il6、Il1b（Il1 β ）、Itgam（CD11b）、及び抗炎症性遺伝子Igflの発現レベルが変わらないことを示した（例えば、図33参照、スチューデントt検定により $p > 0.05$ 、1群当たりのマウス $n = 6$ ）。従って、本明細書に記載のトランスクリプトームの結果は、40 Hz のニューロン刺激が、ミクログリアを、取り込みを促進する状態に誘導したことを示唆している。

【0132】

40 Hz の刺激が食作用関連遺伝子及び遊走／細胞接着関連遺伝子の両方を上方制御したという観察を考慮し、ミクログリア活性化の形態学的特徴を調べた。いくつかの実施形態では、1時間の40 Hz、ランダム、または無刺激（EYFPマウス）後、5XFAD／PV-Creマウス由来の海馬CA1切片のミクログリアを標識するため、ミクログリアのマーカーIba1を認識する抗体を使用した。図34は、EYFP、40 Hz、及びランダム刺激条件における5XFAD／PV-Creマウスの海馬CA1領域での抗Iba1 3402（019-19741）及び抗A β 3404（12F4）抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。画像は、40倍の対物レンズで撮影した（スケールバー＝50 μ m）。矢印は、細胞体中の+Iba1／+A β シグナルを示す。

【0133】

図35Aは、いくつかの実施形態に従って、EYFP及び40 Hz 条件でのミクログリアの数を示す棒グラフである（1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）。図35Bは、いくつかの実施形態に従って、EYFP、40 Hz、及びランダム刺激条件におけるEYFPに対して正規化されたミクログリア細胞体の直径を示す棒グラフである（1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）。図35Cは、EYFP、40 Hz、及びランダム刺激条件であるEYFP、40 Hz、及びランダムにおけるEYFPに対して正規化されたミクログリアの一次過程または突起の平均長さを示す棒グラフである。図35Dは、いくつかの実施形態に従って、EYFP及び40 Hz の刺激条件におけるA β 陽性でもあるIba1陽性（ミクログリア）細胞体の割合を示す棒グラフである（4匹のマウス群から切片 $n = 2$ ）。一元配置分散分析により、注記「n. s.」3502は有意でないことを示し、2つのアスタリスク3504は $p < 0.01$ を示し、3つのアスタリスク3506は $p < 0.001$ を示し、4つのアスタリスク3508は $p < 0.0001$ を示す。

【0134】

第一に、1条件当たり6匹の動物におけるIba1＋ミクログリア数を数えたところ、未刺激のEYFP条件（ROI当たり平均8個のミクログリア細胞）（例えば、図34及び35A参照、一元配置分散分析により $p < 0.01$ 、1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）ならびにランダム条件（ROI当たり平均10個のミクログリア細胞）（例えば、図34及び35A参照、一元配置分散分析により $p < 0.05$ 、1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）と比較して、40 Hz 群で約2倍の数のミクログリア細胞が認められた（212.55 μ m $\times$ 212.55 μ mの目的領域（ROI）当たり15個のミクログリア細胞）。先行研究では、食細胞ミクログリアの2つの主な特徴は、細胞体のサイズの増加及び過程の長さの減少であることが示された場合があり、従って、これらの特徴が

どのように40 Hzの刺激によって影響を受けたかを調べた。いくつかの実施形態では、視野内の明確に標識されたIba1+細胞体の各々の直径を測定した。ミクログリア細胞体の直径は、40 Hzの刺激後、無刺激と比較して135.3%増加し、ランダム条件と比較して138.7%増加したことが分かった（例えば、図34及び35B参照、一元配置分散分析により $p < 0.0001$ 、1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）。各条件におけるミクログリアの一次過程の長さを測定したところ、40 Hzの刺激条件での一次ミクログリア過程の長さにおいてEYFP対照と比較して54.0%の減少及びランダム刺激と比較して38.5%の減少が観察された（例えば、図34及び35C参照、一元配置分散分析により $p < 0.0001$ 、1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）。これらの知見は、条件間でのIba1の発現の差が本明細書に記載の遺伝子発現分析で認められなかったことから、Iba1レベルによっては影響を受けなかった（例えば、表2及び3参照）。従って、40 Hzの刺激後に観察された細胞体のサイズの増加及び過程の長さの減少は、これらミクログリアの貪食状態へのシフトと一致する形態学的変化である。A β 抗体（12F4、これはAPPと交差反応しない）による共免疫染色時、ミクログリア内のA β の潜在的共局在化を、ミクログリアのA β の取り込みを評価する方法として評価した。Iba1+細胞が主に位置するCA1神経網において、細胞体のA β /Iba1共局在化のミクログリアの数（ImageJ、Fuji共局在化プラグイン）のミクログリアの総数に対する比は、40 Hzの刺激後、EYFPと比較して54.9%増加し、ランダム条件と比較して50.3%増加した（例えば、図34及び35C参照、一元配置分散分析により $p < 0.01$ 、1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）。ミクログリア過程におけるIba1/A β シグナルの重なりは、潜在的にランダムな非貪食共局在化を含めることを避けるために除外した。

【0135】

いくつかの実施形態では、ミクログリア内のA β シグナルの存在のより良好な解決法を提供するため、この組織からのミクログリアの3Dレンダリング及びこれらのレンダリングからの映像を形成した。図36は、いくつかの実施形態に従って、0度3602、Y軸の周りに-25度3604、及びX軸の周りに30度3606回転した図34の免疫蛍光画像を統合して形成された一連の3Dレンダリングである。画像は、40倍の対物レンズで撮影した（スケールバー=50 μ m）。全体として、遺伝子発現及び形態学的分析は、40 Hzの刺激が、ミクログリア細胞の刺激部位への動員を増加させ、それらの貪食活性を高めることによってミクログリア活性に影響を与え、A β との結合の増加をもたらすことを示唆している。重要なことには、いくつかの実施形態では、Hoechstによる核染色を用いてCA1細胞層の厚さを測定することによるニューロンの損失の証拠は見られなかった。平均CA1体積は、EYFP及び40 Hzの刺激群間で有意な差はなかった。

【0136】

図37Aは、いくつかの実施形態に従って、EYFP及び40 Hzの刺激条件で、5XFAD/PV-Creの海馬CA1領域におけるHoechstによる免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。図37Bは、いくつかの実施形態に従って、EYFP及び40 Hzの刺激条件における5XFAD/PV-Creの推定されるCA1厚さを示す棒グラフである（1群当たりのマウス $n = 4$ 、スチューデントt検定により、「n.s.」は有意でないことを示す）。

【0137】

次に、AAV-DIO-ChR2-EYFPに感染し、40 HzのFS-PV+刺激（処理）または対照の刺激（CTRL）で刺激された5XFADマウスにおける差次的遺伝子発現を、いくつかの実施形態に従う1時間の刺激後の海馬CA1のゲノムワイドRNA-seqによって評価した。図38Aは、いくつかの実施形態に従って、処理またはCTRL時の海馬CA1のゲノムワイドRNA-seqによって決定された523の差次的に発現される遺伝子（DEG）を示すヒートマップである。図38Aの各列はDEGを表し、図38Aのカラムは、3匹の個々の対照動物及び3匹の個々の処理（40 HzのFS-PV+刺激）動物のトランスクリプトームのプロファイルを表す。

【0138】

図38Bは、いくつかの実施形態に従って、図38Aの処理条件において上方制御されたDEG間の重なりを示す図である。図38Bでは、FS-PV+の40Hzの刺激を介したガンマ振動の誘導が、免疫蛍光で測定して、ランダムなFS-PV+刺激と比較してIba1レベルを低減する（1群当たりのマウスn=3、p=0.006）。図38Bは、処理条件で上方制御された遺伝子が、抗炎症性ミクログリア活性化によって上方制御されたミクログリア遺伝子（すなわち、MCSF遺伝子）と有意に特異的に重複することを示す。遺伝子は、ミクログリア細胞で、星状細胞、内皮細胞、髄鞘形成乏突起膠細胞（MO）、ニューロン、新たに形成された乏突起膠細胞（NFO）、及び乏突起膠細胞前駆細胞（OPC）におけるよりも大きく上方制御された。表5（下記）は、上方制御された遺伝子のミクログリア／マクロファージ経路を示す。

表5

振動トランスクリプトーム名	NES	名目上のp値	FDR q値
MCSF処理ミクログリア	1.76	0.000	0.000
IL34処理ミクログリア	1.59	0.000	0.000
GMCSF処理ミクログリア	1.49	0.005	0.004
LPS及びIFN γ 処理マクロファージ(M1)	1.18	0.122	0.081
IL4処理マクロファージ(M2)	-1.2	0.101	0.147

【0139】

いくつかの実施形態に従って、RT-qPCRを実施し、RNA-seqデータセットから特定の遺伝子標的を検証した。図39は、いくつかの実施形態に従って、図38AのRNA-seqデータセットにおける特定の遺伝子標的のRT-qPCR検証を示す棒グラフである。具体的には、図39は、遺伝子CSF1、CSF1R、IL-6、IL1-Beta、CD11b、CYBA、Hmox1、H2-K1、Lgals3、及びIcam1等の対照及び処理条件における特定の遺伝子標的の発現比（GAPDHに対して正規化）を示す。

【0140】

図40は、いくつかの実施形態に従って、図38Aの上方制御された遺伝子が関連する生物学的過程を示すプロットである。重要なことには、図40の上方制御された遺伝子は、免疫関連の過程と特異的に関連している。上方制御された遺伝子は、リンパ球介在、適応免疫、及び免疫グロブリン介在過程を含めた免疫関連の生物学的過程に属していた。図41は、いくつかの実施形態に従って、図38Aの下方制御された遺伝子が関連する生物学的過程を示すプロットである。図41に示すように、下方制御された遺伝子は、細胞運動、細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、運動器官の行動、及びニューロンの突起を含めた生物学的過程に属していた。

【0141】

図42Aは、いくつかの実施形態に従って、対象の海馬のCA1領域の異なる型の刺激後のIba1のレベルを示す一連の免疫蛍光画像である。図42Bは、いくつかの実施形態に従って、図42Aの免疫蛍光画像に対する平均強度値を示す棒グラフである。図42Aは、エンドソームレベルが、ガンマリズムの光遺伝学的増強によって低減されることを示す。FS-PV+の40Hzの刺激を介したガンマ振動の誘導が、免疫蛍光によって測定されるように、EEA1（エンドソームのマーカー）のレベルを低減した（1群当たりのマウスn=3、p=0.08）。この結果は、エンドソームレベルの増加はAPPのプロセッシング、ひいてはA β の産生の増加を示すことから、ガンマ振動が、ADのマウスモデルにおいてA β の産生を低減することを示した。

【0142】

総合すれば、本試験の結果は、ADのマウスモデルにおいて、ガンマリズムの回復または誘導が分子病態を回復させることを示した。光遺伝学による細胞型特異的な及び時間的に正確なガンマ振動の再導入は、凝集してADの神経病理学に關与する多くの変性カスケードを開始するペプチドであるアイソフォームA β ₁₋₄₀及びA β ₁₋₄₂の生成を低減し、かつこれらのクリアランスを高めた。さらに、この処理は、神経変性に関連する免疫機構に対抗する抗炎症ミクログリアシグナル伝達経路を誘導した。

【0143】

いくつかの実施形態によれば、細胞型特異的で時間的に制御されたガンマ振動は、海馬、視覚野、パレル皮質、及び／または聴覚野において光遺伝学なしで誘導され得る。

【0144】

ガンマ周波数での視覚刺激は、視覚野において非侵襲的にガンマ振動を駆動した。

40 Hzでの光遺伝学的刺激によってA β レベルが強く低下したことで、脳において40 Hzの振動を誘導する他の方法を探索し、この効果が光遺伝学的操作または侵襲的方法に何らかの形で特異的ではないことを確かめるに至った。光の点滅が視覚野において40 Hzの振動を誘導する非侵襲的方法として使用できるかどうかを調べるため、いくつかの実施形態では、動物を暗周期と交互配置された40 Hzまたはランダムな点滅、及び連続光の周期に曝露した。

【0145】

図43Aは、いくつかの実施形態に従って、光の点滅刺激に曝露されたマウスを示す概略図である。この光の点滅がA β を変更するかどうかを判定するため、本明細書に記載のA β を減少させた光遺伝学的刺激の期間と一致する1時間、動物を40 Hzの光の点滅に曝露した。光の点滅は、動物の視界全体を覆った。分子及び細胞アッセイの対照として、3か月齢の5XFADマウスを3日間恒暗に維持したか、1時間恒明もしくは20 Hzの点滅光、または80 Hzの点滅光で処理した（例えば、図43A参照）。

【0146】

図43Bは、いくつかの実施形態に従って、40 Hzの光の点滅の前及び最中の視覚野における局所電場電位トレースならびにパワースペクトル密度のプロットを含む。パワースペクトル密度の平均（実線）及び標準偏差（網掛け領域）を、視覚野において40 Hzの光の点滅4302、ランダムな光の点滅4304、または暗4306の期間中で示す（5つの記録期から5XFADマウスn=4）。図43C～43Fは、いくつかの実施形態に従って、それぞれ40 Hzの光の点滅、ランダムな光の点滅、恒暗、及び恒明の過程で、各マウスに対して各記録期の視覚野における局所電場電位のパワースペクトル密度を示すプロットである（47、51、61、49、16の40 Hzの点滅、47、50、64、50、16のランダムな点滅、279、302、382、294、93の暗、及び47、50、64、49、15の明周期で、4匹の5XFADマウスからの記録n=5）。視覚野において、40 Hzでの光の点滅は、40 HzでLFPのパワーを増大させ（例えば、図43B及び43C参照）、一方、ランダム間隔の光の点滅及び暗黒は増大させない（例えば、図43B、43D、及び43E参照）ことが分かった。

【0147】

図44Aは、いくつかの実施形態に従って、4サイクルの40 Hzの光の点滅に関する時間の関数及びランダムな光の点滅に関する同等の期間の関数としての視覚野におけるスパイクの割合を示す一連のヒストグラムである。図44Aは、4サイクルの40 Hzの光の点滅に関する時間の関数4402またはランダムな光の点滅の同等の期間の関数4404としての視覚野におけるスパイクの割合のヒストグラムを示す（5つの記録期から5XFADマウスn=4、バーは平均を示し、エラーバーは動物間のSEMを示す）。上側のバーは、光がオン4406またはオフ4408の場合を示す。いくつかの実施形態では、スパイクは光がオンとオフに点滅するにつれて増加及び減少し、40 Hzの刺激の最中の40 Hzの周波数に同期されたスパイク位相をもたらした（図44Aのヒストグラム4402）が、ランダム刺激の最中には明らかな周波数は現れなかった（図44Aのヒストグラム4404）。

10

20

30

40

50

【0148】

図44Bは、いくつかの実施形態に従って、光の点滅の間の脳の上で記録された局所電場電位の一連の電気トレースである。いくつかの実施形態では、脳の直上の生理食塩水から記録した場合、40Hzの点滅の最中に40Hzのパワーに増加は見られず、この効果が光電効果や電氣的雑音によるものではないことを示した（例えば、図32及び44B参照）。光遺伝学的刺激と同様、ランダムな点滅は、光の点滅による活性の全体的な変化用の対照を提供した。

【0149】

図45Aは、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅及びランダムな光の点滅の間の発火率の差を示すヒストグラムである（4匹の5XFADマウスにおける5つの記録期から刺激周期 $n=226$ ）。図45Bは、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅、ランダムな光の点滅、暗、及び明周期中の視覚野におけるマルチユニット発火率を示すプロットである。図45Bは、視覚野におけるマルチユニット発火率を示す。箱ひげ図は、中央値（箱内の白線）及び四分位数（箱の上下）を示す。すべての動物において、発火率は40Hzの点滅及びランダムな点滅条件の間に有意な差はなく、このランダム刺激条件がスパイク活動の対照としての役割を果たすことを示した（4匹の5XFADマウスからの5つの記録期の各々に対する順位和検定、 $p>0.06$ 、中央値と四分位数を図に示す。記録当たり40Hzの点滅周期 $n=47, 51, 64, 49, 16$ 及びランダムな点滅周期 $47, 50, 64, 50, 16$ ）。40Hzの点滅及び明条件間で発火率に有意な差はなく、40Hzの光の点滅は、概してニューロンの過剰興奮性を引き起こさなかったことを示した（4匹の5XFADマウスからの5つの記録期の各々に対する順位和検定、4つの記録期について $p>0.2$ 、1つの記録期について $p<0.01$ 、これは複数の比較の実施に対して補正された場合に有意でない。中央値と四分位数を図に示す。記録当たりの40Hz周期 $n=47, 51, 64, 49, 16$ 及び明周期 $47, 50, 64, 49, 16$ ）。1つの期において、40Hzの刺激で暗条件におけるより活動が多かった。40Hz及びランダムな点滅周期間のマルチユニット発火率の差は、ゼロに近い傾向があった（例えば、45A参照）。また、これらの周期を動物内で比較すると、有意な差は見られなかった（例えば、図45B参照。4匹の5XFADマウスからの5つの記録期の各々に関する順位和検定、 $p>0.06$ 、中央値と四分位数を図に示す。記録当たりガンマ点滅周期 $n=47, 51, 64, 49, 16$ 及びランダムな点滅周期 $47, 50, 64, 50, 16$ ）。

【0150】

ガンマ周波数での視覚刺激は、視覚野においてA β レベルを低減する。

光遺伝学的方法の有効性を考慮して、翻訳的で非侵襲的なアミロイド低減処理を設計した。図46Aは、いくつかの実施形態に従う実験的パラダイムを示す概略図である。図46Aに示すように、ADモデルマウスの第一のサブセットを、40Hzの閃光灯を備えた第一のチャンバー4600に入れ、ADモデルマウスの第二のサブセットを、暗くしておいた第二のチャンバー4602に入れた。第一のチャンバー4600内の動物を約1時間、40Hzの閃光灯に曝露した。

【0151】

図46B及び46Cは、いくつかの実施形態に従って、図46Aの実験的パラダイム後、それぞれ、A β ペプチドアイソフォームA β_{1-40} 及びA β_{1-42} のベースラインレベルの変化をさらに示すプロットである。図46Bは、5XFADマウスの視覚野V1における40Hzの光の曝露が有意にA β_{1-40} 及びA β_{1-42} レベルを低下させたことを示す。A β_{1-40} 及びA β_{1-42} のレベルは、pg/mLとして示す（1群当たりの動物 $n=6$ ）。

【0152】

40Hzの光の点滅が40Hzの振動を一次視覚野で駆動し、40Hzの振動の光遺伝学的誘導が海馬のA β レベルを低下させたことを考慮すると、目的は、40Hzの光の点滅が視覚野においてA β レベルを低下させ得るかどうかを判定することとなった。これら

の実験のため、いくつかの実施形態では、発症前の3か月齢の5XFADマウスを用いた。これらマウスを暗箱に入れ、40Hzの光の点滅、恒明オン（明）、または恒明オフ（暗）のいずれかに1時間曝露した。

【0153】

図47A及び47Bは、いくつかの実施形態に従って、暗、明、40Hzの点滅、20Hzの点滅、80Hzの点滅、40Hzの点滅及びピクロトキシン（PTX）、ならびにランダムな点滅条件において、それぞれ、5XFADの視覚野における $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のベースラインレベルの変化を示す棒グラフである（暗については1群当たりのマウス $n=12$ 、明、40Hzの点滅、20Hzの点滅、80Hzの点滅、及びPTXについては1群当たりのマウス $n=6$ 、ランダムな点滅については1群当たりのマウス $n=4$ 、一元配置分散分析により、「n.s.」は有意でないことを示し、1つのアスタリスクは $p<0.05$ を示し、2つのアスタリスクは $p<0.01$ を示す）。図47及び47Bは、平均及びSEMを示す。棒グラフのバーに重ねられた円は、各群の個々のデータ点を示す。露光の1時間後、暗条件と比較して、視覚野における $A\beta_{1-40}$ レベルは57.96%低下し、 $A\beta_{1-42}$ レベルは57.97%低下したことが観察された（ $A\beta$ のELISAにより測定。例えば、図47A及び47B参照。一元配置分散分析により $p<0.05$ 。1群当たりのマウス $n=6$ ）。明対照と比較して、40Hzの点滅1時間後では、アミロイドレベルは62.47%（ $A\beta_{1-40}$ ）及び68.55%（ $A\beta_{1-42}$ ）減少した（ $A\beta$ のELISAにより測定。例えば、図47参照。一元配置分散分析により $p<0.05$ 。1群当たりのマウス $n=6$ ）。さらに、この効果は、20Hz、80Hz、またはランダムな点滅のいずれも暗及び明対照と比較して有意に $A\beta$ レベルを低減しなかったことから、40Hzの点滅に特異的であった（例えば、図47参照。「n.s.」は有意でないことを示す。1群当たりのマウス $n=6$ ）。

【0154】

いくつかの実施形態では、局所的な特異性を試験するため、体性感覚バレル皮質（BC）における $A\beta$ レベルを調べたところ、有意な差は見られなかった。図48Aは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件下での5XFADのバレル皮質における相対的な $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のレベルを示す棒グラフである（1群当たりのマウス $n=3$ 。スチューデントt検定により「n.s.」は有意でないことを示す）。5XFADマウスを少量のGABA-Aアンタゴニスト（ピクロトキシン、0.18mg/kg、これはてんかん性活動を誘導しない）で前処理したところ、40Hzの点滅の $A\beta$ レベルに対する効果は完全に無効になり、十中八九FS-PV介在ニューロンからのGABA作動性シグナル伝達が本効果に必要であることを示した（例えば、図47参照。「n.s.」は有意でないことを示す。1群当たりのマウス $n=6$ ）。

【0155】

この効果が5XFADマウスに特異的でないことを示すため、この結果を、異なるADモデルであるAPP/PS1マウス、すなわち、2つの家族性AD変異（APPスウェーデン型及びPSEN1デルタE9）を有する十分に検証されたモデルで再現した。図48Bは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件下でのAPP/PS1の視覚野における $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のベースラインレベルの変化を示す棒グラフである（暗条件については1群当たりのマウス $n=5$ 及び40Hzの点滅条件については1群当たりのマウス $n=4$ 。スチューデントt検定により「n.s.」は有意でないことを示し、1つのアスタリスクは $p<0.05$ を示す）。

【0156】

図48Cは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件下でのWTの視覚野における $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のベースラインレベルの変化を示す棒グラフである（暗条件については1群当たりのマウス $n=11$ 及び40Hzの点滅条件については1群当たりのマウス $n=9$ 。スチューデントt検定により1つのアスタリスクは $p<0.05$ を示す）。いくつかの実施形態では、40Hzの点滅処理後のAPP/PS1マウスにおいて、20.80%で有意に低下した $A\beta_{1-40}$ 及び37.68%で減少傾向の $A\beta$

10

20

30

40

50

1-42が見出されたが、後者は暗条件と有意差がなかった（例えば、図48B参照。スチューデントt検定により $A\beta_{1-40}$ $p < 0.05$ 、 $A\beta_{1-42}$ $p < 0.09$ 、すなわち有意でない。暗条件については1群当たりのマウス $n = 5$ 、40Hzの点滅については1群当たりのマウス $n = 4$ ）。加えて、老齢WTマウスでは、40Hzの点滅1時間後に内因性のマウス $A\beta_{1-40}$ の58.2%の低下が見られた（例えば、図48C参照。スチューデントt検定により $p < 0.05$ 。暗マウス $n = 11$ 及び40Hzの点滅マウス $n = 9$ ）。 $A\beta_{1-42}$ は、これら動物の点滅及び対照群の両方で検出可能レベル未満であった。WT動物における内因性マウス $A\beta_{1-40}$ の低下は、これらの結果がTgのAPP発現や変異型APPに限定されない可能性があることを明らかにし、むしろ、それらは、その内因性プロモーターが駆動する発現を伴うAPPから産生される $A\beta$ にまで及ぶ可能性がある。図48A～48Cは、平均及びSEMを示す。

【0157】

次に、いくつかの実施形態では、40Hzの点滅が視覚野においてミクログリア活性を変更するかどうかに関する調査を、40Hzの光遺伝学的なFS-PV介在ニューロンの刺激が海馬CA1のミクログリアを変更した方法と同じ方法で実施した。図49は、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件下での5XFADの視覚野に抗Iba1（019-19741）及び抗 $A\beta_{4904}$ （12F4）抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。画像は、40倍の対物レンズで撮影した（スケールバー＝50 μ m）。右：120倍ズーム、矢印は細胞体における+Iba1/+ $A\beta$ シグナルを示す。

【0158】

図50Aは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件におけるミクログリア数を示す棒グラフである（1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ 。スチューデントt検定により「n.s.」は有意でないことを示す）。図50Bは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件における対照に対して正規化されたミクログリア細胞体の直径を示す棒グラフである（1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ 。スチューデントt検定により2つのアスタリスクは $p < 0.01$ を示す）。図50Cは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件における対照に対して正規化されたミクログリアの一次過程の平均長さを示す棒グラフである（1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ 。スチューデントt検定により4つのアスタリスクは $p < 0.0001$ を示す）。図50Dは、いくつかの実施形態に従って、暗及び40Hzの点滅条件下での $A\beta$ 陽性でもあるIba1陽性（ミクログリア）細胞体の割合を示す棒グラフである（1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ 。スチューデントt検定により2つのアスタリスクは $p < 0.01$ を示す）。図50A～50Dは平均及びSEMを示す。

【0159】

いくつかの実施形態では、Iba1を用いて40Hzの点滅または暗条件の1時間後、5XFADマウスの視覚野切片においてミクログリアを標識した（例えば、図49参照）。ミクログリアの数は暗及び40Hzの点滅条件間で差はなかった（例えば、図49及び50A参照。「n.s.」は有意でないことを示す。1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）が、ミクログリア細胞体の直径は、視覚野において40Hzの点滅後、暗対照と比較して65.8%増加した（例えば、図49及び50B参照。スチューデントt検定により $p < 0.01$ 。1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）。ミクログリアの一次過程の長さは、40Hzの点滅条件において暗対照と比較して37.7%減少した（例えば、図49及び50C参照。スチューデントt検定により $p < 0.0001$ 。1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）。視覚野のミクログリアは貪食活性の増強を示す形態を有することから、いくつかの実施形態では、 $A\beta$ を有するミクログリアの数を調べた。本実験のため、視覚野の切片をIba1及び $A\beta$ （12F4）抗体で共標識した。細胞体内における $A\beta$ /Iba1の共局在化は、40Hzの点滅条件で33.5%増加し、これは、40Hzの点滅が暗対照条件より多くの $A\beta$ を有するミクログリアをもたらすことを示した（例えば、図49及び50D参照。スチューデントt検定により $p < 0.01$ 。1群当たり4

匹のマウスから切片 $n = 2$)。

【0160】

いくつかの実施形態では、ミクログリアにおける形態学的変化のより良好な解決法を提供するため、CLARITYを用いて視覚野の $100\ \mu\text{m}$ 切片からミクログリアの3Dレンダリングを形成し、これらのレンダリングから映像を形成した。図51は、 $0^\circ 5102$ 、X軸の周りに $45^\circ 5104$ 、及びY軸の周りに $45^\circ 5106$ 回転したCLARITY処理された $100\ \mu\text{m}$ の組織片からの暗及び $40\ \text{Hz}$ の点滅条件下でのIba+ミクログリアの一連の3Dレンダリング（免疫蛍光画像から）である。画像は63倍の対物レンズで撮影した（スケールバー = $15\ \mu\text{m}$ ）。最後に、5XFADマウスでミクログリアが実際にA β を貪食することを示すため、5XFAD及びWT動物由来のミクログリアを、蛍光活性化細胞分類（FACS）を用いて精製し、A β レベルをELISAにより分析した。

10

【0161】

図52Aは、いくつかの実施形態に従って、蛍光活性化細胞分類（FACS）を用いて視覚野からミクログリアを単離する方法を示す流れ図である。視覚野を切断し、その後単一細胞を懸濁し、CD11b及びCD45抗体で標識した。続いて、細胞を蛍光活性化細胞分類（FACS）により分類し、溶解した。A β_{1-40} レベルをELISAにより分析した。図52Bは、いくつかの実施形態に従って、図52Aの方法を用いて3か月齢の5XFAD及びWT対照動物の視覚野から単離されたミクログリアにおけるA β_{1-40} のレベルを示す棒グラフである（5XFADについては1群当たりのマウス $n = 8$ 及びWTマウスについては1群当たりのマウス $n = 4$ 。スチューデントt検定により1つのアスタリスクは $p < 0.05$ を示す）。棒グラフのバーに重ねられた円は、各群の個々のデータ点を示す。

20

【0162】

図53Aは、いくつかの実施形態に従って、暗及び $40\ \text{Hz}$ の点滅条件下での3か月齢の5XFADの視覚野におけるシナプトフィジンを検出するためのSV38抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。画像は、40倍の対物レンズで撮影した（スケールバー = $50\ \mu\text{m}$ ）。右：100倍の暗及び $40\ \text{Hz}$ の点滅条件。図53Bは、いくつかの実施形態に従って、暗及び $40\ \text{Hz}$ の点滅条件後の5XFADの視覚野の相対的なSV38の強度レベルを示す棒グラフである（1群当たりのマウス $n = 4$ 。スチューデントt検定により「n.s.」は有意でないことを示す）。

30

【0163】

A β のミクログリア特異的レベルは、WT対照と比較して5XFAD動物で有意に高く、5XFADマウスでは $27.2\ \text{pg}/10^4$ ミクログリアのレベルであり、WT対照マウスでは $9.78\ \text{pg}/10^4$ ミクログリアのレベルであることが分かった（例えば、図52A及び52B参照。スチューデントt検定により $p < 0.05$ 。5XFADについては $n = 8$ 及びWTマウスについては $n = 4$ ）。A β_{1-42} は、これら動物において点滅及び対照群の両方について検出可能レベル未満であった。全体として、 $40\ \text{Hz}$ の刺激が誘導する視覚野におけるミクログリアの形質転換は、海馬CA1において生じたそれと同様に見えた。さらに、シナプトフィジンレベルは暗条件と $40\ \text{Hz}$ の点滅条件間で変化せず、ミクログリアの活性化がシナプスの貪食を有意に増加させないことを示した（例えば、図53A及び53B参照。「n.s.」は有意でないことを示す。1群当たり4匹のマウスから切片 $n = 2$ ）。総合すれば、本明細書に開示のデータは、感覚刺激を介して非侵襲的に誘導された $40\ \text{Hz}$ の振動が、ADマウスモデルにおいて効果的にA β の存在量を低減し、ミクログリア/A β 相互作用を促進し得ることを示している。さらに、 $40\ \text{Hz}$ の刺激は、2つの異なる脳回路においてA β を低減する可能性があり、このことが、ガンマ振動が様々な脳領域でアミロイドの存在量を低減し、ミクログリアの食作用を高める一般的機構を示唆している。

40

【0164】

さらなる実験において、暗（光なし）、 $20\ \text{Hz}$ の閃光、 $40\ \text{Hz}$ の閃光、または 80

50

H z の閃光への曝露 1 時間後、 $A\beta_{1-42}$ レベルを評価した。ここで、20 H z と 80 H z は 40 H z の高調波である。しかしながら、40 H z の閃光の点滅のみが $A\beta_{1-42}$ のレベルを有意に低減した。図 5 4 A は、いくつかの実施形態に従うガンマ振動での対象の視覚野の刺激後の $A\beta$ ペプチドアイソフォーム $A\beta_{1-42}$ の減少を示す棒グラフである。
【0165】

別の試験を実施し、 $A\beta_{1-42}$ のレベルの低下のタイミングを評価した。1 時間、マウスを光なしまたは 40 H z の閃光のいずれかに曝露した。 $A\beta_{1-42}$ のレベルを 1 時間の処理後、及び再度処理終了後 24 時間で測定した。図 5 4 B は、いくつかの実施形態に従うガンマ振動での対象の視覚野の刺激後、及びさらに刺激後 24 時間の $A\beta$ ペプチドアイソフォーム $A\beta_{1-42}$ のレベルを示す棒グラフである。 $A\beta$ レベルは処理後 24 時間で依然として低下していたが、この低下は処理直後より小さかった。

【0166】

ガンマ周波数での視覚刺激は、海馬における $A\beta$ のレベルに影響を与えなかった。

光の点滅による視覚刺激が AD に関与する脳回路に影響を与えるかどうかを判定するため、いくつかの実施形態では、海馬、すなわち、ヒトにおいて AD の経過の初期に影響を受ける脳領域の 1 つに対する光の点滅の影響を調べた。図 5 5 A は、いくつかの実施形態に従って、40 H z の光の点滅 5502 の前及び最中での海馬における局所電場電位の電気トレースならびにパワースペクトル密度のプロットを含む。CA1 における暗 5504、40 H z の光の点滅 5506、及びランダムな光の点滅 5508 の間のパワースペクトル密度の平均（実線）及び標準偏差（網掛け領域）（5XFAD マウス $n=2$ 及び WT マウス 3）。

【0167】

図 5 5 B は、いくつかの実施形態に従って、それぞれ、4 サイクルの 40 H z の光の点滅に関する時間の関数 5510 及びランダムな光の点滅に関する同等の期間の関数 5512 としての海馬におけるスパイクの割合の一連のヒストグラムである（5XFAD マウス $n=2$ 及び WT マウス 3、バーは平均を示し、エラーバーは動物間の SEM を示す）。上側のバーは、光がオン（白）またはオフ（黒）の場合を示す。ランダム刺激については、スパイクは、光のオンの開始と合わせ、さらなる光の周期は、グレーが示すランダムな間隔で行った。視覚野において本明細書に開示した CA1 における光の点滅の効果を調べる方法と同じ方法を用いて、40 H z での光の点滅が 40 H z で記録された LFP におけるパワーを増加させる（例えば、図 5 5 A 及び図 5 5 B のグラフ 5510 参照）が、ランダムな間隔の光の点滅（ランダムな点滅）及び暗は増加させない（例えば、図 5 0 D、図 4 3 C のグラフ 4310 参照）ことが見出された。スパイクは、40 H z の刺激の間の 40 H z の点滅周波数によっても変調されるが、しかしながら、この変調は、視覚野におけるよりも小さく見えた（例えば、図 5 5 B、海馬、図 4 4 A、視覚野参照）。

【0168】

図 5 6 A は、いくつかの実施形態に従って、40 H z の光の点滅及びランダムな光の点滅の間の発火率の差を示すヒストグラムである（2 匹の 5XFAD 及び 3 匹の WT マウスにおいて 5 つの記録期からの刺激周期最低 $n=168$ ）。図 5 6 B は、いくつかの実施形態に従って、40 H z の光の点滅 5604、ランダムな点滅 5605、暗 5602、または明 5608 周期の間の CA1 におけるマルチユニット発火率を示すプロットである。箱ひげ図は、中央値（箱内の白線）及び四分位数（箱の上下）を示す。すべての動物において、40 H z の点滅及びランダムな点滅条件の間の発火率に有意な差はなく、このランダム刺激条件がスパイク活動の対照としての役割を果たすことを示した（2 匹の 5XFAD 及び 3 匹の WT 動物からの 5 つの記録期の各々に対する順位和検定、 $p>0.2$ 、中央値と四分位数を図に示す。記録当たりの 40 H z の点滅周期 $n=22$ 、54、42、71、55 及びランダムな点滅周期 12、34、32、54、36）。40 H z の点滅及び明条件間で発火率に有意な差はなく、40 H z の光の点滅は、概してニューロンの過剰興奮性を引き起こさなかったことを示した（2 匹の 5XFAD 及び 3 匹の WT 動物からの 5 つの記録期の各々に対する順位和検定、 $p>0.3$ 。中央値と四分位数を図に示す。記録

当たりの40Hz周期 $n = 22$ 、54、42、71、55及び明周期12、34、32、54、35)。

【0169】

視覚野におけるように、40Hzとランダムな点滅周期の間のマルチユニット発火率の差はゼロに近い傾向があった(例えば、図56A参照)。また、これらの周期を動物内で比較すると、有意な差は見られなかった(例えば、図56B参照。4匹の5XFADマウスからの5つの記録期の各々に関する順位和検定、 $p > 0.06$ 、中央値と四分位数を図に示す。記録当たりの40Hzの点滅周期 $n = 22$ 、54、42、71、55及びランダムな点滅周期12、34、32、54、36)。

【0170】

いくつかの実施形態では、視覚野において用いた方法と同じ方法を用いて、海馬における $A\beta$ のレベルに対する視覚の光の点滅の影響を調べた。いくつかの実施形態に従って、図57Aは、5XFADの視覚野における相対的な $A\beta_{1-40}$ のレベルを示す棒グラフであり、図57Bは、5XFADの視覚野における相対的な $A\beta_{1-42}$ のレベルを示す棒グラフである(1群当たりのマウス $n = 4$ 。「n.s.」は有意でないことを示す)。視覚野において観察されたことは対照的に、CA1では、40Hzの点滅またはランダムな刺激の1時間後の $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のレベルに有意な差は見られなかった。40Hzの点滅またはランダムな点滅後の $A\beta$ レベルは暗条件と有意差がなかった。 $A\beta_{1-40}$ のレベルは、40Hz及びランダムな点滅後、暗条件のそれぞれ、108.4%及び96.82%であり、 $A\beta_{1-42}$ のレベルは、40Hz及びランダムな点滅後、暗条件のそれぞれ、118.8%及び92.15%であった(例えば、図57A及び57B参照。「n.s.」は有意でないことを示す。1群当たりのマウス $n = 4$)。従って、40Hzの光の点滅1時間では、海馬における $A\beta$ のレベルを有意に低減しなかった。

【0171】

ガンマ周波数での長期的視覚刺激は、視覚野における斑負荷を減少させた。

40Hzの振動が光遺伝学的に、または光の点滅を介した視覚刺激によってのいずれかで駆動された場合に、前斑5XFADマウスにおいて影響を受けたアミロイド存在量を調べ、本明細書に開示してきた。次に、目的は、この処理がすでに斑負荷を示している動物に有効であるかどうかを判定することとなった。この目的で、いくつかの実施形態では、6か月齢の5XFADマウスを用いたが、これは、それらが視覚野を含む多くの脳領域において広範囲のアミロイド斑病変を発症するためである。非侵襲的ガンマ刺激後、進行した $A\beta$ 関連の病変に何が起こるかを調べるための試験を実施した。40Hzの点滅1時間に反応した $A\beta$ 減少の期間を調べるため、いくつかの実施形態では、 $A\beta$ レベルを視覚野において、40Hzの点滅または暗条件1時間の4、12、及び24時間後に測定した。

【0172】

図58A及び58Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間の暗または40Hzの点滅処理後1、4、12、及び24時間での5XFADの視覚野における、それぞれ相対的な $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のレベルを示す棒グラフである(4及び12時間の待機については1群当たりのマウス $n = 4$ 、1及び24時間の待機については $n = 6$ 、暗処理については $n = 12$ 。一元配置分散分析により「n.s.」は有意でないことを示し、1つのアスタリスクは $p < 0.05$ を示し、2つのアスタリスクは $p < 0.01$ を示す)。この結果は、4時間後、暗対照と比較して、 $A\beta_{1-40}$ のレベルは63.4%低下し、 $A\beta_{1-42}$ のレベルは63.2%低下したことを示した(例えば、図58参照。 $p < 0.01$ 。1群当たりのマウス $n = 4$)。12時間までに、 $A\beta_{1-40}$ のレベルは、50.9%減少した一方、 $A\beta_{1-42}$ のレベルは、暗対照と有意差はなかった(例えば、図58参照。「n.s.」は有意でないことを示し、 $p < 0.01$ 。1群当たりのマウス $n = 4$)。最後に、1時間の40Hzの点滅処理後24時間で、可溶性 $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のレベルは、暗対照条件と比較して、40Hzの点滅で有意差はなかった(例えば、図58参照。「n.s.」は有意でないことを示す。24時間について1群当たりのマウス $n = 6$ 及び暗条件について1群当たりのマウス $n = 4$)。これらの結果は、40Hzの点滅処

理の効果が一時的であることを示している。

【0173】

従って、進行した斑病変を破壊するため、いくつかの実施形態では、マウスを毎日1時間で7日間、40 Hzの点滅、または対照については暗条件で処理した。図59Aは、いくつかの実施形態に従って、1日当たり1時間の点滅に7日間曝露された6か月齢のマウスを示す概略図である。図59Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗または40 Hzの点滅条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野における相対的な $A\beta_{1-42}$ のレベルを示す棒グラフである（1群当たりのマウス $n=13$ 。2つのアスタリスクは $p<0.01$ を示し、3つのアスタリスクは $p<0.001$ を示す。スチューデントt検定）。図59Cは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗条件または40 Hzの点滅条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野における相対的な $A\beta_{1-40}$ のレベルを示す棒グラフである（1群当たりのマウス $n=13$ 。スチューデントt検定により、1つのアスタリスクは $p<0.01$ を示し、2つのアスタリスクは $p<0.01$ を示す）。図59B及び59Cは、平均及びSEMを示す。棒グラフのバーに重ねられた円は、各群の個々のデータ点を示す。

【0174】

7日の期間の終わりに、この視覚野をELISA及び免疫染色で分析した。いくつかの実施形態では、この組織をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で溶解してPBS可溶性 $A\beta$ 画分を抽出したところ、6か月齢の5XFADマウスにおいて、ELISAで測定して、1時間の40 Hzの点滅7日間で、可溶性 $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のレベルは、それぞれ、60.5%及び51.7%減少したことが分かった（例えば、図59B及び59C参照。スチューデントt検定により $p<0.05$ 及び $p<0.01$ 。1群当たりのマウス $n=13$ ）。組織をさらにグアニジン塩酸(HCl)で処理して、凝集したアミロイド斑を構成する不溶性の $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ 画分を抽出した。不溶性の $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ のレベルは、それぞれ、43.7%及び57.9%減少し、40 Hzの点滅が、6か月齢のマウスにおいてすでに形成された不溶性の $A\beta$ 凝集物を破壊したことを示した（例えば、図59B及び59C参照。スチューデントt検定により $p<0.01$ 及び $p<0.001$ 。1群当たりのマウス $n=13$ ）。

【0175】

斑負荷がどのようにして特異的に影響を受けたかを判定するため、いくつかの実施形態では、免疫組織化学的な特徴づけを、 $A\beta$ 抗体を用いて実施した(Cell Signaling Technology、D54D2)。図60Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗(上)または40 Hzの点滅(下)条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野における抗 $A\beta$ (D5452)抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である(スケールバー=50 μm)。細胞内に見られる $A\beta$ シグナルは除外した。図60Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗または40 Hzの点滅条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野における $A\beta$ 陽性斑の沈着数を示す棒グラフである（1群当たりのマウス $n=8$ 。スチューデントt検定により、3つのアスタリスクは $p<0.001$ を示す）。図60Cは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗または40 Hzの点滅条件下での7日後の6か月齢の5XFADマウスの視覚野における $A\beta$ 陽性斑の面積を示す棒グラフである（1群当たりのマウス $n=8$ 。マン・ホイットニー検定により、2つのアスタリスクは $p<0.01$ を示す）。図60B及び60Cは、平均及びSEMを示す。

【0176】

斑の存在量は、直径が10 μm 以上の $A\beta$ +沈着物数を数えることによって定量化した。40 Hzの点滅は、斑の数を暗対照における33.5と比較して、11.0に低減した（例えば、図60A及び60B参照。スチューデントt検定により $p<0.01$ 。1群当たりのマウス $n=8$ ）。さらに、1週間の40 Hzの点滅処理後、斑のサイズ(緻密な斑領域の面積として測定)は、暗対照と比較して、約63.7%減少した（例えば、図60A及び60C参照。マン・ホイットニー検定により $p<0.01$ 。1群当たりのマウス n

＝8)。総合すれば、これらの実験は、アミロイド斑の病変に強い影響を与える完全に非侵襲的な治療を特定した。

【0177】

40 Hzの点滅が別の重要なAD関連病変を改善するかどうかを判定するため、タウリン酸化を、Tau P301Sタウオパチーマウスモデルを用いて調べた。細胞体に局在するリン酸化タウをこの月齢で示す4か月齢のTau P301S Tgマウスを40 Hzの点滅または暗対照条件のいずれかで毎日1時間、7日間処理した。40 Hzの点滅がタウリン酸化をどのように変化させたかを調べるため、視覚野の免疫組織化学的特徴づけを、pTauの3つの異なるエピトープ（S202、S396、及びS400/T403/S404；11834S、9632S、11837S）に対するpTau抗体及び樹状マーカーMAP2を対照として用いて行った。

10

【0178】

図61Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間／日の暗または40 Hzの点滅条件下での7日後の4か月齢のP301Sマウスにおける抗pTau 6102（S202）及び抗MAP2 6104抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。画像は、40倍の対物レンズで撮影した（スケールバー＝50 μm。差し込み図は、暗及び40 Hzの点滅条件下での代表的な細胞体の100倍のレンダリングを含む）。図61Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間／日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後のP301Sの視覚野の相対的なpTau（S202）の強度レベルを示す棒グラフである（1群当たりのマウスn＝8。スチューデントt検定により、1つのアスタリスクはp<0.05を示す）。図61Cは、いくつかの実施形態に従って、1時間／日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後のP301Sの視覚野の相対的なMAP2強度レベルを示す棒グラフである（1群当たりのマウスn＝8。スチューデントt検定により、「n.s.」は有意でないことを示す）。図61B及び61Cは、平均及びSEMを示す。

20

【0179】

図62Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間／日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後の4か月齢のP301Sマウスにおける抗pTau 6202（S404）抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である（スケールバー＝50 μm）。図62Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間／日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後のP301Sの視覚野の相対的な抗pTau（S400/T403/S404）の蛍光強度レベルを示す棒グラフである（1群当たりのマウスn＝8。スチューデントt検定により、2つのアスタリスクはp<0.01を示す）。図62Bは平均及びSEMを示す。

30

【0180】

図63Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間／日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後の4か月齢のP301Sマウスにおける抗pTau 6302（S396）抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である（スケールバー＝50 μm）。図63Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間／日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後のP301Sの視覚野の相対的なpTau（S396）の蛍光強度レベルを示す棒グラフである（1群当たりのマウスn＝8。スチューデントt検定により、4つのアスタリスクはp<0.0001を示す）。

40

【0181】

その結果、40 Hzの点滅条件では、暗対照と比較して、pTau（S202）のシグナル強度は、41.2%及びpTau（S400/T403/S404）は42.3%減少した（例えば、図61A～B、62A～B参照。スチューデントt検定により、p<0.01。1群当たり8匹のマウスから切片n＝2）一方、MAP2レベルは変化しなかった（例えば、図61A及び61C参照。「n.s.」は有意でないことを示す。1群当たり4匹のマウスから切片n＝2）。pTau（S396）に対する抗体での染色は、同じ方向に向くことを示した。すなわち、40 Hzの点滅が、pTau（S396）レベルを暗対照と比較して14.4%低減した（例えば、図63A～B参照。「n.s.」は有意でないことを示す。1群当たり8匹のマウスから切片n＝2）。さらに、暗対照と比較し

50

て、40 Hzの点滅に反応したp T a uシグナルの点状の細胞体局在化は少なかった。タウリン酸化において有意な変化は見られたが、40 Hzの点滅処理及び暗対照群の間で、不溶性タウのレベルに識別できる差は認められなかった。

【0182】

T a u P 3 0 1 Sマウスモデルのミクログリアに対する40 Hzの点滅の結果を評価した。図64は、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後の4か月齢のP 3 0 1 Sマウスにおける抗I b a 1 (019-19741)抗体による免疫組織化学を示す一連の免疫蛍光画像である。画像は、40倍の対物レンズで撮影した(スケールバー=50 μ m。差し込み図は、E Y F P及び40 Hzの刺激条件での代表的なミクログリアの100倍のレンダリングを含む)。

10

【0183】

図65Aは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後のミクログリアの数を示す棒グラフである(1群当たりのマウスn=8。スチューデントt検定により、「n.s.」は有意でないことを示す)。図65Bは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後の対照に対して正規化されたミクログリア細胞体の直径を示す棒グラフである(1群当たりのマウスn=8。スチューデントt検定により、4つのアスタリスクは $p < 0.0001$ を示す)。図65Cは、いくつかの実施形態に従って、1時間/日の暗及び40 Hzの点滅条件下での7日後の対照に対して正規化されたミクログリアの一次過程の平均長さを示す棒グラフである(1群当たりのマウスn=8。スチューデントt検定により、4つのアスタリスクは $p < 0.0001$ を示す)。

20

【0184】

いくつかの実施形態では、T a u P 3 0 1 Sマウスの視覚野切片において抗I b a 1抗体でミクログリアを1日1時間の40 Hzの点滅または暗条件7日後に標識した(例えば、図64参照)。いくつかの実施形態では、暗対照と比較して、40 Hzの点滅条件では、5 X F A Dモデルで観察されたものと一致して(例えば、図50A参照)、ミクログリア数に29.50%増加する傾向が認められた(例えば、図64及び65A参照。「n.s.」は有意でないことを示す。1群当たりのマウスn=3)。さらに、ミクログリア細胞体の直径は、視覚野において40 Hzの点滅後、暗対照と比較して、49.00%増加した(例えば、図64及び65B参照。スチューデントt検定により、 $p < 0.0001$ 。1群当たりのマウスn=3)。ミクログリアの一次過程の長さは、40 Hzの点滅群で暗対照と比較して、39.08%低下した(例えば、図64及び65C参照。スチューデントt検定により $p < 0.0001$ 。1群当たりのマウスn=3)。

30

【0185】

総合すれば、AD病変の複数のモデルからの及びWT動物におけるこれらのデータは、40 Hzの振動が、A β レベルの低下によって測定される通り、アミロイド病変を軽減し得るとともにタウリン酸化を低下させ得ることを示している。さらに、40 Hzの視覚点滅は、AD病変のアミロイドシス及びタウオパチーモデルのいずれにおいてもミクログリアの明瞭な形態変換を駆動し得る。

【0186】

別の実験において、老齢マウス(すなわち、6か月齢)のサブセットを視覚ガンマ刺激に7日間曝露した。残りのマウスは暗所に置いた。図66は、マウスの視覚野における可溶性A β ペプチド及び不溶性A β ペプチド(すなわち、斑)の両方のレベルを示すプロットである。図66に示すように、可溶性アイソフォームA β_{1-40} 6600、可溶性アイソフォームA β_{1-42} 6602、不溶性アイソフォームA β_{1-40} 6604、及び不溶性アイソフォームA β_{1-42} 6606の各々のレベルは、視覚ガンマ刺激に曝露したマウスにおいて有意に減少した。

40

【0187】

図67A~67Bは、いくつかの実施形態に従って、対象の経頭蓋ガンマ刺激の有無でのA β ペプチドのレベルを示すプロットである。図67Aでは、全脳A β ペプチドレベル

50

は、無刺激 6700 で現状維持であったが、1 時間の経頭蓋ガンマ刺激 6702 後に低下した（1 群当たりの動物 $n=1$ ）。図 67B では、いくつかの実施形態に従って、全脳 A β ペプチドレベルは、40 Hz の経頭蓋刺激後、5 x FAD マウスの海馬 6704 及び皮質 6706 で減少した。

【0188】

ガンマ振動は、長い間、高次の認知機能及び感覚反応と関連していると考えられてきた。いくつかの実施形態では、光遺伝学的方法を用いた F S - P V 介在ニューロンの駆動がマウスにおいて 40 Hz で L F P を増強した。本明細書に開示のように、いくつかの実施形態では、5 X FAD マウスモデルにおいて、光遺伝学または非侵襲的な光の点滅処理を用いた 40 Hz の振動及び位相同期スパイクの駆動により、少なくとも 2 つの異なる脳領域で A β ペプチドの顕著な減少がもたらされたことが示されている。この減少は、A β ペプチドレベルが、40 Hz の振動を高めることなく同様の量のマルチユニットスパイク活動を生じたランダム刺激条件より、40 Hz の刺激に反応して有意に低かったことから、スパイク活動の低下によるものではなかった。錐体細胞の発火率は、これらの条件間で異なり得るが、F S - P V 介在ニューロンまたは他の細胞型はこの変化を隠した。いくつかの実施形態では、F S - P V 介在ニューロンの直接の刺激の同量を与えた F S - P V 介在ニューロンのランダムな光遺伝学的刺激は、依然としてアミロイドを低減しなかった。それどころか、光遺伝学的確率的刺激は、アミロイドレベルを 3 倍超にした一方、確率的視覚点滅は有意な変化をもたらさず、このことは、ランダム刺激のいくつかの側面が神経毒性効果を有することを示す可能性がある。いくつかの実施形態では、ランダム刺激はガンマパワーの増加をもたらさなかった一方、パワーの微増の傾向が、約 20 Hz ~ 60 Hz 超までの広範囲の周波数において認められた。いくつかの実施形態では、20 Hz ~ 80 Hz の光の点滅でアミロイドレベルの増加傾向が認められた。総合すれば、これらの結果は、40 Hz 以下または以上の一部の周波数における駆動活性がアミロイドレベルを増加させる可能性があることを示唆し得る。これらの結果は、スパイク活動のパターンがどのように分子経路及び疾患病変に影響を与えるかを理解する必要性を指摘している。

【0189】

総アミロイドレベルの強い低下は、E E A 1 / R a b 5 陽性初期エンドソームの減少に関連するアミロイド形成の減少及びミクログリアによるアミロイドのエンドサイトーシスの増加の両方によって媒介される可能性が高い。重要なことには、本明細書に開示の遺伝子セットエンリッチメント解析 (G S E A) 統計分析 (The Broad Institute、マサチューセッツ州ケンブリッジ) で、古典的マクロファージの炎症性 M 1 または抗炎症性 M 2 の細胞状態は、40 Hz の振動によるニューロンの刺激後の上方または下方制御された遺伝子発現プロファイルのいずれとも相関しないことが示された。実際、炎症性遺伝子 I l 6、I l 1 b、I t g a m、及び抗炎症性遺伝子 I g f 1 の発現レベルは、刺激後に変化しなかった。代わりに、複数のミクログリアのプロ食作用遺伝子及び細胞接着／遊走調節因子 S p p 1 は、40 Hz の刺激で活性化された。従って、40 Hz のガンマ振動の駆動は、ニューロンとミクログリアの両方を動員することによって、総合的な神経防護反応を誘導するよう見える。G A B A - A アンタゴニスト処理が A β レベルの低下に対する 40 Hz の刺激の効果を完全に無効にしたという事実は、十中八九 F S - P V 介在ニューロンに関連する G A B A 作動性シグナル伝達がこれらの効果に不可欠であることを強く示唆している。さらに、いくつかの実施形態では、5 X FAD マウスに加えて A P P / P S 1 及び W T マウスを含めた複数のマウスモデルにおいて、40 Hz の点滅刺激は A β を低減した。複数のマウスモデルにおけるこの再現は、これらの知見が、1 つの動物モデルに特異的でない可能性があり、重要なことには、W T 動物におけるように、A P P がその生理学的プロモーターによって発現され、A β が内因性 A P P から生じる状況にまで及ぶ可能性があることを示している。さらに、いくつかの実施形態では、40 Hz の振動がタウオパチーのマウスモデル、T a u P 3 0 1 S において p T a u を低減することが分かり、ガンマ刺激の防護効果が、他のマウスモデルだけでなく、他の病原性タンパ

10

20

30

40

50

ク質にも一般化することを示した。要約すれば、本明細書に開示の知見は、ガンマ振動が媒介するこれまで知られていなかった細胞及び分子過程を明らかにし、脳のガンマリズム、ミクログリア機能、ならびにAD関連病変間の機能的結合を確立する。いくつかの実施形態では、ガンマ振動の障害の知見は、異なるADのマウスモデル（hAPP及びapoE4）におけるガンマ振動の証拠に収斂し、ガンマがADのヒトにおいて変更されることを報告する。Tg及びノックインモデルを含めた複数のADのマウスモデルから収斂する証拠を探すことで、これらの結果が、単に導入遺伝子の過剰発現または特に1つのモデルに対する他の副作用によるものではないことが示され得る。マウス及びヒトからのこれらの結果を合わせて、Aβ病変に寄与する複数の分子経路が収斂してADにおけるガンマ振動を変更することが示される。本明細書に開示の知見は、ADに対する新規な治療的介入を期待できる。

10

【0190】

ADの発病の1つの理論は、ミクログリアの機能不全、具体的には、ミクログリアによる病的な分子の除去不全を疾患進行の重要な機序として指摘している。従って、40Hzの刺激が行うように、ミクログリアをエンドサイトーシス状態に復帰させる介入が、強い治療可能性を有する。本明細書にさらに記載される実験では、光遺伝学的な、または光の点滅によるガンマ振動の駆動は、ニューロンの活動過剰を引き起こさなかった。この方法は先行のAD療法とは基本的に異なるため、かかるパターン化された神経活動を駆動して内因性修復を誘発することで、ADに対する新規な治療方法が提供されよう。

【0191】

20

ガンマ周波数での視覚刺激は、対象の行動に好ましい影響を与えた。

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与が対象に何らかのストレスを引き起こすかどうかを調べるための試験を実施した。図68Aは、本試験を示す流れ図である。図68Aの6800に示すように、いくつかの実施形態に従って、WTマウスを連続7日間、すなわち1～7日目に、1日1時間、普通室内光（N=8）または40Hzの光の点滅（N=8）のいずれかに曝露した。6802に示す8日目、マウスから採血し、血漿を分離してコルチコステロンレベルを調べた。マウスでは、コルチコステロンは、ストレス反応に関与する主要な糖質コルチコイドである。

【0192】

30

図68Bは、普通室内光（NRL）に曝露された8匹のマウス及び40Hzの光の点滅（40Hz）に曝露された8匹のマウスから採取した血漿におけるコルチコステロン（CORT）のレベル（pg/ml）を示す棒グラフである。40Hzの光の点滅に曝露されたマウスにおいてコルチコステロンの増加は認められなかった。代わりに、40Hzの光の点滅に曝露されたマウスの群は、対照群と比較して、コルチコステロンのレベルが低かった。1群当たりN=8の独立した測定値について、コルチコステロンレベルのT分布及びp値は：

$$T(14) = 0.827, p = 0.422 \quad (1)$$

と計算された。

【0193】

40

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与が対象の不安を低減するかどうかを調べるために別の試験を実施した。図69Aは、本試験を示す流れ図である。図69Aの6900に示すように、いくつかの実施形態に従って、WTマウスを連続7日間、すなわち1～7日目に、1日1時間、普通室内光（N=10）または40Hzの光の点滅（N=10）のいずれかに曝露した。6902に示す8日目、10分間の期間の高架式十字迷路を実施した。

【0194】

高架式十字迷路は、実験動物の不安を測るために用いられる試験である。この行動モデルは、げっ歯類の開放的空間に対する一般的な嫌悪に基づいており、これが走触性、すなわち、閉鎖空間にとどまるかまたは囲まれた空間のへりの近くの優先傾向につながる。図69Bは、高架式十字迷路装置を示す画像である。この装置は、2つの壁なし走路（垂直

50

）及び2つの壁あり走路（水平）の十字形である。不安は、動物が壁あり走路でより長い時間を過ごすことで表現される。

【0195】

図69C及び69Dは、高架式十字迷路期間中の対象の代表的な軌跡を示す画像である。いくつかの実施形態に従って、図69Cでは、普通室内光に曝露されたマウスは、壁あり走路にとどまる傾向があり、より大きな不安を示したが、図69Dでは、40Hzの光の点滅に曝露されたマウスは、壁なし走路と壁あり走路の両方を探索し、比較的小さい不安を示した。

【0196】

図70は、いくつかの実施形態に従って、普通室内光（NRL）に曝露された10匹のマウス及び40Hzの光の点滅（40Hz）に曝露された10匹のマウスが壁なし走路及び壁あり走路で探索に費やした合計時間を示す棒グラフである。いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅に曝露されたマウスは、壁あり走路でより少ない合計時間及び壁なし走路でより長い合計時間を費やし、対照群と比較して、より少ない不安を示した。1群当たりN=10の独立した測定値について、壁あり走路の探索に費やされた合計時間に関するT分布及びp値は：

$$T(18) = -1.652, p = 0.11 \quad (2)$$

と計算された。

【0197】

1群当たりN=10の独立した測定値について、壁なし走路の探索に費やされた合計時間に関するT分布及びp値は：

$$T(18) = -2.136, p = 0.047 \quad (3)$$

と計算された。

【0198】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与が対象のストレス及び／または不安を低減するかどうかを調べるために別の試験を実施した。図71Aは、本試験を示す流れ図である。図71Aの7100に示すように、いくつかの実施形態に従って、WTマウスを連続7日間、すなわち1～7日目に、1日1時間、普通室内光（N=8）または40Hzの光の点滅（N=8）のいずれかに曝露した。7102に示す8日目、5分間のオープン・フィールド試験を実施した。

【0199】

オープン・フィールド試験は、実験動物で一般的な自発運動レベル及び不安をアッセイするのに用いられる実験である。行動モデルは、明るく照らされた領域を避けるが、認識された脅威刺激を探索するげっ歯類の矛盾した動きによって生じる不安に基づいている。図71Bは、オープン・フィールド・アリーナを示す画像である。このオープン・フィールド・アリーナは、脱出を防ぐための壁を有し、グリッドでマークしても、ソフトウェアシステムと一体化した赤外線ビームまたはビデオカメラを用いて監視してもよい。いくつかの実施形態に従って、不安の増加は、自発運動の低下及びフィールドのヘリに対する優先傾向をもたらすが、不安の減少は、探索行動の増加につながる。

【0200】

図71C及び71Dは、オープン・フィールド試験中の対象の代表的な軌跡を示す画像である。いくつかの実施形態に従って、図71Cでは、普通室内光に曝露されたマウスは、アリーナのヘリを好む傾向があり、より大きなストレス及び／または不安を示したが、図71Dでは、40Hzの光の点滅に曝露されたマウスは、アリーナの中心を探索し、比較的小さいストレス及び／または不安を示した。

【0201】

図72A及び72Bは、いくつかの実施形態に従って、普通室内光（NRL）に曝露された8匹のマウス及び40Hzの光の点滅（40Hz）に曝露された8匹のマウスが、オープン・フィールド・アリーナの中心及び周囲で探索に費やした合計時間を示すグラフである。図72Aは、5分ごとのアリーナの中心で費やされた平均秒数のプロットである。

図 7 2 B は、分ごとに平均された、全 5 分間にアリーナの周囲で費やされた合計時間の棒グラフである。

【0202】

いくつかの実施形態に従って、対照群と比較して、平均すると、40 Hz の光の点滅に曝露されたマウスは、2 分、4 分、及び 5 分の間に有意にアリーナの中心でより長い時間を過ごし、ひいてはより小さいストレス及び／または不安を示したが、これはまた、高架式十字迷路の結果と一致する。反復測定分散分析 (RM ANOVA) を実施した。1 群当たり $N = 8$ の独立した測定値について、オープン・フィールド・アリーナを探索するのに費やされた平均時間に対する F 分布及び p 値は：

$$F(1, 14) = 4.860, p = 0.045 \quad (4)$$

と計算された。

【0203】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与が対象の生得新奇探索行動を変更するかどうかを調べるために別の試験を実施した。図 7 3 A 及び 7 3 B は、新奇認識タスクを用いた本試験を示す概略図である。図 7 3 A では、2 つの新奇物体を慣れ親しんだアリーナに設ける。図 7 3 B では、1 つの慣れ親しんだ物体と 1 つの新奇物体を慣れ親しんだアリーナに設ける。いくつかの実施形態に従って、野生型マウスを連続 7 日間、すなわち 1～7 日目に、1 日 1 時間、普通室内光 ($N = 8$) または 40 Hz の光の点滅 ($N = 8$) のいずれかに曝露した。

【0204】

8 日目に、これらのマウスを 5 分間、図 7 3 A のシナリオ、すなわち、慣れ親しんだアリーナ内で 2 つの新奇物体に曝露した。図 7 3 C は、いくつかの実施形態に従って、普通室内光 (NRL) に曝露された 8 匹のマウス及び 40 Hz の光の点滅 (40 Hz) に曝露された 8 匹のマウスについて、新奇物体 B の探索に費やされた時間のパーセンテージに対して、新奇物体 A を探索するのに費やされた時間のパーセンテージを示す棒グラフである。図 7 3 C に示すように、各群によって各物体に対して等しい優先傾向が見られた。すなわち、群間で、物体探索に差は認められなかった。

【0205】

次に、これらマウスを 5 分間、図 7 3 B のシナリオ、すなわち、慣れ親しんだアリーナ内で 1 つの慣れ親しんだ物体及び 1 つの新奇物体に曝露した。図 7 4 は、5 分ごとの新奇物体を探索するのに費やされた平均秒数を示すプロットである。いくつかの実施形態に従って、対照群と比較して、平均すると、40 Hz の光の点滅に曝露されたマウスは、特に 1～3 分及び 5 分の間、有意に長い時間を新奇物体の探索に費やし、ひいては、新奇探索行動の増加を示した。フリードマンのノンパラメトリック RM ANOVA を実施した。1 群当たり $N = 8$ の独立した測定値について、新奇物体を探索するのに費やされた平均時間に対する検定統計量 χ^2 及び p 値は：

$$\chi^2(4, n = 16) = 16.088, p = 0.003 \quad (5)$$

と計算された。

【0206】

3 分の間に新奇物体を探索するのに費やされた平均時間に対してマン・ホイットニー U 検定を実施した。1 群当たり $N = 8$ の独立した測定値について、U 値、Z 値、及び p 値は：

$$U = 58.00, Z = 2.731, p = 0.005 \quad (6)$$

と計算された。

【0207】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与が対象の学習及び記憶に影響を与えるかどうかを調べるために別の試験を実施した。図 7 5 A は、恐怖条件付けパラダイムを用いた試験を示す流れ図である。図 7 5 A に 7 5 0 0 で示されるように、いくつかの実施形態に従って、WT マウスを連続 7 日間、すなわち 1～7 日目に、1 日 1 時間、普通室内光または 40 Hz の光の点滅のいずれかに曝露した。7 5 0 2 で示される 8 日目、これらマウスを軽度の 2 トーン・ショック・ペアリングに供した。具体的には、マウスを第

10

20

30

40

50

一のトーンと足のショックを組み合わせた新たなアリーナに入れた。これらのマウスは、文脈（すなわち、トーン）と嫌悪体験（すなわち、足のショック）を関連付けるように条件付けされた。この最初の文脈について、すくみに費やされた合計時間に対する T 分布及び p 値は：

$$T(24) = 0.577, p = 0.569 \quad (7)$$

と計算された。

【0208】

7504で示される9日目、トーン試験を変更した文脈で実施した。図75Bは、第一のトーンの文脈7506、第一のトーンの文脈後7508、第二のトーンの文脈7510、及び第二のトーンの文脈後7512を含む、時間の関数としてトーン試験を示す刺激図である。本試験のため、マウスを、第一のトーンが足のショックと組み合わせられたアリーナに戻した。第一のトーンの文脈7506を適用すると、40Hzの光の点滅に曝露されたマウスは、恐らく足のショックを予期して、ひいては記憶の尺度を示すすくみにより長い時間を費やした。40Hzの光の点滅に曝露されたマウスはまた、第二のトーンの文脈7510の間もすくみに対照群より長い時間を費やしたが、いずれのトーンの文脈後の間もすくみ時間は少なかった。

【0209】

図76A及び76Bは、いくつかの実施形態に従って、記憶の強化を示す棒グラフである。いくつかの実施形態に従って、図76Aに示すように、第一のトーンの文脈7506及び第二のトーンの文脈7510の間のすくみに費やされた時間のパーセンテージは、対照群と比較して、40Hzの光の点滅に曝露されたマウスでより高く、記憶の連合の強化を示した。さらに、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅に曝露されたマウスは、トーン提示後により強い消去を示した。図76Bに示すように、いくつかの実施形態に従って、第一のトーンの文脈7506後の間及び第二のトーンの文脈7510後の間にすくみに費やされた時間のパーセンテージは、40Hzの光の点滅に曝露されたマウスと比較して、対照群でより高く、記憶の特異性の強化を示した。

【0210】

トーンの文脈前について、RM ANOVAを群間で実施したところ、すくみに費やされた平均時間に対する F 分布及び p 値は：

$$F(1, 24) = 3.106, p = 0.091 \quad (8)$$

と計算された。

【0211】

第一のトーンの文脈について、すくみに費やされた合計時間に対する T 分布及び p 値は：

$$T(24) = -2.155, p = 0.041 \quad (9)$$

と計算された。

【0212】

第二のトーンの文脈について、すくみに費やされた合計時間に対する T 分布及び p 値は：

$$T(24) = -1.433, p = 0.164 \quad (10)$$

と計算された。

【0213】

トーンの文脈について、RM ANOVAを群間で実施したところ、すくみに費やされた平均時間に対する F 分布及び p 値は：

$$F(1, 24) = 4.559, p = 0.043 \quad (11)$$

と計算された。

【0214】

第一のトーンの文脈後について、すくみに費やされた合計時間に対する T 分布及び p 値は：

$$T(24) = 1.874, p = 0.073 \quad (12)$$

と計算された。

【0215】

第二のトーンの文脈後について、すくみに費やされた合計時間に対する T 分布及び p 値は：

$$T(24) = 2.223, p = 0.036 \quad (13)$$

と計算された。

【0216】

トーンの文脈後について、RM ANOVA を群間で実施したところ、すくみに費やされた平均時間に対する F 分布及び p 値は：

$$F(1, 24) = 6.646, p = 0.017 \quad (14)$$

と計算された。

【0217】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与が対象の記憶を改善するかどうかを調べるために別の試験を実施した。図 77A は、本試験を示す流れ図である。図 77A の 7700 で示すように、いくつかの実施形態に従って、WT マウスを連続 7 日間、すなわち 1～7 日目に、1 日 1 時間、普通室内光または 40 Hz の光の点滅のいずれかに曝露した。7702 で示される 8 日目、Morris 水迷路試験を実施した。

【0218】

Morris 水航行タスクまたは迷路は、実験動物で空間記憶及び学習を研究するために用いられる試験である。行動に関する手続きは、対象を目に見えないまたは見える台を備えた大きな円形のプールに入れることを含み、この台は、対象が、習慣的な方法（台に到着するのに必要な動きの想起）、走性的方法（台を見つける視覚的手がかりの使用）、または空間的方法（基準点として遠位の手がかりの使用）を用いて脱出するのを可能にする。図 77B は、Morris 水迷路を示す図である。この迷路は、方向象限に分割された水の円形プール及び南西（SW）象限に隠された台 7704 を含む。

【0219】

弱い訓練については、Morris 水迷路試験を連続 4 日間、すなわち、8～11 日目に、1 日 2 回繰り返した。図 78A は、いくつかの実施形態に従って、普通室内光（NRL）に曝露されたマウス及び 40 Hz の光の点滅（40 Hz）に曝露されたマウスが台を見つけるまでの時間を示すプロットである。

【0220】

12 日目、Morris 水迷路から、隠された台を除去してプローブ試験を実施した。図 77C 及び 77D は、プローブ試験中の対象の代表的な軌跡を示す画像である。いくつかの実施形態に従って、図 77C では、普通室内光に曝露されたマウスは、プール全体にわたって台を探したように見えるが、図 77D では、40 Hz の光の点滅に曝露されたマウスは、より系統的に、主に SW 象限を探したように見える。図 78B は、目標象限（すなわち、SW 象限）内で台を探すのに費やされた合計時間（各 30 秒間当たりの秒数）を示すプロットであり、図 78C は、逆の象限（すなわち、NE 象限）内で台を探すのに費やされた合計時間（各 30 秒間当たりの秒数）を示すプロットである。いくつかの実施形態に従って、40 Hz の光の点滅に曝露されたマウスは、目標象限を探すのに対照群より多くの時間を費やし、かつ逆の象限を探すのに対照群より少ない時間を費やし、空間記憶の強化を示した。

【0221】

Morris 水迷路試験及びプローブ試験から同じ群のマウスを用いて、逆転学習を実施した。図 79A は、本試験で SW 象限に隠された台 7900 を備えた Morris 水迷路を示す図である。図 79B は、逆転学習のため、逆の NE 象限に隠された台 7902 を備えた Morris 水迷路を示す図である。

【0222】

弱い訓練については、逆転学習を連続 4 日間、すなわち、14～17 日目、1 日 2 回繰り返した。図 79C は、いくつかの実施形態に従って、普通室内光（NRL）に曝露されたマウス及び 40 Hz の光の点滅（40 Hz）に曝露されたマウスが台を見つけるまでの時間を示すプロットである。7 日目以降さらなる 40 Hz の曝露を受けていないにもかかわらず

10

20

30

40

50

わらず、40 Hz の光の点滅に曝露されたマウスは、行動に関する柔軟性の増加を示した。

【0223】

いくつかの実施形態に従って、長期的なガンマ曝露及び／または投与が、対象の空間学習及び記憶に影響を与えるかどうかを調べるために別の試験を実施した。図80Aは、本試験を示す流れ図である。図80Aの8000で示すように、いくつかの実施形態に従って、C57BL/6マウスを、2週間、1日1時間、普通室内光（N=7）または40 Hz の光の点滅（N=7）のいずれかに曝露した。8002で示される第3週の間、これらマウスを普通室内光または40 Hz の光の点滅のいずれかに、毎朝1時間曝露し続け、その後毎日午後、同様にMorris水迷路試験に供した。

【0224】

図80Bは、第3週の1～4日目に、普通室内光（NRL）に曝露されたマウス及び40 Hz の光の点滅（40 Hz）に曝露されたマウスが台を見つけるまでの時間を示すプロットである。第3週の後、隠された台を取り除いてプローブ試験を実施した。図80Cは、プローブ試験中に目標象限内で台を探すのに費やされた合計時間（30秒の試験ごとの秒数）を示す棒グラフである。いくつかの実施形態に従って、1週間の処理と同様に、長期的な3週間の処理は、空間学習を強化した。

【0225】

図80A～80Cから同じ群のマウスを用いて逆転学習を実施した。図81Aは、拡張した試験を示す流れ図である。図81Aの8100に示すように、いくつかの実施形態に従って、C57BL/6マウスを、2週間、1日1時間、普通室内光または40 Hz の光の点滅のいずれかに曝露した。8102で示される第3週の間、これらマウスを普通室内光または40 Hz の光の点滅のいずれかに、毎朝1時間曝露し続け、その後毎日午後、同様にMorris水迷路試験に供した。8104で示される第4週の間、これらマウスを普通室内光または40 Hz の光の点滅のいずれかに、毎朝1時間曝露し続け、その後毎日午後、同様にMorris水迷路再試験に供した。図81Bは、いくつかの実施形態に従って、第4週の1～4日目に、普通室内光（NRL）に曝露されたマウス及び40 Hz の光の点滅（40 Hz）に曝露されたマウスが台を見つけるまでの時間を示すプロットである。

【0226】

第4週の後、隠された台を取り除いてプローブ試験を実施した。図82Aは、プローブ試験中に目標象限内で台を探すのに費やされた合計時間（30秒の試験ごとの秒数）を示す棒グラフである。図82Bは、プローブ試験中、逆の象限内で費やされた時間を示す棒グラフである。40 Hz の光の点滅に曝露されたマウスは、強い認識の柔軟性を示した。

【0227】

ガンマ周波数での視覚刺激は、解剖学的、形態学、細胞的、及び分子的利益を与えた。

いくつかの実施形態に従って、対象の視覚野におけるDNA損傷ならびにニューロンの欠損に対するガンマ曝露及び／または投与の影響を調べるために試験を実施した。本試験のため、p25蓄積の誘導性マウスモデル（すなわち、クレアチンキナーゼカルボキシル末端断片p25Tgマウス（CK-p25Tgマウス））を用いた。CK-p25Tgマウスモデルは、前脳内の重大なニューロン損失、Aβペプチド産生増加、タウ病理、DNA損傷、及び重度の認知機能障害を含むADの重要な病理学的特徴を示す。本モデルでは、ニューロンの損失に先立ってAβペプチドレベルの上昇が認められ、さらに、Aβペプチド産生の低減はCK-p25Tgマウスモデルにおいて記憶障害を軽減することから、この事象がカルボキシル末端断片p25と相乗的に作用し、神経変性及び記憶障害の発現につながることを示している。

【0228】

図83は、CK-p25Tgマウスにおける変化を示すスケジュール図8300である。2週間後8302、マウスはDNA損傷（例えば、バイオマーカーγH2AX）、Aβペプチドの増加、及びミクログリア活性化を示す。6週間後8304、マウスはシナプスの損失、ニューロンの損失、タウの高リン酸化、長期増強不全、及び記憶障害を示す。

10

20

30

40

50

【0229】

異なる処理計画下でのマウスの群を比較するために試験を実施した。図84は、CK対照マウス8400、未処理CK-p25Tgマウス8402、メマンチンで処理された（毎日10mg/kg）CK-p25Tgマウス8404、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露された（6週間毎日1時間）CK-p25Tgマウス8406、ならびにメマンチンで処理され、さらに40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス8408を含む群の図である。メマンチンは、NMDA受容体を遮断し、それによりグルタミン酸系に作用することで重度のADを治療するのに使用される、ある程度の成功を収める薬剤である。

【0230】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与は、脳の解剖学的構造を保存及び／またはそれに関する変化を減少させることが示された。例えば、ガンマ曝露は、CK-p25誘導性の脳重量の減量を低減及び／または防止した。図85は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスにおける脳重量の変化を比較する棒グラフである。脳重量の減量は、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスで顕著であった。しかしながら、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウスは、より大きな脳重量を保っていた。

【0231】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与は、脳の形態を保存及び／またはそれに関する変化を減少させることが示された。例えば、ガンマ曝露は、対象のCK-p25誘導性の異常な側脳室拡張を低減及び／または防止した。図86は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスにおける側脳室拡張の比を、ベースラインとしてのCK対照マウスにおける拡張と比較する棒グラフである。側脳室の拡張は、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスで顕著であった。いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウスの側脳室は、他のCK-p25Tgマウスの側脳室よりはるかに拡張が小さかった。

【0232】

図87A～87Eは、各群における対象の代表的な側脳室を示す画像である。側脳室は未処理CK-p25Tgマウス（図87A）、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス（図87B）、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウス（図87C）において最大であった。図87Dに示すように、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウスの側脳室は、拡張はるかに小さかった。図87Eは、CK対照マウスにおけるベースラインの側脳室サイズの例である。

【0233】

図88A～88Cは、いくつかの実施形態に従って、分子の特徴づけのための目的の脳領域を示す脳解剖図である。図88Aは、視覚野（V1）8800、体性感覚皮質（SS1）8802、海馬8804、及び島皮質8806を含む。

【0234】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与は、視覚野の皮層及びニューロンの層を保存及び／またはそれらに関する変化を減少させることが示された。例えば、ガンマ曝露は、対象の視覚野におけるCK-p25誘導性の皮層及びニューロン層の損失を

10

20

30

40

50

低減及び／または防止した。

【0235】

皮膚の損失は、Hoechst標識（すなわち、DNAを染色するために用いられる青色蛍光染料）による核染色を用いて測定した。ニューロンの層の損失は、NeuN、すなわち、ニューロンのバイオマーカーとして通常用いられるニューロンの核抗原を用いて測定した。図89は、各群におけるV1皮膚の平均厚さを示す棒グラフであり、図90は、各群におけるV1-NeuN陽性細胞層の平均厚さを示す棒グラフである。

【0236】

図91A～91Eは、各群における対象の代表的なHoechst標識及び／またはNeuN標識を有する細胞を示す画像である。図91Aは、CK対照マウスにおけるベースラインのV1皮膚（例えば、 $837 \pm 9 \mu\text{m}$ ）及びV1ニューロン層（例えば、 $725 \pm 7 \mu\text{m}$ ）の厚さの例である。

【0237】

V1皮膚は、いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス（図91D、例えば、 $855 \pm 9 \mu\text{m}$ ）、メマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウス（図91E、例えば、 $821 \pm 22 \mu\text{m}$ ）、未処理CK-p25Tgマウス（図91B、例えば、 $792 \pm 13 \mu\text{m}$ ）、ならびにメマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス（図91C、例えば、 $788 \pm 9 \mu\text{m}$ ）で次第に薄くなった。

【0238】

いくつかの実施形態に従って、40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25TgマウスにおけるV1ニューロン層は、CK対照マウスにおけるより実際に厚かった（図91D、例えば、 $743 \pm 9 \mu\text{m}$ ）が、その一方、メマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウス（図91E、例えば、 $691 \pm 20 \mu\text{m}$ ）、未処理CK-p25Tgマウス（図91B、例えば、 $666 \pm 14 \mu\text{m}$ ）、ならびにメマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス（図91C、例えば、 $660 \pm 7 \mu\text{m}$ ）で、CK対照マウスにおけるより次第に薄くなった。

【0239】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与は、体性感覚皮質において皮膚ならびにニューロン層を保存及び／またはそれらに関する変化を減少させることが示された。例えば、ガンマ曝露は、対象の体性感覚皮質におけるCKp-25誘導性の皮膚及びニューロン層の損失を低減及び／または防止した。

【0240】

図92は、各群におけるSS1皮膚の平均厚さを示す棒グラフであり、図93は、各群におけるSS1-NeuN陽性細胞層の平均厚さを示す棒グラフである。

【0241】

図94A～94Eは、各群における対象の代表的なHoechst標識及び／またはNeuN標識を有する細胞を示す画像である。図94Aは、CK対照マウスにおけるベースラインのSS1皮膚（例えば、 $846 \pm 10 \mu\text{m}$ ）及びSS1ニューロン層（例えば、 $707 \pm 8 \mu\text{m}$ ）の厚さの例である。

【0242】

SS1皮膚は、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス（図94D、例えば、 $834 \pm 9 \mu\text{m}$ ）、メマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウス（図94E、例えば、 $778 \pm 13 \mu\text{m}$ ）、未処理CK-p25Tgマウス（図94B、例えば、 $762 \pm 17 \mu\text{m}$ ）、ならびにメマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス（図94C、例えば、 $756 \pm 11 \mu\text{m}$ ）で次第に薄くなった。

【0243】

いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25TgマウスにおけるSS1ニューロン層は、CK対照マウスにおける厚さとほぼ同じ厚さであった（

10

20

30

40

50

図94D、例えば、 $705 \pm 15 \mu\text{M}$)。しかしながら、SS1ニューロン層は、メマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウス(図94E、例えば、 $650 \pm 11 \mu\text{M}$)、未処理CK-p25Tgマウス(図94B、例えば、 $630 \pm 13 \mu\text{M}$)、ならびにメマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス(図94C、例えば、 $629 \pm 9 \mu\text{M}$)で次第に薄くなった。

【0244】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与は、島皮質における皮層及びニューロン層を保存及び／またはそれらに関する変化を減少させることが示された。例えば、ガンマ曝露は、対象の島皮質におけるCKp-25誘導性の皮層及びニューロン層の損失を低減及び／または防止した。

【0245】

図95は、各群における島皮質の皮層の平均厚さを示す棒グラフであり、図96は、各群における島皮質のNeuN陽性細胞層の平均厚さを示す棒グラフである。

【0246】

図97A~97Eは、各群における対象の代表的なHoechst標識及び／またはNeuN標識を有する細胞を示す画像である。図97Aは、CK対照マウスにおける島皮質のベースラインの皮層(例えば、 $1134 \pm 10 \mu\text{M}$)及びニューロン層(例えば、 $1010 \pm 11 \mu\text{M}$)の厚さの例である。

【0247】

皮層は、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス(図97D、例えば、 $1079 \pm 20 \mu\text{M}$)、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス(図97C、例えば、 $983 \pm 12 \mu\text{M}$)、メマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウス(図97E、例えば、 $965 \pm 16 \mu\text{M}$)、ならびに未処理CK-p25Tgマウス(図97B、例えば、 $764 \pm 27 \mu\text{M}$)の島皮質で次第に薄くなった。

【0248】

ニューロン層は、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス(図97D、例えば、 $953 \pm 17 \mu\text{M}$)、未処理CK-p25Tgマウス(図97B、例えば、 $861 \pm 30 \mu\text{M}$)、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス(図97C、例えば、 $850 \pm 18 \mu\text{M}$)、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウス(図97E、例えば、 $848 \pm 15 \mu\text{M}$)の島皮質で次第に薄くなった。

【0249】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与は、ニューロンの数及び／またはDNAの損傷を保存及び／またはそれらに関する変化を減少させることが示された。例えば、ガンマ曝露は、対象の視覚野におけるCKp-25誘導性のニューロンの損失及びDNA損傷を低減した。

【0250】

図98は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスについて、CK対照マウスにおけるNeuN陽性細胞のパーセンテージとしてのNeuN陽性細胞の量を比較する棒グラフである。従って、CK対照マウスのNeuN陽性細胞のパーセンテージはCK対照マウスで100%であるが、未処理CK-p25Tgマウスで約80%しかなく、CK-p25Tgマウスモデルにおけるニューロンの損失を裏付ける。メマンチンでの処理は、未処理群と比較してCK-p25Tgマウスにおいていくらかのニューロンの損失を防止した。いくつかの実施形態に従う40Hzの光の点滅への曝露は、CK-p25Tgマウスにおいてほとんどのニューロンの損失を防止した。従って、図98は、いくつかの実施形態に従う40Hzの視覚的点滅処理がどのようにして視覚野のニューロンを保存することができるかを示す。しかしながら

10

20

30

40

50

、メマンチン及び40Hzの光の点滅への曝露の組合せは、等しくニューロンの損失を防ぐことができなかった。

【0251】

DNA二重鎖切断(DSB)は、真核細胞におけるDNA損傷の一例であり、ゲノムの不安定性を引き起こし、腫瘍形成及び恐らくは老化促進につながる。リン酸化ヒストンH2AX(γ H2AX)をDSBに対する細胞応答のバイオマーカーとして用いた。図99は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスにおける γ H2AX陽性細胞の量を比較する棒グラフである。 γ H2AXに対して陽性の細胞は、CK対照マウスではほとんど存在しなかったが、未処理CK-p25Tgマウスでは非常に多く、大量のDSB及び他のDNA損傷を示した。メマンチンでの処理は未処理群と比較して、CK-p25Tgマウスにおける γ H2AX陽性細胞の量を低減した。いくつかの実施形態に従う40Hzの光の点滅への曝露は、CK-p25Tgマウスにおける γ H2AX陽性細胞のさらに大きな減少をもたらした。従って、図99は、いくつかの実施形態に従う40Hzの視覚の点滅処理がどのようにして視覚野におけるDNA損傷を低減することができるかを示す。しかしながら、メマンチン及び40Hzの光の点滅への曝露の組合せは、CK-p25Tgマウスにおける γ H2AX陽性細胞の数を有意に増大した。

【0252】

図100は、Hoechst染色(皮質細胞を示す)、緑色蛍光タンパク質もしくはGFP(CK-p25を示す)、 γ H2AX(DSBを示す)、またはNeuN(ニューロンを示す)で標識した各群における対象の代表的な視覚野の試料を示す一連の画像である。

【0253】

ガンマ曝露はまた、対象の体性感覚皮質におけるCK-p25誘導性のニューロン損失及びDNA損傷も低減した。図101は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスについて、CK対照マウスにおけるNeuN陽性細胞のパーセンテージとしてのNeuN陽性細胞の量を比較する棒グラフである。従って、CK対照マウスのNeuN陽性細胞のパーセンテージは、CK対照マウスで100%であるが、未処理CK-p25Tgマウスではより80%に近く、CK-p25Tgマウスモデルにおけるニューロンの損失を裏付ける。CK-p25Tgマウスにおいてほとんどのニューロンの損失を防いだ40Hzの光の点滅への曝露との組合せ以外は、メマンチンでの処理は、未処理群と比較してCK-p25Tgマウスにおいてニューロンの損失を防止できなかった。従って、図101は、いくつかの実施形態に従う40Hzの視覚の点滅処理がどのようにして体性感覚皮質のニューロンを保存することができるかを示す。

【0254】

図102は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスにおける γ H2AX陽性細胞の量を比較する棒グラフである。 γ H2AXに対して陽性の細胞は、CK対照マウスでは存在しなかったが、未処理CK-p25Tgマウスでは非常に多く、大量のDSB及び他のDNA損傷を示した。メマンチンでの処理は未処理群と比較して、CK-p25Tgマウスにおける γ H2AX陽性細胞の量を低減した。いくつかの実施形態に従う40Hzの光の点滅への曝露は、CK-p25Tgマウスにおける γ H2AX陽性細胞のさらに大きな減少をもたらした。従って、図102は、いくつかの実施形態に従う40Hzの視覚の点滅処理がどのようにして体性感覚皮質におけるDNA損傷を低減することができるかを示す。しかしながら、メマンチ

ン及び40Hzの光の点滅への曝露の組合せは、CK-p25TgマウスにおけるγH2AX陽性細胞の数を有意に増大した。

【0255】

図103は、NeuN（ニューロンを示す）、γH2AX（DSBを示す）、GFP（CK-p25を示す）、及び／またはHoechst染色（皮質細胞を示す）で標識された各群における対象の代表的な体性感覚皮質の試料を示す一連の画像である。

【0256】

ガンマ曝露はまた、対象の島皮質におけるCKp-25誘導性のニューロン損失及びDNA損傷も低減した。図104は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスについて、CK対照マウスにおけるNeuN陽性細胞のパーセンテージとしてのNeuN陽性細胞の量を比較する棒グラフである。従って、CK対照マウスのNeuN陽性細胞のパーセンテージは、CK対照マウスで100%であるが、未処理CK-p25Tgマウスではより80%に近く、CK-p25Tgマウスモデルにおけるニューロンの損失を裏付ける。CK-p25Tgマウスにおいてニューロンの損失の防止が最小であった40Hzの光の点滅への曝露との組合せ以外は、メマンチンでの処理は、未処理群と比較してCK-p25Tgマウスにおいていくらかのニューロンの損失を防止した。従って、図104は、いくつかの実施形態に従う40Hzの視覚の点滅処理がどのようにして島皮質のニューロンを保存することができるかを示す。

【0257】

図105は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25TgマウスにおけるγH2AX陽性細胞の量を比較する棒グラフである。γH2AXに対して陽性の細胞は、CK対照マウスでは存在しなかったが、未処理CK-p25Tgマウスでは非常に多く、大量のDSB及び他のDNA損傷を示した。メマンチンでの処理は未処理群と比較して、CK-p25TgマウスにおけるγH2AX陽性細胞の量を低減した。いくつかの実施形態に従う40Hzの光の点滅への曝露は、CK-p25TgマウスにおけるγH2AX陽性細胞に同様の減少をもたらした。従って、図105は、いくつかの実施形態に従う40Hzの視覚の点滅処理がどのようにして島皮質におけるDNA損傷を低減することができるかを示す。しかしながら、メマンチン及び40Hzの光の点滅への曝露の組合せは、CK-p25TgマウスにおけるγH2AX陽性細胞の数を有意に増大した。

【0258】

図106は、NeuN（ニューロンを示す）、γH2AX（DSBを示す）、GFP（CK-p25を示す）、またはHoechst染色（皮質細胞を示す）で標識された各群における対象の代表的な島皮質の試料を示す一連の画像である。

【0259】

ガンマ曝露はまた、対象の海馬におけるCKp-25誘導性のニューロン損失及びDNA損傷も低減した。図107は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスについて、CK対照マウスにおけるNeuN陽性細胞のパーセンテージとしてのNeuN陽性細胞の量を比較する棒グラフである。従って、CK対照マウスのNeuN陽性細胞のパーセンテージは、CK対照マウスで100%であるが、未処理CK-p25Tgマウスではより80%に近く、CK-p25Tgマウスモデルにおけるニューロンの損失を裏付ける。40Hzの光の点滅への曝露の有無にかかわらず、メマンチンでの処理は、CK-p25Tgマウスにおいてニューロンの損失の防止が最小であった未処理群と比較して、CK-p25Tgマウスにおいていくらか

のニューロンの損失を防止した。従って、図107は、いくつかの実施形態に従う40Hzの視覚の点滅処理がどのようにして海馬のニューロンを保存することができるかを示す。

【0260】

図108は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25TgマウスにおけるγH2AX陽性細胞の量を比較する棒グラフである。γH2AXに対して陽性の細胞は、CK対照マウスでは存在しなかったが、未処理CK-p25Tgマウスでは非常に多く、大量のDSB及び他のDNA損傷を示した。メマンチンでの処理は未処理群と比較して、CK-p25TgマウスにおけるγH2AX陽性細胞の量を低減した。いくつかの実施形態に従う40Hzの光の点滅への曝露は、CK-p25TgマウスにおけるγH2AX陽性細胞のより良好な減少をもたらした。従って、図108は、いくつかの実施形態に従う40Hzの視覚の点滅処理がどのようにして海馬におけるDNA損傷を低減することができるかを示す。しかしながら、メマンチン及び40Hzの光の点滅への曝露の組合せは、CK-p25TgマウスにおけるγH2AX陽性細胞の数を有意に増大した。

10

【0261】

図109は、Hoechst染色（皮質細胞を示す）、GFP（CK-p25を示す）、γH2AX（DSBを示す）、またはNeuN（ニューロンを示す）で標識した各群における対象の代表的な海馬の試料を示す一連の画像である。

20

【0262】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与は、シナプスを保存すること及び／またはシナプスの損失を低減することを示した。シナプス接続の変化は、グルタミン酸作動性シナプス（例えば、VGluT1、VGluT2、PSD95、及びGluR2）ならびにGABA作動性シナプス（例えば、GAD及びVGAT）に特異的なマーカーを用いて定量化され得る。

【0263】

例えば、ガンマ曝露は、対象の視覚野におけるCK-p25誘導性のシナプス損失を低減した。図110は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスについて、ベースラインのCK対照マウスのシナプスの点密度のパーセンテージとしてのグルタミン酸作動性シナプス（VGluT1を用いて）及びGABA作動性シナプス（GAD65を用いて）の点密度を比較する棒グラフである。

30

【0264】

ガンマ曝露はまた、対象の体性感覚皮質におけるCK-p25誘導性のシナプスの損失を低減しただけでなく、シナプスの点密度を増大させた。図111は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスについて、ベースラインのCK対照マウスのシナプスの点密度のパーセンテージとしてのグルタミン酸作動性シナプス（VGluT1を用いて）及びGABA作動性シナプス（GAD65を用いて）の点密度を比較する棒グラフである。

40

【0265】

ガンマ曝露は、対象の島皮質におけるCK-p25誘導性のシナプス損失を低減した。図112は、CK対照マウス、未処理CK-p25Tgマウス、メマンチンで処理されたCK-p25Tgマウス、いくつかの実施形態に従って40Hzの光の点滅に曝露されたCK-p25Tgマウス、ならびにメマンチン及び40Hzの光の点滅の両方で処理されたCK-p25Tgマウスについて、CK対照マウスにおけるベースラインのシナプスの

50

点密度のパーセンテージとしてのグルタミン酸作動性シナプス（V G l u T 1を用いて）及びG A B A作動性シナプス（G A D 6 5を用いて）の点密度を比較する棒グラフである。

【0266】

図113Aは、H o e c h s t染色（皮質細胞を示す）による代表的な試料を示す画像である。図113Bは、この代表的な試料におけるV G l u T 1（グルタミン酸作動性シナプスを示す）を示す画像である。図113Cは、この代表的な試料におけるG A D 6 5（G A B A作動性シナプスを示す）を示す画像である。図113Dは、この代表的な試料におけるH o e c h s t染色、V G l u T 1、及びG A D 6 5を示す統合した画像である。図113E及び113Fは、G A D 6 5を用いた点の定量化方法を示す。図113Eは、図113Cから変換されたG A D 6 5の二値画像である。図113Fに示すように、I m a g e Jソフトウェア（米国国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダより入手可能）を用いて、二値画像を定量化した。

10

【0267】

いくつかの実施形態に従うガンマ曝露及び／または投与が脳血管系に影響を与えるかどうかを調べるための試験を実施した。マウスを暗箱に入れ、40Hzの発光ダイオード（L E D）の点滅、または恒明オフ（暗）のいずれかに1時間曝露した。刺激後、マウスをサクリファイスし、かん流させた。脳切片をフルオロフォアに結合したレクチンで染色し、血管を蛍光標識した。共焦点像を用いて、脈管構造のサイズ（すなわち、血管径）の変化を測定した。40HzのL E D点滅の1時間後、血管拡張が認められた。

【0268】

20

図128Aは、いくつかの実施形態に従って、視覚野における拡大した脈管構造を示す一連の代表的な免疫蛍光画像である。図128Bは、視覚野における血管径を示し、いくつかの実施形態に従うガンマ曝露後の血管径の増大を示す棒グラフである。

【0269】

従って、ガンマ曝露及び／または投与は、解剖学的（例えば、脳重量の減量及び脈管構造の拡大の予防及び／または低減）、形態学（例えば、異常な脳室の拡張及び皮層の厚さの損失の予防及び／または低減）、細胞的（例えば、ニューロンの損失の予防及び／または低減）、ならびに分子的（例えば、D N A損傷及びシナプスの損失の予防及び／または低減）利益を与えることが示された。

【0270】

30

さらに、ガンマ曝露及び／または投与には、神経保護作用があることが示された。ガンマ処理の後、C K - p 2 5 T gマウスモデル、すなわち、さもないとA β ペプチドレベルの上昇、顕著なニューロンの損失、D N A損傷、シナプスの損失、タウの高リン酸化、長期増強不全、及び重度の認知／記憶障害を示すモデルは、相対的なニューロン構造及び／または機能の保存（例えば、疾患の程度の維持／予防及び／または疾患進行の緩和／減退）を示し、いくつかの場合には、ニューロン構造及び／または機能の改善を示唆した。

【0271】

ガンマ周波数での聴覚刺激は、対象のミクログリアの変化を非侵襲的に誘導した。

いくつかの実施形態では、ガンマ曝露及び／または投与は、聴覚刺激を含む。聴覚刺激は音波パルスまたはクリックを含み得る。音刺激は、1秒当たり約35回の音波パルスまたはクリック（クリック／秒）から約45クリック／秒のクリック・トレインを含み得る。図114は、いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激を示す刺激図である。図114の刺激は、各クリック間が25ミリ秒でクリック頻度40クリック／秒を有し、各クリックが持続時間1ミリ秒を有する。

40

【0272】

いくつかの実施形態では、音刺激は、周波数約10Hz～約100kHz、約12Hz～約28kHz、約20Hz～約20kHz、及び／または約2kHz～約5kHzを有する。例えば、クリック・トレインの各音波パルスまたはクリックは、周波数約10kHzを有し得る。

【0273】

50

いくつかの実施形態では、音刺激は、音圧レベル約0 dB～約85 dB、約30 dB～約70 dB、及び／または約60 dB～約65 dBを有する。例えば、クリック・トレインの各音波パルスまたはクリックは、音圧レベル約65 dBを有し得る。

【0274】

聴覚ガンマ刺激は、いくつかの実施形態に従って、対象のミクログリアの細胞状態の変化を誘導することが示された。いくつかの実施形態に従って、聴覚ガンマ曝露及び／または投与が対象の聴覚野におけるミクログリアの活性化を誘導するかどうかを調べるための試験を実施した。図114と同様の40 Hzのクリック・トレイン刺激を用いた。この刺激は、クリック頻度約40クリック／秒を有し、各クリックはトーン約10 kHz及び約60～65 dBで約1ミリ秒の持続時間を有する。このクリック・トレイン刺激は、聴覚野におけるPV+介在ニューロンに同調し、それにより、聴覚野でガンマ振動を外因的に調節すると仮定された。

10

【0275】

図115は、本試験を示す流れ図である。図115では、WTマウスをそれらのホームケージ11500に収容した。1日1時間、連続7日間（1～7日目）、これらマウスを行動箱（すなわち、防音室）11502に移動させた。行動箱11502の中で、第1群のマウスを静寂に曝露し、第2群のマウスをいくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露した。行動箱11502での毎時間後にマウスをそれらのホームケージ11500に戻した。8日目、これらマウスを組織の採取と染色11504のためにサクリファイスした。

20

【0276】

この組織を、ミクログリア細胞のレベル、ミクログリア細胞の形態学的変化、及び細胞サイズで示されるミクログリア活性化について調べた。図116Aは、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスと比較した、静寂（無刺激）に曝露されたマウスにおけるミクログリアの平均数を示す棒グラフである。いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスで、より多くのミクログリア細胞が認められた。図116Bは、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスと比較した、静寂（無刺激）に曝露されたマウスにおけるミクログリアの突起の長さの平均比を示す棒グラフである。ミクログリアの突起の長さの平均比は、いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスで有意に低かった。図116Cは、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスと比較した、静寂（無刺激）に曝露されたマウスにおけるミクログリアの細胞サイズの平均比を示す棒グラフである。ミクログリアの細胞サイズの平均比は、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスにおいて有意に高く、いくつかの実施形態に従うより高いミクログリアの活性化を示した。

30

【0277】

図117Aは、静寂に曝露されたマウスにおけるミクログリア細胞の代表的な画像である。図117Bは、いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスにおけるミクログリア細胞の代表的な画像である。ミクログリアの突起及び細胞は、図117Aといくつかの実施形態に従う117Bの間で明らかに異なる。図118Aは、いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスからのミクログリア細胞の図117Bからの拡大画像である。ミクログリア細胞の1つの突起11800が強調表示されている。一方、図118Bは、静寂に曝露されたマウスからのミクログリア細胞の図117Aからの拡大画像である。ミクログリア細胞の1つの突起11802を強調表示し、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露されたマウスからのミクログリア細胞の比較的短い突起11800に対するその長さを示している。

40

【0278】

図119Aは、いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスからのミクログリア細胞の図117Bからの拡大画像である。このミクログリア細胞の細胞11900の場所が強調表示されている。一方、図119Bは、静寂に曝露されたマウスからのミクログリア細胞の図117Aからの拡大画像である。このミクログリア細胞

50

胞の細胞 11902 の場所を強調表示して、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスからのミクログリア細胞の比較的大きい細胞 11900 に対するそのサイズを示し、ひいては、いくつかの実施形態に従うより高いミクログリア活性化を示している。

【0279】

聴覚ガンマ刺激は、いくつかの実施形態によれば、対象においてミクログリア活性化様表現型を誘導することが示された。図 115 の試験を、いくつかの実施形態に従って、5 X F A D T g マウスで繰り返した。この組織を、ミクログリア細胞のレベル、ミクログリア細胞の形態学的変化（例えば、突起の長さ）、及びミクログリア活性化（例えば、細胞サイズで示される）について調べた。図 120 A は、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスと比較した、静寂（無刺激）に曝露されたマウスにおける画像フィールド当たりの平均ミクログリア数を示す棒グラフである。いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露されたマウスに有意に多くのミクログリア細胞が認められた。図 120 B は、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスと比較した、静寂（無刺激）に曝露されたマウスにおけるミクログリアの細胞サイズの平均比を示す棒グラフである。この細胞サイズの平均比は、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスで有意に高く、いくつかの実施形態に従って、より大きなミクログリア活性を示した。図 120 C は、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスと比較した、静寂（無刺激）に曝露されたマウスにおけるミクログリアの突起の長さの平均比を示す棒グラフである。この突起の長さの平均比は、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露されたマウスにおいて有意に低かった。

【0280】

図 121 A は、静寂に曝露されたマウスにおけるミクログリア細胞の代表的な画像である。図 121 B は、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露されたマウスにおけるミクログリア細胞の代表的な画像である。このミクログリアの突起及び細胞は、図 121 A と図 121 B 間で明らかに異なり、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露されたマウスからのミクログリアにおいて相対的に突起の長さが短く、細胞サイズが大きい。

【0281】

ガンマ周波数での聴覚刺激は、対象の聴覚野及び海馬において A β を非侵襲的に低減する。

聴覚ガンマ刺激は、いくつかの実施形態によれば、対象の A β のレベルを減少させることが示された。図 115 の試験を、いくつかの実施形態に従って、6 か月齢の 5 X F A D T g マウスで繰り返した。8 日目、この聴覚野及び海馬を切断した。E L I S A を用いて、アイソフォーム A β ₁₋₄₀ ペプチド及びアイソフォーム A β ₁₋₄₂ ペプチドを含む可溶性及び不溶性の A β アイソフォームのレベルを測定した。不溶性の A β は、5 M のグアニジン H C l で 3 時間処理し、斑を可溶化した。

【0282】

聴覚ガンマ刺激は、いくつかの実施形態によれば、対象の可溶性 A β のレベルを減少させることが示された。図 122 A は、いくつかの実施形態に従って、静寂（無刺激）に曝露されたマウスの聴覚野における可溶性アイソフォーム A β ₁₋₄₂ ペプチドのレベルに対して、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスの聴覚野におけるはるかに小さいレベルの可溶性アイソフォーム A β ₁₋₄₂ ペプチドを示す棒グラフである。

【0283】

図 122 B は、いくつかの実施形態に従って、静寂（無刺激）に曝露されたマウスの聴覚野における可溶性アイソフォーム A β ₁₋₄₀ ペプチドのレベルに対して、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスの聴覚野における小さいレベルの可溶性アイソフォーム A β ₁₋₄₀ ペプチドを示す棒グラフである。

【0284】

図 122 C は、いくつかの実施形態に従って、静寂（無刺激）に曝露されたマウスの海馬における可溶性アイソフォーム A β ₁₋₄₂ ペプチドのレベルに対して、クリック・トレ

イン刺激（刺激）に曝露されたマウスの海馬におけるはるかに小さいレベルの可溶性アイソフォーム $A\beta_{1-42}$ ペプチドを示す棒グラフである。

【0285】

図122Dは、いくつかの実施形態に従って、静寂（無刺激）に曝露されたマウスの海馬における可溶性アイソフォーム $A\beta_{1-40}$ ペプチドのレベルに対して、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスの海馬における小さいレベルの可溶性アイソフォーム $A\beta_{1-40}$ ペプチドを示す棒グラフである。

【0286】

聴覚ガンマ刺激は、いくつかの実施形態によれば、対象の不溶性 $A\beta$ のレベルを減少させることが示された。図123Aは、いくつかの実施形態に従って、静寂（無刺激）に曝露されたマウスの聴覚野における不溶性アイソフォーム $A\beta_{1-42}$ ペプチドのレベルに対して、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスの聴覚野におけるはるかに小さいレベルの不溶性アイソフォーム $A\beta_{1-42}$ ペプチドを示す棒グラフである。

【0287】

図123Bは、いくつかの実施形態に従って、静寂（無刺激）に曝露されたマウスの聴覚野における不溶性アイソフォーム $A\beta_{1-40}$ ペプチドのレベルに対して、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスの聴覚野における小さいレベルの不溶性アイソフォーム $A\beta_{1-40}$ ペプチドを示す棒グラフである。

【0288】

図123Cは、いくつかの実施形態に従って、静寂（無刺激）に曝露されたマウスの海馬における不溶性アイソフォーム $A\beta_{1-42}$ ペプチドのレベルに対して、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスの海馬におけるはるかに小さいレベルの不溶性アイソフォーム $A\beta_{1-42}$ ペプチドを示す棒グラフである。

【0289】

図123Dは、いくつかの実施形態に従って、静寂（無刺激）に曝露されたマウスの海馬における不溶性アイソフォーム $A\beta_{1-40}$ ペプチドのレベルに対して、クリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスの海馬における小さいレベルの不溶性アイソフォーム $A\beta_{1-40}$ ペプチドを示す棒グラフである。

【0290】

図124Aは、いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激に曝露された5XFADマウスにおけるミクログリア細胞の代表的な画像である。図124Bは、静寂に曝露された5XFADマウスにおけるミクログリア細胞の代表的な画像である。このミクログリアの突起及び細胞は、図124Aと図124B間で明らかに異なり、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露された5XFADマウスからのミクログリアにおいて相対的に突起の長さが短く、細胞サイズが大きい。

【0291】

図124Cは、静寂に曝露されたWTマウスにおけるミクログリア細胞の代表的な画像である。図124Dは、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露されたWTマウスにおけるミクログリア細胞の代表的な画像である。このミクログリアの突起及び細胞は、図124Cと図124D間で明らかに異なり、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露されたWTマウスからのミクログリアにおいて相対的に突起の長さが短く、細胞サイズが大きい。

【0292】

従って、いくつかの実施形態によれば、ガンマ周波数での非侵襲的な聴覚刺激は、聴覚野及び海馬におけるガンマ振動ならびにAD関連病変の顕著な減少を促進した。

【0293】

ガンマ周波数での聴覚刺激は、対象の行動に好ましい影響を与えた。

聴覚ガンマ刺激は、いくつかの実施形態によれば、対象の認識を改善することが示された。図125Aは、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露された5XFADマウス及び静寂に曝露された5XFADマウスを用いて実施された新奇物体認識

10

20

30

40

50

試験を示す流れ図である。この試験は、げっ歯類が慣れ親しんだ物体よりも新奇物体を探索するのにより多くの時間を費やす傾向に基づいて、対象が慣れ親しんだ物体から新奇物体を認識する能力（すなわち、認識記憶）を評価する。認識指数 RI を用いて対象を比較した：

$$RI = \frac{(time\ with\ new\ object)}{(time\ with\ new\ object) + (time\ with\ familiar\ object)} \quad (15)$$

【0294】

図125Aでは、5XFADマウスを環境12500に馴化させた。時間T1で、2つの新奇物体12502を導入した。その後時間T2で、1時間の休息後、これらマウスを1つの慣れ親しんだ物体及び1つの新奇物体12504、12506に1時間曝露した。図125Bは、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスがより高い RI を有していた新奇物体認識試験の結果を示す棒グラフであり、いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスが、より良好な認識記憶のために慣れ親しんだ物体より新奇物体で長い時間を費やしたことを示している。

【0295】

聴覚ガンマ刺激は、いくつかの実施形態によれば、対象の識別を改善することが示された。図126Aは、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露された5XFADマウス及び静寂に曝露された5XFADマウスを用いて実施された新奇位置認識試験を示す流れ図である。この試験は、げっ歯類が新奇に位置した物体を探索するのにより多くの時間を費やす傾向に基づいて、空間記憶及び／または識別を評価する。認識指数 RI を用いて対象を比較した：

$$RI = \frac{(time\ with\ newly\ located\ object)}{(time\ with\ newly\ located\ object) + (time\ with\ previously\ located\ object)} \quad (16)$$

【0296】

図126Aでは、5XFADマウスを環境12600に馴化させた。時間T1で、2つの物体を第一の位置12602を導入した。その後時間T2で、1時間の休息後、これらマウスをこれら物体のうちの1つをその最初の位置で、及び他の物体を新奇の第二の位置12604、12606で1時間曝露した。図126Bは、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスがより高い RI を有していた新奇位置認識試験の結果を示す棒グラフであり、いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスが、より良好な空間記憶及び／または識別のために同じ位置にとどまった物体より移動した物体で長い時間を費やしたことを示している。

【0297】

聴覚ガンマ刺激は、いくつかの実施形態によれば、対象の空間記憶を改善することが示された。Morris水迷路試験を、いくつかの実施形態に従ってクリック・トレイン刺激に曝露された5XFADマウス及び静寂に曝露された5XFADマウスを用いて実施した。上述したように、この試験は、オープン・スイミング・アリーナの周囲の開始位置から航行し、水没した逃避台の位置を見つけるための対象が用いる遠位の手がかりに基づいて、空間及び／または参照記憶を評価する。この試験は、反復試行を経て評価し、空間及び／または参照記憶は、台が存在しない場合の台の場所に対する優先傾向によって判定した。

【0298】

図127Aは、いくつかの実施形態に従って、各日の静寂（無刺激）に曝露されたマウス及びクリック・トレイン刺激（刺激）に曝露されたマウスが台を見つけるまでの平均時間を示すプロットである。図127Bは、台が除去されたプローブ試験の結果を示す棒グ

ラフである。クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスは、目標象限において見当たらない台を探すのに、静寂に曝露されたマウスよりも多くの時間を費やし、ひいては、いくつかの実施形態に従って、クリック・トレイン刺激に曝露されたマウスが、より良好な空間及び／または参照記憶を有することを示した。

【0299】

従って、いくつかの実施形態によれば、ガンマ周波数での非侵襲的な聴覚刺激は、ミクログリアの活性化を誘導し、AD関連（例えば、 $A\beta$ ）病変を低減し、認知障害（例えば、認識、識別、及び空間記憶における）を有意に軽減した。簡単に利用しやすい投与の選択肢（自己投与を含む）のため、聴覚ガンマ刺激には、家庭用または携帯用（例えば、雑音消去ヘッドホンの使用）の用途が挙げられるがこれらに限定されない広大な商業的用途の可能性もある。自己投与の可能性に加えて、臨床医及び／または研究者が、いくつかの実施形態に従って、動物モデルからヒト患者に及ぶ対象に対して刺激パラダイムを投与してもよい。臨床医及び／または研究者は、聴覚ガンマ刺激と様々な種類の監視を組み合わせることが有用であることを見出し得る。例えば、治療期間は、対象を防音室に配置することを含んでもよいし、対象に雑音消去ヘッドホンもしくは干渉を制限する別の装置を供給することを含んでもよい。該対象は、刺激の間、例えば、機能的磁気共鳴画像法（fMRI）を用いて、有益な脳状態の変化を監視され得る。

【0300】

実験方法

動物

すべての動物実験は、比較医学部門の実験動物委員会（the Committee for Animal Care of the Division of Comparative Medicine）（マサチューセッツ工科大学、マサチューセッツ州ケンブリッジ）によって承認された。成体（3か月齢）雄二重Tg 5XFAD Creマウスは、5XFAD TgマウスをTg PVまたはCW2プロモーター駆動Cre系統とかけ合わせることで産生した。成体（5か月齢）雄及び雌APP/PS1マウスは、Tonegawa Laboratory（マサチューセッツ工科大学、マサチューセッツ州ケンブリッジ）から寄贈された。成体（4か月齢）雄TauP301Sマウスは、Jackson Laboratoryより入手した。老齢WTマウス（8か月齢、C57BL/6）は、Jackson Laboratory（メイン州バーハーバー）より入手した。マウスは、3～5の群で、標準的な12時間の明/12時間の暗サイクルにて飼育し、すべての実験は、明サイクルの間に実施した。餌と水は、他に記載のない限り不断に与えた。同腹仔は、実験者によって各条件にランダムに割り当てられた。実験者には、組織の処理ならびに電気生理学的記録及び分析中、動物の遺伝子型は分からなかった。分析から除外した動物はなかった。

【0301】

AAVベクター

血清型5のアデノ随伴ウイルス粒子は、Vector Core Facility（ノースカロライナ大学、ノースカロライナ州チャペルヒル）から入手した。このAAV5ウイルスは、EF1 α プロモーターによって駆動される高感度黄色蛍光タンパク質（EYFP）に融合された二重floxed、逆方向オープン・リーディング・フレーム（DIO）内のChR2を含んでいた（例えば、図9参照）。AAV DIO EYFP構築物は対照として用いた。

【0302】

外科処置

3か月齢の5XFAD/PV-CreまたはCW2マウスは、ケタミン（ 1.1 mg kg^{-1} ）及びキシラジン（ 0.16 mg kg^{-1} ）の混合物の腹腔内注射で麻酔した。2.0mm後葉から泉門点まで及び1.8mm側葉から正中まで左側に小開頭を行った。ウイルスは、硬膜の小切開を介して、Quintessential Stereotaxic Injector（商標）（Stoelting Co.、イリノイ州ウッドデー

ルより入手可能)に取り付けられたガラス製マイクロピペットで供給した。このガラス製マイクロピペットを脳表面の下1.2mmまで下ろした。ウイルス(AAV DIO ChR2-EYFPまたはAAV DIO EYFP、1mL当たり 2×10^{12} ウイルス分子)1 μ Lのボラスを、海馬のCA1領域に $0.075 \mu\text{L分}^{-1}$ で注射した。ピペットは、注射後5分間その場に残し、その後脳から後退させた。片側光ファイバーインプラント(コア径300 μm 、Thorlabs Inc.、ニュージャージー州ニュートンより入手可能)をほぼ注射部位の脳表面の下0.9mmまで下ろした。手術部位の前縁及び後縁に固定した2つの小ネジを歯科用の接着剤で固着し、このインプラントを定位置に固定した。電気生理学的記録については、成体(3か月齢)雄5XFAD/PV-Cre二重トランスジェニックマウス及び5XFAD陰性同腹仔(CA1記録用)、または5XFAD及びそのWT同腹仔(視覚野記録用)マウスをイソフルランで麻酔し、定位フレームに入れた。頭皮を剃毛し、眼軟膏(例えば、Puralube(登録商標)Vet軟膏(Dechra Pharmaceuticals PLC、英国ノースウィッチ))を目に塗り、Betadine(登録商標)消毒剤(Purdue Products L.P.、コネチカット州スタンフォードより入手可能)及び70%エタノールを用いて手術領域を消毒した。CA1の記録については、開頭(mm単位で、泉門点から:-2A/P、1.8M/L)を行い、ウイルス1 μL をCA1に供給した(上述の通り)。LFP記録のための標的開頭部位は、頭蓋骨上にマークし(mm単位で、泉門点から:CA1については-3.23A/P、0.98M/L及び視覚野については2.8A/P、2.5M/L)、3つのセルフタッピングネジ(例えば、F000CE094、Morris Precision Screws and Parts、マサチューセッツ州サウスブリッジより入手可能)をこの頭蓋骨に取り付け、カスタムステンレス鋼ヘッドプレートを歯科用セメント(例えば、C&B Metabond(登録商標)、Parkell Inc.、ニューヨーク州エッジウッドより入手可能)を用いて取り付けた。第一の記録期間の日に、歯科用ドリルを用い、第一に頭蓋骨を厚さ約100 μm まで薄くし、その後30ゲージの針を用いて小開口を作ることによってLFP開頭術(例えば、300~400 μm 径)を行った。この開頭は、その後、滅菌シリコーンエラストマー(例えば、Kwik-Sil(商標)接着剤、World Precision Instruments, Inc.、フロリダ州サラソータより入手可能)で、その日の記録まで、及び記録期間の間、密封した。

【0303】

光遺伝学的刺激プロトコル

マウスが回復し、電気生理学用の動物用の行動訓練を受けるための、及びウイルスがニューロンで発現するための時間を与える、ウイルス注射及びインプラント設置の2~4週間後に、海馬CA1ニューロンを光遺伝学的に操作した。200mWの4793nm DPSSレーザを、各端にファイバー・チャンネル/身体的接触コネクタを備えたパッチ・コードに接続した。実験中、1mW(ファイバーの端部から測定)の光刺激を1時間送った。分子及び生化学的分析用に、各動物は、3つの刺激プロトコル、すなわち、8Hz、40Hz、もしくはランダム刺激(光パルスは、平均周波数40Hzで、ポアソン過程により決定されたランダムな間隔で送った)のうちの1つを受けたか、または、電気生理学的記録については、各動物は、記録中、交互配置されたすべての刺激条件を受けた。

【0304】

視覚刺激プロトコル

実験の15分前、5XFADマウスを生理食塩水(対照)またはピクロトキシン(0.18mg/kg)で処理した。分子及び生化学的分析用に、その後マウスを、LED電球によって照らされる暗室に入れ、5つの刺激条件、すなわち、暗、明、20Hzの点滅、40Hzの点滅、または80Hzの点滅(12.5ミリ秒の光オン、12.5ミリ秒の光オフ)1時間(例えば、図43A参照)のうちの1つに曝露した。電気生理学的記録については、各動物は、記録中、10秒のブロックで交互配置された、暗、明、40Hzの点滅、またはランダム(光パルスは、平均間隔40Hzで、ポアソン過程により決定された

ランダムな間隔で送った) 刺激条件を受けた。

【0305】

電気生理学用の行動訓練及び仮想現実環境 (VR)

C A 1 の記録については、H a r v e y らに記載の通り、頭部を固定した動物を、エアクッションで支えられた 8 インチの球状トレッドミル上を仮想現実環境で走らせた。球状トレッドミルの動きは、光学式マウスで測定し、M A T L A B (登録商標) コンピュータ環境 (ソフトウェアバージョン 2013b、MathWorks、マサチューセッツ州ナティックより入手可能) で実行中の仮想現実ソフトウェアに送った。この仮想環境は、直線トラックと、動物が向きを変えることができる端部の 2 つの小さな囲いからなる。動物は、トラックの各端への交互の訪問に対して、トラックの各端で、加糖練乳 (1:2 に水で希釈) の報酬を得た。動物は、約 1 週間以上、この仮想直線トラック上を走行することを学習した。これらの動物を 1 週間おいて手術から回復させ、1~2 日間ハンドリングに馴らし、その後行動訓練を開始した。トレッドミルを操ること、及び試験環境に慣れることを学習するように、訓練の最初の 2 日間、動物は、仮想現実システムをオフにして球状トレッドミル上に置かれ、希釈されていない加糖練乳の報酬を得た。球状トレッドミル上での訓練の 2 日目に、動物の餌を制限し、走るための動機づけをした。動物を、その基準体重のせいぜい 85% に制限し、通常はその基準体重の 88% を超えた。3 日目から訓練の終わりまで (通常 5~7 日)、動物を、時間を延長しつつ (30 分~2 時間) トレッドミル上に置き、VR 直線トラックを走行させた。動物は、トラックの長さを横断した後、直線トラックの端で希釈 (1:2) 加糖練乳の報酬を得た。記録期間の間、動物は、行動能力を維持するために再訓練期間を与えられた。視覚野の記録については、動物に球状トレッドミル上を走行させ、その間に暗、明、または光の点滅条件 (以下のデータ収集に記載) に曝露した。記録に先立って、動物は、球状トレッドミル上に置かれ (仮想現実システムをオフにして)、希釈されていない加糖練乳の報酬を得ることで、トレッドミルを操ること及び試験環境に慣れることを学習した。

【0306】

電気生理学データ収集

記録中の C A 1 の光遺伝学的刺激については、300 μm コアの光ファイバーを、C A 1 ヘウイルスを供給するために用いた開頭を介して脳内に 900 μm の深さまで進めた。1 ミリ秒及び 1 mW (ファイバーの端部から測定) の光パルスで 473 nm の D P S S (ダイオード励起固体) レーザを介して供給した (上述の通り)。光電アーチファクトを避けるため、神経活動はガラス電極で記録した。L F P 電極は、ホウケイ酸ガラス製ピペット (例えば、W a r n e r I n s t r u m e n t s、コネチカット州ハムデンより入手可能) から、フィラメント系のマイクロピペットブラー (例えば、P-97 F l a m i n g / B r o w n (商標) マイクロピペットブラー、S u t t e r I n s t r u m e n t C o .、カリフォルニア州ナバトより入手可能) にて引き延ばして微細な先端にし、これを次に手で折って直径約 10~20 μm に戻し、その後滅菌生理食塩水で満たした。C A 1 の記録については、この L F P 電極を、L F P 記録用開頭を介して、前頭面に対して後方に 60 度の角度及び水平面に対して下側 45 度で、海馬層の錐体層の明確な電気生理学的サイン (動物の走行中、約 600~1000 μV のシータ波、不動状態では明らかに区別できる S W R、150 μV を超える複数のスパイク、例えば、図 2 A~2 B 参照) が認められるまで進めた。視覚野の記録については、L F P 電極は、L F P 記録用開頭を介して垂直に 600~900 μm の深さまで進め、150 μV を超える複数のスパイクが認められた。データは、サンプリングレート 20 kHz 及びバンドパスフィルター 1 Hz~1 kHz で収集した。動物は、長期にわたって球状トレッドミル上を走行させたか、または休息させた。光遺伝学的刺激期間については、いずれかの刺激の開始前 30 分間データを記録した。その後、刺激をガンマ (40 Hz)、ランダム (光遺伝学的刺激で記載)、またはシータ (8 Hz) の周波数で 10 秒間の周期を 10 秒間のベースライン周期 (無刺激) と交互配置して供給した。2 匹の動物において、各タイプの刺激またはベースラインを 10 秒周期の代わりに 5 分周期で供給した。各 30 分間の刺激の記録の後、5~30 分間

の無刺激の記録を行った。視覚の光の点滅刺激期間については、10秒間の光オフの周期を交互配置して、動物ライト周囲のLEDストリップライトをガンマ（40Hz）、ランダム（視覚刺激プロトコルに上述）、シータ（8Hz）、または20Hzの周波数で10秒間の周期で点滅させたか、または、10秒間の連続オンの周期であった。光の点滅の間、脳表面の上でいくつかの記録を行い、記録中にこれらのライトが電氣的または光電ノイズを生成しないことを保証した。記録期間は、約3～5時間後に終了させた。動物は、記録時、3～4か月齢であった。電気生理学的記録の分析

【0307】

スパイク検出

スパイクは、300～6000Hzのバンドパスシグナルを閾値化することによって検出した。閾値は、スパイクによる標準偏差測定のコントラミネーションをさけるため、フィルターにかけられたシグナルの中央値プラスフィルターにかけられたシグナルの標準偏差のロバスト推定量の5倍（中央値／0.675）であった（例えば、Rossant et al., "Spike Sorting for Large, Dense Electrode Arrays," bioRxiv doi:dx.doi.org/10.1101/015198 (Feb. 16, 2015) 参照）。

【0308】

局所電場電位（LFP）

記録されたトレースを、2kHzに低解像度処理し、1～300Hz間でバンドパスフィルターにかけた。

【0309】

シータ及びSWR検出

動物が走行や静止をすると、海馬のネットワークを通じた活動は顕著に変化し、これらの変化はしばしば異なるネットワーク状態と呼ばれる。これらのネットワーク状態は、異なる周波数帯域におけるLFP振動の有無によって明らかに区別できる。動物が走行した際、他が示したように、CA1において大きなシータ（4～12Hz）振動が認められた（例えば、図2A参照）。動物が静止した際、シータ振動はもはや見られず、SWR、すなわち、約50～100ミリ秒続き、集団的活動のバーストと関連する150～250Hzの高周波振動（例えば、図2B参照）が記録された。SWRは、フィルターにかけられたトレースのエンベロープ振幅が、少なくとも15ミリ秒に対する平均の上側4標準偏差を超えた時に検出された（例えば、図4A、4B、5A、5B、6A、6B、7B、及び8参照）。エンベロープ振幅は、フィルターにかけられたLFPのヒルベルト変換の絶対値を取って計算した。本明細書に開示の結果は、SWR検出のため、より高閾値、すなわち、より大きなSWRを検出する、平均の上側6標準偏差を用いた場合に有効であることが確認されている（例えば、図6C及び7C参照）。シータを検出するため（例えば、図3A及び3C参照）、FIR等リップルフィルターを用いて、LFPをシータ（4～12Hz）、デルタ（1～4Hz）、及びベータ（12～30Hz）についてバンドパスフィルターにかけた。デルタ及びベータに対するシータの比（「シータ比」）を、デルタ及びベータエンベロープ振幅の合計で除したシータエンベロープ振幅として計算した。シータ周期は、シータ比が少なくとも2秒間平均の上側1標準偏差を超え、この比が平均の上側少なくとも2標準偏差のピークに達した場合にそのように分類した。非シータ周期は、このシータ比が少なくとも2秒間1未満の場合にそのように分類した。SWR、シータ周期、及び非シータ周期を視覚的に検査し、これらの基準がそれぞれ、SWR、シータ周期、及び非シータ周期を正確に検出することを確認した。

【0310】

パワースペクトル

スペクトル解析は、マルチテーパー法を用いて実施した（例えば、Mitra Lab in Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク州コールドスプリングハーバーより入手可能なChronuxのオープンソースソフトウェア、時間帯域幅積＝3、テーパー数＝5）。刺激なしのパワースペクトルを調べるため（例えば

、図 3 A 及び 3 C 参照)、シータ周期のみを含めた。5 秒の長さを超えるシータ周期を 5 秒の試験に分割し、平均パワースペクトル密度をこれらの試験にわたって各動物について計算した。光遺伝学的刺激(例えば、図 1 3 A 及び 6 C 参照)及び視覚刺激(例えば、図 4 3 B 及び 4 3 C 参照)中にパワースペクトルを調べるため、データは、各刺激条件またはベースライン周期の 10 秒試験に分割し、平均パワースペクトル密度をこれら試験にわたって各動物について計算した。

【0311】

SWR 中のガンマ

スペクトログラムは、マルチテーパー法を用いて計算した(例えば、M i t r a L a b i n C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y、ニューヨーク州コーールドスプリングハーバーより入手可能の C h r o n u x のオープンソースソフトウェア)。スペクトログラムは、SWR のピークの前後 400 ミリ秒の期間を含む各 SWR について計算した。その後、z スコアのスペクトログラムは、全記録期間にわたって計算したスペクトログラムの平均及び標準偏差を用いて各周波数帯域で計算し、標準偏差の単位でパワーの正規化された尺度を生成した(例えば、図 4 A、4 B、5 A、及び 5 B 参照)。SWR 中のガンマ振動の瞬時周波数は、L F P を 10 ~ 50 H z に対してバンドパスフィルターにかけ、ヒルベルト変換をし、その後変換されたシグナルのピークの差の逆数をとって計算した(例えば、図 4 A、5 A、及び 6 B 参照)。SWR の前、最中、及び後のガンマパワーは、L F P を低ガンマ(20 ~ 50 H z)に対してフィルターにかけ、ヒルベルト変換のエンベロープ振幅を取ることで計算し、SWR ピークを中心とした 100 ミリ秒のビンにおける平均ガンマパワーを得た。これは、全記録期間についてのエンベロープ振幅の平均及び標準偏差によって正規化し、各 SWR の周囲の各ビンについての z スコアのガンマパワーを得た(例えば、図 6 A 及び 7 B 参照)。SWR 中のガンマによる位相変調は、L F P をガンマ(20 ~ 50 H z)に対してバンドパスフィルターにかけ、ヒルベルト変換をし、SWR 中に生じた各スパイクに対して得られたシグナルの位相を決定することによって計算した(例えば、図 7 E 参照)。5 X F A D 及び W T 動物間で位相変調の差を測定するため、復元再抽出を用いた。すなわち、各記録から 100 スパイクのサブセットをランダムに選択して位相変調分布を作成し、これを各記録について 500 回繰り返した(例えば、図 6 C 及び 7 A 参照)。変調の深さは、その後、各分布に対するピークとトラフの和で除したピークとトラフの差を計算することによって、スパイクガンマ位相分布を測定した(例えば、図 6 C 及び 7 A 参照)。刺激中の発火の差：刺激によって誘発されたマルチユニット発火ヒストグラムをプロットするため、パルスの各光の開始後 100 ミリ秒について、スパイクを 2.5 ミリ秒のビンにし、各ビンにおけるスパイクの割合を計算した。平均及び S E M をその後周期のすべての光にわたって計算した。条件間のマルチユニット発火率の差を計算するため、発火率を各 10 秒間の刺激またはベースライン周期について計算した(周期の期間で除した合計スパイク数)。発火率の差は、関連のあるタイプの刺激の隣接する周期間で取った(光遺伝学的刺激についてはガンマ刺激周期マイナスベースラインまたはランダム周期の発火率、光の点滅刺激については、ガンマ刺激周期マイナスベースライン、連続オン、またはランダム周期の発火率)。すべての動物からの差をヒストグラムにプロットし(例えば、図 1 4 A 及び 4 4 A 参照)、動物当たりの差の中央値及び四分位数を箱ひげ図にプロットした(例えば、図 1 3 B 及び 4 4 A 参照)。

【0312】

免疫組織化学

マウスは、深麻酔下で 4 % のパラホルムアルデヒドでかん流し、脳を 4 % のパラホルムアルデヒドで一夜後固定した。脳をビブラトーム(例えば、L e i c a V T 100 S、L e i c a B i o s y s t e m s、イリノイ州バッファローグローブより入手可能)を用いて 40 μ m で切片にした。切片を、室温で 1 時間、0.2 % の T r i t o n X - 100 及び 10 % の正常口バ血清を含む P B S で透過処理及びブロックした。切片を一次抗体の P B S 溶液中、4 $^{\circ}$ C で 0.2 % T r i t o n X - 100 及び 10 % 正常口バ血清とともに一夜インキュベートした。一次抗体は、抗 E E A 1 (B D T r a n s d u c t i

on Laboratories (商標) EEA1 (641057)、BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼより入手可能)、抗 β アミロイド (例えば、 β アミロイド (D54D2) XP (登録商標)、Cell Signaling Technology、マサチューセッツ州ダンバースより入手可能)、抗Iba1 (例えば、019-19741、Wako Chemicals、バージニア州リッチモンドより入手可能)、抗パルプアルブミン (例えば、ab32895、Abcam、マサチューセッツ州ケンブリッジより入手可能)、抗Rab5 (ADI-KAp-GP006-E、Enzo Life Sciences Inc.、ニューヨーク州ファーマンデールより入手可能)であった。ELISA実験を確認するため、EEA1との同時標識を可能にすることから抗A β 抗体D54D2を用い、APPと反応せず、この標識がA β に特異的かどうかについての判断を可能にすることから、抗A β 抗体12F4を用いた。同時標識実験については、抗A β 抗体12F4 (805501、BioLegend、カリフォルニア州サンディエゴより入手可能)を用いた。一次抗体は、Alexa-Fluor 488及びAlexa-Fluor 647二次抗体 (Molecular Probes)、Hoechst 33342 (94403、Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイスより入手可能)でのニューロン核で可視化した。画像は、共焦点顕微鏡 (LSM 710、Zeiss (商標))を用い、すべての条件に対して同一の設定で取得した。画像は、ImageJ 1.42qを用い、処理群が分からない実験者が定量化した。各実験条件に対して、少なくとも3匹の動物から少なくとも2つの冠状断面を定量化に用いた。海馬CA1画像化については、十分な細胞数を画像化するのに全視野が必要なIba1+細胞分析の場合を除いて、この分析を錐体細胞層に限定した。ImageJを用いて、Iba1+細胞体の直径を測定し、長さ測定の過程をトレースした。さらに、Coloc2プラグインを用いて、Iba1及びA β の共局在化を測定した。3-Dレンダリング用にImaris x64 8.1.2 (Bitplane、英国ベルファストより入手可能)を用いた。「斑数」の計数に関しては、10 μ m以上の沈着物を含めた。

【0313】

CLARITY

固定した脳を1XPBS中、ビブラトーム (例えば、Leica VT100S、Leica Biosystems、イリノイ州バッファローグロブより入手可能)で100 μ mの冠状断面にスライスした。Allen Mouse Brain Atlasを参照して視覚野を含む切片を選択し、清澄用緩衝液 (pH 8.5~9.0、ドデシル硫酸ナトリウム200mM、水酸化リチウム水和物20mM、ホウ酸4mMのddH₂O溶液)中、55℃で振盪しながら2時間インキュベートした。清澄切片を1XPBST (0.1% Triton X-100/1XPBS)で3×10分間洗浄し、ブロッキング用溶液 (2%ウシ血清アルブミン/1XPBST)に入れ、室温で一夜振盪した。次に、1XPBST中で、室温にて振盪しながら1時間の洗浄を3回実施した。切片をその後、1:100に1XPBSTで希釈した抗 β アミロイド (805501、BioLegend、カリフォルニア州サンディエゴより入手可能)及び抗Iba1 (Wako Chemicals、バージニア州リッチモンド、019-19741)一次抗体とともに振盪しながら4℃で2時間インキュベートした。さらに3×1時間の洗浄を1XPBST中で実施した後、切片を、1:100に1XPBSで希釈した二次抗体混合物中、室温にて振盪しながら9時間インキュベートした。断片化ロバ抗ウサギAlexa Fluor (登録商標) 488 (ab175694)及び抗マウス568 (ab150101)二次抗体 (いずれもAbcam、マサチューセッツ州ケンブリッジより入手可能)を用いて一次抗体標識を可視化した。このインキュベート期間の途中で、Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich、94403)を各試料中に最終希釈1:250でスパイクした。切片をその後室温で振盪しながら1XPBS中で一夜洗浄した。画像化用にマウントする前に、スライスを、室温で振盪しながら、1時間、RIMS (屈折率整合溶液: Histodenz 75g、0.1Mリン酸緩衝液20mL、ddH₂O 60mL)中でインキュベートした。Fluoromount G Mounting Medium (Elect

10

20

30

40

50

ron Microscopy Sciences、米国ペンシルベニア州ハットフィールド)を用い、カバースリップ(例えば、VistaVision(商標)、VWR International, LLC、ペンシルベニア州ラドナーより入手可能)とともに組織切片を顕微鏡のスライドにマウントした。画像を、Zen Black 2.1ソフトウェア(Carl Zeiss Microscopy、ドイツ、イエナ)付随のZeiss(商標)LSM 880顕微鏡で取得した。3-D復元に用いる断面の概観及び細胞レベルの画像をPlan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC対物レンズを用いて撮影した。Imaris x64 8.1.2(Bitplane(商標)(スイス、チューリヒ))を3-Dレンダリング及び分析に用いた。

【0314】

ウェスタンブロット

海馬CA1全細胞溶解物は、3か月齢の雄5XFAD/PV-Creマウスの組織を用いて調製した。組織を手動式ホモジナイザー(Sigma-Aldrich(ミズーリ州セントルイス))を用いて1mlのRIPA(Tris HCl pH8.0 50mM、NaCl 150mM、NP-40 1%、デオキシコール酸ナトリウム0.5%、SDS 0.1%)緩衝液中でホモジナイズし、氷上で15分間インキュベートし、4℃で30分間回転させた。14,000rpmで10分間の遠心分離により細胞残屑を単離し廃棄した。溶解物を、ナノドロップを用いて定量化し、25µgのタンパク質を10%アクリルアミドゲルにロードした。100Vで120分間、タンパク質をアクリルアミドゲルからPVDF膜(例えば、Invitrogen(商標)、Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサムより入手可能)に移した。TBS:Tweenで希釈したウシ血清アルブミン(5%w/v)を用いて膜をブロックした。膜を一次抗体中、4℃で一夜、及び二次抗体中、室温で90分間インキュベートした。一次抗体は、抗APP(Invitrogen(商標)PAD CT695、Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサムより入手可能)、抗APP(A8967、Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイスより入手可能)、抗βアクチン(ab9485、Abcam、マサチューセッツ州ケンブリッジより入手可能)であった。二次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合(例えば、GE Healthcare、マサチューセッツ州モールバラより入手可能)であった。シグナル強度は、ImageJ 1.46aを用いて定量化し、βアクチンの値に対して正規化した。タウタンパク質の溶解性は、順次タンパク質抽出を用いて調べた。界面活性剤不溶性タウ画分は、Tau5に対する抗体(例えば、AHB0042、Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサムより入手可能)を用いてプローブした。

【0315】

ELISA

海馬CA1またはVCを雄のマウスから単離し、PBSまたは5MのグアニジンHClで溶解し、マウス/ヒトAβ₁₋₄₀またはAβ₁₋₄₂ELISAキット(例えば、Invitrogen(商標)、Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサムより入手可能)を用い、製造業者の取扱説明書に従ってAβ測定に供した。組織はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で溶解し、PBS可溶性Aβ画分を抽出した。この可溶性Aβ画分は、恐らくモノマー及びオリゴマーのAβを含んでいた。組織をさらにグアニジン塩酸(HCl)で処理し、不溶性Aβ画分を抽出した。

【0316】

ゲノムワイドRNAシーケンシング

RNeasy(登録商標)キット(Qiagen、ドイツ、ヒルデンより入手可能)を用いて、海馬CA1単離物から全RNAを抽出した。BIOO NEXTflex(商標)キット(BIOO番号5138-08)を製造業者の取扱説明書の通りに用いるRNA-seqライブラリの調製用に、精製mRNAを用いた。簡潔には、全mRNA1µgを、ポリA精製、断片化、第一のフレックスストランド及び第二のストランド合成、DNA

10

20

30

40

50

末端アデニル化、ならびにアダプターライゲーションの連続ワークフローに供した。これらライブラリは、15サイクルのPCR反応により濃縮し、Agencourt（登録商標）AMPure XP磁気ビーズ（Beckman Coulter Genomics、マサチューセッツ州ダンバーズより入手可能）で洗浄した。ライブラリの品質は、Advanced Analytical-fragment Analyzerを用いて評価した。バーコード化されたライブラリは、MIT BioMicro Center（マサチューセッツ工科大学、マサチューセッツ州ケンブリッジ）にて、Illumina HiSeq 2000プラットフォームの単一のレーンにおけるシーケンシングのため、均等に混合した。50塩基対シングルエンドシーケンシングリードの生fastqデータを、TopHat 2.0ソフトウェア（ジョンズ／ホプキンス大学、メリーランド州ボルチモアの計算生物学センターより入手可能、RNA-seqリードを哺乳類サイズのゲノムに対して、超高スループットショートリードアライナBowtieを用いて整列させ、その後マッピングの結果を分析してエクソン間のスプライス部位を特定するため）を用いてマウスmm9参照ゲノムに対して整列させた。マッピングされたリードをCufflinks 2.2ソフトウェア（ワシントン大学Trapnell Lab、ワシントン州シアトルより入手可能）により、UCSCmm9参照遺伝子注釈で処理し、転写物の存在量を推定し、差次的発現を調べた。転写物の相対的存在量は、マッピングされた100万断片当たりのエクソンのキロベース当たりの断片（FPKM）で測定した。処理及び未処理群間の遺伝子の差次的発現試験は、Cuffdiffモジュール（転写物の発現、スプライシング、及びプロモーターの使用における有意な変化を見つけるため。Cufflinks 2.2ソフトウェア（ワシントン大学Trapnell Lab、ワシントン州シアトルより入手可能）の一部として含まれる）を用い、統計的有意性に対する調整p値<0.05で実施した（GEO登録：GSE77471）。

【0317】

RNA-seqデータから細胞及び分子機序を理解するため、14の公開されているRNA-seqデータセットを細胞型特異的分析用に処理した。さらに、60の公開されている異なる化学的及び遺伝的摂動下でのニューロン、ミクログリア、ならびにマクロファージ特異的RNA-seqデータセットをダウンロードし、GSEA統計分析用に、TopHat Cufflinks 2.2ソフトウェア（ワシントン大学Trapnell Lab、ワシントン州シアトルより入手可能）を用いて処理した。遺伝子セットエンリッチメント解析（GSEA）を用いて、RNA-seqデータからの定義された遺伝子セットが、特定の摂動試験からのランク付けされた遺伝子リストのいずれかの方向で有意に濃縮されるかどうかを判定した。公開されているRNA-seqデータセットにおいて検出された遺伝子を発現比（症例対対照）のlog2値によって正から負の値にランク付けした。定義された遺伝子セット（この場合、ガンマ処理での上方または下方制御された遺伝子）は、名目上のp値及びFDRのq値がいずれも0.05未満の場合、摂動に誘導されたトランスクリプトーム的变化（上方または下方制御のいずれか）と有意に相関すると考えられた。計算された正規化エンリッチメントスコア（NES）の符号は、遺伝子セットがランク付けされたリストの上位または下位で濃縮されるかどうかを示す。差次的に発現される遺伝子のヒートマップは、カスタムRスクリプトを用いて生成し、各遺伝子に対するすべてのライブラリにわたるzスコア値を、遺伝子FPKM値を基に計算した。細胞型特異性分析に対する箱ひげ図もまた、遺伝子FPKM値を基にRプログラムによって生成した。

【0318】

定量的RT-PCR

CA1は、3か月齢の雄5XFAD/PV-Creマウスの海馬から単離した。液体窒素を用いて組織を急速に凍結し、-80℃で保存し、製造業者のプロトコル（Qiagen（ドイツ、ヒルデン））に従ってRNeasyキットを用いてRNAを抽出した。RNA（3µg）をDNase Iで処理し（4U、Worthington Biochemical Corporation（ニュージャージー州レークウッド））、RNA CL

ean及びConcentrator-5キット (Zymo Research (カリフォルニア州アーバイン)) を用い、製造業者の取扱説明書に従って精製し、 $14\mu\text{L}$ のDEPC処理水で溶出した。各試料について、ランダムヘキサマー混合物及びSuperscript III逆転写酵素 (50U 、Invitrogen (商標)、ThermoFisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサムより入手可能) を含む $20\mu\text{L}$ の反応体積中、 50°C で1時間、 $1\mu\text{g}$ のRNAを逆転写した。第一ストランドcDNAを1:10に希釈し、 $1\mu\text{L}$ を、プライマー ($0.2\mu\text{M}$) を含む $20\mu\text{L}$ の反応物 (SsoFast (商標) EvaGreen (登録商標) Supermix、Bio-Rad) 中でのRT-qPCR増幅に用いた。遺伝子発現の相対的变化を $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法を用いて評価した。

10

【0319】

視覚野からのミクログリアの単離。V1領域を迅速に切断し、氷冷ハックス平衡塩類溶液 (HBSS) (Gibco (商標) 14175-095、Life Technologiesより入手可能) に入れた。この組織を次に、製造業者のプロトコルにわずかな改変を加えて従い、神経組織解離キット (P) ($130-092-628$ 、Miltenyi Biotec、マサチューセッツ州ケンブリッジ) を用いて酵素的に消化した。具体的には、組織を35分間の代わりに15分間、 37°C で酵素的に消化し、得られた細胞懸濁液を、MACS (登録商標) SmartStrainer、 $70\mu\text{m}$ の代わりに $40\mu\text{m}$ の細胞濾過器 (352340 、Falcon Cell Strainers, Sterile、ニューヨーク州コーニング) を通した。得られた細胞懸濁液をその後アロフィコシアニン (APC) コンジュゲートCD11bマウスクローンM1/70.15.11.5 ($130-098-088$ 、Miltenyi Biotec、マサチューセッツ州ケンブリッジ) 及びフィコエリトリン (PE) コンジュゲートCD45抗体 (例えば、BD Pharmingen (商標)、 553081) を用いて染色した。蛍光活性化細胞分類 (FACS) を次に用いてCD11b及びCD45陽性ミクログリア細胞を精製した。これらの細胞は直接1XPBSに分取した (例えば、図52A参照)。

20

【0320】

統計

正規分布しなかった電気生理学的データについては、別段の記載がない限り、結果は中央値及び四分位数として示した。等しい中央値に対する両側ウィルコクソン順位検定を実施し、分布が有意に異なるかどうかを判定したか、または、ウィルコクソン符号順位検定を実施し、これらが、データが正規分布していると仮定しない場合に分布がゼロから有意差があるかどうかを判定した。ばらつきは、統計的に比較された群間で同様であった。ボンフェローニの方法を用いて多重比較を補正した。分子及び生化学的結果を平均及びSEMで示す。本開示に記載のパーセンテージは群平均である。すべての統計分析は、Prism GraphPadソフトウェア (GraphPad software Inc.、カリフォルニア州ラ・ホーヤ) を用いて実施した。正規性はD'Agostino & Pearsonオムニバス正規性検定を用いて判定した。ばらつきは、統計的に比較された群間で同様であった。2群からなる正規分布したデータに対する比較データは、両側独立t検定によって分析した。3群以上からなる正規分布したデータに対する比較データは、一元配置分散分析に続いてテューキーの多重比較検定によって分析した。非正規分布データに関する比較データは、マン・ホイットニー検定を用いて行った。各実験についての統計検定、正確なP値、及びサンプルサイズ (n) を図の凡例に明記する。分子及び生化学的分析を、条件当たり最低3回の生物学的反復を用いて実施した。

30

40

【0321】

聴覚ガンマ刺激生成

MATLAB (登録商標) プログラミング言語 (MathWorks、マサチューセッツ州ナティックより入手可能) に構成される以下のスクリプトは、いくつかの実施形態に従って聴覚クリック・トレイン刺激を生成する1つの方法を示す：

50

```

click_freq=input('Specify Number of Clicks Per Second: ');%Obtain desired
    number of clicks per second from the keyboard
click_duration=input('Specify Click Duration in Milliseconds: ');%Obtain
    desired click duration from the keyboard
sound_freq=input('Specify Sound Frequency in Hertz: ');%Obtain desired
    sound frequency in Hertz from the keyboard
sound_duration=input('Specify Sound Duration in Seconds: ');%Obtain
    desired sound duration from the keyboard
%audio_sample_rate=input('Specify Audio Sample Rate in
    Hertz: ');%Obtain desired audio sample rate from the keyboard
audio_file_name=input('Specify Audio File Name and
    Extension: ');%Obtain desired audio file name from the keyboard

rfreq=2*pi*sound_freq;%Convert sound frequency to radian frequency
%% audio_sample_rate = double(sound_freq*8);
%%
%% if audio_sample_rate < 8192
%%     audio_sample_rate = 8192
%% end

audio_sample_rate = 200000;

%Ts=linspace(0,
    sound_duration,audio_sample_rate*sound_duration);%Specify sample
    times over 4 seconds (default sample rate in 8192 Hz)
Ts=0:1/audio_sample_rate:sound_duration;

sound_signal=cos(rfreq*Ts);%Calculate the cosine for the entire sound
    duration

pulse_width = click_duration/1000;% pulse width
D_1 = pulse_width/2:1/click_freq:max(Ts);% 50Hz repetition freq; note:
    starting D at width/2 instead of 0 to shift the pulse train to the right by
    width/2 and thus start the train at 0
pulse_train_mask = pulstran(Ts, D_1, 'rectpuls', pulse_width);

%Mask the sound signal with the pulse train mask
sound_signal_masked = sound_signal.*pulse_train_mask;

%Play the click sound
soundsc(sound_signal_masked, audio_sample_rate);

%Save the audio file
audiowrite(audio_file_name, sound_signal_masked, audio_sample_rate);

```

【 0 3 2 2 】

結論

様々な発明に関する実施形態を本明細書に記載及び説明してきたが、当業者には、本明細書に記載の機能を実行し、及び／またはその結果及び／または1つ以上の利点を獲得するための様々な他の方法及び／または構造が容易に想起されるときにも、かかる変化及び／または修正の各々は、本明細書に記載の本発明の実施形態の範囲内であると見なされる。より一般的には、当業者には、本明細書に記載のすべてのパラメータ、寸法、材料、及び構成が例示的であることを意図し、実際のパラメータ、寸法、材料、及び／または構成は、本発明の開示が用いられる特定の用途または複数の用途に依存するということが容易

に理解されよう。当業者は、従来の実験だけを用いて、本明細書に記載の特定の発明に関する実施形態の多くの等価物を認識し、またはこれらを確認することができるであろう。従って、前述の実施形態が単なる例示として提示され、添付の特許請求の範囲及びその等価物の範囲内で、発明に関する実施形態が、具体的に記載され、請求される以外の方法で実施され得ることを理解されたい。本開示の発明に関する実施形態は、本明細書に記載の個々の特徴、システム、物品、材料、キット、及び／または方法に関する。さらに、かかる特徴、システム、物品、材料、キット、及び／または方法の2つ以上の組合せは、かかる特徴、システム、物品、材料、キット、及び／または方法が互いに矛盾しない限り、本開示の発明の範囲内に含まれる。

【0323】

上記実施形態は、多くの方法のいずれかで実行することができる。例えば、本明細書に記載の実施形態は、ハードウェア、ソフトウェア、またはそれらの組合せを用いて実行してもよい。ソフトウェアで実行する場合、該ソフトウェアのコードは、単一のコンピュータに設けられていようと複数のコンピュータに分配されていようと、任意の適切なプロセッサまたは一群のプロセッサで実行することができる。

【0324】

さらに、コンピュータは、複数の形態のいずれか、例えば、ラックマウント型コンピュータ、デスクトップ型コンピュータ、ラップトップ型コンピュータ、またはタブレット型コンピュータで具体化され得ることを理解されたい。加えて、コンピュータは、個人用デジタル補助装置(PDA)、スマートフォン、または任意の他の適切な携帯用もしくは固定電子デバイスを含めた一般にはコンピュータと見なされないが適切な処理能力がある装置に埋め込まれてもよい。

【0325】

また、コンピュータは、1つ以上の入力及び出力装置を有し得る。これらの装置を用いて、とりわけ、ユーザインタフェースを提供することができる。ユーザインタフェースを提供するために用いることができる出力装置の例としては、出力の視覚的提示用のプリンタまたは表示画面、及び出力の可聴提示用のスピーカまたは他の音声発生装置が挙げられる。ユーザインタフェースのために用いることができる入力装置の例としては、キーボード、ポインティング・デバイス、例えば、マウス、タッチパッド、及び離散化タブレットが挙げられる。別の例として、コンピュータは、入力情報を音声認識を介して、または他の可聴形式で受信してもよい。

【0326】

かかるコンピュータは、ローカルエリア・ネットワークまたは広域ネットワーク、例えば、企業ネットワーク、及びインテリジェント・ネットワーク(IN)またはインターネットを含めた任意の適切な形態の1つ以上のネットワークで相互接続されてもよい。かかるネットワークは、任意の適切な技術に基づいていてもよく、任意の適切なプロトコルに従って作動してもよく、無線ネットワーク、有線ネットワーク、または光ファイバー・ネットワークを含んでもよい。

【0327】

本明細書で概説した様々な方法またはプロセスは、様々なオペレーティング・システムまたはプラットフォームのいずれか1つを使用する1つ以上のプロセッサで実行可能なソフトウェアとしてコード化され得る。さらに、かかるソフトウェアは、複数の適切なプログラミング言語及び／またはプログラミングもしくはスクリプト作成ツールのいずれかを用いて書かれてもよく、また、フレームワークもしくは仮想計算機上で実行される、実行可能な機械語コードまたは中間コードとしてコンパイルされ得る。

【0328】

また、様々な発明に関する概念は、例が提供されている1つ以上の方法として具体化されてもよい。該方法の一部として実行される行為は、任意の適切な方法で順序付けられ得る。従って、行為が説明されているものと異なる順序で実行される実施形態が構成されてもよく、これは、例示的な実施形態では連続的な行為として示されていても、いくつかの

10

20

30

40

50

行為を同時に実行することを含んでもよい。

【0329】

本明細書で言及するすべての刊行物、特許出願、特許、及びその他の参考文献は、参照することによりそれらの全体が組み込まれる。

【0330】

本明細書で定義され使用されるすべての定義は、辞書的定義、参照により組み込まれる文書における定義、及び／または定義された用語の通常の意味を制御すると理解されたい。

【0331】

本明細書及び特許請求の範囲において使用される不定冠詞「a」ならびに「an」は、それと異なるように明確に示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解されたい。

10

【0332】

本明細書及び特許請求の範囲において使用される「及び／または」という表現は、そのように結合された要素の「いずれかまたは両方」を意味すること、すなわち、ある場合には接続的に存在し、他の場合には離接的に存在する要素を意味することを理解されたい。

「及び／または」とともに列挙される複数の要素は、同じように、すなわち、そのように結合された要素の「1つ以上」と解釈されるべきである。「及び／または」の節によって明確に同定された要素以外に、明確に同定されたそれらの要素と関連していても関連していなくても、他の要素が任意に含まれる場合がある。従って、非限定的な例として、「含む」等のオープンエンドの用語と併せて用いられた場合、「A及び／またはB」への言及は、1つの実施形態では、Aのみ（B以外の要素を任意に含む）、別の実施形態では、Bのみ（A以外の要素を任意に含む）、さらに別の実施形態では、AとBの両方（他の要素を任意に含む）、等を指すことができる。

20

【0333】

本明細書及び特許請求の範囲において使用される「または」は、上で定義した「及び／または」と同じ意味を有すると理解されたい。例えば、リスト内の項目を分離する場合、「または」もしくは「及び／または」は、包括的、すなわち、複数の要素または要素のリストの少なくとも1つであるが、同様に複数、及び任意にリストにないさらなる項目の包含として解釈されるものとする。それとは異なるように明確に示される限定用語、例えば、「1つだけの」もしくは「厳密に1つの」または、特許請求の範囲で使用される場合、「～からなる」は、例えば、複数の要素または要素のリストのうちの厳密に1つの要素の包含と見なす。一般に、本明細書で使用される「または」という用語は、排他的な用語、例えば、「いずれか」、「1つの」、「ただ1つの」、または「厳密に1つの」が先行する場合、排他的な選択肢（すなわち、「一方または他方であるが両方でない」）を示すと解釈されるのみとする。特許請求の範囲で使用される場合、「本質的に～からなる」は、特許法の分野で使用されるその通常の意味を有するものとする。

30

【0334】

本明細書及び特許請求の範囲において使用される、1つ以上の要素のリストを参照した「少なくとも1つ」という表現は、要素のリスト内の任意の1つ以上の要素から選択される少なくとも1つの要素であるが、必ずしも要素のリスト内に具体的に記載されたありとあらゆる要素の少なくとも1つを含まず、要素のリスト内の任意の要素の組合せを排除しないことを意味すると理解されたい。この定義はまた、「少なくとも1つ」という表現が言及する要素のリスト内で明確に同定された要素以外に、明確に同定された要素に関連しているか関連していないかにかかわらず、要素が任意に含まれる場合があることを許可する。従って、非限定的な例として、「A及びBのうちの少なくとも1つ」（または、同等に、「AまたはBのうちの少なくとも1つ」もしくは同等に「A及び／またはBのうちの少なくとも1つ」）は、1つの実施形態では、少なくとも1つの、任意に複数を含めて、AでBを含まず（任意にB以外の要素を含む）、別の実施形態では、少なくとも1つの、任意に複数を含めて、BでAを含まず（任意にA以外の要素を含む）、さらに別の実施形態では、少なくとも1つの、任意に複数を含めて、A及び少なくとも1つの、任意に複数

40

50

を含めて、B（任意に他の要素を含む）、等を指すことができる。

【0335】

特許請求の範囲において、ならびに上記明細書において、すべての移行句、例えば、「**comprising**（含む）」、「**including**（含む）」、「**carrying**（有する）」、「**having**（有する）」、「**containing**（含む）」、「**involving**（含む）」、「保持する」、「**composed of**（～からなる）」等は、オープンエンドである、すなわち、～を含むがこれに限定されないということを意味すると理解されるべきである。米国特許局特許審査便覧、第2111.03条に記載の通り、移行句「**consisting of**（～からなる）」及び「**consisting essentially of**（～から本質的になる）」のみが、クローズドまたはセミクローズドの移行句であるものとする。

10

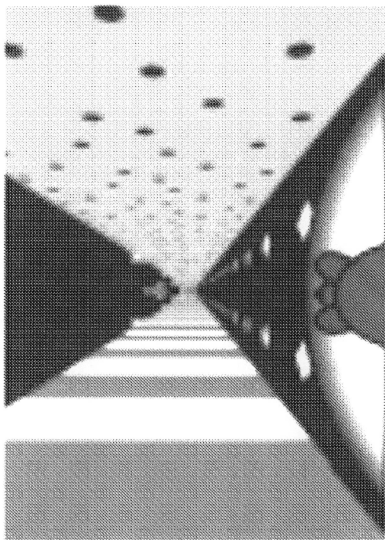
20

30

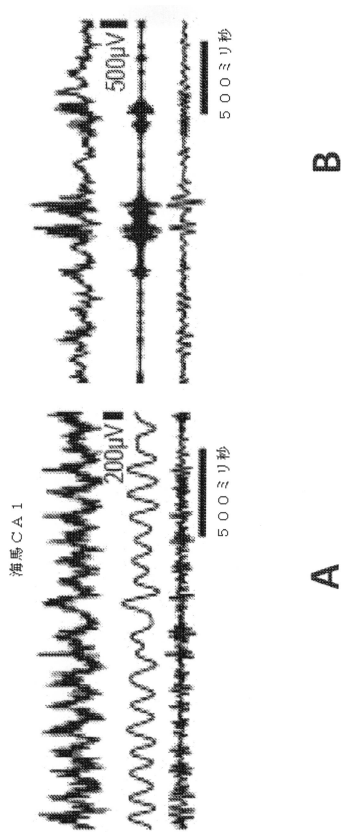
40

50

【図面】
【図 1】



【図 2】



10

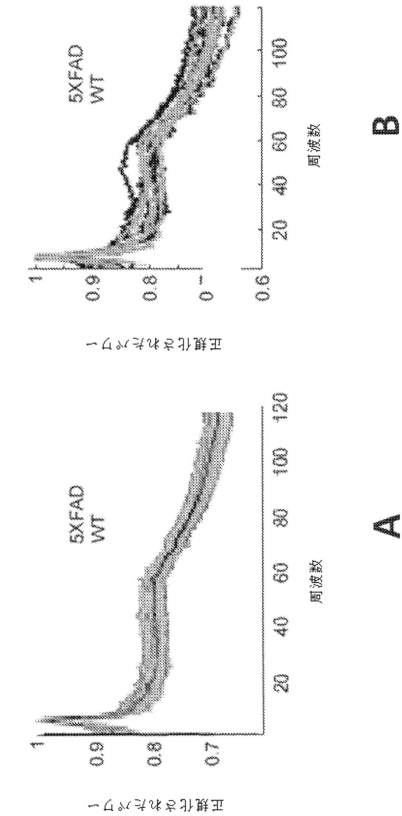
20

30

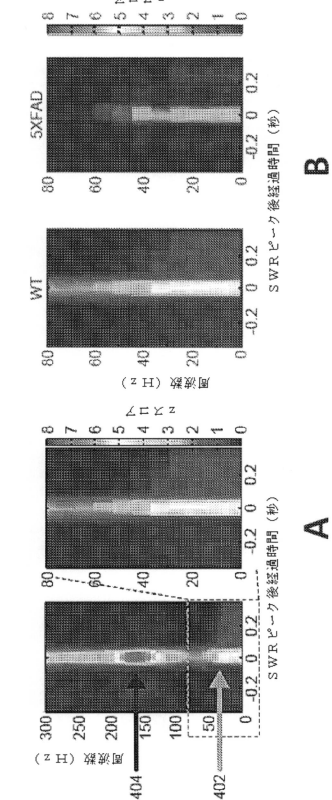
40

50

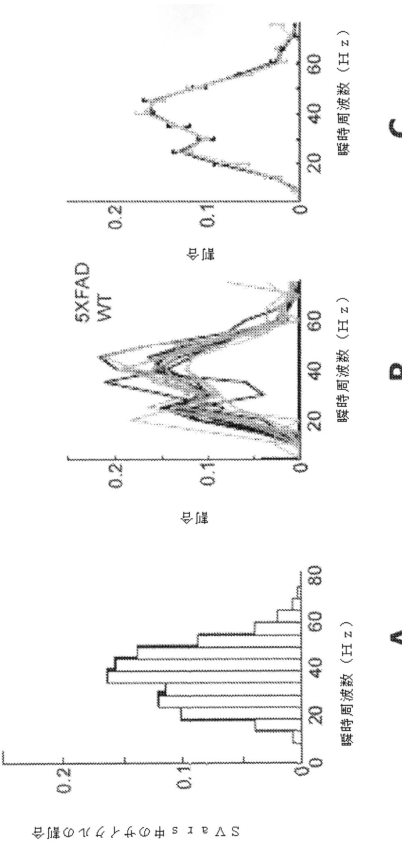
【図 3】



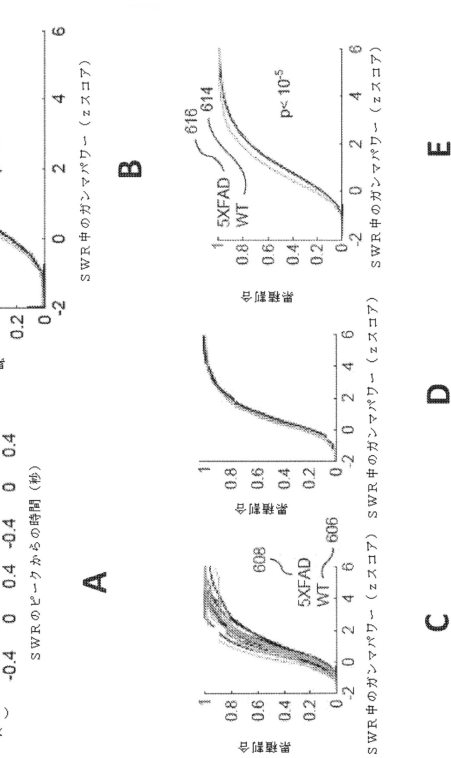
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

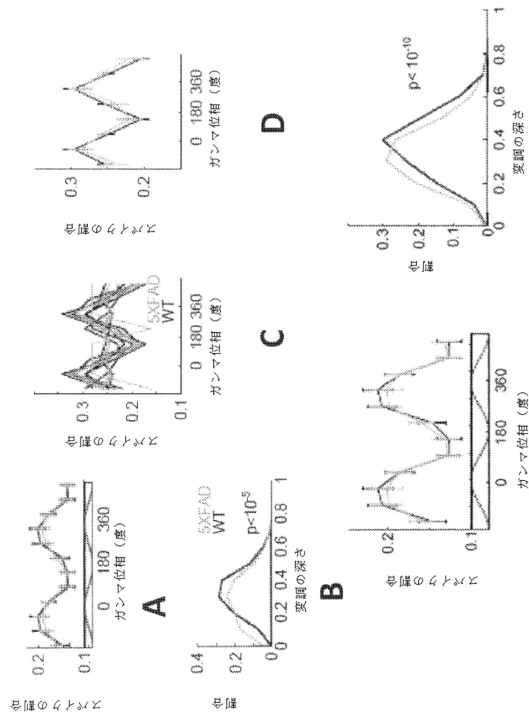
20

30

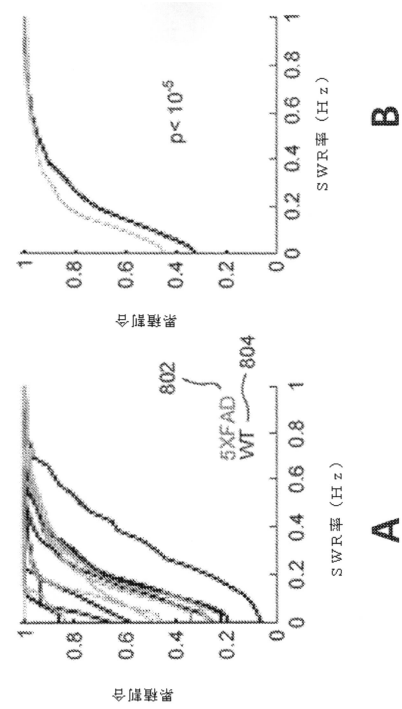
40

50

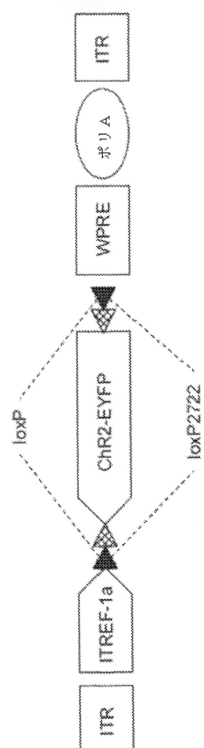
【圖 7】



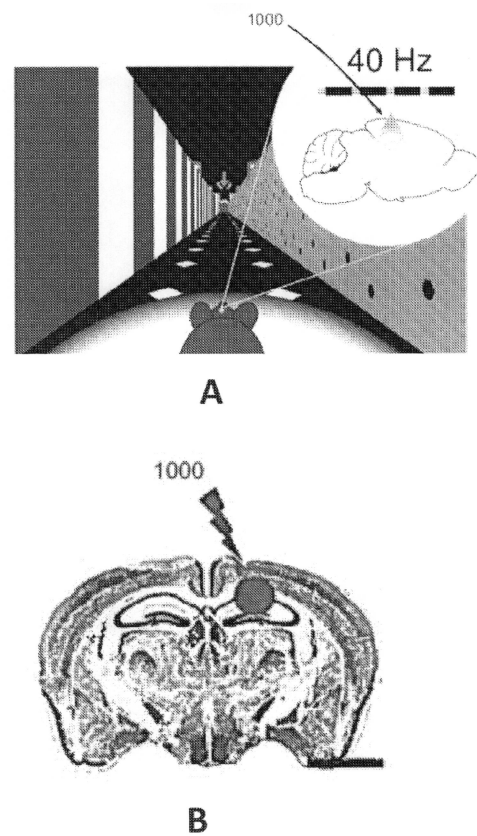
【図 8】



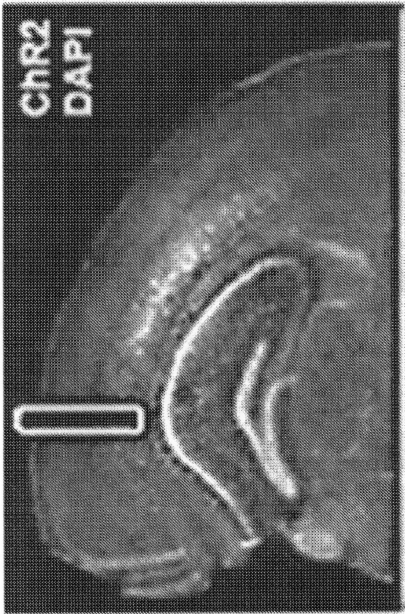
【図 9】



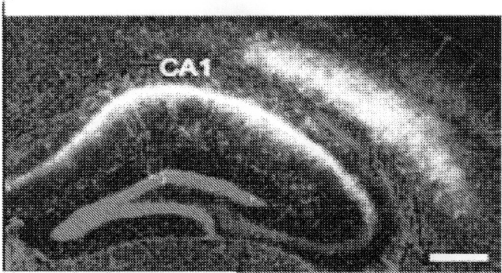
【図 10】



【図 1 1】

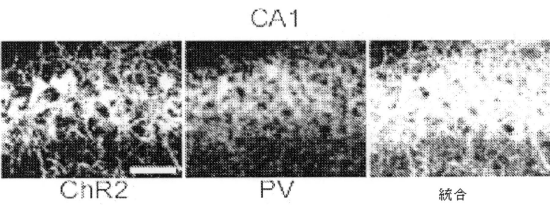


【図 1 2】



A

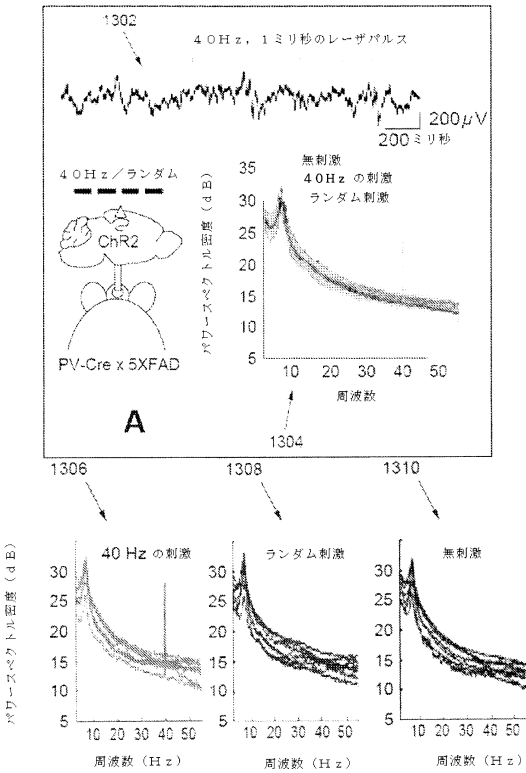
10



B

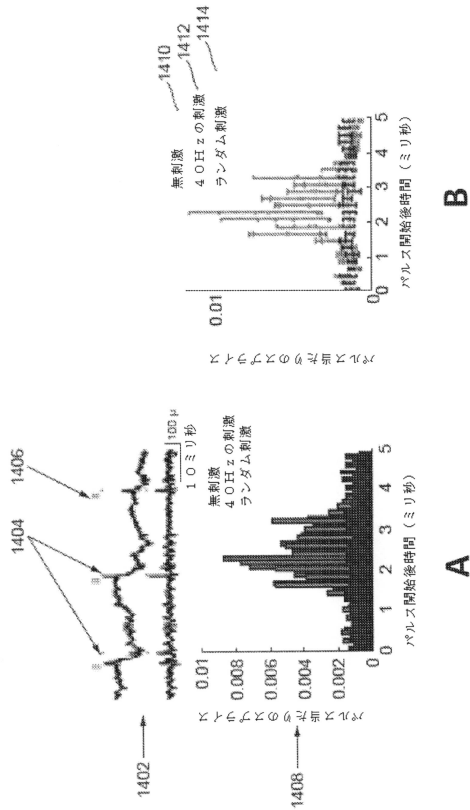
20

【図 1 3】



B

【図 1 4】



A

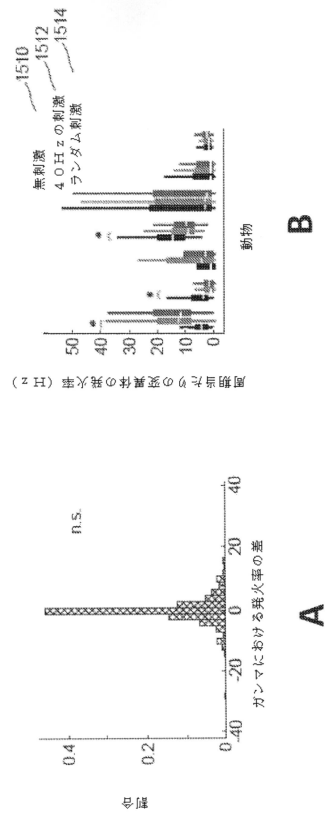
B

30

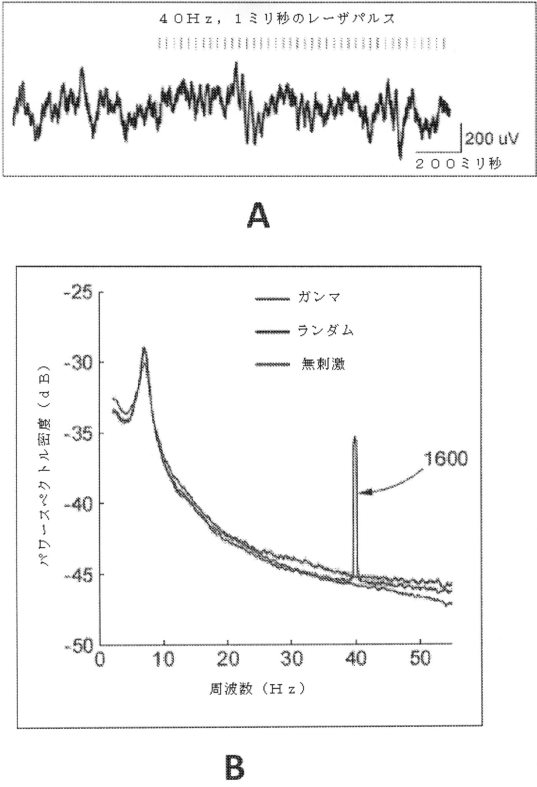
40

50

【図 1 5】



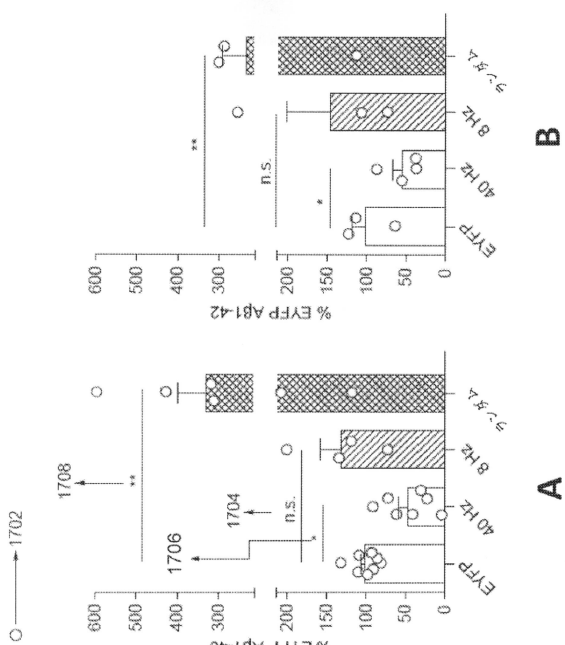
【図 1 6】



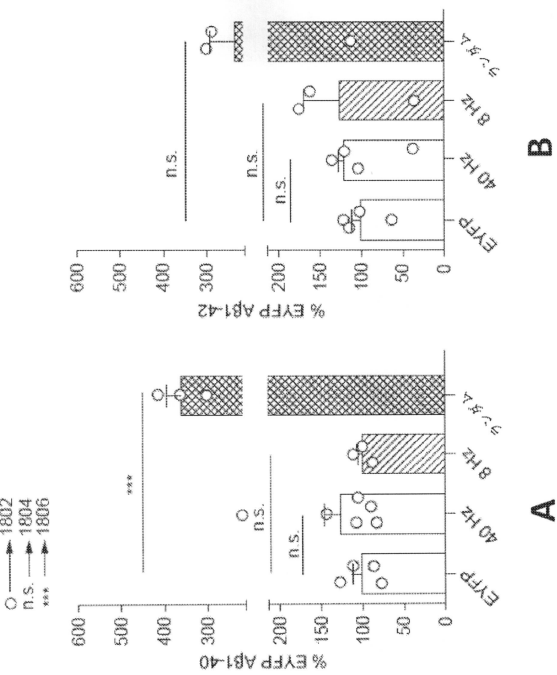
10

20

【図 1 7】



【図 1 8】

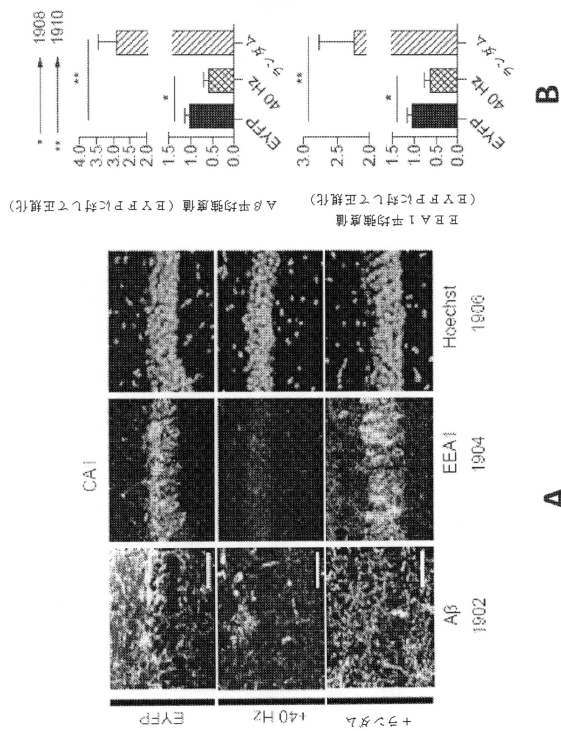


30

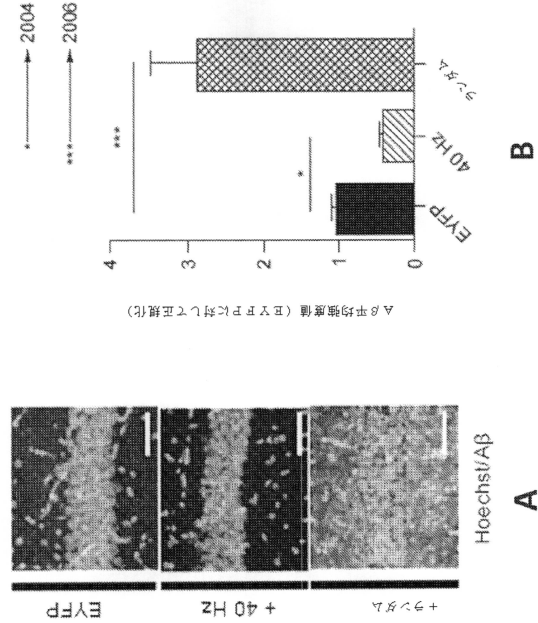
40

50

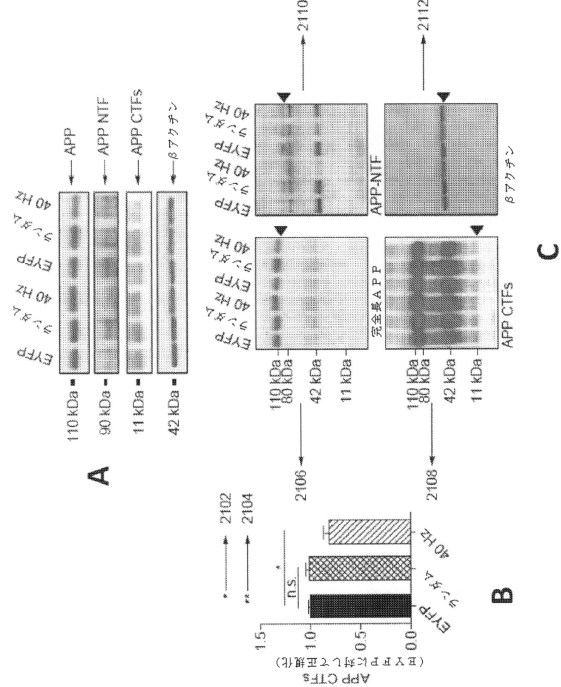
【図 19】



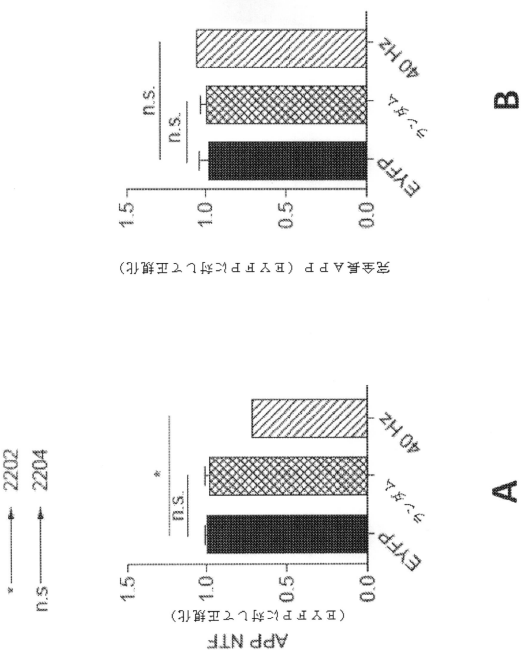
【図 20】



【図 21】



【図 22】



10

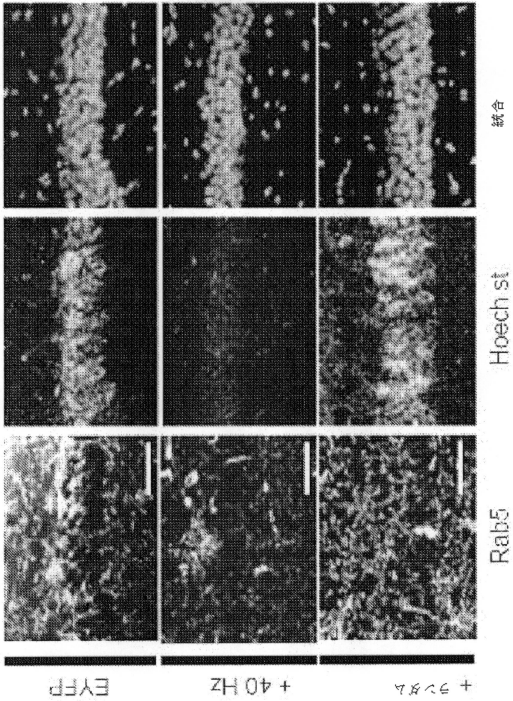
20

30

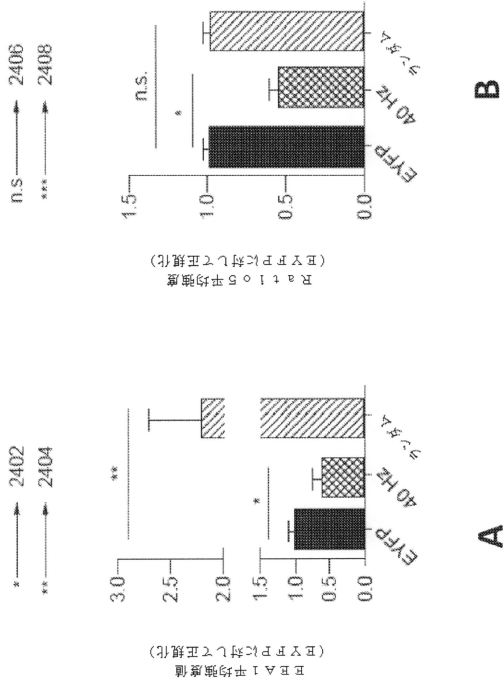
40

50

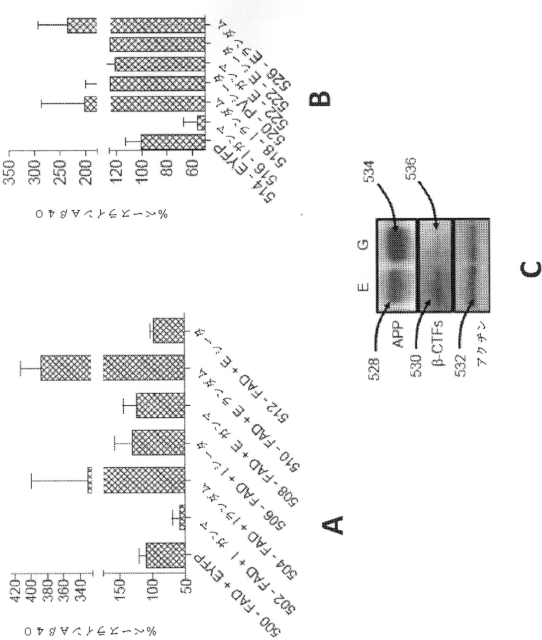
【図 2 3】



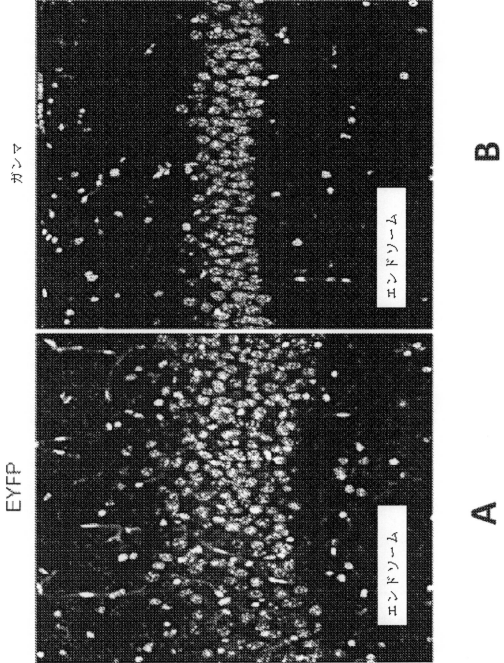
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

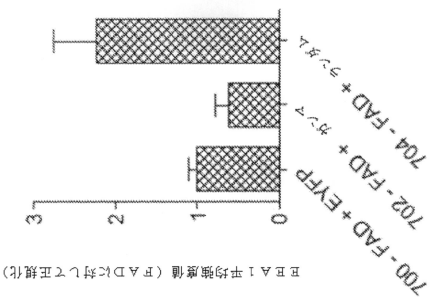
20

30

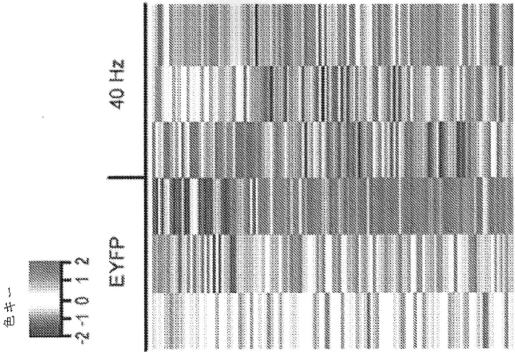
40

50

【図 2 7】

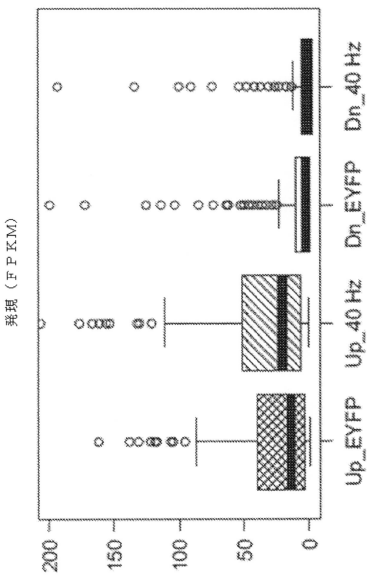


【図 2 8】

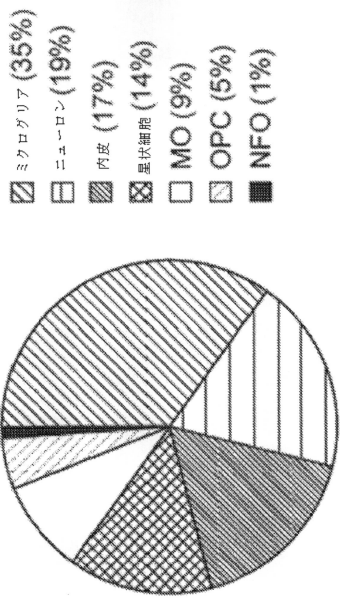


10

【図 2 9】



【図 3 0】



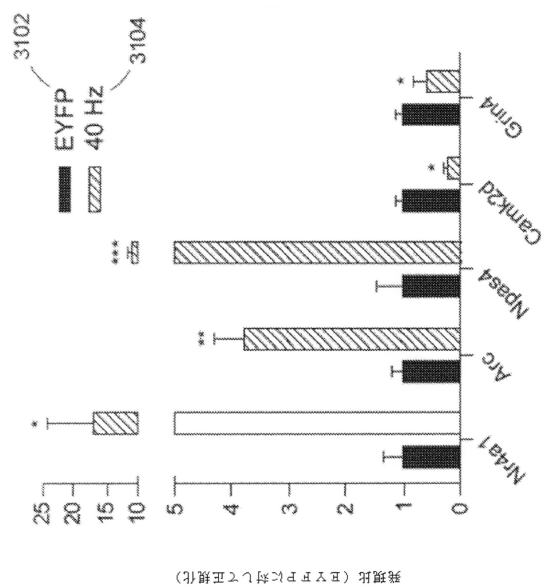
20

30

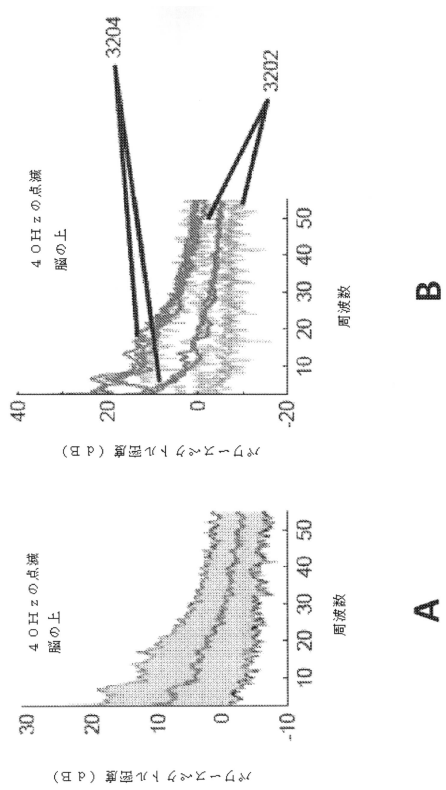
40

50

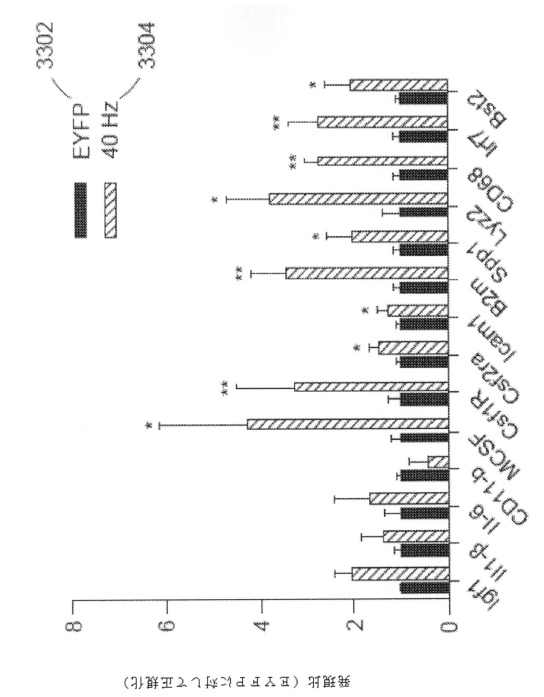
【図 3 1】



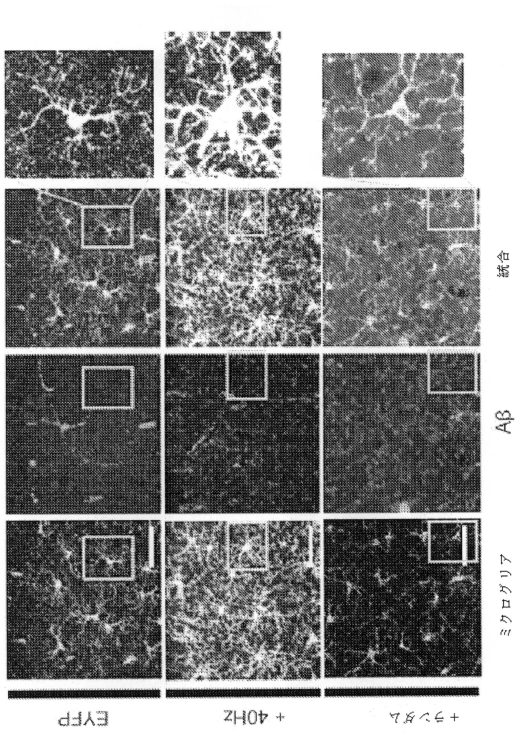
【図 3 2】



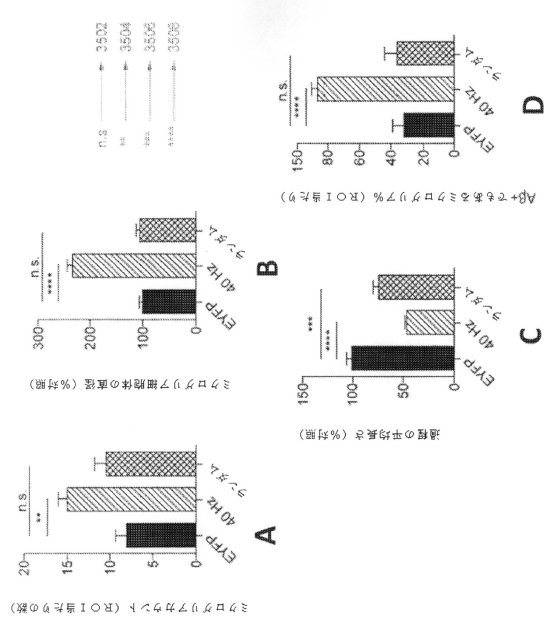
【図 3 3】



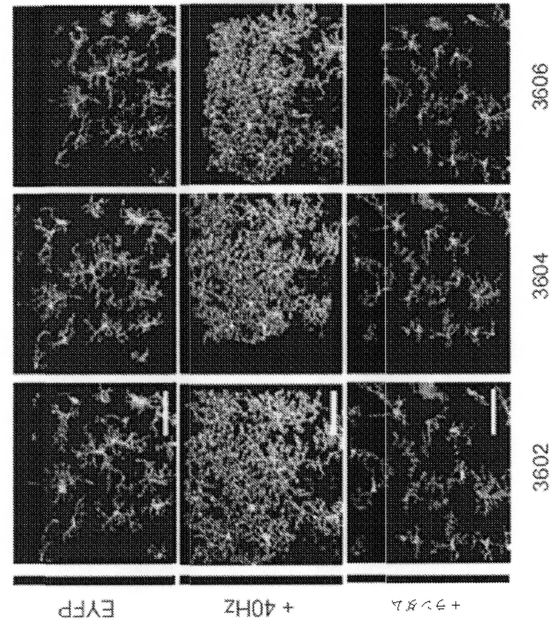
【図 3 4】



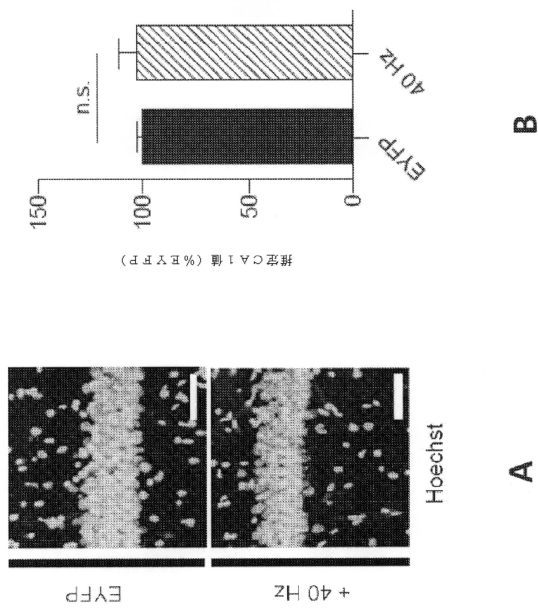
【図 3 5】



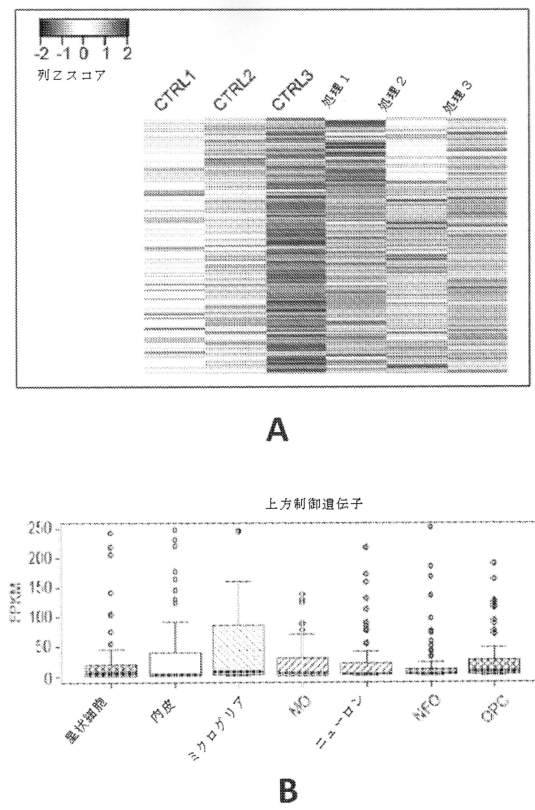
【図 3 6】



【図 3 7】



【図 3 8】



10

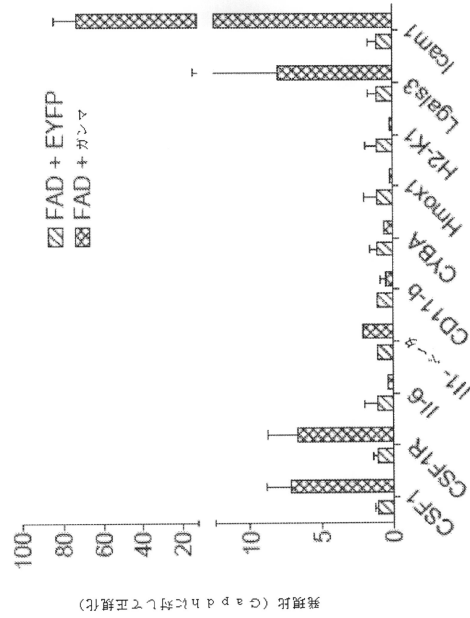
20

30

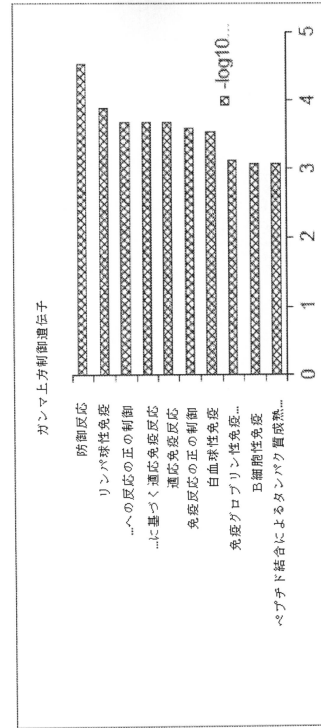
40

50

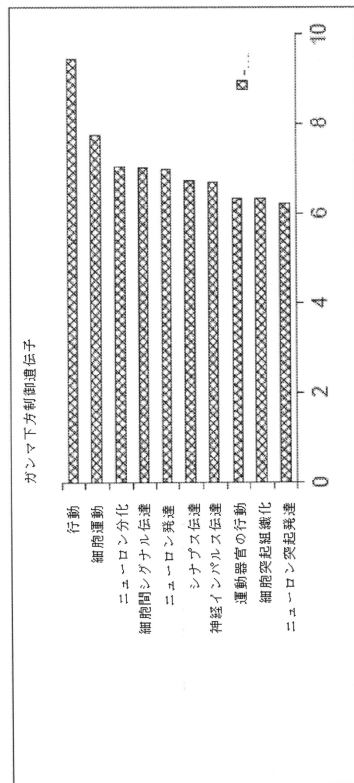
【図 3 9】



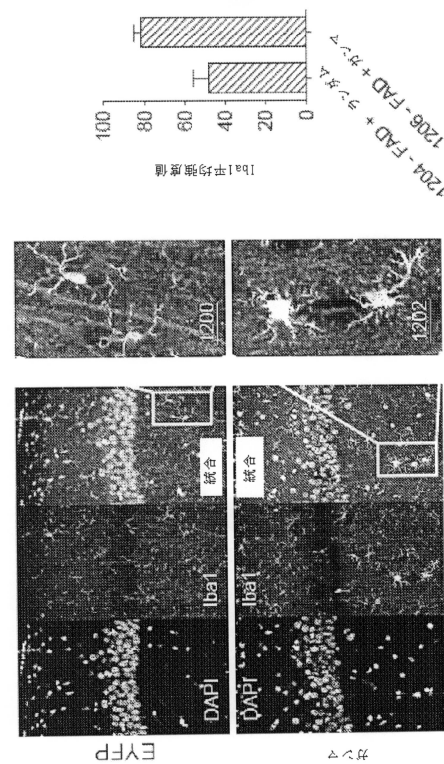
【図 4 0】



【図 4 1】



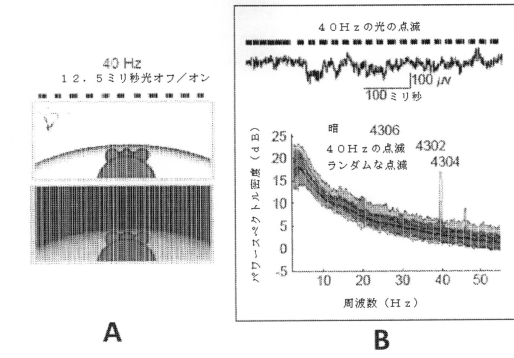
【図 4 2】



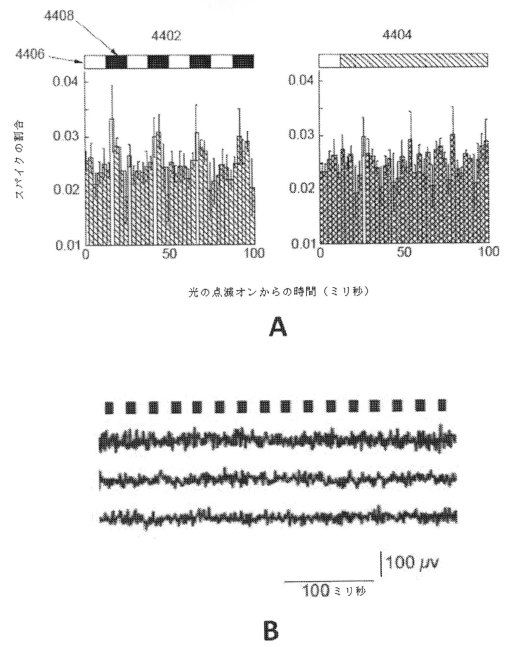
B

A

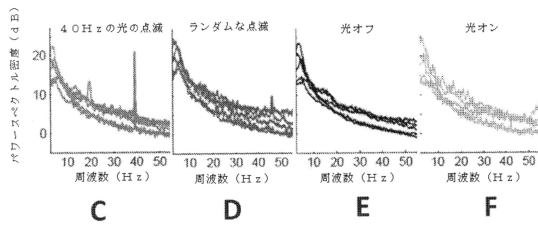
【図 4 3】



【図 4 4】

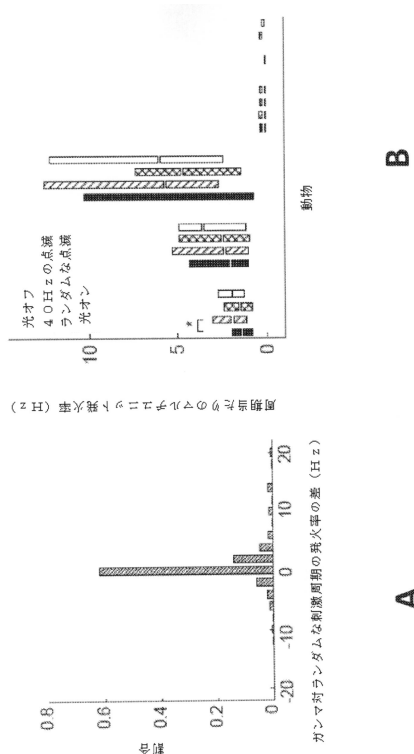


10

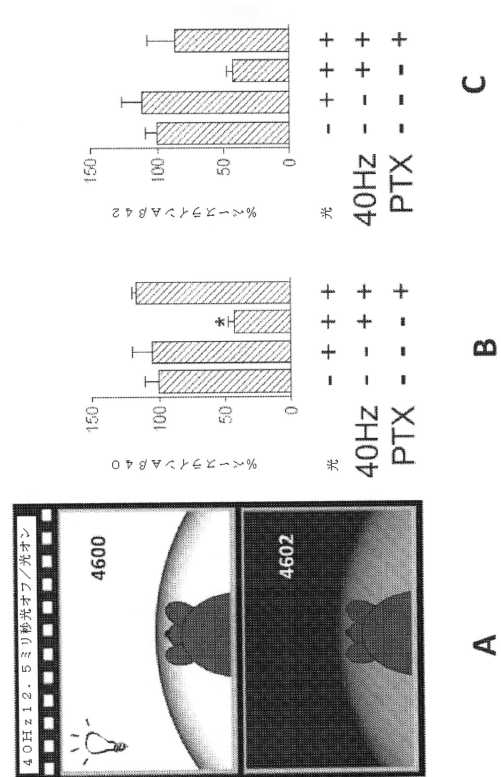


20

【図 4 5】



【図 4 6】

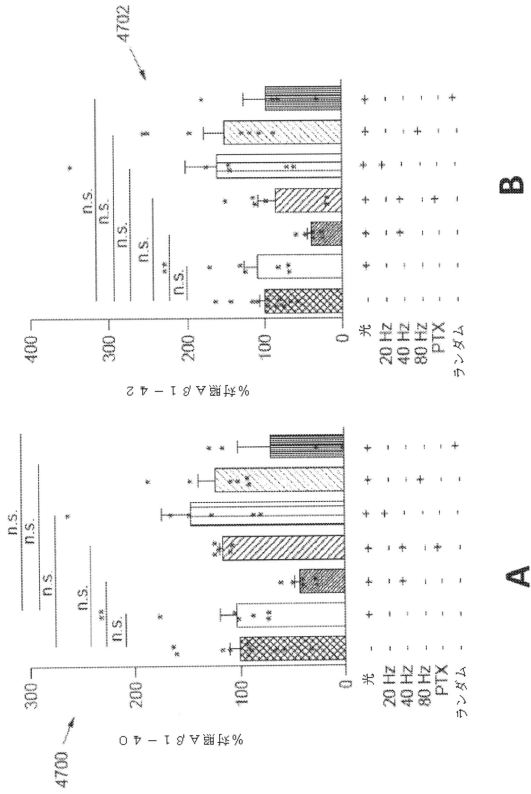


30

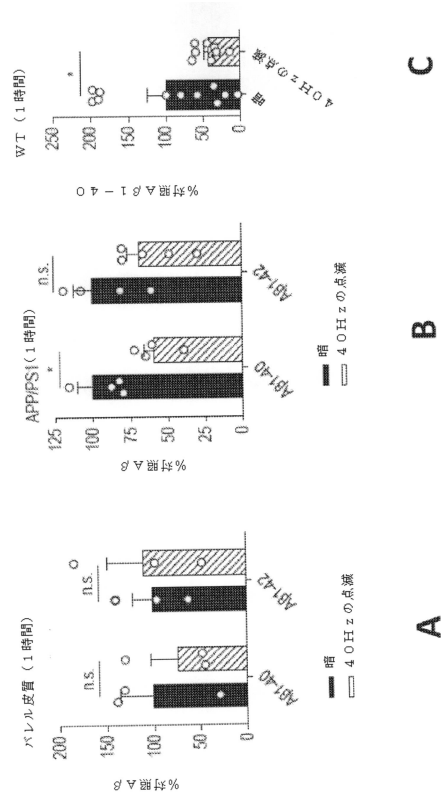
40

50

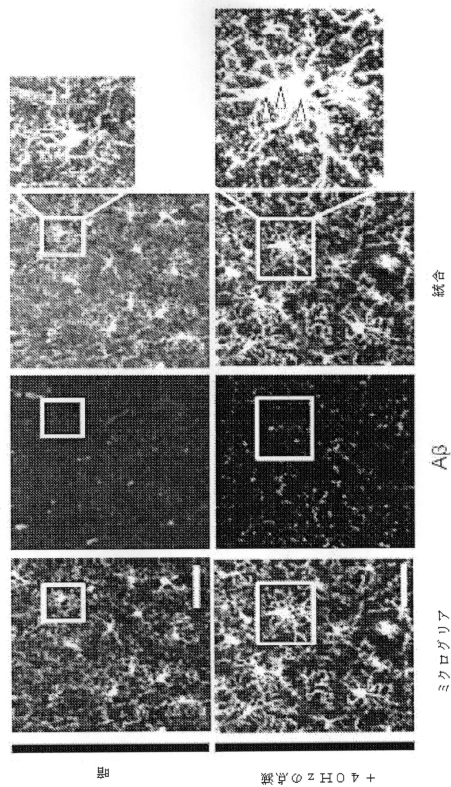
【図 47】



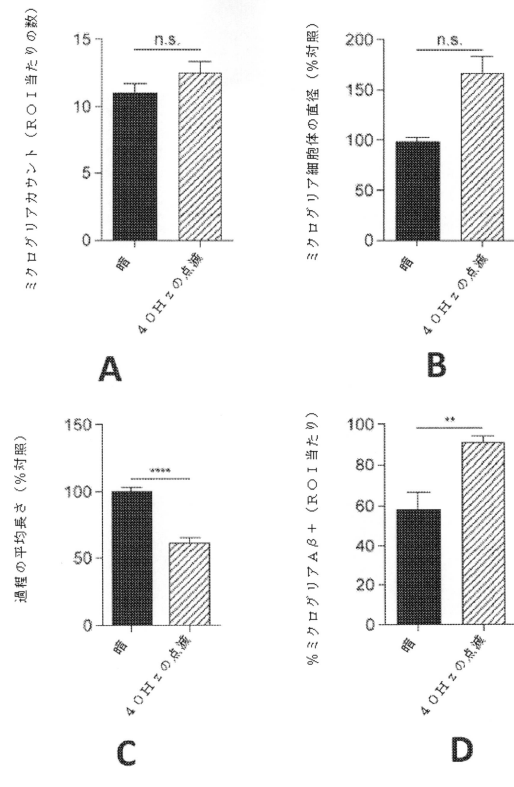
【図 48】



【図 49】



【図 50】



10

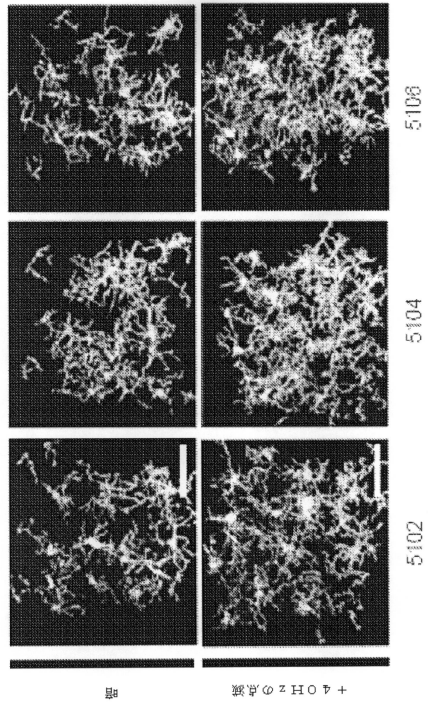
20

30

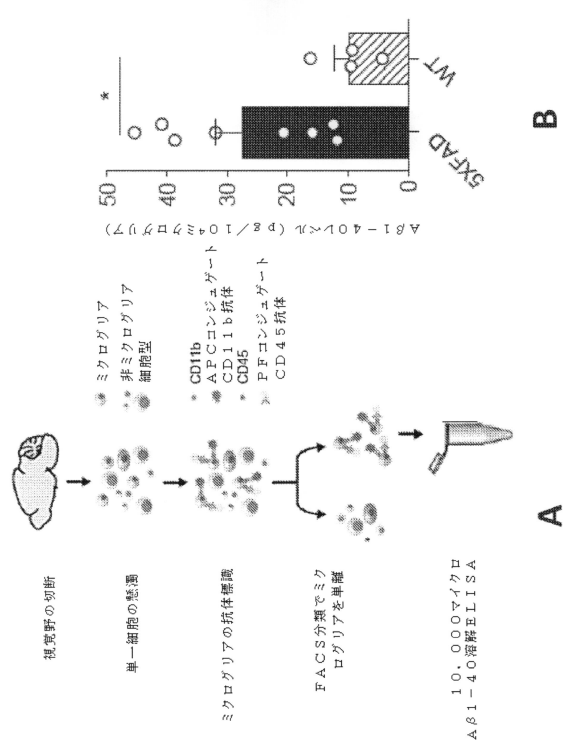
40

50

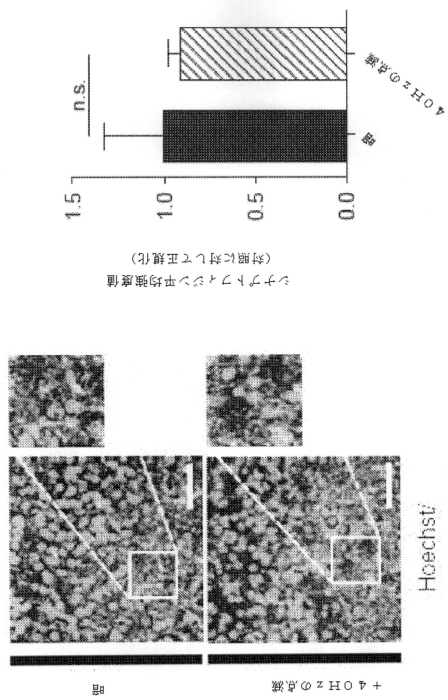
【図 5 1】



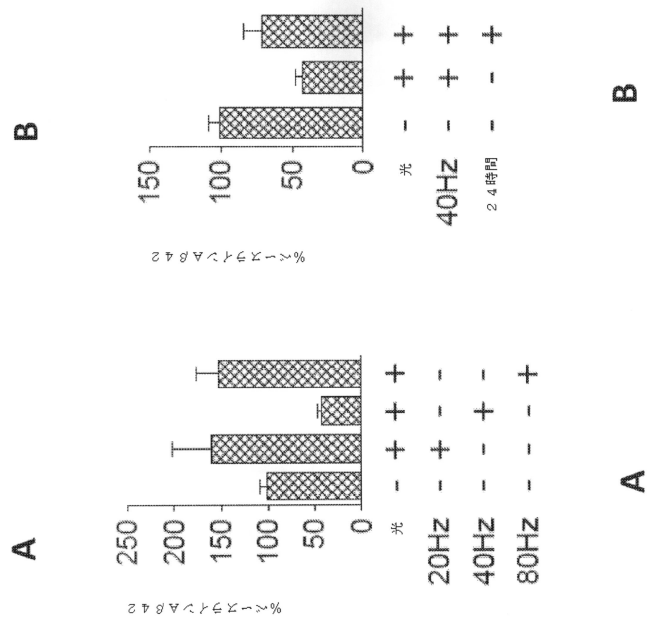
【図 5 2】



【図 5 3】



【図 5 4】



10

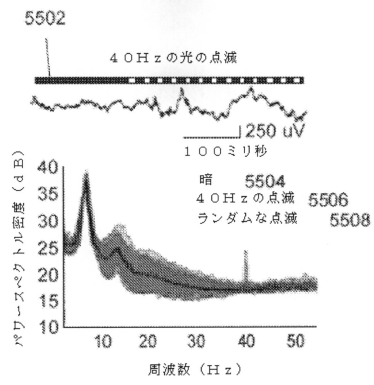
20

30

40

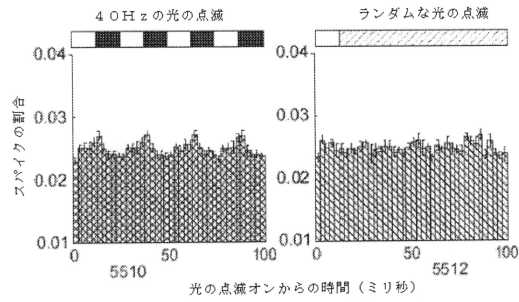
50

【図 5 5】



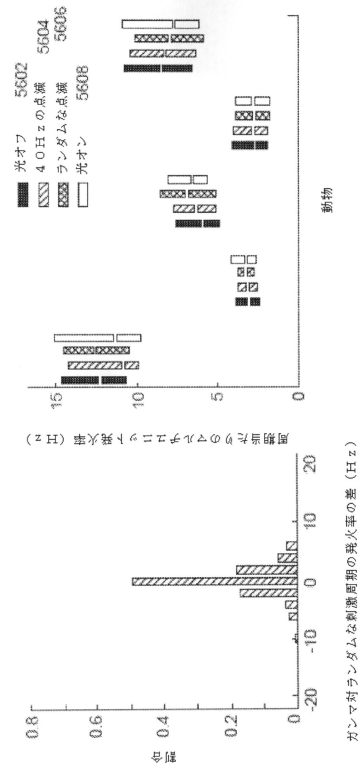
A

海馬



B

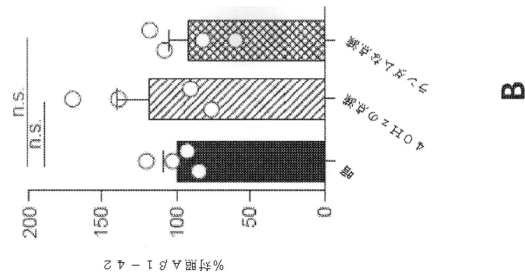
【図 5 6】



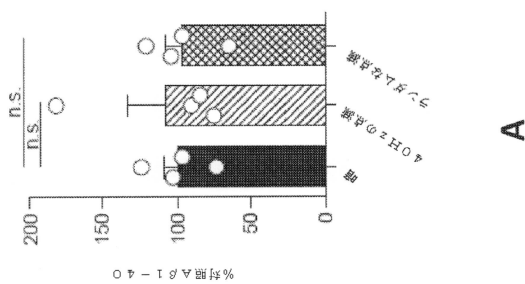
B

A

【図 5 7】

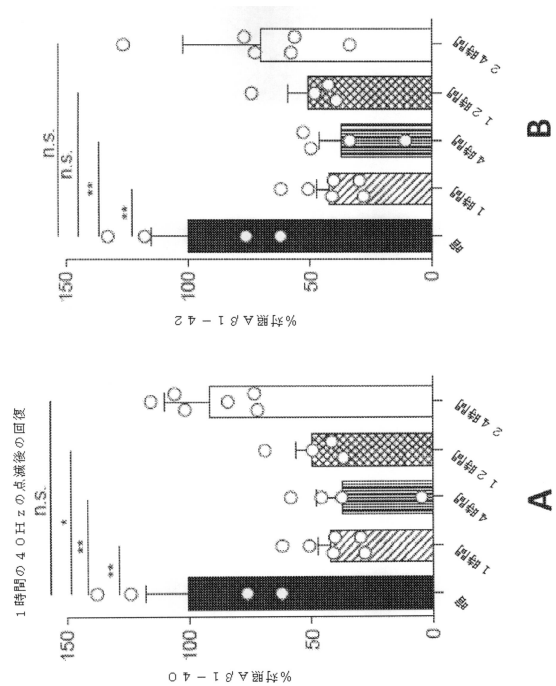


B



A

【図 5 8】



B

A

10

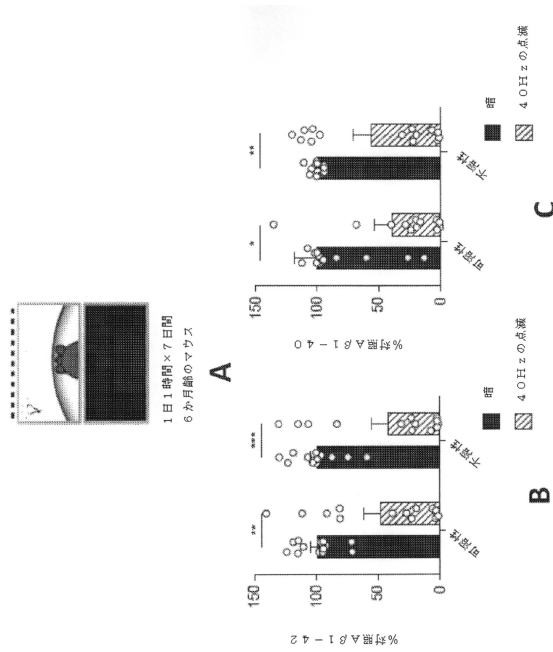
20

30

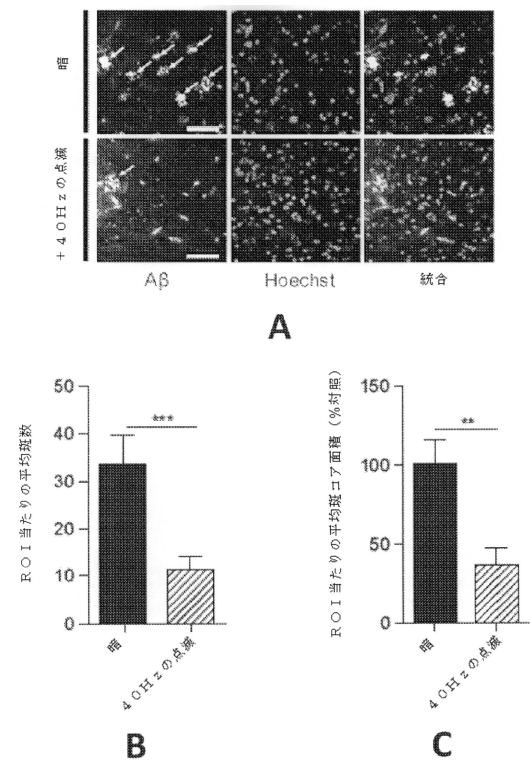
40

50

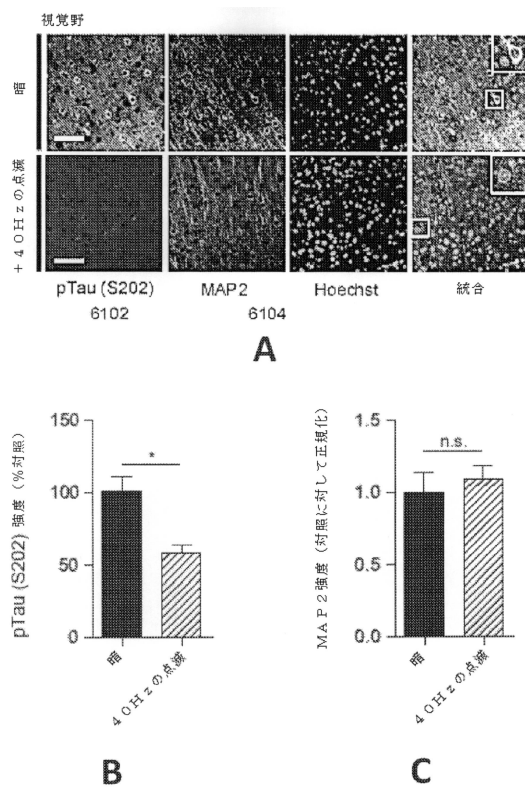
【図 59】



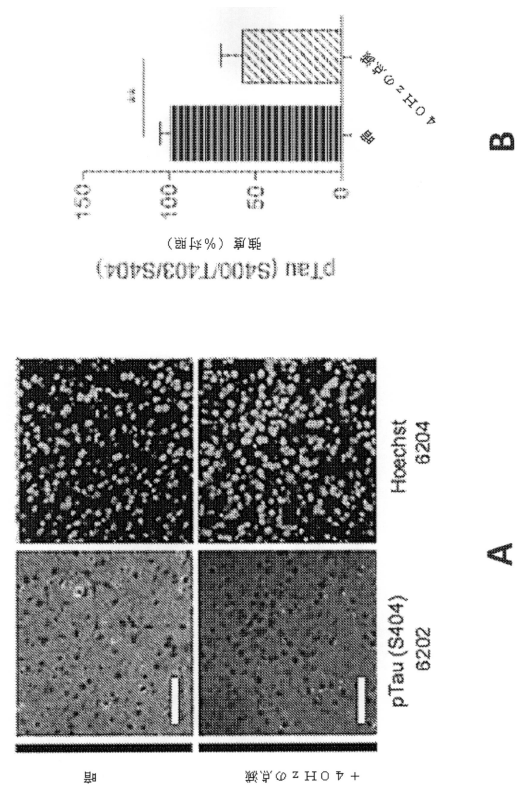
【図 60】



【図 61】



【図 62】



10

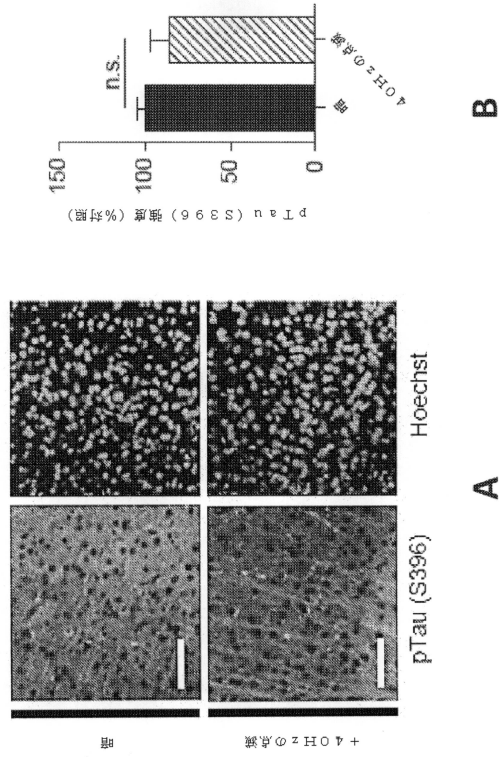
20

30

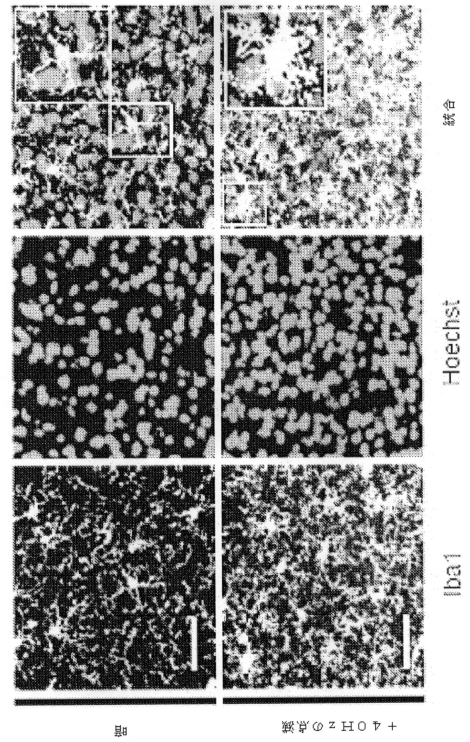
40

50

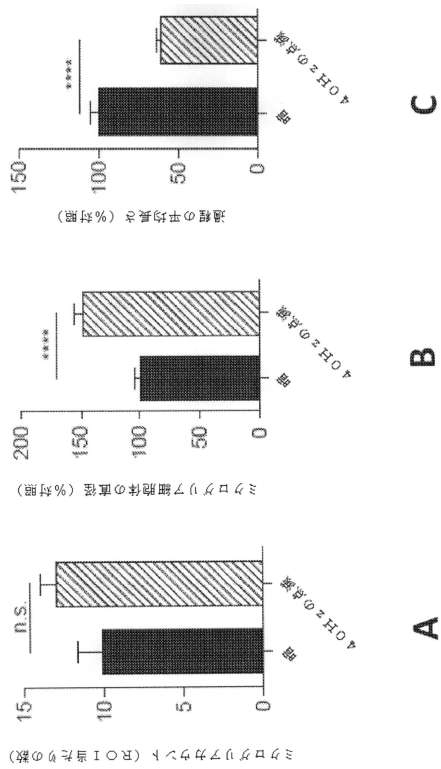
【図 6 3】



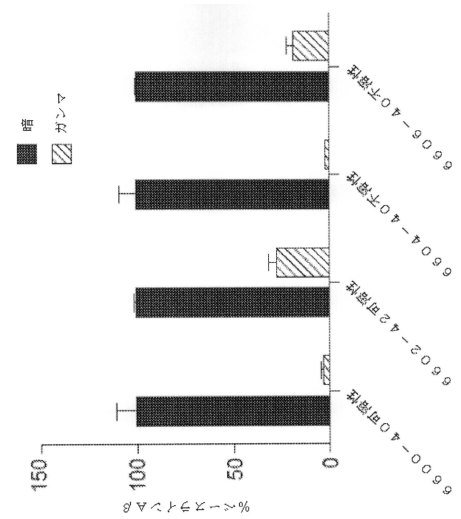
【図 6 4】



【図 6 5】



【図 6 6】



10

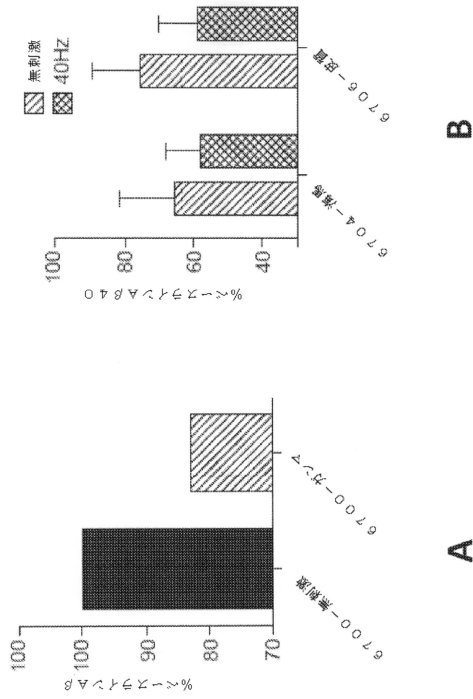
20

30

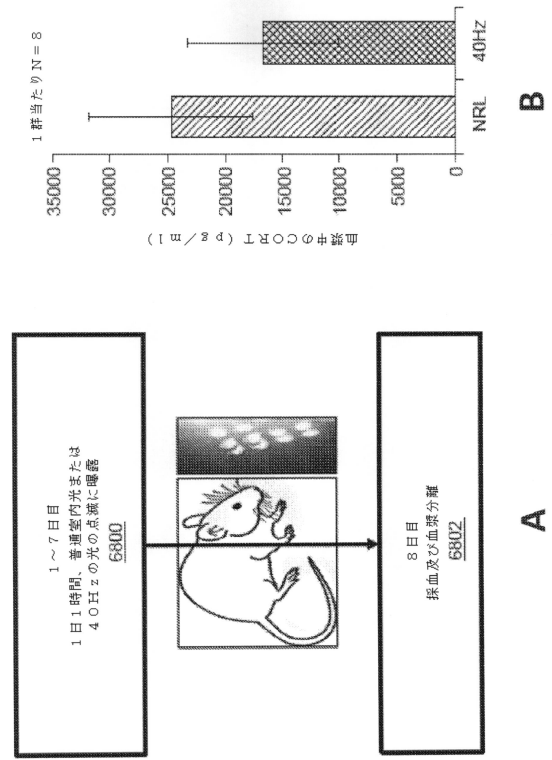
40

50

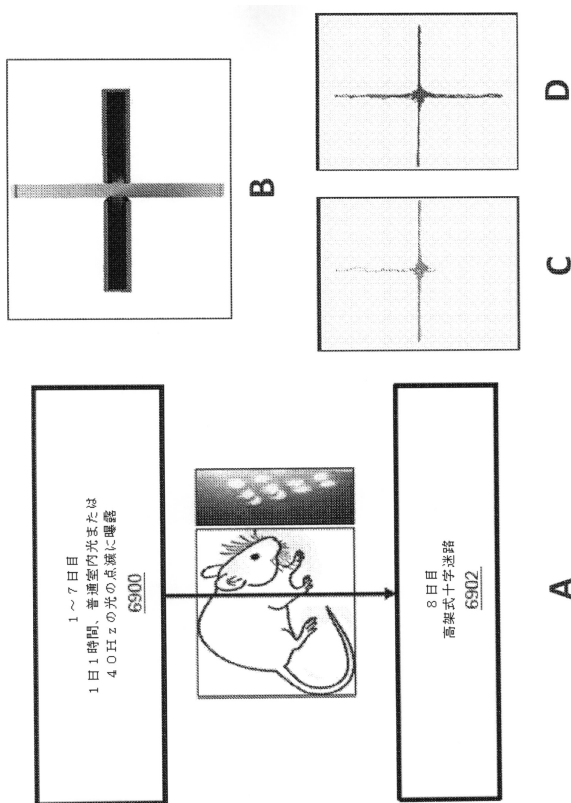
【図 67】



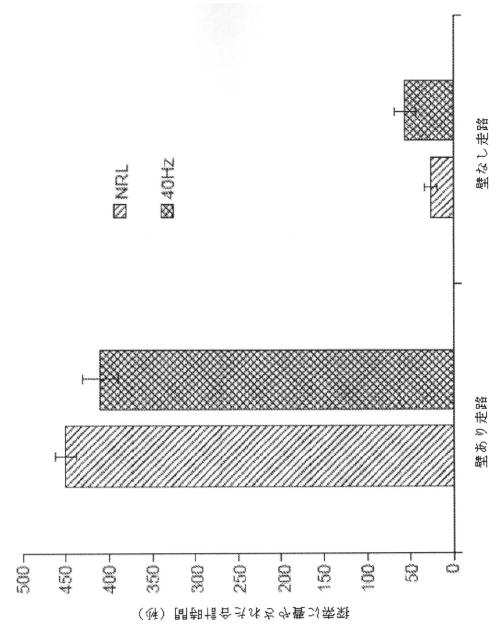
【図 68】



【図 69】



【図 70】



10

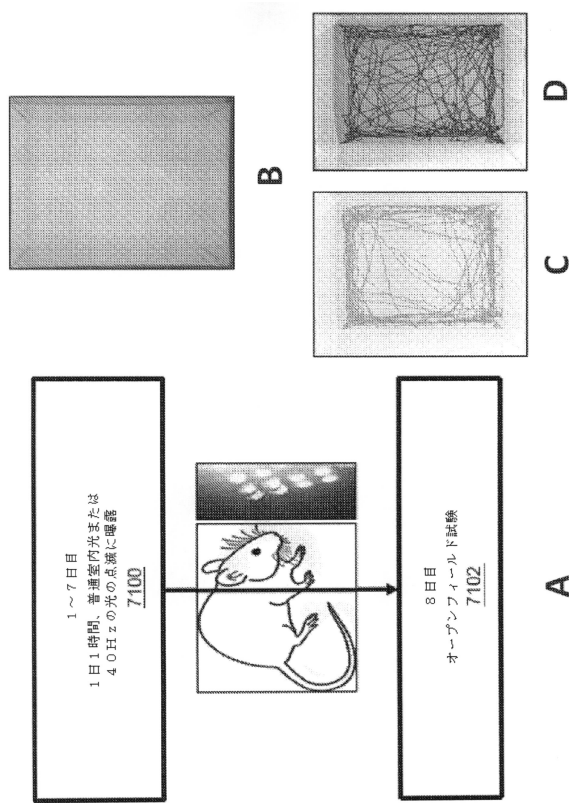
20

30

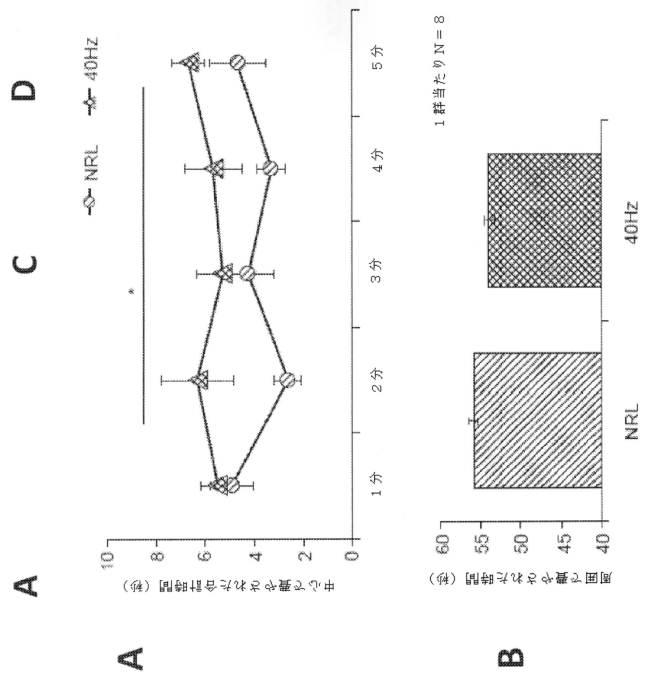
40

50

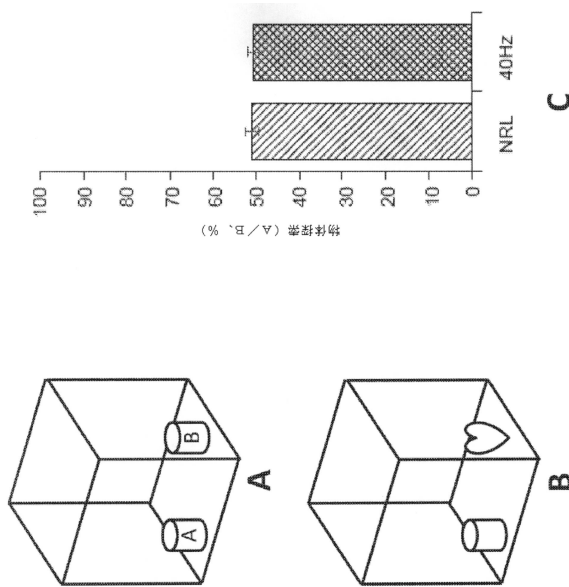
【図 7 1】



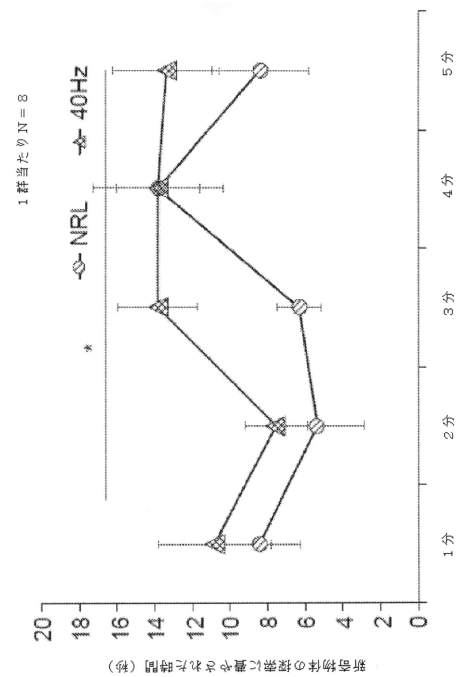
【図 7 2】



【図 7 3】



【図 7 4】



10

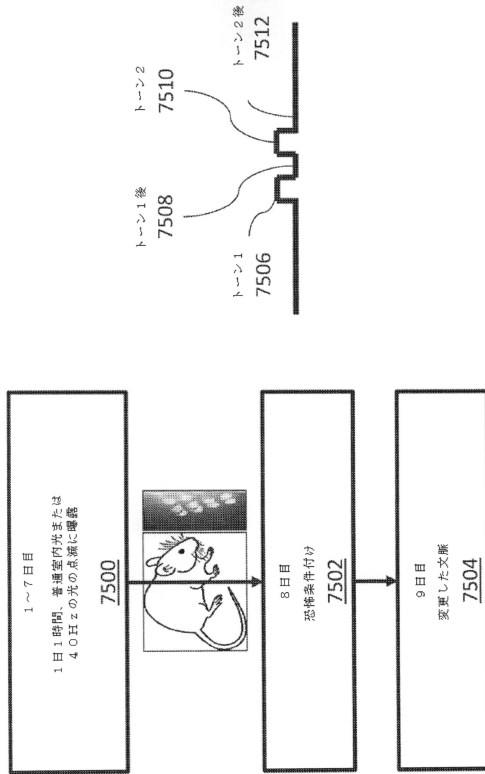
20

30

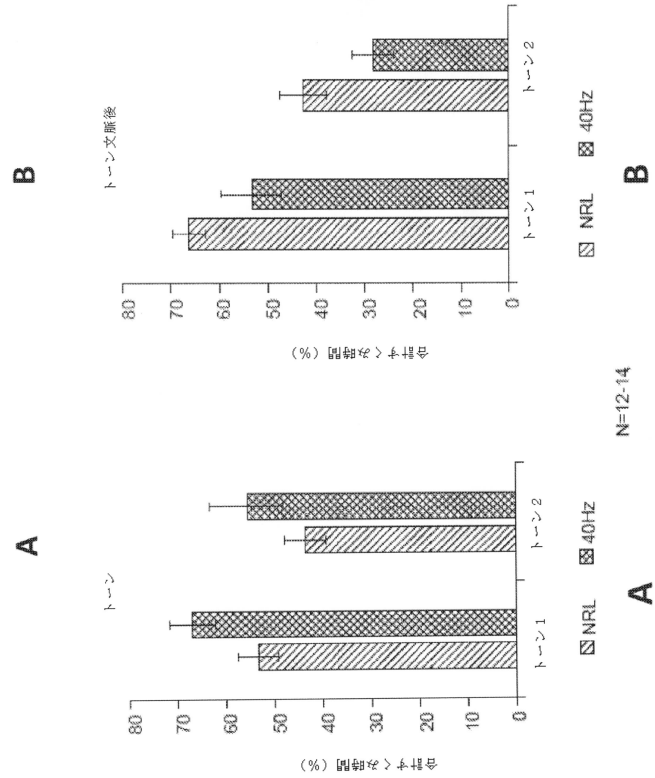
40

50

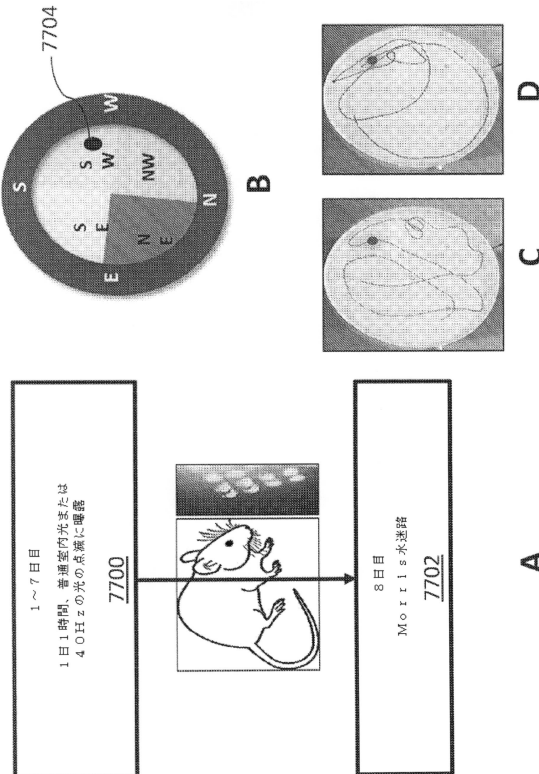
【図 7 5】



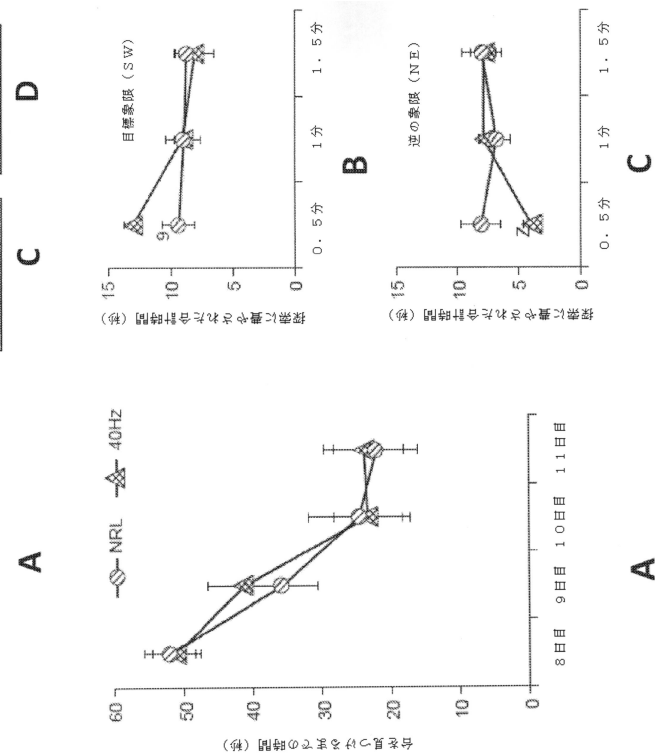
【図 7 6】



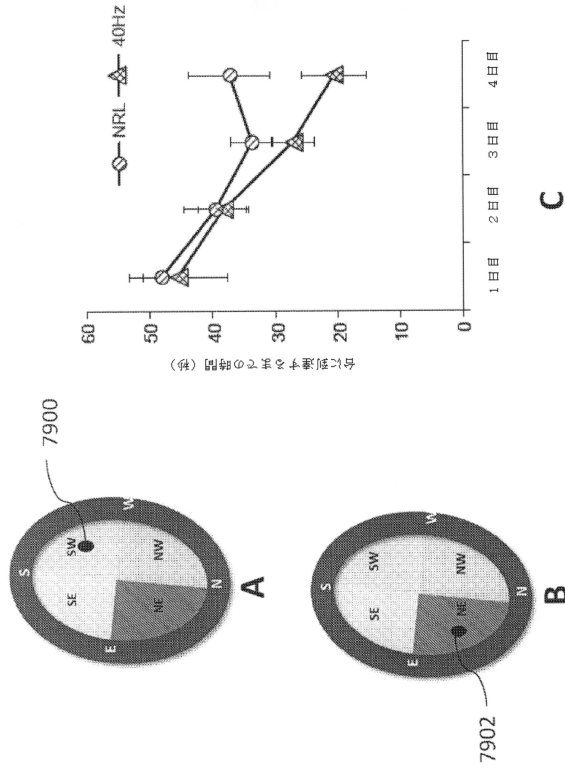
【図 7 7】



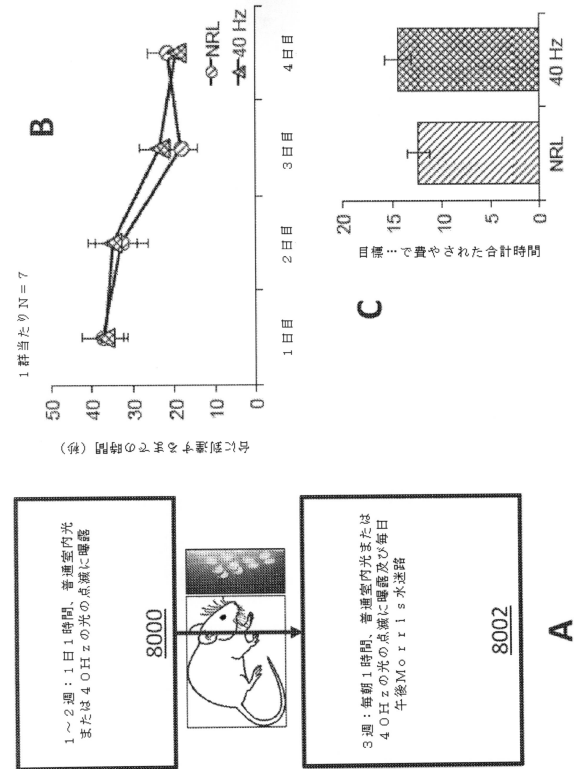
【図 7 8】



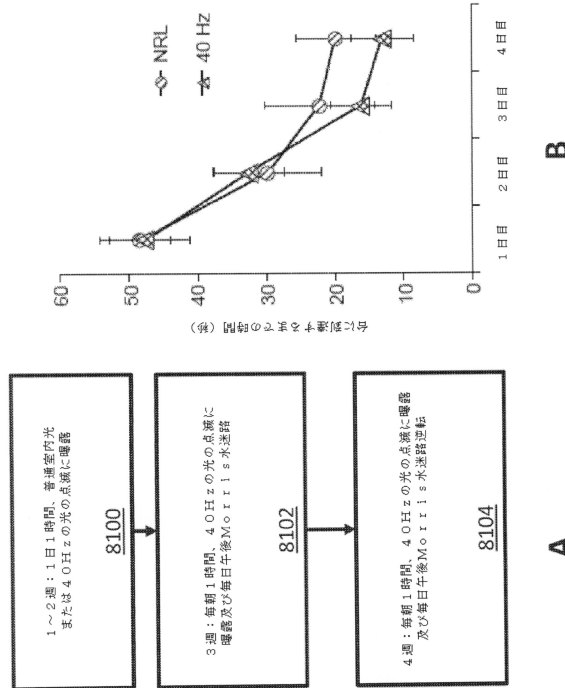
【図 79】



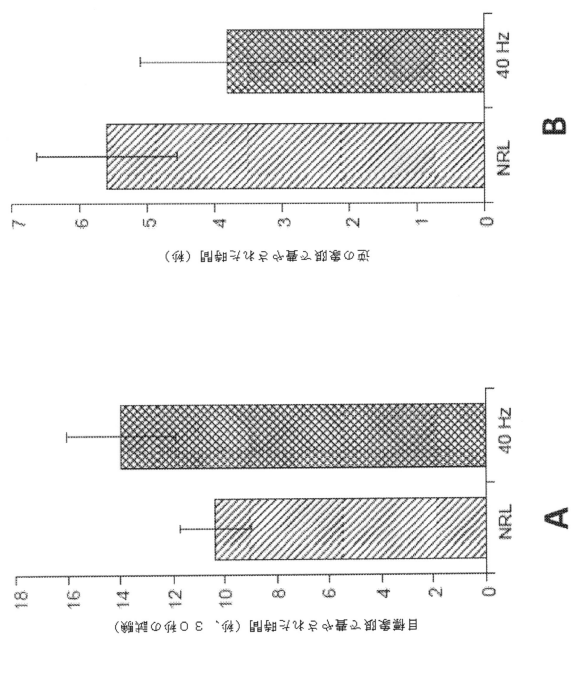
【図 80】



【図 81】



【図 82】



10

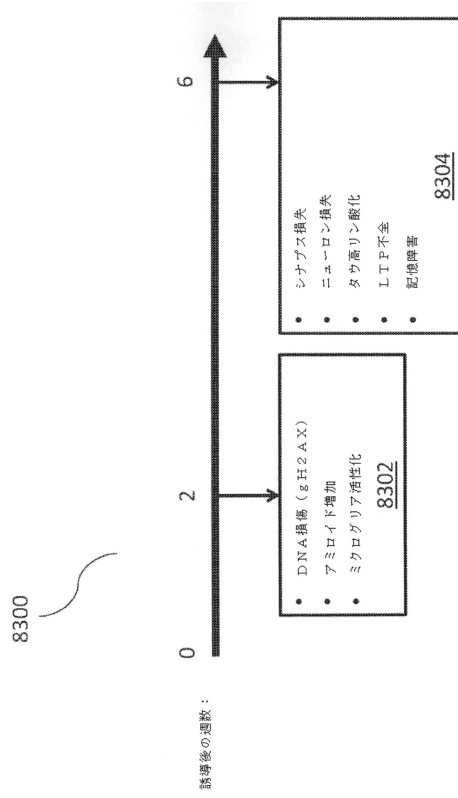
20

30

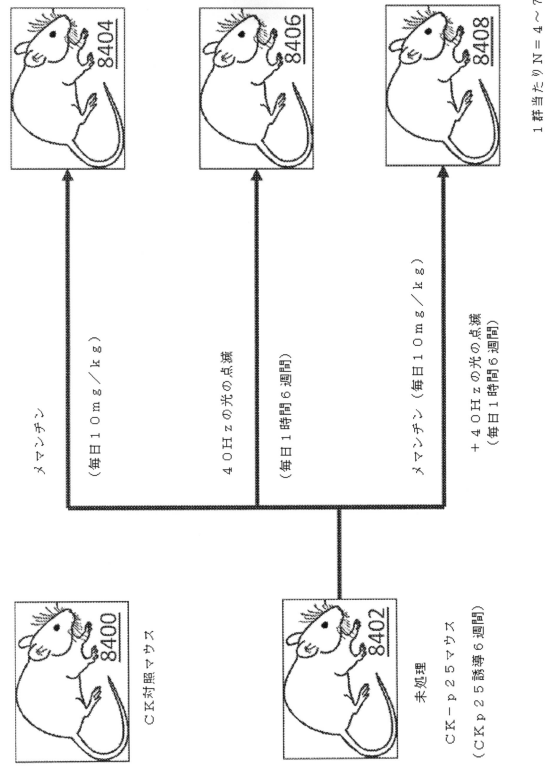
40

50

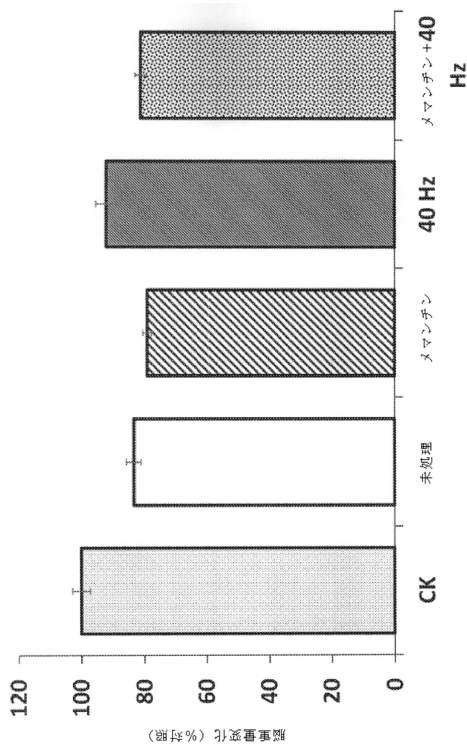
【図 8 3】



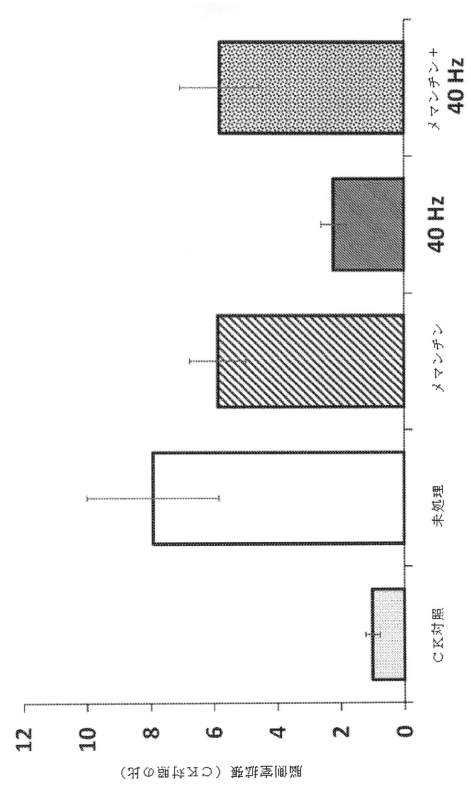
【図 8 4】



【図 8 5】



【図 8 6】



10

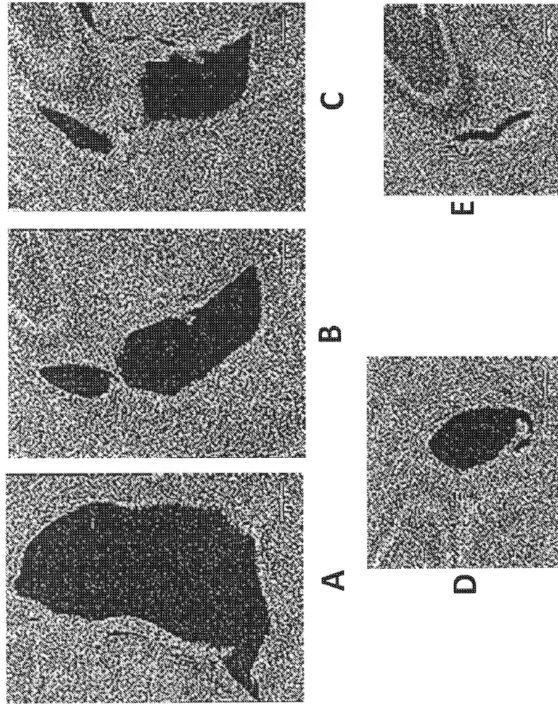
20

30

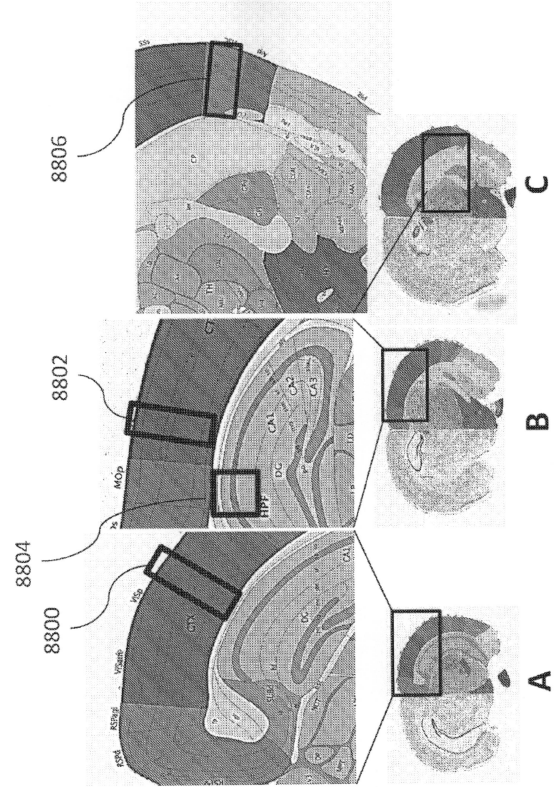
40

50

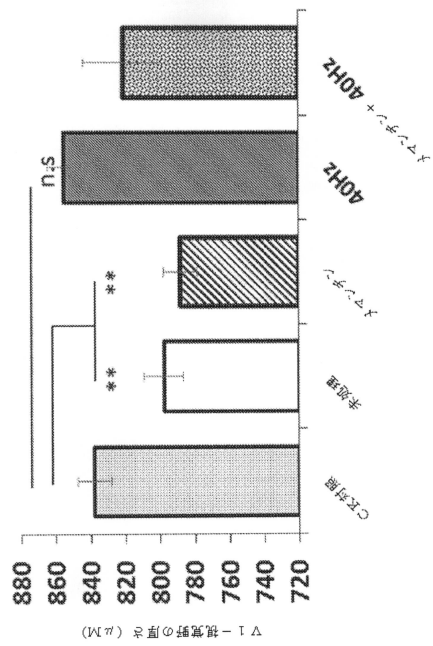
【図 87】



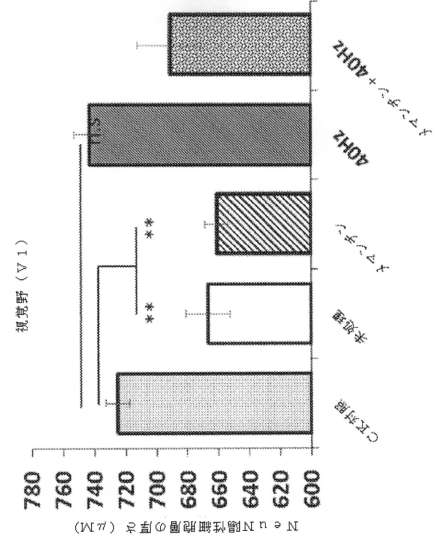
【図 88】



【図 89】



【図 90】



10

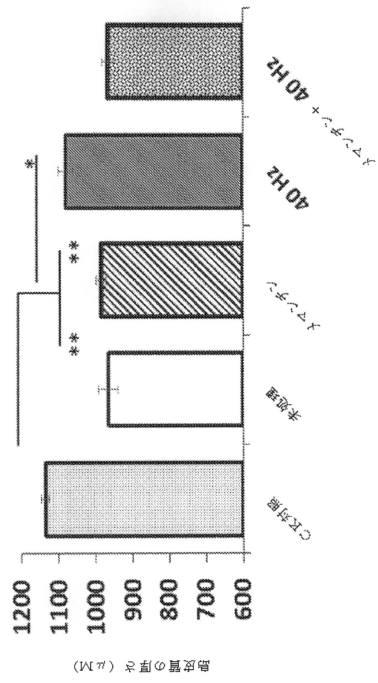
20

30

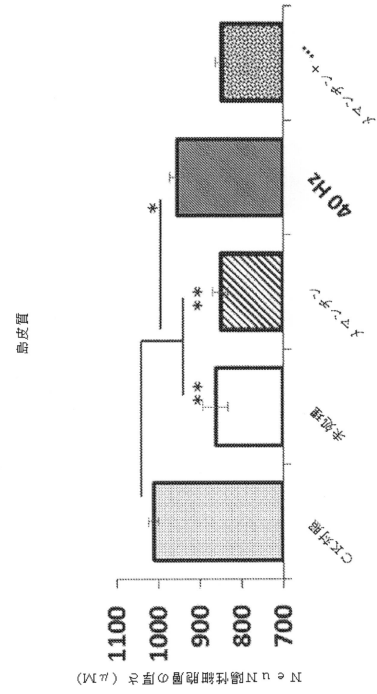
40

50

【図 9 5】



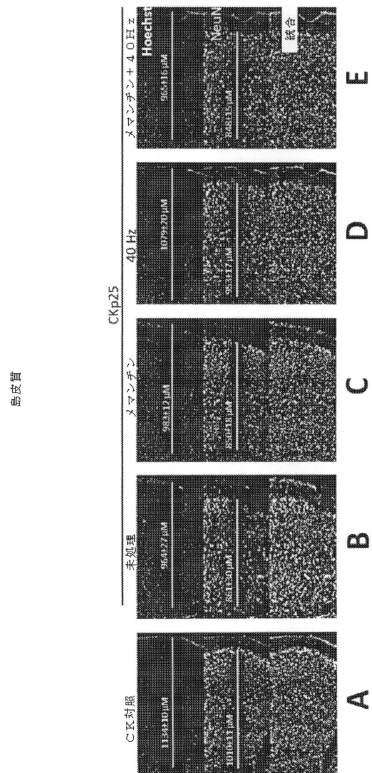
【図 9 6】



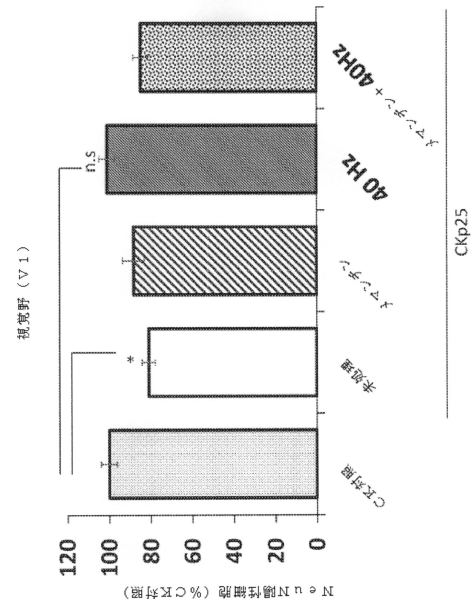
10

20

【図 9 7】



【図 9 8】

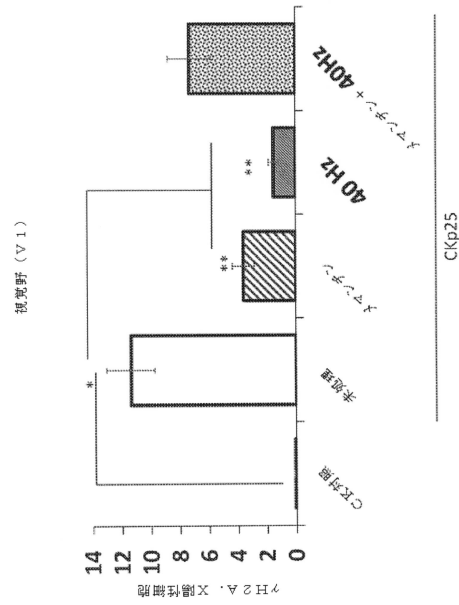


30

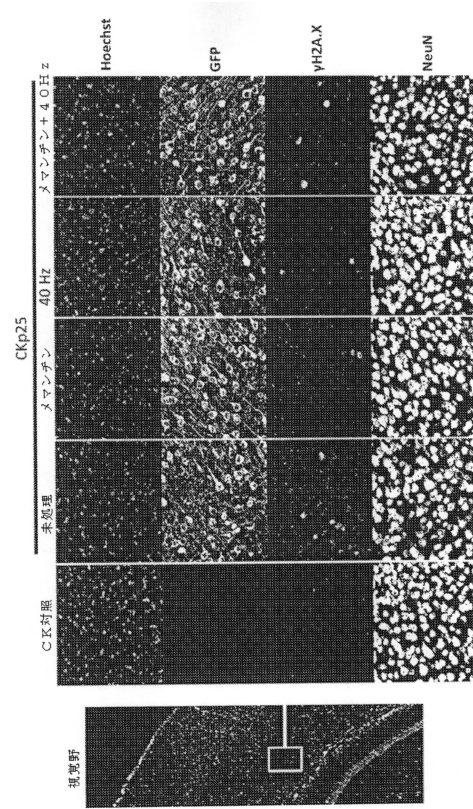
40

50

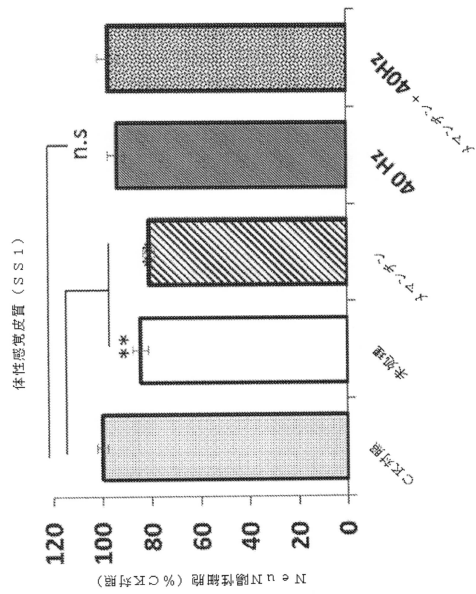
【図 99】



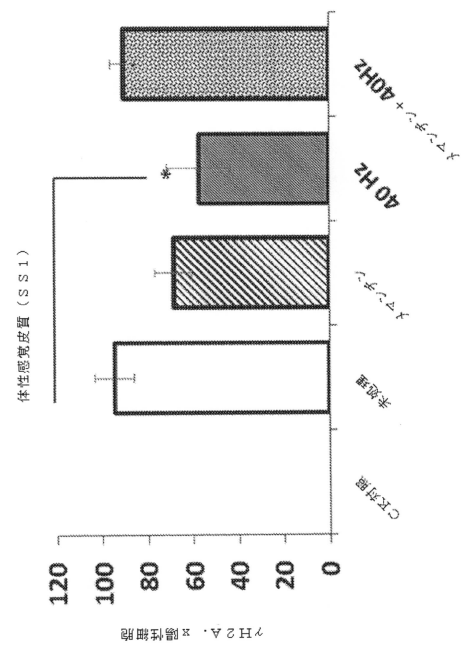
【図 100】



【図 101】



【図 102】



10

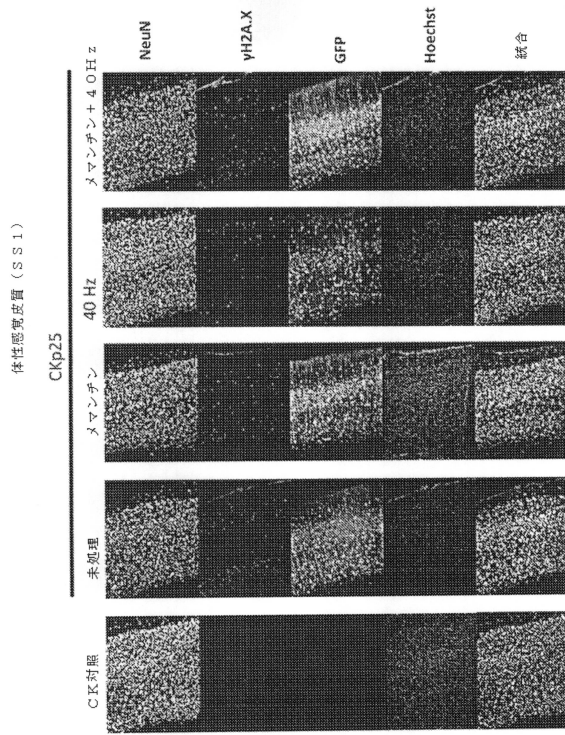
20

30

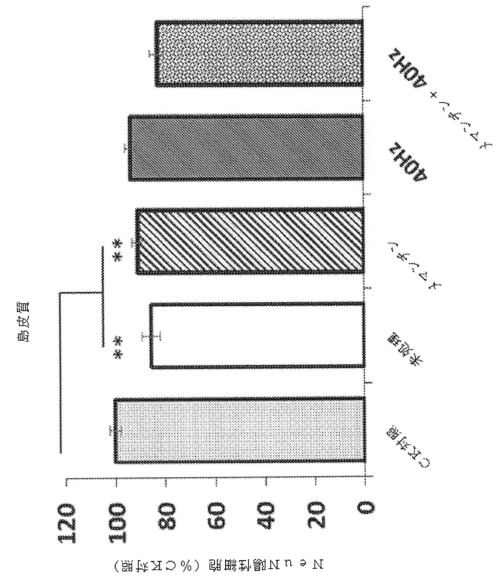
40

50

【図 1 0 3】



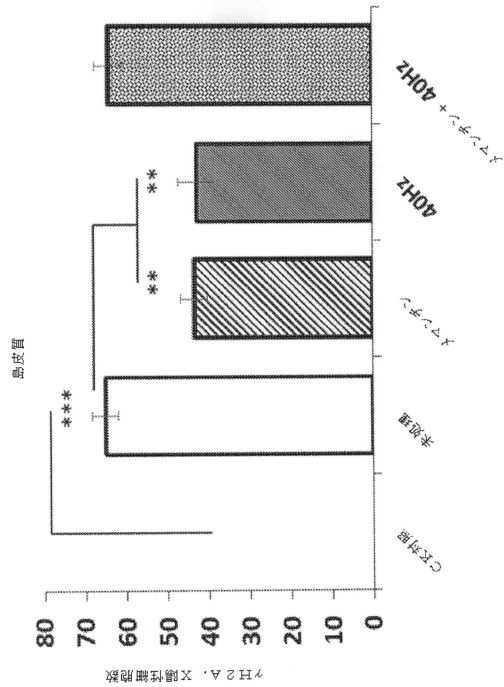
【図 1 0 4】



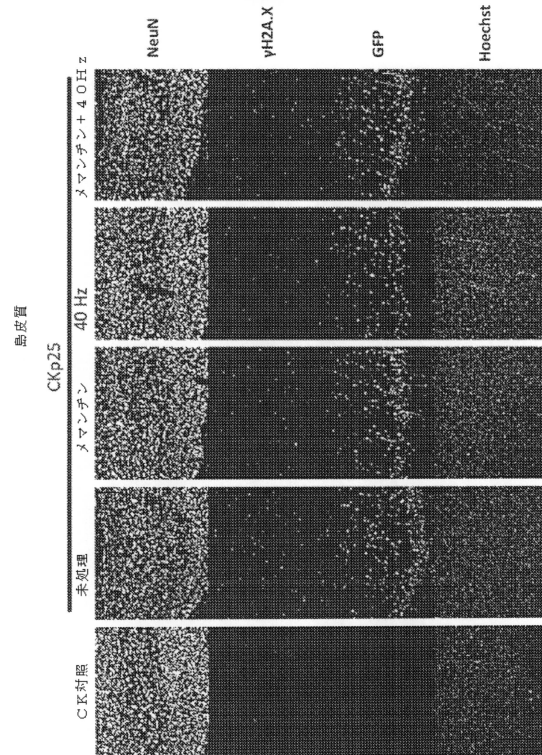
10

20

【図 1 0 5】



【図 1 0 6】

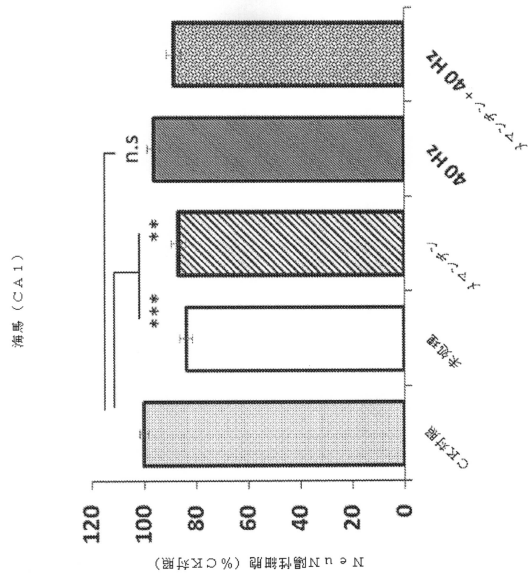


30

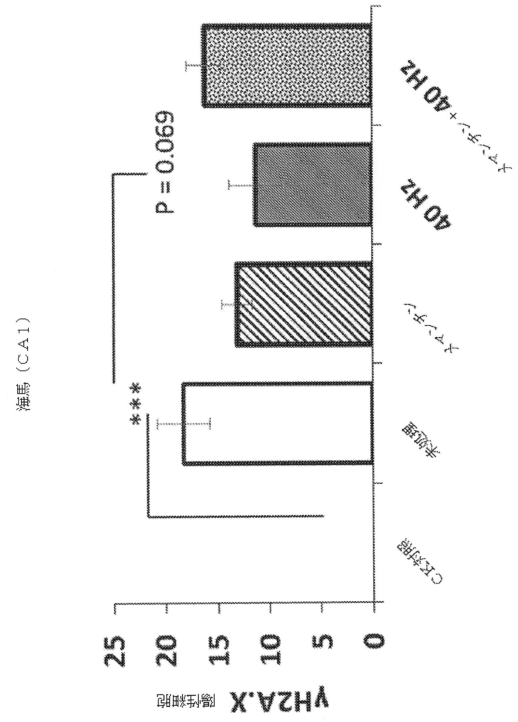
40

50

【図107】



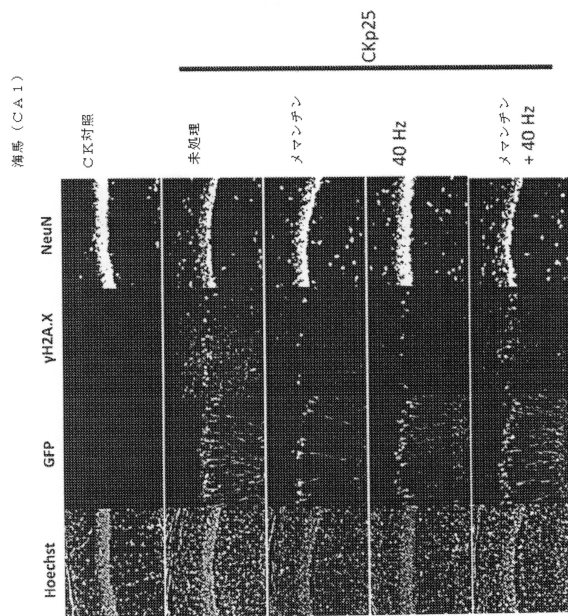
【図108】



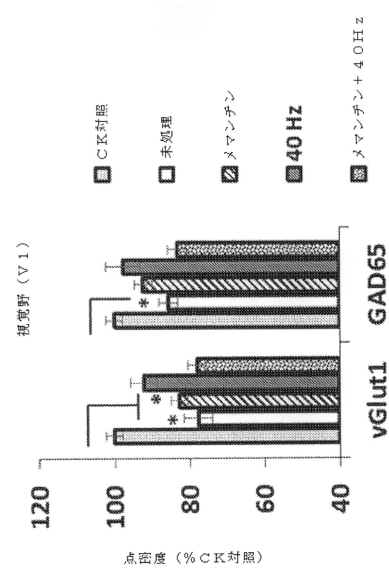
10

20

【図109】



【図110】

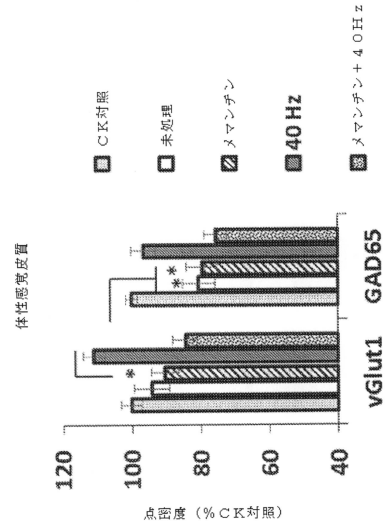


30

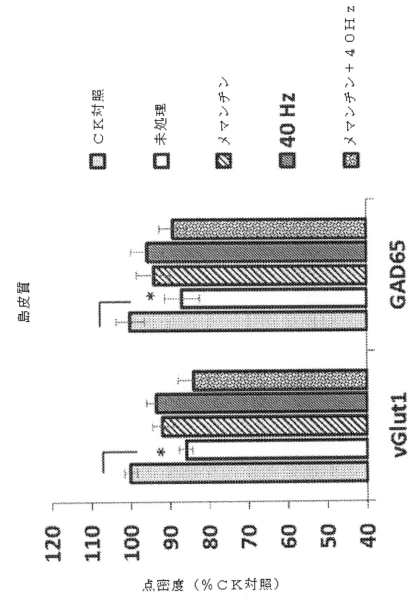
40

50

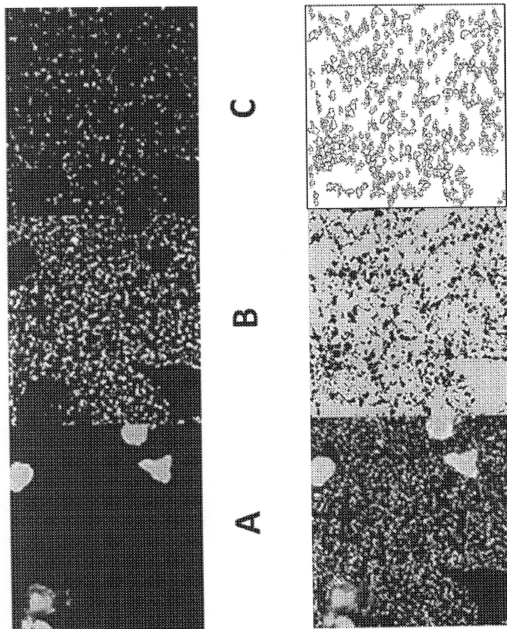
【図 1 1 1】



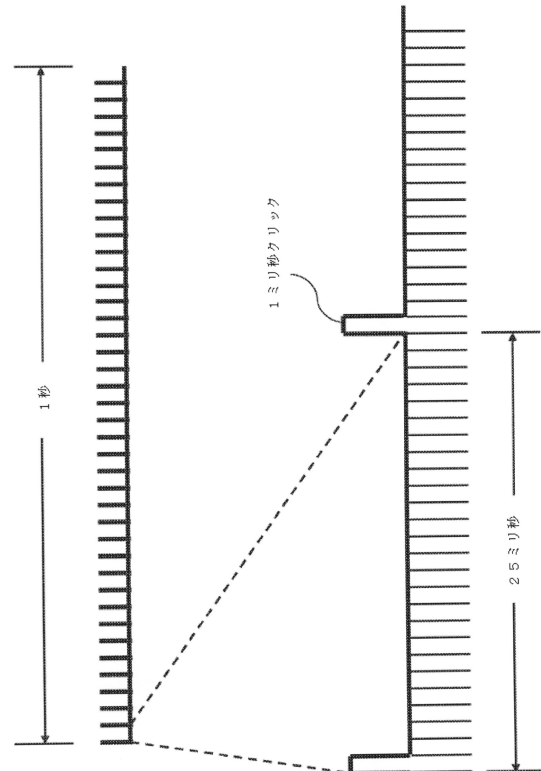
【図 1 1 2】



【図 1 1 3】



【図 1 1 4】



10

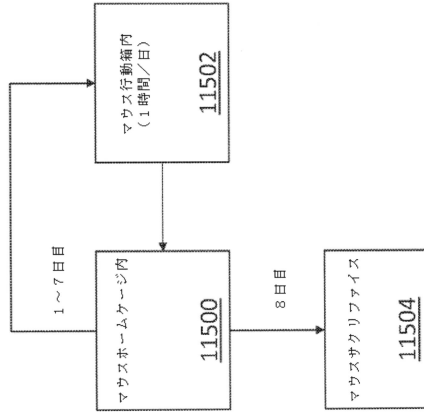
20

30

40

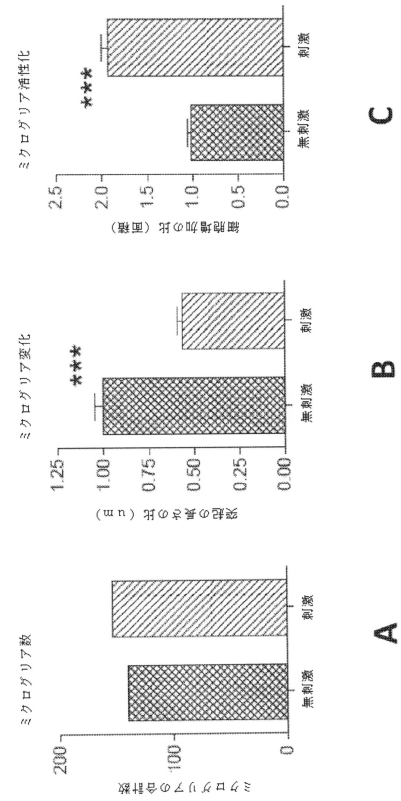
50

【図 1 1 5】



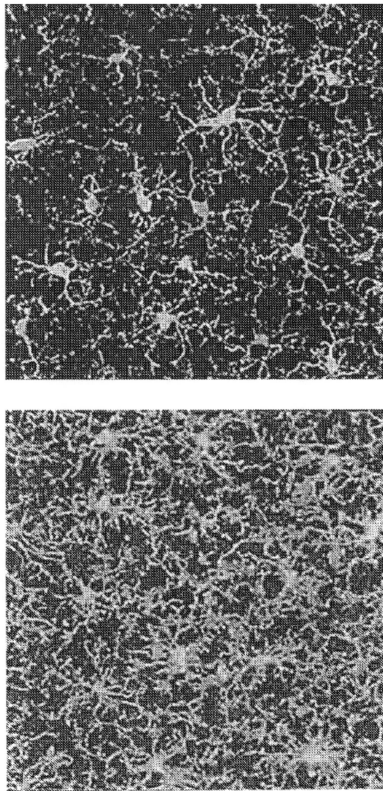
【図 1 1 6】

パワー = 0.95; $N = 3$, $P < 0.0001$, $N = 18$ 細胞

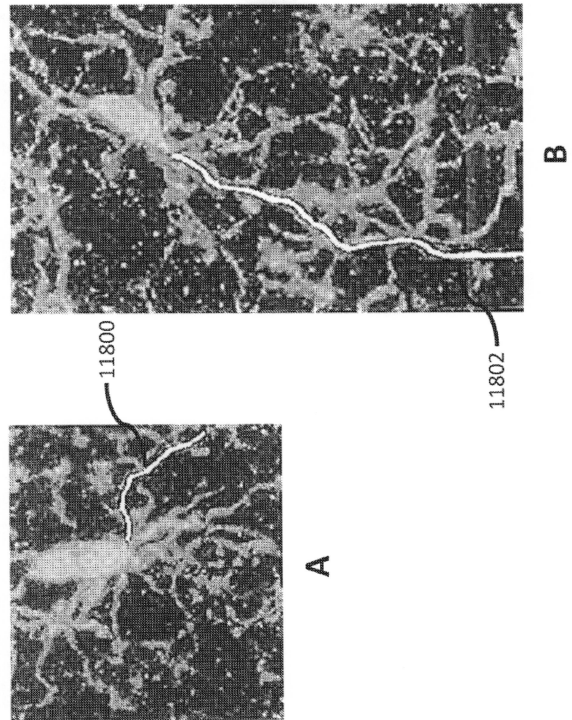


【図 1 1 7】

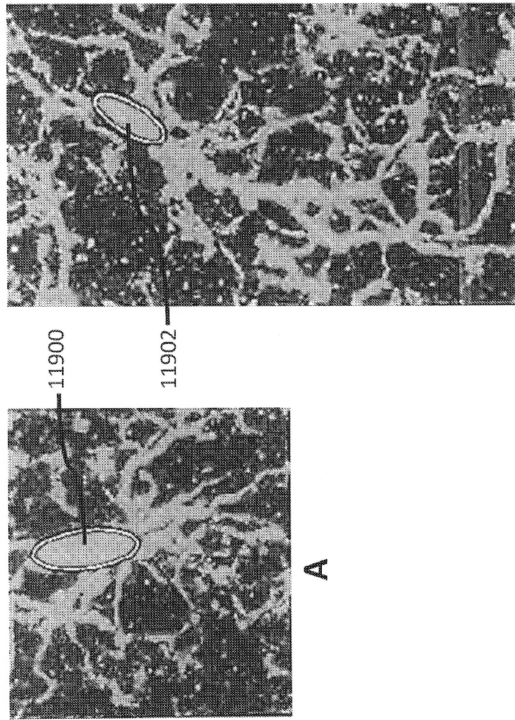
パワー = 0.95; $N = 3$, $P < 0.0001$, $N = 18$ 細胞



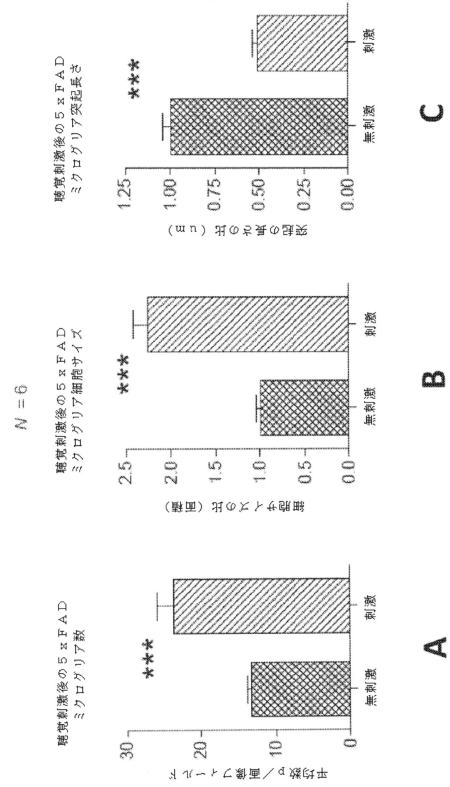
【図 1 1 8】



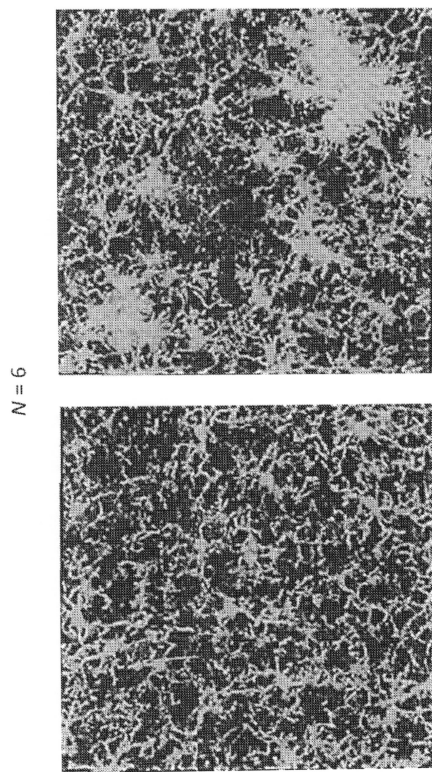
【図 1 1 9】



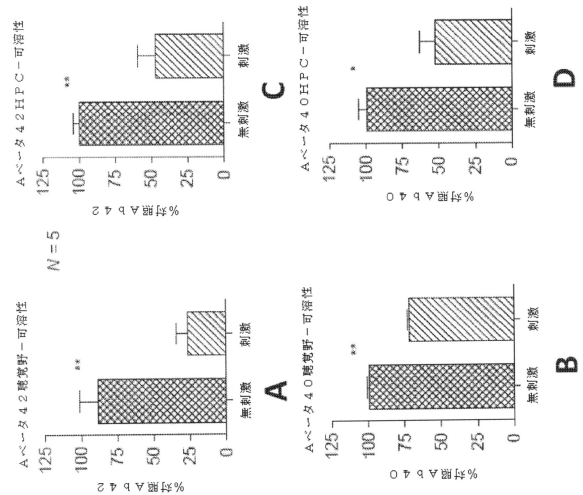
【図 1 2 0】



【図 1 2 1】



【図 1 2 2】



10

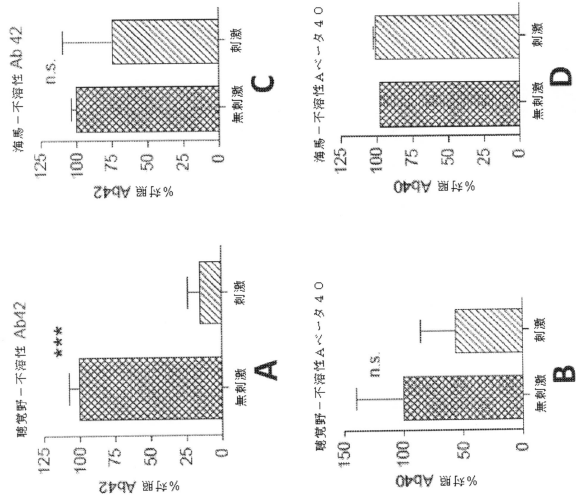
20

30

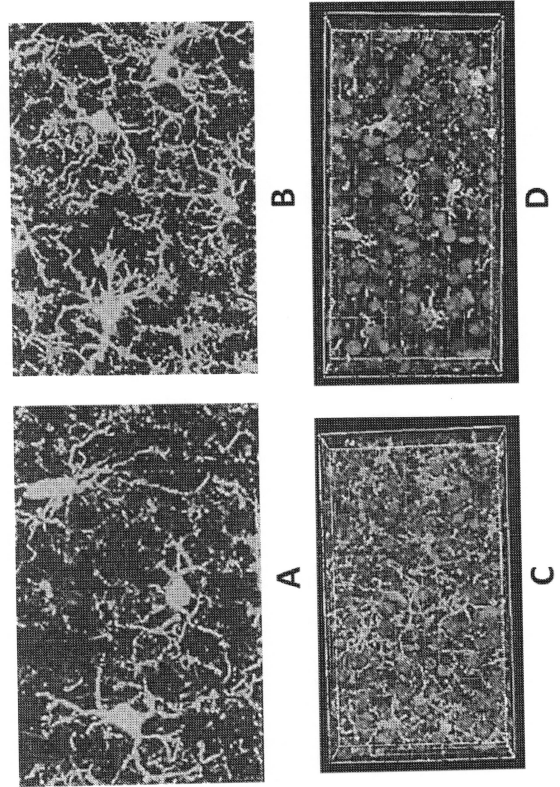
40

50

【図 1 2 3】



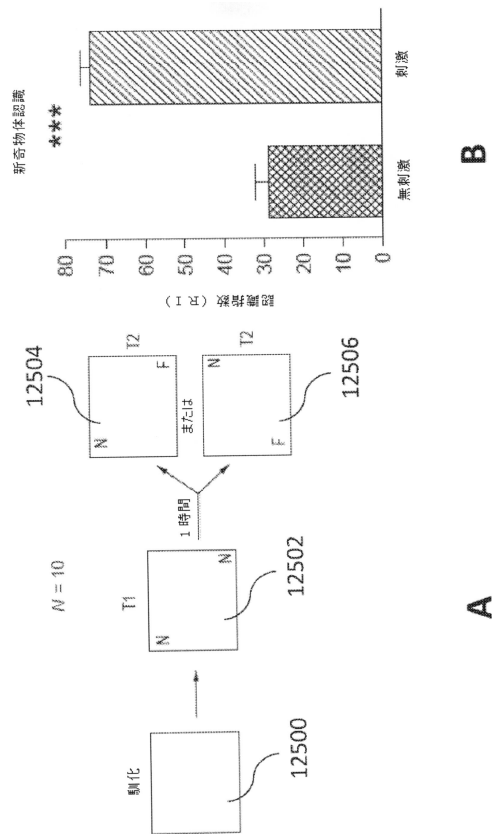
【図 1 2 4】



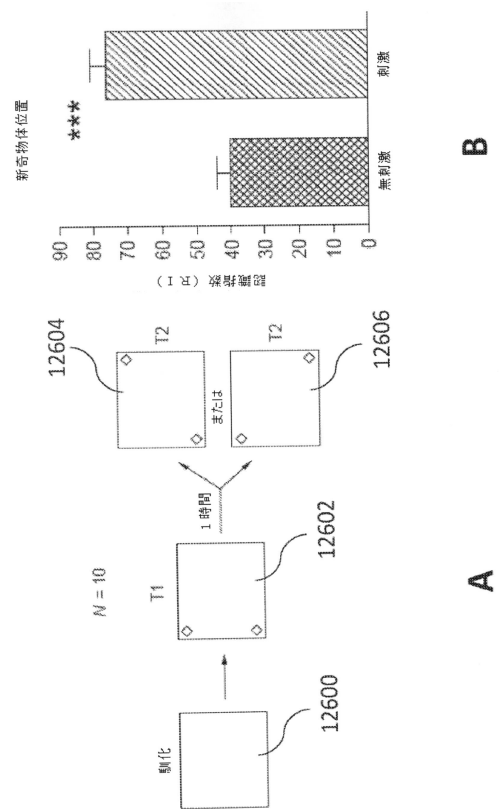
10

20

【図 1 2 5】



【図 1 2 6】

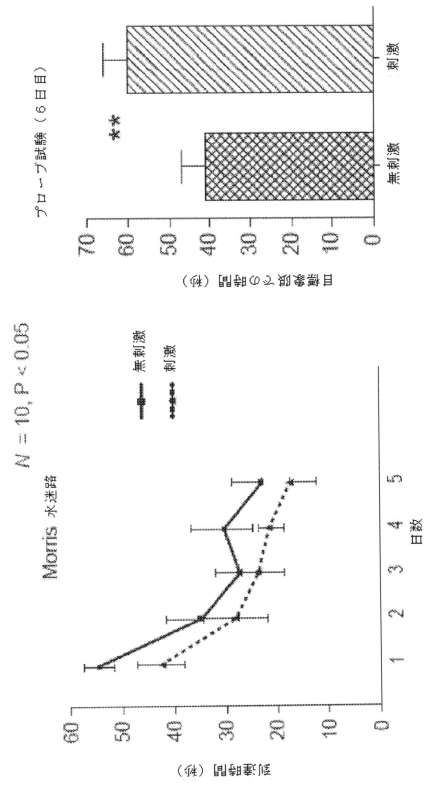


30

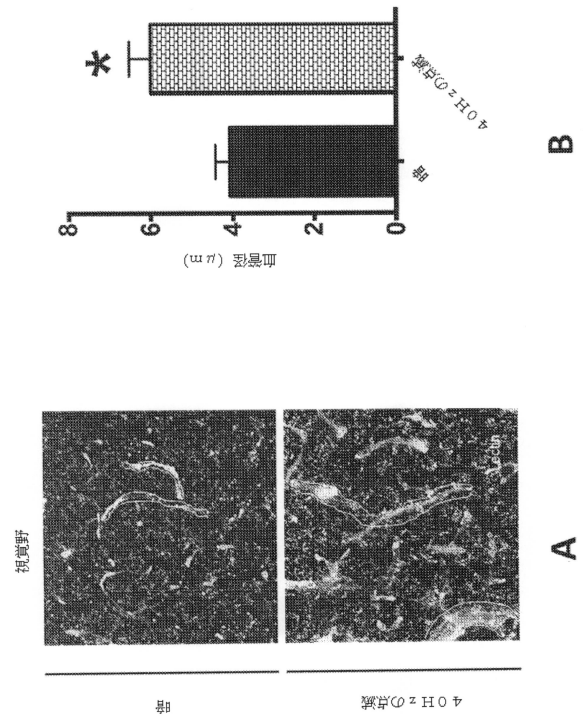
40

50

【図 1 2 7】



【図 1 2 8】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

米国(US)

早期審査対象出願

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100221958

弁理士 篠田 真希恵

(74)代理人 100192441

弁理士 渡辺 仁

(72)発明者 マートレル アンソニー ジェームス

アメリカ国 02139 マサチューセッツ ケンブリッジ パシフィックストリート70

(72)発明者 アダイカン シナカルパン

アメリカ国 02144 マサチューセッツ サマービル キダーアベニュー ナンバー9 アパートメント1

(72)発明者 ツァイ リーヒューイ

アメリカ国 02138 マサチューセッツ ケンブリッジ フレッシュポンドパークウェイ26

(72)発明者 ブラウン エメリー

アメリカ国 02446 マサチューセッツ ブルックリン フランシスストリート34

(72)発明者 イアカリーノ ハナー

アメリカ国 02144 マサチューセッツ サマービル グローブストリート49

合議体

審判長 内藤 真徳

審判官 栗山 卓也

審判官 井上 哲男

(56)参考文献 特開2014-71825 (JP, A)

特表2015-519096 (JP, A)

田中慶太, ほか2名, 事象関連コヒーレンス解析を用いた脳磁界聴性40Hz応答の検討, 電気学会論文誌C (電子・情報・システム部門誌), 2005年, 第125巻, 第6号, pp. 898-903

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61N5/06

A61N21/00