

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-536219

(P2009-536219A)

(43) 公表日 平成21年10月8日 (2009.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 37/14	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁)		

(21) 出願番号 特願2009-510101 (P2009-510101)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月4日 (2007.5.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月26日 (2008.12.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/068263
 (87) 国際公開番号 W02007/131180
 (87) 国際公開日 平成19年11月15日 (2007.11.15)
 (31) 優先権主張番号 60/797, 357
 (32) 優先日 平成18年5月4日 (2006.5.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504338070
 ウェイン・ステート・ユニバーシティー
 アメリカ合衆国、ミシガン州 48202
 、デトロイト、ウェスト・カービー 65
 6、ファクultyー／アドミニストレイシ
 ョン・ビルディング 4032
 (71) 出願人 508328925
 サラス ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 190
 27, エルキンス パーク, オールド
 ヨーク ロード 8360
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ロドプシン拡散のインビボ送達による視覚応答の回復

(57) 【要約】

光ゲートの陽イオン選択性膜チャネル、詳細にはチャネルロドプシン-2 (Chop2) をコードする核酸ベクターは、動物モデルにおいて、光受容体変性網膜における、内網膜神経細胞を光感受性細胞に変換した。このような処置によって、視覚認知および視覚の種々の局面が回復された。光受容体変性に起因して失明している被験体の網膜に対する光感受性の回復の方法が、網膜色素変性症または黄斑変性症においてと同様に提供される。この方法は、硝子体内または網膜下の注射によって、この被験体に対して、ロドプシンをコードするオープンリーディングフレームを含む上記の核酸ベクターであって、ここにプロモーターおよび転写調節配列が作動可能に連結されており、その結果その核酸が内網膜神経細胞で発現されるベクターを送達する工程を包含する。

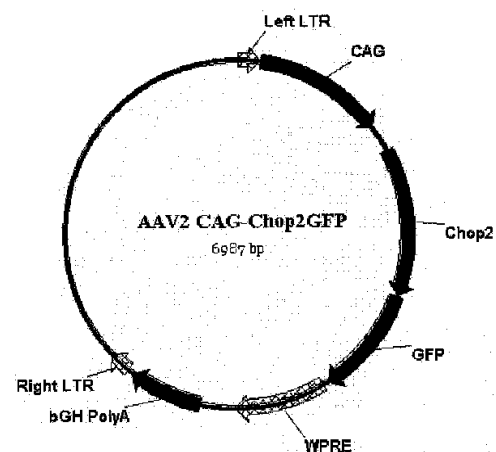


Fig. 7

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

網膜に対する光感受性を回復する方法であって：

(a) 網膜神経細胞に対して、該神経細胞中で発現可能な光ゲートチャネルロドプシンまたは光駆動性イオンポンプロドプシンをコードする核酸発現ベクターを送達する工程であって、

該ベクターは該ロドプシンをコードするオープンリーディングフレーム、およびそれに対して作動可能に連結されたプロモーター配列、および必要に応じて転写調節配列を含む工程と、

(b) 該神経細胞中で該ベクターを発現する工程と、
を包含し、
これによって、光感受性を回復する、方法。

10

【請求項 2】

前記ロドプシンが、配列番号 6 を有するチャネルロドプシン-2 (Chop2)、またはその生物学的に活性なフラグメント、好ましくは配列番号 3、またはその保存的なアミノ酸置換改変体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ベクターが rAAV ウイルスベクターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記プロモーターが構成的プロモーターである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記構成的なプロモーターが、ハイブリッド CMV エンハンサー／ニワトリ β アクチンプロモーター (CAG) である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記プロモーターがハイブリッド CAG である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記構成的なプロモーターが CMV プロモーターである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記プロモーターが誘導性プロモーターおよび／または細胞型特異的プロモーターである、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記細胞型特異的プロモーターが、mGluR6 プロモーター、Pcp2 (L7) プロモーターまたはニューロキニン-3 (NK-3) プロモーターからなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記プロモーターが、mGlu6 プロモーターであり、かつプロモーター配列の配列番号 7 の一部である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ベクターが、ハイブリッド CMV エンハンサー／ニワトリ β -アクチン (CAG) プロモーター、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE)、およびヒトまたはウシ成長ホルモンポリアダニル化配列を備える、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記ベクターが、CAG プロモーター、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE)、およびヒトまたはウシ成長ホルモンポリアダニル化配列を備える、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

前記網膜神経細胞が、ON 型および OFF 型の網膜神経節細胞、網膜桿状体双極細胞、AII アマクリン細胞ならびに ON および OFF の網膜錐体双極細胞から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記ベクターが、ON型神経節細胞および／またはON型双極細胞に対して標的され、かつそこで発現される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記ベクターが、mGluR6プロモーターを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記mGluR6プロモーターが、プロモーター配列の配列番号7の一部である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記プロモーターがNK-3プロモーターであり、かつ前記ベクターがOFFの錐体双極細胞に標的される、請求項9に記載の方法。

10

【請求項18】

網膜の光受容体細胞が変性されているか、または変性されかつ死滅された、失明または盲目に罹患している被験体の網膜神経細胞に対する光感受性を回復する方法であって：

(a) 該被験体の網膜に対して、該神経細胞中で発現可能な光ゲートチャネルロドプシンまたは光駆動性イオンポンプロドプシンをコードする核酸ベクターを送達する工程であって、

該ベクターはロドプシンをコードするオープンリーディングフレーム、およびそれに対して作動可能に連結されたプロモーター配列、および必要に応じて転写調節配列を含む工程と、

(b) 該神経細胞中で該ベクターを発現する工程と、

20

を包含し、

該ロドプシンの発現が該神経細胞を光感受性にさせ、これによって該網膜に対する光感受性の回復がされる、方法。

【請求項19】

前記ロドプシンが、Chop2、またはその生物学的に活性なフラグメントまたはその保存的なアミノ酸置換改変体である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記ベクターがrAAVウイルスベクターである、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記プロモーターが構成的プロモーターである、請求項18に記載の方法。

30

【請求項22】

前記構成的なプロモーターが、ハイブリッドCAGプロモーターである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記プロモーターがハイブリッドCAGプロモーターである、請求項19に記載の方法。

【請求項24】

前記構成的なプロモーターがCMVプロモーターである、請求項21に記載の方法。

【請求項25】

前記プロモーターが誘導性プロモーターまたは細胞型特異的プロモーターである、請求項18に記載の方法。

40

【請求項26】

前記細胞型特異的プロモーターが、mGluR6プロモーター、Pcp2(L7)プロモーターまたはニューロキニン-3(NK-3)プロモーターからなる群より選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記プロモーターが、mGlu6プロモーターであり、かつプロモーター配列の配列番号7の一部である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記網膜神経細胞が、ON型の網膜神経節細胞、OFF型の網膜神経節細胞、網膜桿状

50

体双極細胞、A I I アマクリン細胞、O N 型網膜錐体双極細胞またはO F F 型網膜錐体双極細胞である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記ベクターが、O N 型神経節細胞および／またはO N 型双極細胞に対して標的され、かつそこで発現される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記ベクターが、m G l u R 6 プロモーターを含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記m G l u R 6 プロモーターが、プロモーター配列の配列番号 7 の一部である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記プロモーターがN K - 3 プロモーターであり、かつ前記ベクターがO F F の錐体双極細胞に標的される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記光感受性の回復が、前記被験体における視覚の回復を生じる、請求項 1 8 ～ 3 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 4】

前記視覚が、以下の方法：

(i) 光刺激に対する露出後の前記被験体による光検出応答

(i i) 光刺激に対する露出後の前記被験体による光投射応答；

(i i i) 光対暗のパターン化視覚刺激の被験体による光分解能；

(i v) 光フラッシュ刺激因子またはパターンの視覚刺激に対する視覚皮質の応答の電氣的記録、

の 1 つ以上によって測定される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記失明または盲目が、変性疾患の結果である、請求項 1 8 ～ 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6】

前記疾患が、網膜色素変性症または加齢性黄斑変性症である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記被験体がまた、前記ベクターの送達の前、同時、または後に視力補綴物を提供される、請求項 1 8 ～ 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 8】

前記視力補綴物が、網膜インプラント、皮質インプラント、外側膝状核インプラント、または視覚神経インプラントである、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記被験体の視覚応答が、1 つ以上の視覚刺激を用いる処置に供される、請求項 1 8 ～ 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 0】

前記被験体の視覚応答が、1 つ以上の視覚刺激を用いる訓練に供される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記訓練が、以下の方法：

(a) (i) 変動するレベルの光刺激および／もしくはパターン刺激、ならびに／または (i i) 共通の光源もしくは対象物由来の環境的刺激、を認識するように被験体を訓練することによって特徴付けられる習慣性訓練と；

(b) 視覚的に局所の物体を検出し、かつ訓練なしよりも有効にとりわけ該対象物を動かすために該被験体を訓練することによって特徴付けられる方向付けおよび移動度の訓練、

10

20

30

40

50

のうちの1つ以上によって達成される、請求項39または40に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府に支援された研究の下でなされた発明に対する権利の声明

本発明は、National Institute of Healthの助成金（EY12180、EY-04068、EY16087、EY17130およびEY11522）による助成金によって、一部資金援助された。このことにより、米国合衆国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0002】

発明の背景

発明の分野

分子生物学および医薬の分野における本発明は、光受容体変性網膜において内網膜神経細胞を光感受性細胞へ変換し、それによって視覚認知および視覚の種々の局面を回復する、ライト・ゲートの（light-gated）陽イオン選択性膜チャネル、チャネルロドプシン-2（Chop2）のような、微生物型のロドプシンの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

（背景技術の説明）

視覚は通常、光受容体とも呼ばれる桿体および錐体が光シグナルを電気的シグナルに変換し、次いでこれが第二および第三次の網膜神経細胞および視神経を通じて外側膝状核に、次いで視覚皮質にリレーされ、ここで視覚画像が形成されるとき、始まる（Baylor, D, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:560~565; Wassle, H, 2004, Nat. Rev. Neurosci. 5:747~57）。光受容体の消失に起因する視覚障害の患者については、視覚認知は、特定の障害の性質に依存してこれらの顆粒の神経位置の1つで電気的刺激を提供することによって誘発され得る。

【0004】

光受容体細胞の重篤な損失は、網膜色素変性症（RP）のような先天性の網膜変性症によって生じ得（Sung, CHら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6481~85; Humphries, Pら、1992, Science 256:804-8; Welles, RGRら、in: SJ Ryan編, Retina, Mosby, St. Louis (1994), pp. 335~466）、そして完全な盲目を生じ得る。加齢性黄斑変性症（AMD）はまた、視野の中央に位置する最高の視覚領域内の重篤な視覚障害を生じ得る、光受容体細胞の変性および死滅の結果である。

【0005】

げっ歯類もヒトも両方とも、進行性に盲目になる。なぜなら、桿体および錐体が失われるにつれて脳へ送られるシグナルは少なくなるかまたはなくなるからである。部分的または全体的な盲目を生じる遺伝性の網膜変性は、世界中で3000人に1人に影響する。アッシャー症候群に罹患している患者は、網膜変性に加えて進行性の難聴を発症する。現在これらの状態について有効な処置も治療もない。

【0006】

網膜変性についてのアプローチに対する基礎的研究は、長らく2つのアプローチに分類されている：（1）網膜変性疾患を有する患者において残留する光受容体を保存するための処置、および（2）光受容体消失を網膜変性に置き換えるための方法。網膜疾患に罹患している患者は、しばしば、彼ら自身を、その視覚減退の消失を遅らせるための方法を探索する患者、および、遺伝性の眼の疾患または外傷のせいで光受容体を失っている、既に法的に盲目である患者（「光の知覚なし」）に分類する。

【0007】

最初のアプローチについては、神経栄養因子での神経保護（LaVail, MMら、1

10

20

30

40

50

992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11249~53) および劣性のヌル変異についての野性型遺伝子のウイルスベクターに基づく送達 (Accland, GMら、2001, Nat. Genet. 28:92~95) は、第I/I相の臨床試験の観点に対して最も遠くっており (Hauswirth, WW, 2005, Retina 25, S60; Jacobson, S, Protocol #0410-677, World Wide Web URL: webconferences.com/nihoba/16_jun_2005.html)、網膜変性の特異的な形態である、レーバーの先天性黒内障 (Leber's Congenital Amaurosis) (LCA) のアデノ随伴ウイルス (AAV) 媒介性遺伝子置換療法について米国で承認を受けている。不幸にも、網膜変性の進行段階にある患者では、このアプローチは適用不能であり、そして光受容体細胞が置換されなければならない。

10

【0008】

置換について、一つのアプローチは、疾患の網膜に対する正常な組織または細胞の移植 (置換) に関与する。別のアプローチは、失われた光受容性細胞の代わりに網膜移植片を介した残留非視覚的神経細胞の電氣的刺激を包含する (補綴的置換)。しかし、両方の方法とも、多くの基本的な障害に直面する。例えば、首尾よい移植のためには、移植された組織または細胞は、宿主の網膜内に機能的に組み込まなければならない。電氣的な刺激アプローチは、機械的困難性および技術的困難性、ならびに移植された生体工学デバイスの長期生体適合性の欠失に関する問題に悩まされる。めとめると、遺伝的な盲目疾患の有効な視覚回復治療は存在しない。

20

【0009】

本明細書に開示される本発明者らの戦略は、適切な分子「光センサー (light-sensor)」を要する。前の研究では、Drosophilaのロドプシンの異種発現 (非特許文献1)、そしてさらに最近では、内因性の光感受性網膜神経節細胞の推定の感光色素であるメラノプシン (melanopsin) が報告されている (非特許文献2; 非特許文献3; 非特許文献4)。しかしこれらの感光色素は、Gタンパク質シグナル伝達カスケードを介して膜チャネルにカップリングされ、そしてそれらの発色団としてレチナルデヒド (retinaldehyde) のcis-イソ型を用いる。結果として、複数の遺伝子の発現は、光感受性をもたらす必要がある。さらに、それらの光応答動態は、むしろ緩徐である。時間分解能を改善することを目的とした近年の研究では、光感受性のK⁺チャネルの操作を記載している (非特許文献5) が、これには、外因性の「分子拘束 (「molecular tether」の誘導およびこのチャネルをブロックしないためのUV光の使用を必要とした。この操作されたチャネルは、変性網膜における光感度を回復するために強力に有用であると提唱されたが、網膜神経細胞におけるその発現および機能は未知のままである。

30

【0010】

本発明は、バクテリオロドプシンと類似の微生物型ロドプシンを利用し (Oesterhel, Dら、, 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:2853~7)、その構造変化は、レチナルデヒドのオール・トランス (all-trans) イソ型である、それらの発色団群の可逆性の光異性化によって生じ、そして膜を通じてイオン運動に直接カップリングされる (Oesterhel, D., 1998, Curr. Opin. Struct. Biol. 8:489~500)。2つの微生物型ロドプシンである、チャネルロドプシン (channelopsin) -1および-2 (Chop1およびChop2) は現在Chlamydomonas reinhardtiiからクローニングされており (Nagel, G. ら、2002, Science 296:2395~8; Sineshchekov, OAら、2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:8689~94; Nagel, G. ら、2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 13940~45)、そしてオール・トランスレチナルの存在下でXenopus laevisの卵母細胞またはHEK293細胞で発現される場合、直接ライト・ゲートの膜チャネルを形成することが示

40

50

されている。7回膜貫通ドメインタンパク質であるChop2は、発色団オール・トランスレチナールに結合した場合、光で切り換え可能になる。Chop2は特に誘引性である。なぜならその機能的な光感受性チャネル、発色団が結合されたチャネルロドプシン-2 (ChR2と略されるChop2レチンアリデン (retinalidene)) は、生理学的な陽イオンに浸透性である。11-cis高次構造にのみ結合する動物のロドプシンと異なり、Chop2はオール・トランスレチナール異性体に結合し、脊椎動物の視覚サイクルによって供給されるオール・トランスから11-シスの異性化反応の必要性を省く。しかし、一般にインビボで天然の神経細胞においてChR2を発現する長期適合性、および詳細には網膜神経細胞におけるChR2媒介性の光応答の特性は本発明までは未知のままであった。

10

【0011】

本発明の戦略は実現可能である、なぜなら組織学的な研究では、光受容体変性の動物モデルにおいて (Chang, B. ら、2002, Vision Res. 42: 517~25; Olshevskaya, EV ら、2004, J. Neurosci. 24: 6078~85)、およびRPに起因するほぼ完全な光受容体喪失を有する死後患者の眼において (Santos, AH ら、1997, Arch. Ophthalmol. 115: 511~15; Milam, AH ら、1998, Prog. Retin. Eye Res. 17: 175~205)、その両方で、かなりの数の内網膜神経細胞の保存が報告されたからである。

【0012】

20

網膜遺伝子療法は、人にとって可能な治療オプションを考慮している。例えば、米国特許第5,827,702号は、外因性の核酸が発現のための細胞に取り込まれる条件下で細胞とこの外因性核酸とを接触させることによって、遺伝子操作された眼細胞を操作するための方法について言及する。この外因性核酸は、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはプラスミドとして記載される。また、WO 00/15822 (2000年3月23日) およびWO 98/48097 (1998年10月29日) を参照のこと。

【0013】

このような遺伝子療法における労力は、一次光受容体疾患のげっ歯類モデルにおいて網膜変性を遅らせることに対して主に集中している。光受容体に送達された正常な遺伝子および変異特異的なリボザイムは、そうでなければアポトーシス性の細胞死に運命づけられたこれらの細胞の寿命を延長している (Bennett, J., ら、1996 Nat. Med. 2, 649~54; Bennett, J., ら、1998, Gene Therapy 5, 1156~64; Kumar-Singh, R ら、1998 Hum. Mol. Genet. 7, 1893~900; Lewin, AS ら、1998, Nat. Med. 4, 967~71; Ali, R ら、2000, Nat. Genet. 25, 306~10; Takahashi, M. ら、, 1999, J. Virol. 73, 7812~6; Lau, D. ら、2000, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41, 3622~33; および LaVail, MM, ら、2000, Proc Natl Acad Sci USA 97, 11488~93)。

30

【0014】

組み換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) を用いる、レポーター遺伝子である緑色蛍光タンパク質 (GFP) の網膜遺伝子移入は、正常な霊長類で実証された (Bennett, J. ら、1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9920~25)。しかし、網膜色素上皮 (RPE) および/または光受容体細胞における遺伝子欠損によって生じる、動物、詳細にはヒトおよび他の哺乳動物での盲目疾患における視覚の回復は達成されていない。Jean Bennett および共同研究者は、RP65遺伝子の変異および変異遺伝子を置換または取って代わる正常遺伝子での置換療法を用いる光受容体の急速な変性のモデルにおける、遺伝子治療を用いる光受容体の救済を記載している。例えば、Acland, Bennett および共同研究者の特許文献1を参照のこ

40

50

と。この療法によって、網膜変性の重篤な疾患の天然に存在するイヌモデル（ヒトLCAに類似である、RPE65変異体イヌ）でのいくつかの成功が示された。

【0015】

本発明のアプローチの利点としては、内因性細胞および組織または物理的デバイスを誘導する必要がなく、従って、既存のアプローチによって遭遇される多くの障害を回避するという事実が挙げられ；本発明は、多くの網膜変性疾患によって生じる失明または盲目の逆転に適用可能である。ウイルスベースの遺伝子治療法によって、疾患状態の網膜の生存している網膜神経細胞において、光感受性の膜チャネルまたは分子を発現することによって、本発明は、視覚回復のための高い空間および時間の分解能をとまなう失明または盲目の永続的な治療を生じ得る。

10

【0016】

上述の刊行物または他の刊行物における任意の特定の開示が、本発明の任意の一般的局面を予測すると考えられ得る程度まで、本発明の開示は、前に開示された任意のこのような種を放棄することを除外する条項を包含することが理解されるべきである。このような刊行物の開示によって予測されない本発明の局面はまた、本明細書において開示されるかまたは主張される予期されない優れた結果に対して少なくとも一部は起因して、これらの刊行物の開示からは不明である。

【特許文献1】米国特許出願公開2004/0022766号明細書

【非特許文献1】Zemel'man, BVら、2002, Neuron 33:15~22

20

【非特許文献2】Melyan, Z. ら、2005, Nature 433:741~5

【非特許文献3】Panda, S. ら、2005, Science 307:600~604

【非特許文献4】Qiu, X. ら、2005, Nature 433:745~9

【非特許文献5】Banghartら、2004, Nat. Neurosci. 7:1381~6

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0017】

（発明の要旨）

30

本発明は、網膜における、生きている光非感受性内網膜神経細胞（ここでは光受容体は変性されているかまたは既に死滅している）の、直接の光感受性神経細胞への遺伝的変換に関しており、これによってこのような網膜に対して光感受性が与えられ、このような変性に罹患している被験体に対する視覚応答および機能的視覚の1つ以上の局面が回復される。疾患に起因する、この能力を欠く網膜に対する光感受性の回復によって、本発明は、視覚に必要である最も基礎的な光応答の機構を提供する。別の言い方をすれば、本発明は、網膜光受容体細胞の損失を補償するために、通常「光センサー（light sensors）」を有さない網膜神経細胞にそれらの「光センサー」を導入する。

【0018】

本発明者らおよび共同研究者らは、桿体および錐体の変性を受けている網膜に対する光感受性を回復するためにChop2/ChR2を用いる実現可能性を検討した。この結果によって本明細書では、インビボでげっ歯類の内網膜神経細胞におけるChop2/ChR2の長期間発現が示された。この結果また、これらの内網膜神経細胞が十分な数の機能的なChR2チャネルを発現して、オール・トランスのレチナールの外的な供給なしに強固な膜脱分極または活動電位発火を生じることができるということを示している。さらに、本発明者らは、光受容体欠損マウスモデルにおけるChR2の発現が、網膜神経節細胞が光シグナルをコードできるだけでなく、視覚皮質における視覚的に喚起された応答を回復もできるということを実証した。

40

【0019】

本発明は、網膜の光受容体変性の結果として視覚を失っているかまたは盲目である個体

50

に対する視覚喪失の回復に関する。本発明は、これらの網膜神経細胞において光感受性の膜チャネルまたは分子を発現することによって、このような疾患状態の網膜における網膜神経細胞が、光に応答することを可能にする。好ましい光感受性のチャネルまたは分子は、微生物型の光ゲートチャネルロドプシン、例えば、ChR2、ChR1、光駆動イオンポンプ、例えば、バクテリオロドプシン (Lany i, JK, 2004, Annu Rev Physiol. 55: 665~88)、ハロロドプシン (Lany i, JK, 1990, Physiol Rev. 70: 319~30)、およびそれらの誘導体である。

【0020】

本発明者らによって発見されたとおり、盲目のマウスの網膜において正常には光感受性 (直接) でない網膜神経細胞、例えば、網膜神経節細胞 (RGC) および双極細胞は、チャネルロドプシン-2 (ChR2) と呼ばれる緑藻タンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントまたは保存的アミノ酸置換改変体が神経細胞膜に挿入されるとき、光に反応し得る。この研究は、ヒトでのRPをモデリングする状態である、網膜での光感受性細胞、桿体および錐体を失うように遺伝子的に交配されたマウスで行った。RPに加えて、本発明のアプローチによって可能性として処置され得る網膜変性性眼疾患の多くの形態が存在する。

【0021】

本明細書において開示されたとおり、視覚機能は、桿体および錐体が死んだ後、網膜における他の生存細胞に対して光感受性の特性を伝達することによって回復され得る。DNA移入のアプローチを用いて、本発明者らは、桿体および錐体が死んだ後に生存したマウス網膜神経細胞に光吸収タンパク質ChR2を導入した。これらの細胞は光感受性になり、そして視神経およびより高次の視覚経路を介して視覚皮質までシグナルを送り、ここで視覚の知覚が生じる。電気生理学的方法を用いて、ChR2処置マウスのほとんどにおける視覚皮質にこのシグナルが達したことが示された。この光感受性は、少なくとも6ヶ月間持続し、このことは、この被験体が、他のタイプの網膜細胞におけるChR2発現または光感受性および/もしくはChR2の波長選択性の改変のような、本明細書に開示されるさらなる手技を用いて、あるいは類似の細菌タンパク質を用いて、有用な視覚を再獲得し得、正常な視覚の回復のための転帰の改善のために多様な光感受性チャネルを生成することを示唆している。

【0022】

当業者によって注目されたとおり、このストラテジーは、「視野のパラダイムシフト (paradigm shift in the field)」に相当し、これは、「遺伝子操作された (補綴細胞) としてリエンジニアリングする網膜介在神経細胞の新しい分野 (new field of re-engineering retinal interneurons as genetically modified 'prosthetic' cells)」をいう。本発明は、「置換光検知受容体として機能する生存している網膜介在神経細胞を遺伝子操作する可能性を開いた (opened the possibility of genetically modifying the surviving retinal interneurons to function as replacement light-sensing receptor)」 (Flannery, J and Greenberg, K., 2006, Neuron. 50: 1-3; 本発明者らおよび共同研究者の同じ論点の刊行物に対する予告編として書かれた、Bi J. ら、Neuron 50, 23~33, 2006)。

【0023】

本発明者らは、網膜光受容体細胞に対して遺伝子を移入するためにウイルスベクターを用いることによってこの分野での進歩に投資した (Flannery JGら、1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6916~21)。光非感受性網膜介在神経細胞の光感受性細胞への変換によって、盲目の網膜変性の処置のための完全に新規な方向が誘導される。

【0024】

本発明の1実施形態では、網膜双極細胞、特定のアマクリン細胞および神経節細胞を、Chop2 DNAの形質導入について標的して、桿体および錐体の機能を包含する光感受性細胞へそれらを機能的に変換する。網膜における細胞の積層の結果、光受容体細胞が双極細胞を興奮させ、これが神経節細胞を興奮させて、視覚皮質にシグナルを伝達する。双極ON型細胞において本発明のチャンネルオプソニンを発現することが好ましい。硝子体内および／または網膜下の注射を用いて、標的されている細胞に達するようにDNA分子およびウイルスベクターを送達する。

【0025】

1実施形態では、プロモーターは、代謝調節型グルタミン酸受容体6の発現を制御する遺伝子である、Grm6遺伝子のmGluR6プロモーター領域（GenBankアクセッション番号BC041684）由来である（（Ueda Yら、1997, J Neurosci 17:3014~23）。このゲノム配列は、GenBankアクセッション番号AL627215に示される。上記のGenBank記録由来のこのプロモーター領域の配列の好ましい実施例は、図8に示される、11023ヌクレオチドからなる配列番号9である。もとのUmedaらの研究では、10kbのプロモーターを使用したか、プロモーターおよびGrm6のコントロールエレメントを含む配列の正確な長さは、フラグメントの長さを増大または減少することによって調節され得る。これは、所望の標的細胞における、好ましくはグルタミン酸受容体が富化されている双極細胞、詳細には網膜でのほとんどの双極細胞である、「オン」型双極細胞における、選択されたコード配列、好ましくはChop2のトランスジェニック発現を駆動するGrm6遺伝子から最適にサイ

10

20

【0026】

本発明は、網膜に対する光感受性を回復する方法に関しており、この方法は以下：

（a）神経細胞中で発現可能な光ゲートチャンネルロドプシンまたは光駆動性のイオンポンプロドプシンをコードする核酸発現ベクターであって、ロドプシンをコードするオープンリーディングフレーム、およびそれに作動可能に連結された、プロモーター配列、および必要に応じて転写調節配列を含むベクターを網膜神経細胞に送達する工程と；

（b）この神経細胞中でベクターを発現させ、これによって光感度を回復する工程と、を包含する。

30

【0027】

ロドプシンは好ましくは、チャンネルロドプシン-2（Chop2）または生物学的に活性なフラグメントまたはその保存的なアミノ酸置換改変体である。

【0028】

このベクターは好ましくはrAAVウイルスベクターである。

【0029】

このプロモーターは、構成的プロモーター、例えば、ハイブリッドCMVエンハンサー／ニワトリ（chicken）βアクチンプロモーター（CAG）（配列番号1の一部として下に示される）、またはCMVプロモーターであってもよい。このプロモーターはまた、（i）誘導性プロモーター、または（ii）細胞型特異的プロモーターであってもよく、後者の好ましい例は、mGluR6プロモーター（例えば、配列番号9のプロモーター配列の一部）、Pcp2（L7）プロモーターまたはニューロキニン-3（NK-3）プロモーターである。

40

【0030】

上記の方法における好ましいベクターは、CAGプロモーター、ウッドチャック転写後調節エレメント（WPRE）、およびヒトまたはウシ成長ホルモンポリアダニル化配列を備える。

【0031】

本方法では、網膜神経細胞は、ON-およびOFF-型の網膜神経節細胞、網膜桿状体

50

双極細胞、A I I アマクリン細胞ならびにO NおよびO F Fの網膜錐体双極細胞から選択される。好ましくは、このベクターは、O N型神経節細胞および／またはO N型双極細胞に対して標的され、かつそこで発現される。上記ベクターが、N K-3プロモーターを含む場合、このベクターは好ましくは、O F F錐体双極細胞に標的化される。

【0032】

本発明はまた、網膜の光受容体細胞が変性されているか、または変性されかつ死滅された、失明または盲目に罹患している被験体の網膜神経細胞に対する光感受性を回復する方法に関しており、この方法は：

(a) この被験体の網膜に対して、この神経細胞中で発現可能な光ゲートチャネルロドプシンまたは光駆動性イオンポンプロドプシンをコードする核酸ベクターを送達する工程であって、このベクターはロドプシンをコードするオープンリーディングフレーム、およびそれに対して作動可能に連結された、プロモーター配列および、必要に応じて、転写調節配列を含む工程と、

(b) この神経細胞中でこのベクターを発現する工程であって、このロドプシンの発現がこの神経細胞を光感受性にさせ、これによってこの網膜に対する光感受性の回復がされる工程と、を包含する。

【0033】

この方法では、上記ロドプシンは好ましくは、C h o p 2、またはその生物学的に活性なフラグメントまたは保存的なアミノ酸置換改変体である。上記ベクターは好ましくはr A A Vウイルスベクターである。好ましいプロモーターは上記に提示される実施形態について上記されるとおりである。このベクターに好ましい標的細胞は上記されるとおりである。

【0034】

上記の方法を用いる光感受性の回復は好ましくは、この被験体における視覚の回復を生じる。この視覚は好ましくは、以下の方法の1つ以上によって測定される：

(i) 光刺激に対する露出後の上記被験体による光検出応答

(i i) 光刺激に対する露出後の上記被験体による光投射応答；

(i i i) 光対暗のパターン化視覚刺激の被験体による光分解能；

(i v) 光フラッシュ刺激因子またはパターンの視覚刺激に対する視覚皮質中の応答の電氣的記録。

【0035】

この前述の方法では、上記失明または盲目は、変性疾患の結果、好ましくは、網膜色素変性症または加齢性黄斑変性症であってもよい。

【0036】

別の実施形態では、上記被験体はまた、上記ベクターの送達の前、同時、または後に視力補綴物を提供される。好ましい視力補綴物は、網膜インプラント、皮質インプラント、外側膝状核インプラント、または視覚神経インプラントを含む。

【0037】

前述の方法を使用する場合、この被験体の視覚応答は、1つ以上の視覚刺激を用いる訓練に供されてもよい。この訓練は好ましくは、以下の方法：

(a) (i) 光刺激および／もしくはパターン刺激のレベルを変更すること、ならびに／または(i i) 共通の光源もしくは対象物由来の環境的刺激、を認識するように被験体を訓練することによって特徴付けられる習慣性訓練と；

(b) 視覚的に局所の物体を検出し、かつ訓練なしよりも有効にとりわけこの物体を動かすためにこの被験体を訓練することによって特徴付けられる方向付けおよび移動度の訓練、

のうちの1つ以上によって達成される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

(発明の詳細な説明)

本発明は、ヒト、他の哺乳動物または他の動物被験体での眼の障害を処置するための方法を提供する。詳細には、眼の障害は、網膜色素上皮細胞または光受容体細胞における変異遺伝子または遺伝子欠損を含む障害である。本発明の方法は、眼の細胞における遺伝子の産生の発現を指向するプロモーター配列に作動可能に連結されるか、またはそのプロモーター配列の制御下にある眼の細胞に特異的な正常遺伝子をコードする核酸配列を担持する、組み換えウイルスの有効量の硝子体内または網膜下注射によるこの被験体への投与の工程を包含し、そして変異された遺伝子または欠失された遺伝子の発現の欠失または不正確な発現を置き換える。

【0039】

眼科障害

本発明の方法が考慮され、かつ視覚の1つ以上のパラメーターを改善するために用いられ得る眼科の障害としては、限定はしないが、眼の前部および後部の両方に影響する発達性の異常が挙げられる。前眼部障害としては、緑内障、白内障、角膜ジストロフィー、円錐角膜が挙げられる。後眼部障害としては、光受容体の機能不全によって生じる盲目障害、および／または網膜のジストロフィーおよび変性によって生じる死が挙げられる。網膜の障害としては、先天性定常夜盲症、加齢性黄斑変性症、先天性錐体ジストロフィー、および大グループの網膜色素変性症(RP)ー関連障害が挙げられる。これらの障害としては、種々の年齢で生じる網膜における光受容体細胞、桿体および錐体の遺伝子的に死滅しやすい傾向が挙げられる。とりわけ、重篤な網膜症、例えば、年齢とともに進行し、小児期および青年期早期に盲目を生じるRP自体のサブタイプ、ならびにRP関連の疾患、例えば、LCAの遺伝的サブタイプ(人生の初年度程度の早期に小児期に視覚喪失を高頻度に生じる)である。後者の障害は、光受容体細胞、桿体および錐体の重篤な減少、およびしばしば完全な喪失によって遺伝的に特徴付けられる。(Trabulsi, EI, 編, Genetic Diseases of the Eye, Oxford University Press, NY, 1998)。

【0040】

詳細には、本発明の方法は、機能の喪失にかかわらず眼の組織構造の長期保存によって、そして被験体の眼の細胞における機能喪失と正常な遺伝子の欠損または非存在との間の関連によって、特徴付けられる、RPE関連の網膜症のような眼科障害に起因して視覚を喪失している被験体に対する少なくとも部分的な視覚の処置および／または復旧に有用である。種々のこのような眼科障害、例えば、小児期発現の失明病、網膜色素変性症、黄斑変性症、および糖尿病性網膜症、ならびに、当該分野で公知の眼の失明病が公知である。これらの他の障害、ならびに以前には未知の原因の失明病(後者は、上記と同じ説明で特徴付けられる)も、本発明の方法によって首尾よく処置され得ることが予想される。従って、本発明の方法によって処置される特定の眼科障害は、上述の障害およびまだそのように特徴付けられていない多数の疾患を包含し得る。

【0041】

視覚情報は、2つの経路を通じて網膜を通じて処理される: 光ONをシグナル伝達するON経路、および光OFFをシグナル伝達するOFF経路(Wassle、前出)。ONおよびOFF経路の存在が、コントラスト感度の増強には重要であると一般に考えられる。ON経路における視覚シグナルは、ON錐体双極細胞からON神経節細胞へリレーされる。ON錐体双極細胞およびON神経節細胞の両方が、光に応答して脱分極される。他方では、OFF経路の視覚シグナルは、OFF錐体双極細胞からOFF神経節細胞に伝達される。OFF錐体双極細胞およびOFF神経節細胞の両方が、光に応答して低分極される。ほのかな明りで見える能力(暗所視)を担う桿体双極細胞は、ON双極細胞(光に応答して脱分極)である。桿体双極細胞は、AIIアマクリン細胞(ON型網膜細胞)を通じてONおよびOFFの錐体双極細胞へ視覚シグナルを伝達する。

【0042】

本発明の実施例によって、CAGプロモーターによる網膜神経節細胞における光感受性チャンネル、すなわちChR2を偏在的に発現する発現の機能的な結果が示され、かつこれ

が有用な視覚を回復するのに十分であることが示唆される。しかし、ON型網膜神経細胞に対するChR2のような脱分極膜チャネルの標的化は、より良好な有用な視覚を生じ得る。さらに、双極細胞のような、より遠位の網膜神経細胞における光センサーの発現は、変性網膜の残留しているシグナル処理機能を利用する。さらに、ON型網膜神経細胞（ON型神経節細胞および／またはON型双極細胞）において、ChR2のような脱分極光センサーを発現すること、およびハロロドプシン（halorhodopsin）（塩化物ポンプ）のような低分極光センサー（Han, Xら、2007, PLoS ONE, Mar 21; 2:e299; Zhang, Fら、2007; Nature 446:633-9; present inventors' results）を、OFF型網膜神経細胞（OFF型神経節細胞および／またはOFF型双極細胞）において発現することによって、光受容体変性網膜においてONおよびOFF経路を作成できる。

10

【0043】

網膜でON経路およびOFF経路を回復するための別のアプローチは、桿体双極細胞またはAIIアマクリンに対して、ChR2のような脱分極光センサーを発現することによって達成される。この理由は、桿体双極細胞またはAIIアマクリン細胞の脱分極が、錐体双極細胞および下流の網膜神経節細胞のレベルでONおよびOFF応答をもたらし得、従って網膜で固有であるON経路およびOFF経路が維持され得るからである（Wassle, 2004）。

【0044】

本発明によれば、以下のアプローチを用いて、内網膜神経細胞の光感度を回復する。

20

【0045】

（1）偏在的に発現するChR2のような光感受性チャネルを使用して、全てのタイプの神経節細胞（ONおよびOFFの両方の神経節細胞）、または全てのタイプの双極細胞（桿体双極細胞、ならびにONおよびOFF錐体双極細胞）における膜脱分極を生じる。CAGプロモーターを有するAAVベクターは既に、本明細書で例示されるとおり、げっ歯類の網膜においてこのアプローチを部分的に達成している。

【0046】

（2）脱分極光センサー、例えば、ChR2は、ON型網膜神経細胞、例えば、ON型神経節細胞またはON型双極細胞に標的される。Dr. J. G. Flanneryのグループからの研究は、AAV-2ウイルスベクターを用いることによってON型網膜神経節細胞においてGFPを標的する、ヒトギャップ接合性タンパク質（コネキシン-36）プロモーターのフラグメントを特定した（Greenberg K Pら、2007, In vivo Transgene Expression in ON-Type Retinal Ganglion Cells: Applications to Retinal Disease. ARVO abstract, 2007）。mGluR6プロモーターの容易にパッケージ可能なバージョン（<2.5 kb）によって、ON型双極細胞（桿体双極細胞およびON型錐体双極細胞の両方）に対するChR2の標的化が可能になる。

30

【0047】

（3）細胞特異的なプロモーターを用いて、特定のタイプの網膜神経細胞を標的する。桿体双極細胞を標的し得るプロモーターは、Pcp2（L7）プロモーターである（Tomomura, Mら、2001, Eur J Neurosci. 14:57~63）。活性プロモーターの長さは好ましくは、2.5 Kb未満であり、そのため、これは、AAVウイルスカセット中にパッケージングされ得る。

40

【0048】

（4）ChR2のような脱分極光センサーは、ON型神経節細胞またはON型錐体双極細胞、および低分極光センサー、例えば、ハロロドプシンに対して、OFF型神経節細胞またはOFF型錐体双極細胞に標的化されて、ONおよびOFF経路が生成される。上記されるとおり、mGluR6プロモーター（<2.5 kb）の十分短い（パッケージ可能）バージョンによって、ON型双極細胞に対してChR2を標的することが可能になる。

50

ニューロキニン-3 (NK-3) プロモーターを用いて、OFF 錐体双極細胞に対してハロロドプシンを標的する (Haverkamp, Sら, 2002, J Comparative Neurology, 455: 463~76)。

【0049】

ベクター

本発明の種々の実施形態によれば、種々の公知の核酸ベクター、例えば、組み換えウイルス、例えば、組み換えアデノ随伴ウイルス (rAAV)、組み換えアデノウイルス、組み換えレトロウイルス、組み換えポックスウイルス、および当該分野で公知の他のウイルス、ならびにプラスミド、コスミドおよびファージなどをこれらの方法で用いてもよい。当該分野で周知の多くの刊行物は、遺伝子の送達のための種々のこのようなベクターの使用を考察している。例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 最終版; Kay, MA. ら、2001, Nat. Med., 7: 33~40; および Walther Wら、2000, Drugs 60: 249~71を参照のこと)。

【0050】

組み換えベクターのアセンブリのための方法は周知である。例えば、その全てが参照によって本明細書に援用される、WO 00/15822 およびそこに引用される他の参考文献を参照のこと。

【0051】

種々のウイルスベクター系に対して利点および不利な点がある。どれほど多くのDNAがパッケージ可能かという限界は、どの系が使用されるかを選択するのにおける1つの決定因子である。rAAVは、約4.5 kbのDNAに限定される傾向であるが、レンチウイルス (例えば、レトロウイルス) 系は、4~5 kbを収容し得る。

【0052】

AAVベクター

アデノ随伴ウイルスは、小型の一本鎖DNAウイルスであって、効率的な複製のためにヘルパーウイルスを要する (Berns, KI, Parvoviridae: the viruses and their replication, p. 1007~1041 (第2巻), Fields, BNら、Fundamental Virology, 第3版, (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1995))。AAVの4.7 kbのゲノムは、2つの逆方向末端反復 (ITR)、ならびにそれぞれRepタンパク質およびCapタンパク質をコードする2つのオープンリーディングフレーム (ORF) を有する。Repリーディングフレームは、分子量78、68、52および40 kDaの4つのタンパク質をコードする。これらのタンパク質は主に、AAV複製を調節すること、ならびにAAVのレスキューおよび宿主細胞染色体への組み込みに機能する。Capのリーディングフレームは、分子量85 (VP1)、72 (VP2) および61 (VP3) kDaの3つの構造的タンパク質をコードし、これらのタンパク質がビリオンカプシドを形成する (Berns, 前出)。VP3は、総AAVビリオンタンパク質の80%より多くを含む。

【0053】

5'末端および3'末端で隣接するrepおよびcapのORFは、145 bpのITRであり、その最初の125 bpは、Y型またはT型の二重鎖構造を形成し得る。この2つのITRはAAVの複製、レスキュー、パッケージングおよびゲノムの組み込みに必須の唯一のcisエレメントである。「flip」および「flop」と呼ばれるAAVのITRの2つの高次構造が存在する (Snyder, ROら、1993, J Virol, 67: 6096~6104; Berns, KI, 1990 Microbiol Rev, 54: 316~29)。全体的なrepおよびcapドメインは、切除されて、導入遺伝子、例えば、レポーターまたは治療用導入遺伝子で置き換えられてもよい (Carter, BJ, in Handbook of Parvoviruses, P. Tijss

ser, ed., CRC Press, pp. 155~168 (1990))。

【0054】

AAVは、多くの動物種で見出されており、これには霊長類、イヌ、家禽およびヒトが挙げられる(Murphy, F.A.ら、The Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Rept of the Int'l Comm on Taxonomy of Viruses, Arch Virol, Springer-Verlag, 1995)。6つの霊長類血清型が公知である(AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5およびAAV6)。

【0055】

ミニ遺伝子、ベクターおよびカプシド、ならびに本発明で用いられる他の構築物を生成するのに使用されるAAVのITR配列および他のAAV配列は、種々の供給源から入手され得る。例えば、この配列は、現在公知のヒトAAVおよびまだ特定されていない血清型の両方を含む、任意の上記の6つのAAV血清型または他のAAV血清型または他のデソウイルスによって提供され得る。同様に、他の動物種に感染することが公知のAAVは、本発明の分子および構築物で用いられるITRの供給源であり得る。種々の血清型のAAV由来のカプシドを、他のベクター成分と種々の混合物中で組み合わせてもよい(例えば、WO01/83692(2001年11月8日)参照によって本明細書に援用される)。多くのこれらのウイルス株または血清型は、American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VA., から入手可能であり、または種々の他の供給源(学術的または商業的)から入手可能である。

【0056】

例えば、種々のデータベースから入手可能な、公表されたAAV配列に基づいて、公知の技術を用いて本発明のベクターおよびウイルスを調製することに用いられる配列を合成することが所望され得る。本発明の構築物を調製するために利用される配列の供給源は、限定されるとは考えられない。同様に、AAVの血清型および(起源の)種の選択は、当該分野の技術の範囲内であり、限定とは解釈されない。

【0057】

ミニ遺伝子

本明細書において用いる場合、AAV配列は代表的には、rAAVビリオン中にパッケージングされるrAAV構築物(例えば、ミニ遺伝子またはカセット)の形態である。最小限、rAAVミニ遺伝子は、AAV ITRおよび宿主細胞への送達のための異種核酸分子によって形成される。最も適切には、ミニ遺伝子は、異種配列に対して5'および3'側に配置されたITRを含む。しかし、直列に、例えば、5'~3'またはヘッド・ターミナルに配置された、または別の構成の5' ITRおよび3' ITRの配列を含むミニ遺伝子も所望され得る。他の実施形態は、複数のコピーのITRを有するミニ遺伝子、または5' ITR(または反対には3' ITR)が異種配列に対して5'および3'の両方に位置しているものを包含する。ITR配列は、異種配列のすぐ上流および/または下流に位置してもよい; 介在性配列が存在してもよい。ITRはAAV5由来であってもよいし、または任意の他のAAV血清型由来であってもよい。ミニ遺伝子は、1血清型由来の5' ITRおよび別の血清型由来の3' ITRを含み得る。

【0058】

用いられるAAV配列は好ましくは、145bpのシス作用性5'および3' ITR配列である(例えば、Carter, B.J., 前出)。好ましくは、全体的なITR配列を用いるが、最少の改変は許容できる。これらのITR配列を改変するための方法は周知である(例えば、Sambrook, J. ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Brent, R ら編集, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 2003; Ausubel, F.M.ら、編, Short Protocols in Molecular Biolog

y, 第5版, Current Protocols, 2002; Carterら、前出; および Fisher, Kら、1996 J Virol. 70:520~32)。公知の方法を用いて rAAV ウイルスを操作することが慣習的である (例えば、Bennett, Jら、1999, 前出)。本発明において使用されるこのような分子の例は、5' および 3' AAV ITR 配列に隣接する異種配列、好ましくは Chop2 配列を含む「シス作用性 (cis-acting)」プラスミドである。

【0059】

この異種配列は、細胞に送達されて発現されることが所望されるタンパク質またはポリペプチドをコードする。本発明は、選択されたプロモーターおよび他の従来のベクター調節成分の制御下の Chop2 配列に関する。

10

【0060】

標的されかつ発現されている導入遺伝子

最も好ましい実施形態では、この異種配列は、導入遺伝子として機能する核酸分子である。本明細書において用いる場合、「導入遺伝子 (transgene)」という用語は、AAV 配列に対して異種であり、かつ所望の産物、好ましくは Chop2、ならびに宿主細胞中でこの核酸の転写および／または翻訳を指向または調整して、コードされた産物のこのような細胞中での発現を可能にする調節配列をコードする核酸配列をいう。好ましいポリペプチド産物とは、眼に、詳細には網膜神経細胞に送達され得る産物である。

【0061】

導入遺伝子は、正常な光受容体特異的遺伝子における変異を含む、任意の多数の原因から生じ得る眼の障害を有する被験体の視覚状態を処置するかそうでなければ改善するために送達および発現される。この標的された眼の細胞は、光受容体細胞 (完全に変性されていない場合) であっても、またはさらに好ましくは、他の網膜神経細胞、すなわち、双極細胞および網膜神経節細胞であってもよい。

20

【0062】

Chop2 オプシンコード配列に作動可能に連結された mGluR6 プロモーターおよびレポーター遺伝子、例えば、GFP または別の蛍光タンパク質を用いて、約 4.5 kb の挿入物が好ましく、オプシンについては 1 kb、レポーターについては 0.7 kb、mGluR6 プロモーター領域については 10 kb、そして従来の転写調節因子については約 0.4 kb。

30

【0063】

種々のオプソニン遺伝子の使用によって、異なるチャネルタンパク質の吸収極大が異なるにつれて所望の波長の選択が可能になる。1 実施形態では、報告された遺伝子を視覚スペクトルの赤い部分に動かす。

【0064】

同様に、本明細書で報告された研究に基づいて、形質導入されたマウス網膜において誘発電位を刺激するのに必要な光の明るさによって、漸増する光感度を有するチャネルオプシンが所望され得ることが示される。これは、適切な天然に存在するオプシン、例えば、他の微生物型ロドプシンの選択によって、または Chop2 の光感度およびその他の特性、例えば、イオン選択性およびスペクトル感度を改変して、視覚回復に対する必要性をより良好にフィットさせる多様化光感度チャネルを生成することによって、達成され得る。

40

【0065】

異なる導入遺伝子を用いて、送達されているタンパク質の別のサブユニットをコードしても、または同時発現が所望される異なるポリペプチドをコードしてもよい。単一の導入遺伝子が、各々のいくつかのサブユニットをコードする DNA を含む場合、各々のサブユニットをコードする DNA は、短いサブユニットコード DNA 配列 (例えば、IRES を含む総 DNA が 5 kb 未満) に好ましい内部リボサームエントリーサイト (internal ribosome entry site) (IRES) によって隔てられてもよい。IRES を使用しない他の方法、例えば、その全てが当該分野で公知である、第二の

50

内部プロモーター、別のスプライスシグナル、翻訳と同時またはその後のタンパク質分解性切断ストラテジーなどの使用が同時発現に用いられてもよい。

【0066】

本明細書において有用な核酸のコード配列または非コード配列は好ましくは、それらが発現されるべき種にとってコドン最適化される。このようなコドン最適化は当該分野では慣用的である。

【0067】

好ましい導入遺伝子は全長ポリペプチド、好ましくはChop2（配列番号6）をコードするが、本発明はまた、Chop2の（または網膜神経細胞で発現されるべき本発明の任意の別のポリペプチドの）生物学的に活性なフラグメントまたは保存的アミノ酸置換改変体をコードするベクターにも関する。有用なフラグメントの非限定的な例は、配列番号3および配列番号8の配列を有するポリペプチドである。このフラグメントまたは改変体は、形質転換されている標的細胞によって発現され、そして改変体ではなく天然のアミノ酸配列を有する全長または実質的に全長のポリペプチドのものと機能的に等価である光感度をこのような細胞に与えることを可能にする。生物学的に活性なフラグメントまたは改変体は「機能的に等価（functional equivalent）」であり、この用語は当該分野で十分に理解され、そして本明細書においてさらに詳細に記載される。フラグメントまたは改変体の要求性の生物学的活性は、チャネルオプシンの活性を確立するために本明細書に開示されるかまたは当該分野で公知である任意の方法を用いて、野生型の天然のポリペプチドに対して以下の活性を有する：約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、および本明細書で導き出せる任意の範囲、例えば、約70%～約80%、そしてさらに好ましくは約81%～約90%；またそれよりさらに好ましくは、約91%～約99%。

【0068】

遺伝子コードの縮重の結果として、同じ配列のポリペプチドを発現する本発明の核酸およびベクターのコード配列における任意の改変体は、本発明の範囲内に包含されることが理解されるべきである。

【0069】

本発明の改変体のアミノ酸配列同一性は、代表的には特定の数学的アルゴリズムに基づいて標準的な方法を用いて決定される。好ましい実施形態では、アミノ酸配列の間の同一性パーセントは、NeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol. 48：444-453（1970））のアルゴリズムを用いて決定され、このアルゴリズムはBlossom62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、16、14、12、10、8、6、または4というギャップウエイト、および1、2、3、4、5または6という長さウエイトを用いて、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>で利用可能）におけるGAPプログラムに組み込まれている。さらに別の好ましい実施形態では、2つのヌクレオチド配列の間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>で利用可能）におけるGAPプログラムを用いて、NWSgapdna.CMPマトリックスおよび40、50、60、70、または80というギャップウエイトおよび1、2、3、4、5、または6という長さウエイトを用いて決定される。別の実施形態では、2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列の間の同一性パーセントは、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているMeyersおよびMiller（CABIOS, 4：11-17（1989））のアルゴリズムを用いて、PAM120ウエイト残余表（weight residue table）、12というギャップ長ペナルティおよび4というギャップペナルティを用いて決定される。本発明のヌクレオチドおよびアミノ酸配列はさらに、例えば、他のファミリーメンバーまたは関連の配列を特定するために、公的データベースに対する検索を行うための「クエリー配列（query sequence）」として用いられてもよい。このような検索は、NBLASTおよびXBLASTプログラム（Altschulら、（1990）J. Mol. Biol. 215：403-10）を用い

て行われ得る。BLASTのヌクレオチド検索は、例えば、C. reinhardtii の Chop2 をコードするDNAに対して相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア＝100、ワード長＝12で行われてもよい。BLASTのタンパク質検索は、Chop2のような適切な参照タンパク質に相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア＝50、ワード長＝3で行われてもよい。比較目的のギャップアラインメントを得るためには、Gapped BLASTを利用してもよい(Altschul ら、(1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389～3402)。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを用いてもよい。World Wide Web URL ncbi.nlm.nih.gov. を参照のこと。

【0070】

好ましいアミノ酸配列を改変体は、天然の全長チャネルオプシンポリペプチド、好ましくは、C. reinhardtii 由来の Chop2 (配列番号6)と、またはそのフラグメント(例えば、配列番号3または8)と以下の程度の配列同一性を有する：約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約71%、約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%、およびその中で導き出せる任意の範囲、例えば、約70%～約80%、そしてさらに好ましくは約81%～約90%など；またはそれよりさらに好ましくは、約91%～約99%の同一性。好ましい生物学的に活性なフラグメントは、配列番号6の残基1～315に相当する配列番号3を含むかもしくはそれからなり、または配列番号8を含むかしくはそれからなる。

【0071】

フラグメントまたは改変体をコードするDNA分子を生成するために任意の多数の公知の組み換え方法が用いられる。改変体の生成のためには、コード配列に変異を導入して、本発明の所望のアミノ酸配列改変体を生成することが慣用的である。部位指向性の変異誘発は、プロトコールおよび試薬が市販されている周知の技術である(例えば、Zoller, MJら、1982, Nucleic Acids Res. 10: 6487～6500; Adelman, JPら、1983, DNA 2: 183～93)。これらの変異体は、単純な欠失もしくは挿入、体系的な欠失、塩基の集団の挿入もしくは置換、または単一の塩基の置換を包含する。

【0072】

機能的等価物に関して、「生物学的に機能的な等価な(biologically functional equivalent)」タンパク質、ポリペプチド、遺伝子または核酸の定義における、固有の(生来の)(inherent)とは、その分子の規定の部分内で作成され得る変化の数に対する制限が存在し、そして等価な生物学的活性の受容可能なレベルを有する分子がやはり生じ得るという概念であることが当業者にはよく理解される。従って、生物学的に機能的な等価なペプチドとは、ほとんどでも全てでもない特定のアミノ酸が置換され得るペプチドとして本明細書で規定される。

【0073】

詳細には、ポリペプチドの長さが短いほど、少ないアミノ酸変化が作成されるはずである。それよりフラグメントが長ければ、中間的な数の変化を有し得る。全長ポリペプチドタンパク質は、多数の変化について最も耐性を有する。特定の残基が、結合領域または活性部位におけるポリペプチド残基の生物学的または構造的な特性に対して特に重要であることが示されている場合、このような残基は、一般には交換され得ないこともよく理解される。この方式では、機能的な等価物とは、本明細書において、それらのネイティブな生物学的活性のかなりの量を維持するポリペプチドとして規定される。

【0074】

タンパク質の化学および構造の詳細な説明については、参照によって本明細書に援用される、Schulz, G Eら、Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, 1978, および Creighton, T. E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983を参照のこと。タンパク質分子において作成され得る置換のタイプは、Schulzら、(前出)の表1～2およびCreighton(前出)の図3～9に提示されるような、種々の種の相同なタンパク質の間のアミノ酸変化の頻度の分析に基づいてもよい。このような分析に基づいて、保存的置換は、以下の5つの群のうちの1つ内の変化として本明細書で規定される。

10

【0075】

【表1】

1	小型の脂肪族、非極性またはわずかに極性の残基	Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2	極性、負に荷電した残基およびそれらのアミド	Asp, Asn, Glu, Gln;
3	極性、正に荷電した残基	His, Arg, Lys;
4	大型の脂肪族、非極性の残基	Met, Leu, Ile, Val (Cys)
5	大型の芳香族残基	Phe, Tyr, Trp.

20

上記のカッコ内の3つのアミノ酸残基は、タンパク質の構造に特別な役割を有する。Glyは、側鎖を欠く唯一の残基であり、従ってその鎖に可塑性を付与する。Proは、その通常でない幾何形状のせいで、その鎖を緊密に拘束する。Cysは、タンパク質折り畳みに重要であるジスルフィド結合形成に関与し得る。

【0076】

アミノ酸の疎水性親水性指標も、改変体選択において考慮され得る。各々のアミノ酸は、それらの疎水性および電荷の特徴に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられており、これらは以下である：Ile (+4.5); Val (+4.2); Leu (+3.8); Phe (+2.8); Cys (+2.5); Met (+1.9); Ala (+1.8); Glycine (グリシン) (-0.4); Thr (-0.7); Ser (-0.8); Trp (-0.9); Tyr (-1.3); Pro (-1.6); His (-3.2); Glu (-3.5); Gln (-3.5); Asp (-3.5); Asn (-3.5); Lys (-3.9); および Arg (-4.5)。タンパク質様の分子に対して相互作用的な生物学的機能を付与するのにおける疎水性親水性指標の重要性は一般に、当該分野で理解される (KyteおよびDoolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157:105～32)。特定のアミノ酸が、同様の疎水性親水性指標係数またはスコアを有する他のアミノ酸で置換されてもよく、それでも同様の生物学的活性を保持していることが公知である。疎水性親水性指標に基づく変化を作成するのには、その疎水性親水性係数が±2内であるアミノ酸置換が好ましく、±1内であるアミノ酸置換が特に好ましく、そして±0.5内のアミノ酸置換がそれよりさらに特に好ましい。類似のアミノ酸の置換は、そのように作成された生物学的に機能的なポリペプチドが、本発明の特定の実施形態における使用に意図される場合特に、疎水性親水性指標に基づいて有効になり得ることも当該分野で理解される。米国特許第4,554,101号は、その隣接アミノ酸の親水性によって支配されるとおり、タンパク質様分子の最大の局所平均親水性が、その分子の生物学的な特性に相関するというを開示する。親水性の値については、米国特許第4,554,101号を参照のこと。類似の親水性値に基づいた変化を作成するのにおいて、親水性値が±2内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1内であるアミノ酸置換が特に好ましく、そして±0.5内のアミノ酸置換がそれよりさらに特に好ましい。

30

40

【0077】

調節性(制御)配列(regulatory sequences)

50

本発明のミニ遺伝子または導入遺伝子は、コード配列またはORFに対して作動可能に連結された適切な配列を含み、標的された宿主細胞でその発現を促進する。「作動可能に連結された (operably linked)」配列としては、コード配列と接触しているプロモーターのような発現制御配列、およびポリペプチド産物の発現をトランスでまたは遠位で制御するように作用する発現制御配列の両方が挙げられる。

【0078】

発現制御配列 (expression control sequences) としては、適切な転写開始、終止、プロモーターおよびエンハンサー配列；効率的なRNAプロセシングシグナル、例えば、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル；細胞質のmRNAを安定化する配列；翻訳効率を増強する配列（例えば、Kozakコンセンサス配列）；核酸またはタンパク質の安定性を増強する配列；そして所望の場合、タンパク質プロセシングおよび／または分泌を増強する配列が挙げられる。多くの変化した発現制御配列であって、天然および非天然の構成的な誘導性のおよび／または組織特異的な配列を含む配列は、当該分野で公知であり、そして所望の発現のタイプに依存して本明細書で利用され得る。

10

【0079】

真核生物細胞についての発現制御配列は代表的には、プロモーター、エンハンサー、例えば、免疫グロブリン遺伝子由来の配列、SV40、CMVなど、およびスプライスドナーおよびアクセプター部位を含み得るポリアデニル化配列を含む。ポリアデニル化配列は一般には、コード配列に対して3'側および3'側LTR配列に対して5'側に挿入される。ウシ成長ホルモン由来のポリAは適切な配列である。

20

【0080】

本明細書で有用な調節配列はまた、イントロン、例えば、プロモーター／エンハンサー配列とコード配列との間に位置する配列を含んでもよい。1つの有用なイントロン配列は、SV40由来であり、そしてSV40Tイントロン配列と呼ばれる。別には、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後エレメントが挙げられる（例えば、Wang LおよびVerma, I, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96:3906~10を参照のこと）。

【0081】

IRES配列、または上で考察されるような他の適切なシステムは、単一の転写物由来の2つ以上のポリペプチドを生成するために用いられ得る。n例示的なIRESは、ポリオウイルスIRESであり、これが光受容体、RPEおよび神経節細胞における導入遺伝子発現を支持する。好ましくは、IRESはrAAVベクターにおけるコード配列に対して3'側に位置する。

30

【0082】

このプロモーターは、好ましくは網膜神経細胞における、眼の設定における選択された導入遺伝子の発現を駆動し得る多数の構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターから選択され得る。好ましいプロモーターは、「細胞特異的 (cell-specific)」であり、このことは、これが光受容体細胞のような特定の眼の細胞タイプにおける選択された導入遺伝子の発現を指向するように選択されるということを意味している。

40

【0083】

有用な構成的プロモーターの例としては、例示されたCMV早初期エンハンサー／ニトリβ-アクチン (CβA) プロモーター-エキソン1-イントロン1エレメント、RSV LTRプロモーター／エンハンサー、SV40プロモーター、CMVプロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) プロモーター、およびホスホグリセロールキナーゼ (phosphoglycerol kinase) (PGK) プロモーターが挙げられる。

【0084】

さらなる有用なプロモーターは、W. W. Hauswirthら、1998, WO98/48027およびA. M. Timmersら、2000, WO00/15822に開示される。RPE細胞特異的遺伝子発現をインビボで駆動することが見出されたプロモータ

50

ーとしては、(1) 528bpのプロモーター領域(マウスの11-シスレチノールデヒドロゲナーゼ(RDH)遺伝子の塩基1~528)(Driessen, CAら、1995, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36:1988~96; Simon, A. ら、1995, J. Biol. Chem. 270:1107~12, 1995; Simon, A. ら、1996, Genomics 36:424~3) Genbank Accession Number X97752); (2) 2274bpのプロモーター領域) ヒト細胞性レチナルデヒド結合タンパク質(human cellular retinaldehyde-binding protein)(CRALBP)遺伝子由来(Intres, Rら、1994, J. Biol. Chem. 269:25411~18; Kennedy, BNら、1998, J. Biol. Chem. 273:5591~8, 1998)、Genbank Accession Number L34219); ならびに(3) ヒトRPE65由来の1485bpのプロモーター領域(Nicoletti, Aら、1998, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39:637~44, Genbank Accession Number U20510)。これらの3つのプロモーター(WO00/15822"2.3および3において以下の配列番号で標識される)は、GFPのRPE細胞特異的な発現を促した。本明細書に考察される種々のプロモーターおよびプロモーター領域におけるわずかな配列改変は(付加でも、欠失でもまたは変異でも、天然に存在してもまたはインビトロで導入されても)、本発明の細胞標的において発現を駆動する能力に影響しないと想定される。さらに、網膜細胞における、詳細には双極細胞または神経節細胞における豊富なおよび/または特異的な発現によって特徴付けられる、他のプロモーターの使用は、まだ発見されていない場合でも、特に本発明の範囲内に包含される。

【0085】

誘導性プロモーターは、眼の細胞における導入遺伝子産物の産生の量およびタイミングを制御するために用いられる。このようなプロモーターは、この遺伝子産物が、それが過剰に蓄積する場合、いくつかの所望されない、例えば毒性の効果を細胞中で有する場合に有用であり得る。誘導性プロモーターとしては、当該分野で公知のプロモーター、例えば、Zn誘導性のヒツジメタロチオネイン(MT)プロモーター、デキサメタゾン(Dex)誘導性マウス哺乳動物腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター; T7プロモーター; エクジソン昆虫プロモーター; テトラサイクリン抑制系; テトラサイクリン誘導性系; RU486-誘導性系; およびラバマイシン誘導性系が挙げられる。任意の誘導性プロモーターであって、その作用が緊密に調節され、そして特定の標的の眼の細胞タイプに特異的なプロモーターが用いられ得る。他の有用なタイプの誘導性プロモーターは、特異的な生理学的状態、例えば、温度、急性期、細胞複製または分化状態によって調節されるプロモーターである。

【0086】

本明細書における使用のための種々のベクターおよび調節(制御)エレメントの選択は、従来の、十分記載され、そして容易に利用可能である。例えば、Sambrookら、前出; およびAusubelら、前出を参照のこと。全てではないベクターおよび発現制御配列が、本発明の導入遺伝子、好ましくはChop2を発現するのに十分等しく機能するということが容易に理解される。明らかに、当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、そして一般的な知識および本明細書に提供されるガイダンスに基づいて、公知の発現制御配列のなかで慣用的な選択を適用し得る。当業者は、1つ以上の発現制御配列を選択し、発現されているコード配列に対してそれらを作動可能に連結してミニ遺伝子を作成し、このミニ遺伝子またはベクターをAAVベクターに挿入し、そしてrAAVに公知のパッケージング方法のうち1つに従って感染性粒子またはビリオンへのこのベクターのパッケージングを生じることができる。

【0087】

rAAVの産生

本発明に用いられるrAAVは、本明細書に記載される材料および方法、ならびに当該

分野で周知の材料および方法を用いて構築および生成され得る。本発明の任意の構築物を生成するために好ましい方法は、構成的および誘導性の遺伝子操作、組み換え操作、および合成的技術、例えば、上記で引用される引用文献に示されるものである。

【0088】

要するに、rAAVビリオン中へのrAAV構築物をパッケージングするために、AAVのrepおよびAAVのcapまたはその機能的なフラグメントを発現するのに必要な配列、ならびにAAVの産物に必須のヘルパー遺伝子が宿主細胞に存在しなければならない。例えば、異なる血清型のAAVのRepおよびCapタンパク質をコードするシュードタイプのrAAVビリオンベクターの産生およびヘルパー機能を提供するAdV転写産物を記載する米国特許出願公開第2007/0015238号を参照のこと。例えば、AAVのrepおよびcap配列は、限定はしないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リボソーム送達、膜融合、DNAコーティングペレットの微粒子銃送達、ウイルス感染およびプロトプラスト融合を含む任意の公知の方式で宿主細胞に導入されてもよい。遺伝子療法の目的のために眼の中および周囲の特定の領域にDNAを送達するために特に適合されたデバイスは、最近記載されており（例えば、参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開2005/0277868）、本発明の範囲内で用いられる。このようなデバイスは、エレクトロポレーションおよびエレクトロマイグレーション（electromigration）を利用し、これは網膜の背後に位置されてもよい可塑性支持体上に例えば2つの電極を提供する。第三の電極は、中空支持体の一部であり、この支持体はまた所望の領域にこの分子を注射するために用いられ得る。この電極は、網膜の背後または硝子体内を含む、眼の周囲に配置されてもよい。

【0089】

これらの配列は、エピソームとして細胞中で安定に存在してもよいし、または細胞のゲノムに安定に組み込まれてもよい。それらはまた、宿主細胞においてさらに一過性に発現されてもよい。例えば、有用な核酸分子は、5'～3'のプロモーター、プロモーターとrep配列の開始部位との間の任意のスペーサー、AAVのrep配列、およびAAVのcap配列を含む。

【0090】

repおよびcap配列は、それらの発現制御配列とともに、好ましくは、単一ベクターに提供されるが、それらは個々のベクター中に別々に提供されてもよい。このプロモーターは任意の適切な構成的、誘導性または天然のプロモーターであってもよい。RepおよびCapタンパク質を提供する送達分子は、任意の形態、好ましくはプラスミドであってもよく、このプラスミドは、マーカーとして使用される配列のような他の非ウイルス配列を含んでもよい。この分子は代表的には、AAV ITRおよびパッケージング配列を排除する。相同組み換えの発生を回避するために、他のウイルス配列、特にアデノウイルス配列が回避される。このプラスミドは好ましくは、安定に発現されるものである。

【0091】

引用される参考文献に記載される従来の遺伝子操作または組み換えDNA技術が用いられる。rAAVは、製造業者の指示に従ってリン酸カルシウム（Clontech）またはEffectedene（商標）試薬（Qiagen）のいずれかによる三重トランスフェクション方法を用いて生成され得る。例えば、Herzogら、1999, Nat. Med. 5: 56～63を参照のこと。

【0092】

rAAVビリオンは、全てが調節性配列指向性発現の制御下であるrAAVビリオンにパッケージングされるべきrAAV構築物、AAVのrep配列およびAAVのcap配列を含む、本明細書に記載されるようなrAAVを含む宿主細胞を培養することによって生成される。

【0093】

適切なウイルスヘルパー遺伝子、例えば、アデノウイルスE2A、E4Orf6およびVAは、好ましくは別々のプラスミド上で培養物に添加されてもよい。その後、導入遺伝

子の発現を指向する r A A V ビリオンは、混入するヘルパーウイルスも野生型 A A V もなしに単離される。

【0094】

特定の発現制御配列が、所定の導入遺伝子に適切であるか否かを評価して、導入遺伝子を発現するのに最も適切なものを選択することが慣習的である。例えば、標的細胞は、インビトロで感染され得、そして細胞中の導入遺伝子の多数のコピーがサザンブロットまたは定量的 P C R によってモニターされ得る。R N A 発現のレベルは、ノーザンブロットの定量的 R T - P C R によってモニターされ得る。タンパク質発現のレベルは、ウエスタンブロット、免疫組織化学、酵素イムノアッセイ (enzyme immunoassay) (E I A)、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (enzyme-linked immunosorbent assays) (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A) を含むイムノアッセイによって、または他の方法によってモニターされ得る。特異的な実施形態は、下の実施例に記載される。

10

【0095】

本発明の薬学的組成物および方法

C h o p 2 導入遺伝子および上記されるような標的眼細胞における使用のための細胞特異的プロモーターを含む r A A V は、従来の方法を用いて混入について評価され、そして例えば、網膜下注射による投与のための滅菌または無菌の薬学的組成物中に処方されるべきである。

【0096】

このような処方物は、薬学的に、そして／または生理学的に受容可能なビヒクル、希釈剤、キャリアまたは賦形剤、例えば、緩衝化生理食塩水または他の緩衝液、例えば、H E P E S を、生理学的な p H を維持するために含む。このような成分およびそれらの処方物の考察については、一般には、Gennaro, A E., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2003 または最終版を参照のこと。また、W O O O / 1 5 8 2 2 も参照のこと。この調製物が長期間保管されるべき場合、これは、例えば、グリセロールの存在下で凍結されてもよい。

20

【0097】

上記の薬学的組成物は、任意の適切な経路によって、好ましくは、硝子体内または網膜下注射によって、標的化されている網膜層に依存して、視覚疾患または失明病を有する被験体に投与される。

30

【0098】

B e n n e t t および共同研究者 (本明細書に引用される) の開示は、網膜色素上皮 (硝子体腔から最も遠位の層) の標的化に関する。本発明によれば、D N A 構築物は、網膜神経節細胞または双極細胞のいずれかに標的化される。この神経節細胞は、本明細書に記載のような硝子体内注射に合理的に十分使用可能である。硝子体内および／または網膜下注射は、特に光受容体細胞層が変性のせいで存在しない環境中で (本発明が克服しようとする変性の特定の形態における場合である)、双極細胞に対する必須のアクセスを提供し得る。

40

【0099】

ベクターが、詳細には哺乳動物網膜神経細胞において、A A V 媒介性送達によって、導入遺伝子を発現する能力について試験するために、S V 4 0 ポリ A 配列に連結された L a c Z または G F P のようなレポーター遺伝子に連結された好ましいプロモーター配列の組み合わせが、プラスミドに挿入されて、そして r A A V ウイルス粒子中にパッケージングされて、濃縮され、混入するアデノウイルスについて試験され、そして感染中心アッセイを用いて r A A V について滴定されてもよい。多数の試験被験体、好ましくは近交系マウスの右目は、r A A V 調製物の約 1 μ l を網膜下に注射される (例えば、1 m l あたり約 1 0 ¹⁰ を超える感染単位)。2 週間後、動物の半分の右 (試験) および左 (コントロール) の眼を取り除き、固定して、適切な基質または抗体または他の物質で染色して、レポー

50

ター遺伝子の存在を明らかにする。注射された眼の試験網膜のほとんどが、局所染色領域、例えば、局所化された網膜剥離を作成する注射ウイルスの網膜下小疱と一致した、L a c Z / X g a l については青、またはG F Pについては緑を示した。全てのコントロールの眼は、レポーター遺伝子産物について陰性である。後者の時点で屠殺されたマウスで試験されたレポーター遺伝子発現は、注射の少なくとも10週後に検出され、これによって、レポーター導入遺伝子の一過性発現が示唆される。

【0100】

選り抜きのプロモーター、好ましくは構成的C M Vプロモーターまたは細胞特異的プロモーター、例えば、m G l u R 6の制御下でC h o p 2 D N Aをコードする核酸配列を担持するr A A Vビリオンの有効量は好ましくは、1注射あたり約150～約800 μ lの容積中に、約 10^{10} ～約 10^{13} 個のr A A V感染性単位の範囲が好ましい。r A A V感染性単位は、M c L a u g h l i n, S Kら、1988, J V i r o l 62:1963に従って測定され得る。より好ましくは、有効量は、約 10^{10} ～約 10^{12} 個のr A A V感染性単位であり、そしてその注射容積は好ましくは、約250～約500 μ lである。他の投薬量および容積、好ましくはこれらの範囲内だが可能性としてはそれらの外側が、年齢、体重、全体的な健康ならびに特定の眼の障害の性質および重篤度を含む、処置されている被験体（好ましくはヒト）の身体的状態を考慮して処置の専門家によって選択されてもよい。

【0101】

本発明の核酸またはr A A V組成物のさらなる用量（「ブースター（b o o s t e r s）」）を投与することも所望され得る。例えば、眼の標的細胞内の導入遺伝子発現の期間に依存して、第二の処置は、6ヶ月後または年々投与されてもよく、そして同様に繰り返されてもよい。A A Vに対する中和抗体は、用いられる経路および用量の観点で生成されることが予想されず、これによって反復処置経路が可能になる。

【0102】

このようなさらなる用量についての必要性は、例えば、周知の電気生理学および他の網膜および視覚機能試験および視覚挙動試験を用いて処置する専門家によってモニターされ得る。処置専門家は、当該分野の慣用的な技術を行う適切な試験を選択し得る。相対的な転帰のパラメーターをさらに改善するために単一または複数の用量のいずれかでその組成物のより大きい容積を注射することも所望され得る。

【0103】

光感度および視覚の回復または改善

本発明の種々のパラメーターを評価するためのインビトロおよびインビボの両方の研究を用いてもよく、これには、失明するヒトの眼科障害の認識された動物モデルを含む。ヒト網膜症、例えば、小児失明の大きい動物モデルが有用である。本明細書に提供される実施例によって、この方法が網膜疾患の範囲を処置するのに同様に用いられ得るということを当業者は容易に予想できるようになる。

【0104】

他者による初期の研究では、網膜変性は遺伝子治療技術によって遅延させられ得ることが実証されているが、本発明では、行動的パラメーターを含む視覚の種々のパラメーターを生成または改善することが予測される機能の明確な生理学的回復を実証する。

【0105】

行動的測定は、公知の動物モデルおよび試験、例えば水迷路における能力を用いて、得ることが可能であり、ここでは視覚が保存されているかまたは種々の程度まで回復されている被験体は光に向かって泳ぐ（H a y e s, J Mら、1993, B e h a v G e n e t 23:395～403）。

【0106】

失明が成体の寿命の間に誘発されるか、または個人が視覚を失う前に視覚を経験するのに十分ゆっくと先天性の失明が発症するモデルでは、種々の試験において被験体の訓練を行ってもよい。この方法では、これらの試験を視覚喪失の後に再投与して、本発明の組

成物および方法の有効性をその視覚回復効果について試験する場合、動物は、盲目状態で新規に作業を学習しなければならないということはない。他の行動試験には、学習を必要とせず、そして特定の挙動の本能に依拠する。例としては、視動眼振試験である（Balkema GWら、1984, Invest Ophthalmol Vis Sci. 25:795~800; Mitchiner JCら、1976, Vision Res. 16:1169~71）。

【0107】

本明細書において例証されるとおり、Chop2をコードするDNAでの網膜神経細胞のトランスフェクションによって、残留網膜神経細胞、主に双極細胞および神経節細胞に、光感受性の膜チャネルを与える。従って、強力な光刺激を用いて、視覚シグナルを処理することを担う脳の領域である、動物の視覚皮質に対する視覚刺激の伝達を測定することが可能であった；従って、これは、本明細書に示されるとおり、視覚の形成を構成する。このような視覚は、正常なヒト視覚の形態とは異なり得、そして光の感覚と呼ばれてもよく、また「光検出（light detection）」または「光知覚（light perception）」とも名付けられる。

【0108】

従って、「視覚（vision）」という用語は本明細書において用いられる場合、生物体が分化または作用の刺激として光を有用に検出する能力として規定される。視覚とは、以下を包含するものとする：

1. 光の検出または知覚（光が存在しようとしまいと認識する能力）
2. 光投影（光刺激がきている方向を認識する能力）；
3. 解像力（回折格子または文字標的において種々の明るさレベル（すなわち、コントラスト）を検出する能力）；および
4. 認識（標的内の種々のコントラストのレベルを参照して視覚標的の形状を認識する能力）

従って「視覚（vision）」としては、光の存在を単に検出する能力が挙げられる。これは、本発明に従って処置されている罹患した被験体を訓練して光を検出する可能性を開き、これによって、個体は彼の環境から離れて応答することが可能になり、ただし相互作用はそのままであり得る。一例では、シグナルのアレイを生成して、これに対して視力低下したヒトが応答し得、これによってこの人は、離れて電気的方法によって連絡するか、または毎日のタスクを行う能力が強化される。さらにこのような人の移動は、「光検出」から生じる光のこのような新たな検知を用いるように訓練された場合劇的に増強する。光知覚が完全に欠損すれば、その人は、その人から離れたなんらかの物体について見分ける方法（聴覚および臭いは別として）がなくなる。

【0109】

光知覚を生じる本発明の方法によって、完全な正常な視覚なしでさえも、睡眠覚醒サイクルおよび関連のホルモンを含む多くの生理学的プロセスを制御する正常に調節されたサーカディアンリズムが改善または可能にされる。残留する網膜神経節細胞（retinal ganglion cells）（RGC）を有する数例の盲目の個体は、RGCメラノプシンを用いてそれらのリズムを媒介し得るが、彼らにとってそうすることは希である。従って、ほとんどの盲目の人は、自由継続の（free-running）サーカディアンリズムを有する。このような個体がメラノプシン経路を利用する場合でさえ、この効果は極めて弱い効果である。従って、本発明の方法は、光エントレインメント（entrainment）をなくさせること、またはそれらのサーカディアンリズムの弱い（メラノプシン媒介性）光エントレインメントを改善することによって、盲目の個体の健康状態を改善することが期待される。これは被験体の健康増進および幸福につながる。

【0110】

サーカディアンリズムに加えて、本発明は、他の光誘発性の生理学的現象の欠損を改善する基礎を提供する。光受容体変性は、個人が寝ていなければいけないサーカディアンサイクル（概日周期）における間隔の間の自発運動の種々の程度の陰性のマスキング、また

は抑うつを生じ得る。別の結果は、松果体メラトニンの抑制である。これらの両方がエン
トレインメントプロセスに寄与する。従って、光受容体が変性されているかまたは変性さ
れた被験体におけるこれらの応答または活性の改善は、現実の世界における被験体の環境
に応答する適切な睡眠／覚醒周期に対して、それ自体、視覚とは独立して寄与する。

【0111】

本発明のさらに別の利点は、瞳孔光反射の正規化である。なぜなら、瞳孔サイズの調節
は、天然のフィードバックループにおける光刺激の有効性を調節することを補助するから
である。従って、本発明は、この天然のフィードバックループの再確立を促進し、本明細
書に記載のように処置される被験体における視覚をより有効にさせる。

【0112】

特定の実施形態では、本発明の方法は、例えば、Chop 2をコードするDNAを含む
ベクターを投与する前、および好ましくは後の視覚の測定を包含する。視覚は、当該分野
で周知の任意の多数の方法またはまだ確立されていない方法を用いて測定される。本明細
書で最も好ましいのは、以下の視覚的応答である：

(1) 光刺激に対する曝露後の被験体による光検出応答（証拠は、光がつけられる時、被
験体個体による光の一般的な検出における指示または動きの信頼できる応答について追及
される）

(2) 光刺激に対する曝露後の被験体による光投射応答（証拠は、光がつけられる時、個
体による光の特異的な検出における指示または動きの信頼できる応答について追及される
）

(3) 光対暗のパターン化された視覚刺激の被験体による光解像、これは、以下によって
証明されるとおり、被験体が光対暗のパターン化視覚刺激を解像する能力を測定する：

(a) 標的のトラッキングを実証する、実証可能な信頼できる、視線運動性に生成さ
れた眼振様の眼の動きおよび／または関連の頭部もしくは身体の動きの存在（上記を参照
のこと）および／または

(b) 例えば、指示することまたはバーもしくはボタンを押すことを含む、パターン
視覚刺激を識別し、そして言語的または非言語的手段によるこのような識別を示すための
信頼できる能力の存在；あるいは

(4) 回復された網膜から視覚皮質への電氣的伝達のエンドポイントである、光フラッ
シュ刺激またはパターン視覚刺激に対する視覚皮質応答の電氣的記録。測定は、皮質表面
上の視覚皮質の領域での頭皮表面上における電氣的な記録、および／または視覚皮質の細
胞内で記録することによってもよい。

【0113】

光の知覚のみを有する小児がこの視覚を有するということを評価することはしばしば困
難であることが当該分野で公知である。訓練には、彼らの視覚的感覚に対してこのような
小児が反応するようになる必要がある。このような状況は下で例証される動物研究で模倣
される。本発明の組成物および方法が達成される光の知覚を促進することまたは増強する
ことは、有益である。なぜなら光知覚を有する患者は光を見るように訓練可能なだけでな
く、彼らは、光の視覚方向を検出するように通常は訓練され得、これによって彼らは、彼
らの環境での移動において訓練されることが可能になる。さらに、基礎的な光知覚でさえ
、特定の毎日の作業を達成することをこれらの個体に可能にするために専門的に操作され
た電氣的および機械的なデバイスとともに、本発明の組成物および方法を用いて視覚が改
善される個体を含む、視覚的に障害のある個体によって用いられ得る。これを超えて、か
つそれらの条件に依存して、それらは、特徴の認識およびそれらの障害が可能な場合は読
み取りのような解像タスクにおいてさえ訓練されることが可能であり得る。従って、本発
明は、さらなる訓練方法を適用することによって、障害された被験体の視覚をこのような
レベルまで増強し、これらの個体は上記の目標を達成すると期待される。

【0114】

低感度の視覚は、夜盲症を有するヒトの状態を模倣し得る。その例は、網膜色素変性症
(RP)であり、その人は、その環境で光レベルを適応することが困難であり、補助照明

および／または暗視装置のような光増幅デバイスを用い得る。

【0115】

従って、下に記載される動物試験で記載されている視覚回復によって、ヒトに関しては、その人は視覚機能の下端におかれる。それにもかかわらず、このようなレベルでの配置は、大きな利点である。なぜなら、これらの個体は、彼らを完全な失明に比べて大きく改善したレベルの視覚非依存をもたらす運動において、そして可能性として低次の解像タスクで訓練され得るからである。

【0116】

本発明の実施例で研究されたマウスには、光受容体の完全な欠失をもたらした；これは最悪のヒト疾患でさえかなり希である。最も類似のヒトでの状態はRPである。RPのほとんどの場合、中心視野は、極めて悪くなるまでは保持される。対照的に、研究されたマウスモデルでは、このマウスは出生直後に完全に盲目になる。

10

【0117】

視力低下に遭遇した一般的な障害は、J. T a s c a および E. A. D e g l i n, E s s e n t i a l s o f L o w V i s i o n P r a c t i c e の第6章, R. L. B r i l l i a n t, 編, B u t t e r w o r t h H e i n e m a n n P u b l., 1999 (その全体が参照によって援用される) によって記載される。類似の変性条件についての引用文献があるが、これらの引用文献は、視覚鋭敏さとして測定可能な形態視 (f o r m v i s i o n) を示す。神経節細胞層は、全ての形態のRPでは保持されず、そのため本発明のアプローチは、このような障害については機能しない。

20

【0118】

重篤な症例のRPを有するヒトに本発明の方法を適用する場合、中心視覚は、ある程度低レベルである時間維持されるが、末梢の網膜は最初に変性することが予測される。これは、本発明を用いる再活性化のための標的である変性網膜である。本質的に、これらの個体は、彼らが徐々に盲目に達する場合、運動性視力を保持できる。

【0119】

視覚の中心の「スイートスポット (s w e e t s p o t) 」内に光受容体喪失によって特徴付けられる黄斑変性症を有する被験体 (M a c u l a L u t e a) は、本発明に従う処置によって利益を得ることが期待され、この場合、回復された視覚の解像能力は、ヒト網膜黄斑内のかなり高い神経細胞密度に起因してさらに高いと期待される。

30

【0120】

視覚的に障害された個体によって用いられ得る日光および人工的な光の明るい照射は、本発明の処置の結果として回復された視覚で行われる多くの視覚活性に十分であると期待される。必要に応じて、罹患した人の視覚感度をさらに増強するために、光増幅デバイスを用い得ることも可能である。ヒトの視覚系は、10対数単位範囲を超える輝度で作動し得る。他方では、微生物型のロドプシン、例えば、C h R 2 は、最大3対数範囲の輝度を超えて作動する。さらに、患者が遭遇する光条件は、光センサーの作動範囲の外側になり得る。種々の光条件について補償するために、光の前増幅または減衰デバイスを用いて、光条件の作動範囲を拡大してもよい。このようなデバイスは、暗視ゴーグルおよび／または3Dアドベンチャーおよび娯楽システムのような、現在利用可能な技術からアセンブルされ得るカメラ画像処理システム、およびマイクロディスプレイを含む。(例えば、W o r l d w i d e w e b - e m a g i n . c o m / の以下のURLを参照のこと)。

40

【0121】

本発明は、当該分野で公知の他の形態の視覚治療と組み合わせて用いられ得る。これらのうち主要なものは、視力補綴物の使用であり、これには、網膜インプラント、皮質インプラント、外側膝状核インプラントまたは視神経インプラントが挙げられる。従って、本発明を用いる生存する網膜神経細胞の遺伝的改変に加えて、処置されている被験体は、分子方法が使用される前、同時または後に視力補綴物を提供されてもよい。

【0122】

視力補綴物の有効性は、個人の訓練、従って、本明細書で考慮されるような患者細胞の

50

C h o p 2 形質転換の潜在的な影響を増強することで改善され得る。訓練のアプローチの例は、参照によって援用される米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 2 3 6 3 8 9 号 (F i n k ら) に見出される。この訓練方法は、参照画像に基づいて視力補綴物を有する患者に対して非視覚的参照刺激を提供する工程を包含し得る。この非視覚参照刺激とは、患者に対してその補綴物が誘導する視覚画像の期待値を与えることを意図する。非視覚的参照刺激の例は、ピンボード、B r a i l l e テキスト、または言語的コミュニケーションである。視力補綴物は、患者の神経細胞であって、その応答性が本明細書に開示されるような C h p 2 を発現することによって改善されている神経細胞を、非視覚的な参照刺激由来の患者の予測される知覚にマッチする視覚知覚を誘導することを企図する一連の刺激パターンで刺激する。この患者は、どの一連の刺激パターンが、予想される知覚を最も緊密に模倣する知覚を誘導するかを示すフィードバックを提供する。この患者フィードバックは、「適合度機能 (f i t n e s s f u n c t i o n) 」 (費用関数またはエネルギー関数とも呼ばれる) として用いられる。視覚補綴物を通じて患者に提供される引き続く刺激は、少なくとも一部は、患者の以前のフィードバックに基づき、それに関しては刺激のパターンは、予想される知覚に最も適合する知覚を誘導する。引き続く刺激パターンはまた、少なくとも一部は、適合度関数最適化アルゴリズム、例えば、シミュレーションアニーリングアルゴリズムまたは遺伝的アルゴリズムに基づいてもよい。

10

【 0 1 2 3 】

従って、本発明の特定の実施形態では、被験体における視覚の改善または回復の方法はさらに、上記されるようなその被験体の訓練を包含する。訓練方法の好ましい例は以下である：

20

(a) 被験体を訓練することによって特徴付けられる習慣性訓練であって、 (i) 光および／もしくはパターン刺激のレベルを変化させること、ならびに／または (i i) 当業者によって理解されるように共通の光源または物体からの環境的刺激を認識する訓練；ならびに

(b) 視覚的に局所の物体を検出して、訓練なしよりも有効にこれらの物体の間で動くようにこの被験体を訓練することによって特徴付けられる方向および運動の訓練。

【 0 1 2 4 】

実際には、視力低下リハビリテーションの分野で代表的に用いられる任意の視覚刺激技術がここで適用可能である。

30

【 0 1 2 5 】

光受容体変性によって誘発される内網膜神経細胞の再構築は、光受容体の死滅後の網膜ベースのレスキューストラテジーについての懸念を惹起させた (S t r e t t o i a n d P i g n a t e l l i 2 0 0 0 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 9 7 : 1 1 0 2 0 ~ 5 ; J o n e s , B W ら、2 0 0 3 , J C o m p N e u r o l 4 6 4 : 1 ~ 1 6 ; J o n e s , B W および M a r c , R E , 2 0 0 5 , E x p E y e R e s . 8 1 : 1 2 3 ~ 3 7 ; J o n e s , B W ら、2 0 0 5 , C l i n E x p O p t o m . 8 8 : 2 8 2 ~ 9 1) 。網膜再構築は、光受容体からの求心性入力 of 喪失である求心路遮断 (換言すれば、光誘発性活性の喪失) から生じると考えられる。そのため、桿体および錐体の死滅後、網膜双極細胞および神経節細胞に対する、そしてそれらを通じたより高次の視覚中枢への光誘発性入力 is 存在しない。このような入力の喪失にตอบสนองして、網膜およびそれらの高次の視覚ネットワークを、他の形態の入力を求める方式で、再構築を受けるように誘引する。別の言い方をすれば、網膜は、その正常なネットワークを維持するために光を検知するように用いられる必要があり、光検知の喪失があれば、そのネットワークは、再構築プロセスを介して悪化する。このプロセスは、光受容体死滅の即時的な結果ではなく；むしろ、これは緩徐なプロセスであって、介入のための合理的に長いウィンドウを提供する。

40

【 0 1 2 6 】

従って、本発明に従って、内網膜ニューロンに対する光感度を回復するさらなる有用性は、網膜における、そして可能性としては、より高次の中心における再構築プロセスの予

50

防または遅延である。このような網膜再構築は、内網膜網状構造、主に双極と網膜神経節細胞との間の接続の悪化のような所望されない結果を有し得る。双極細胞または神経節細胞において光誘発性活性を誘導することによって、本発明は、入力欠失に起因して再構築を予防または減少する；本発明の方法は、この欠失入力を誘導し（双極細胞または神経節細胞のいずれかで開始する）、それによって網膜およびより高次の視覚中枢ネットワークを安定化する。従って、視覚に対するその直接の効果とは独立して、本発明は、光受容体移植またはデバイスインプラントのような他の治療的アプローチのために有益である。

【0127】

本発明をここで一般に記載してきたが、同じことが、例示の目的で提供され、そして特定しない限り本発明を限定するとは解釈されない以下の実施例を参照してさらに容易に理解される。

【実施例】

【0128】

実施例の概要

（以下の節で引用される引用文献は、最後に列挙して示し得る）

方法

Chop2-GFPキメラは、発現されたタンパク質がChop2領域のC末端に対して連結されたGFPを有するように、チャンネルオブシン-2（Cho2）の活性フラグメント（配列番号3）をコードする核酸（配列番号2）に対して、緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードする核酸（下に示されるとおり配列番号1の一部）を連結することによって作成した。これらの配列の両方とも、上記で考察されるような「導入遺伝子（transgene）」を構成する。Chop2-GFPのDNAを、CMVプロモーターの制御下でHEK293細胞中にトランスフェクトした。

【0129】

ウイルス構築物（配列番号1）を、CAGプロモーターを含むAAV-2ウイルスカセット中にChop2-GFPをサブクローニングすることによって作成した。この構築物のマップは図7に示す。このウイルスベクターを、新生ラットの眼に注射した。Chop2-GFPの発現は、網膜のホール・マウントまたはスライス切片においてGFP蛍光によって検査した。Chop2-GFPの機能は、全細胞のパッチクランプ記録によって評価した。

【0130】

結果

明るいGFP蛍光は、トランスフェクション後にHEK細胞中で18～24時間内に検出した。その蛍光は、原形質膜に優先的に位置した。Chop2-GFPキメラの機能の保存は、パッチクランプ記録によって確認した。かなりの光ゲート電流がまた、内因性のオール・トランスレチナルの添加なしにChop2-GFP発現HEK細胞で観察され、このことは、多数の機能的なChop2-GFPチャンネルが、発色団について内因性の前駆体のみを用いてHEK細胞で形成されたということを示している。注射の3～4ヵ月後、GFP蛍光が、注射された眼の網膜神経細胞で観察された。明るいGFP蛍光が多く、神経節細胞および水平細胞、いくつかのアマクリン細胞で、そして時には双極細胞で、注射後少なくとも1つの10週間にわたって観察された。Chop2-GFP発現網膜神経細胞は、光刺激に応答して強固な膜脱分極を示し、そしてオール・トランスレチナルの外因性の供給源は必要としなかった。

【0131】

従って、本発明者らは、選択されたAAVベクター構築物が、正常なおよび病気の網膜の両方において硝子体内注射後、網膜神経節細胞を効率的に標的化し、そしてChop2-GFP cDNAを効率的に送達し、そして、高レベルでタンパク質を発現するということを実証した。内因性の網膜がChopに結合される場合、これは光切り換え（photoswitched）されてもよく、そして神経活性は、網膜および皮質レベルで誘発され得る。これは、いくつかの技術によって示された（最初は、個々の解離されたRG

10

20

30

40

50

Cのインビトロのパッチクランプ記録により、続いて大集団のRGCの代表であるホール・マウントの網膜調製物の多電極アレイ記録によって）。最終的には、生きた盲目のマウス由来のインビボ皮質記録によって、重要な接続はより高次の視覚中枢に機能的に維持されることが実証された。

【0132】

結論

進行性のインビトロおよびインビボの結果によって、Chop2の異所性発現が、「盲目の(b l i n d)」網膜に対する光感受性の回復についての治療ストラテジーであることが示される。直接光ゲートされた膜チャンネルChop2の機能的な発現を、インビボでラットの網膜ニューロンで実証した。従って、第二または第三次の網膜ニューロンにおける光ゲートの膜チャンネルの発現は、光受容体生成後の光知覚の回復のための有用なストラテジーである。

10

【0133】

実施例1

材料および方法

DNAおよびウイルスベクター構築物

Chop2のN末端フラグメント(Met¹-Lys³¹⁵)をコードするDNAフラグメントを(Nagelら、2003)、Chop2コードフラグメントの3'末端でインフレームに挿入された、ポリアデニル化シグナル(mP1)およびGFPを含むマウスプロタミン1遺伝子の最後のエキソンを含むpBluescriptベクター(Stratagene)中にクローニングして、Chop2-GFP融合タンパク質を生成した。Chop2-GFPキメラの機能は、トランスフェクトされたHEK293細胞中で確認した。

20

【0134】

ウイルス発現構築物rAAV2-CAG-Chop2-GFP-WPREは、Chop2-GFPフラグメントを、アデノ随伴(血清型2)ウイルス発現カセット中にサブクローニングすることによって作成した。このウイルスカセットは、ハイブリッドのCMVエンハンサー/ニワトリβアクチンプロモーター(CAG)、ウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)、およびウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化配列を含んだ。ウイルスベクターをパッケージングしてアフィニティー精製した(GeneDetect)。

30

【0135】

ベクターマップを図7に示す。

【0136】

このベクター(配列番号1)の核酸配列を、下にアノテーション型で示す(記載どおりのアノテーションを有する)：

- ・ ITR's (両方の末端) (大文字下線)
- ・ CAGプロモーター配列 (小文字、太字、イタリック体)
- ・ Kozak配列 (小文字二重下線)
- ・ Chop2コード配列 (小文字、太字)
- ・ 緑色蛍光タンパク質コード配列 (小文字、下線の太字)
- ・ WPRE (調節性(制御)エレメント)： (大文字)
- ・ BGHポリA配列は印をしていない。

40

【0137】

Chop2とGFPとの間を含む残りの配列(全て小文字)はベクター配列である

【0138】

【数 1】

←-----ITR -----
 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG CCCGGGCGTC 60
 GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA 120

-----ITR-----→ ←-----CAG プロモーター -----
 ACTCCATCAC TAGGGGTTCC Tgcggccgca a**cgcgttacg** **tatcggtacc** **agaattcgtg** 180
atatctgaat **tcgtcgacaa** **gcttctcgag** **cctaggctag** **ctctagacca** **cacgtgtggg** 240
ggccggccgt **aatgagacgc** **acaaactaat** **atcacaaact** **ggaaatgtct** **atcaatatat** 300
agttgtctta **gttattaata** **gtaatcaatt** **acggggtcat** **tagttcatag** **cccatatatg** 360
gagttccgcg **ttacataact** **tacggtaa** **ggccgcctg** **gctgaccgcc** **caacgacccc** 420
cgccattga **cgtaataat** **gacgtatgtt** **cccatagtaa** **cgccaatagg** **gactttccat** 480
tgacgtcaat **gggtggagta** **tttacggtaa** **actgcccact** **tggcagtaca** **tcaagtgtat** 540
catatgctaa **gtacgcccc** **tattgacgtc** **aatgacggt** **aatggcccgc** **ctggcattat** 600
gcccagtaca **tgaccttatg** **ggactttcct** **acttggcagt** **acatctacgt** **attagtcatc** 660
gctattacca **tgcattgtcg** **aggtgagccc** **cacgttctgc** **ttcactctcc** **ccatctcccc** 720
cccctcccca **cccccaattt** **tgtattttat** **tattttttaa** **ttattttgtg** **cagcgatggg** 780
ggcggggggg **gggggggggg** **gcgcgccagg** **cggggcgagg** **ggggcgagg** **ggcggggcgg** 840
ggcgaggcgg **agagggtcgg** **cggcagccaa** **tcagagcggc** **gcgctccgaa** **agtttccttt** 900
tatggcgagg **cggcggcggc** **ggcggcccta** **taaaaagcga** **agcgcgcggc** **gggcgggagt** 960

-----CAG プロモーター -----→
cgctgcgcgc **tgctttcgcc** **ccgtgccccg** **ctccgcccgc** **gcctcgcgcc** **gccccccccg** 1020
gctctgactg **accgcgttac** **tcccacaggt** **gagcgggcgg** **gacggccctt** **ctccttcggg** 1080
ctgtaattag **cgcttggttt** **aatgacggct** **tgtttctttt** **ctgtggctgc** **gtgaaagcct** 1140

<Kozak>←-----Chop2-----
 tgaggggctc cgggagggcc cgagctcgcg atccgcagcc atggattatg gaggcgccct 1200
 gagtgccgtt gggcgcgagc tgctatttgt aacgaaccca gtagtcgtca atggctctgt 1260
 acttgtgcct gaggaccagt gttactgcgc gggctggatt gagtcgcgtg gcacaaacgg 1320
 tgcccaaacg gcgtcgaacg tgcgtcaatg gcttgctgct ggcttctcca tcctactgct 1380
 tatgttttac gcctacaaa catggaagtc aacctgcggc tgggaggaga tctatgtgtg 1440
 cgctatcgag atggtaacgg tgattcttga gttcttcttc gagtttaaga acccgcccat 1500

10

20

【 0 1 3 9 】

【数 2】

gctgtatcta gccacaggcc accgcgtcca gtggttgctg tacgccgagt ggctttctcac 1560
 ctgcccggtc atttctattc acctgtcaaa cctgacgggc ttgtccaacg actacagcag 1620
 gcgactatag ggtctgcttg tgtctgatat tggcacaatt gtgtggggcg ccacttccgc 1680
 tatggccacc ggatacgtca aggtcatctt cttctgcttg ggtctgtgtt atggtgctaa 1740
 cacgttcttt cacgctgcca aggcctacat cgagggttac cataccgtgc cgaagggccg 1800
 gtgtcgccag gtggtgactg gcatggcttg gctcttcttc gtatcatggg gtatgttccc 1860
 catctgtttc atcctcgggc cggagggctt cggcgtcttg agcgtgtacg gctccaccgt 1920
 cggccacacc atcattgacc tgatgtcgaa gaactgcttg ggtctgctcg gccactacct 1980
 gcgcgtgctg atccacgagc atatcctcat ccacggcgac attcgcaaga ccaccaaat 2040
 gaacattggt ggactgaga ttgaggtcga gacgtggtg gaggacgagg ccgaggcttg 2100

-----Chop2----->

<-----GFP-----

cgcggtcaac aagggcaccg gcaaggaatt cggaggcgga ggtggagcta gcaaaggaga 2160
 agaactcttc actggagttg tcccaattct tgttgaatta gatggtgatg ttaacggcca 2220
 caacttcttc atcctcgggc cggagggctt cggcgtcttg agcgtgtacg gctccaccgt 2280
 gttcatctgc actactggca aactgcctgt tccatggcca acactagtca ctactctgtg 2340
 ctatgggtgt caatgctttt caagataccc ggatcatatg aaacggcatg actttttcaa 2400
 gagtggcatg cccgaagggt atgtacagga aaggaccatc ttcataaag atgacggcaa 2460
 ctacaagaca cgtgctgaag tcaagtttga aggtgatacc cttgttaata gaatcgagt 2520
 aaaagggtatt gacttcaagg aagatggcaa cattctggga cacaattgg aatacaacta 2590
 taactcacac aatgtatata tcatggcaga caaacaaga aatggaatca aagtgaactt 2640
 caagaccgcg cacaacattg aagatggaaq cgttcaacta gcagaccatt atcaacaaaa 2700
 tactccaatt ggcgatggcc ctgtcctttt accagacaac cattacctgt ccacacaatc 2760
 tgccctttcg aaagatccca acgaaaagag agaccacatg gtccttcttg agtttqtaac 2820

10

-----GFP----->

agctgctggg attacacatg gcatggatga actgtacaac atcgattgac taagcttgcc 2880

<-----WPRE-----

tcgagaattc acgcgtggtg cCGATAATCA ACCTCTGGAT TACAAAATTT GTGAAAGATT 2940
 GACTGGTATT CTTAACTATG TTGCTCCTTT TACGCTATGT GGATACGCTG CTTTAATGCC 3000
 TTTGTATCAT GCTATTGCTT CCCGTATGGC TTTTCATTTT TCCTCCTTGT ATAAATCCTG 3060
 GTTGCTGTCT CTTTATGAGG AGTTGTGGCC CGTTGTCAGG CAACGTGGCG TGGTGTGCAC 3120
 TGTGTTTGCT GAGCAACCC CCACTGGTTG GGGCATTGCC ACCACCTGTC AGCTCCTTTC 3180
 CGGGACTTTT GCTTTCCCCC TCCCTATTGC CACGGCGGAA CTCATCGCCG CCTGCCTTGC 3240
 CGCTGCTGG ACAGGGGCTC GGCTGTTGGG CACTGACAAT TCCGTGGTGT TGTCGGGGAA 3300
 GCTGACGTCC TTTCCATGGC TGCTCGCCTG TGTGCCACC TGGATTCTGC GCGGGACGTC 3360
 CTCTGCTAC GTCCCTTCGG CCCTCAATCC AGCGGACCTT CTTCCCGCG GCCTGCTGCC 3420
 GGCTCTGCGG CCTCTCCGC GTCTTCGCT TCGCCCTCAG ACGAGTCGGA TCTCCCTTTG 3480

20

-----WPRE----->

GGCCGCCTCC CCGCTGATC cggccgcggg gatccagaca tgataagata cattgatgag 3540
 tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgta aatttgatg 3600
 gctattgctt cattataagc agttaaac aagtttaaca caacaattgc 3660
 attcatitaa tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttcgga tcctctagag 3720

30

<-----bGH ポリ A-----

tcgagagatc tacgggtggc atccctgtga cccctcccca gtgcctctcc tggccctgga 3780
agtggccact ccagtggcca ccagccttgt cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc 3840
tgactagggtg tccttctata atattatggg gtggaggggg gtggtatgga gcaaggggca 3900
agtggggaag acaacctgtg gggcctgcgg ggtctattgg gaaccaagct ggagtgcagt 3960
ggcacaatct tggctcactg caatctccgc ctctgggtt caagcgattc tctgcctca 4020
gcctcccagag ttgttgggat tccaggcatg catgaccagg ctgagctaatt tttgttttt 4080
ttggtagaga cggggtttca ccatattggc caggctggtc tccaactcct aatctcaggt 4140
gatctaccca ctttggcttc ccaaatgtct gggattacag qcgtgaacca ctgctccctt 4200

-bGH ポリ A->

<-----ITR---

ccctgtccctt ctgattttgt aggttaaccac gtgcggaccg agcggccgcA GGAACCCCTA 4260

GTGATGGAGT TGGCCACTCC CTCTCTGCGC GCTCGCTCGC TCACTGAGGC CGGGCGACCA 4320
 AAGTGCGCC GACGCCCGG CTTTGCCCGG GCGGCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAGC 4380

40

---ITR--->

TGCTTGCAAG ggcgcctgat gcggtatttt ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac 4440
 cgcatacgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg 4500

【 0 1 4 0 】

【数 3】

tgggtggttac	gcgcagcgtg	accgctacac	ttgccagcgc	cctagcgccc	gctccttttcg	4560
ctttctttccc	ttccttttctc	gccacgttcg	ccggcttttc	ccgtcaagct	ctaaatcggg	4620
ggctcccttt	agggttccga	tttagtgctt	tacggcacct	cgaccccaaa	aaacttgatt	4680
tgggtgatgg	ttcacgtagt	gggccaatcg	cctgatagac	ggttttttcgc	cctttgacgt	4740
tggagtcac	gttctttaat	agtggactct	tgttccaaac	tggaaacaaca	ctcaacccta	4800
tctcgggcta	ttcttttgat	ttataaggga	ttttgccgat	ttcggcctat	tggttaaaaa	4860
atgagctgat	ttacaaaaa	tttaacgcga	attttaacaa	aatattaacg	tttacaattt	4920
tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	gttaagccag	ccccgacacc	4980
cgccaacacc	cgctgacgcg	ccctgacggg	cttgtctgct	cccggcatcc	gcttacagac	5040
aagctgtgac	cgctccggg	agctgcatgt	gtcagagggt	ttcacgcgtca	tcaccgaaac	5100
gcgcgagacg	aaagggcctc	gtgatacgcc	tattttttata	ggttaatgtc	atgataataa	5160
tggttttcta	gacgtcaggt	ggcacttttc	ggggaaatgt	gcgcggaacc	cctattttgtt	5220
tatttttcta	aatacatcca	aatatgtatc	cgctcatgag	acaataaccc	tgataaatgc	5280
ttcaataatg	ttgaaaaagg	aagagtatga	gtattcaaca	tttcctgtgc	gcccttattc	5340
ccttttttgc	ggcatttttg	cttcctgttt	ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	5400
aagatgctga	agatcagttg	gggtgcacgag	tgggtttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	5460
gtaagatcct	tgagagtttt	cgccccgaag	aacgttttcc	aatgatgagc	actttttaag	5520
ttctctggag	tcattgaaag	ttatcccgtg	gttcggcggg	gcaagagcaa	ctcggtcgac	5580
gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	agtactcacc	agtcacagaa	aagcatctta	5640
cggatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	gtgctgccat	aaccatgagt	gataacactg	5700
cggccaactt	acttctgaca	acgatcggag	gaccgaagga	gctaaccgct	tttttgacac	5760
acatgtggga	tcattgaaag	cgcttgcgtg	gttgggaacc	ggagctgaat	gaagccatac	5820
caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgcctg	tagcaatggc	aacaacgttg	cgcaactat	5880
taactggcga	actacttact	ctagcttccc	ggcaacaatt	aatagactgg	atggaggcgg	5940
ataaagtgc	aggaccactt	ctgcgctcgg	cccttccggc	tggctgggtt	attgctgata	6000
aatctgtgag	cgtgtgagct	gggtctcgcg	gttctattgc	agcactgggg	ccagatggta	6060
agccctcccg	tatcgtagtt	atctacacga	cggggagtc	ggcaactatg	gatgaacgaa	6120
atagacagat	cgctgagata	gggtgcctcac	tgattaaagca	ttggtaactg	tcagaccaag	6180
tttactcata	tatactttag	attgatttaa	aacttcattt	ttaattttaa	aggatctagg	6240
tgaagatcct	ttttgataat	ctcatgacca	aaatccccta	acgtgagttt	tcgttccact	6300
gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	gatcttcttg	agatcctttt	tttctgcgcg	6360
taatctgctg	cttgcaaaaca	aaaaaaccac	cgctaccagc	gggtgggttg	ttgccggatc	6420
aagagctacc	aactcttttt	ccgaaggtaa	ctggcttcag	cagagcgcag	ataccaaata	6480
ctgtcctttc	tgttgtagcc	tagttagggc	accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	6540
catacctcgc	tctgctaatt	ctgttaccag	tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	6600
ttaccgggtt	ggactcaaga	cgatagttac	cggataaggc	gcagcggctg	ggctgaacgg	6660
gggggttcgtg	cacacagccc	agcttggagc	gaacgaccta	caccgaactg	agatacctac	6720
agcgtgagct	atgagaaagc	ggcacgcttc	cgaaagggag	aaaggcggac	aggtatccgg	6780
taagcggcag	ggctggaaca	ggagagcgca	cgagggagct	tccaggggga	aacgcctggg	6840
atctttatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	6900
cgtcaggggg	gcggagccta	tggaaaaacg	ccagcaacgc	ggccttttta	cggttcctgg	6960
ccttttgctg	gccttttgct	cacatgt				6987

10

20

30

40

上記のベクター由来のChop2コード配列を、配列番号2として下に示す。番号付けは、ヌクレオチド数およびコドン数の両方を示す。コードされたポリペプチド（配列番号3）も示す。ここでも、これはChop2ポリペプチドのN末端の315残基である（配列番号6）。

【0141】

【数4】

atg gat tat gga ggc gcc ctg agt gcc gtt ggg cgc gag ctg cta ttt	48
M D Y G G A L S A V G R E L L F	16
gta acg aac cca gta gtc gtc aat ggc tct gta ctt gtg cct gag gac	96
V T N P V V V N G S V L V P E D	32
cag tgt tac tgc gcg ggc tgg att gag tgc cgt ggc aca aac ggt gcc	144
Q C Y C A G W I E S R G T N G A	48
caa acg gcg tgc aac gtg ctg caa tgg ctt gct gct ggc ttc tcc atc	192
Q T A S N V L Q W L A A G F S I	64
cta ctg ctt atg ttt tac gcc tac caa aca tgg aag tca acc tgc ggc	240
L L L M F Y A Y Q T W K S T C G	80

【0142】

【数 5】

tg	g	g	a	t	g	t	g	c	a	g	a	t	g	t	a	g	g	t	a	t	t		288
W	E	E	I	Y	V	C	A	I	E	M	V	K	V	I	L								96
g	a	t	t	c	g	a	t	t	a	a	c	c	a	t	a	t	g	c	t	a	t	a	336
E	F	F	F	E	F	K	N	P	S	M	L	Y	L	A	T								112
g	g	c	a	c	g	t	c	a	g	t	g	t	t	g	c	a	t	t	c	a	c	t	384
G	H	R	V	Q	W	L	R	Y	A	E	W	L	L	T	C								128
c	c	g	t	a	t	c	a	c	c	t	a	a	c	c	g	a	t	t	a	a	c	a	432
P	V	I	L	I	H	L	S	N	L	T	G	L	S	N	D								144
t	a	c	a	g	a	g	c	a	c	a	t	a	t	g	g	t	c	t	g	t	a	t	480
Y	S	R	R	T	M	G	L	L	V	S	D	I	G	T	I								160
g	t	g	g	c	a	c	a	c	t	c	a	t	g	c	a	c	a	a	g	a	a	a	528
V	W	G	A	T	S	A	M	A	T	G	Y	V	K	V	I								176
t	t	c	t	g	c	t	g	g	t	c	t	a	t	g	a	a	c	a	c	t	t	c	576
F	F	C	L	G	L	C	Y	G	A	N	T	F	F	H	A								192
g	c	a	a	g	c	a	c	a	c	a	c	a	a	g	a	a	g	a	a	g	a	a	624
A	K	A	Y	I	E	G	Y	H	T	V	P	K	G	R	C								208
c	g	c	a	g	g	t	g	a	c	t	g	c	t	t	c	a	a	a	a	a	a	a	672
R	Q	V	V	T	G	M	A	W	L	F	F	V	S	W	G								224
a	t	g	t	c	a	c	a	c	a	c	a	a	g	a	a	g	a	a	a	a	a	a	720
M	F	P	I	L	F	I	L	G	P	E	G	F	G	V	L								240
a	g	c	a	c	a	c	a	c	a	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	768
S	V	Y	G	S	T	V	G	H	T	I	I	D	L	M	S								256
a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	816
K	N	C	W	G	L	L	G	H	Y	L	R	V	L	I	H								272
g	a	c	a	c	a	c	a	c	a	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	864
E	H	I	L	I	H	G	D	I	R	K	T	T	K	L	N								288
a	t	t	g	g	a	c	a	t	a	a	g	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	912
I	G	G	T	E	I	E	V	E	T	L	V	E	D	E	A								304
g	a	c	a	c	a	c	a	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	945
E	A	G	A	V	N	K	G	T	G	K													315

10

20

C. reinhardtii の全長 Chop2 タンパク質をコードする天然の核酸配列 (GenBank Accession #AF461397) は、以下のヌクレオチド配列を有する (配列番号 4)。このコード配列は、ヌクレオチド 28 で始まる ATG コドンで開始することに注目のこと。

【0143】

【数 6】

1	gc	at	ct	gt	gc	cca	ag	ca	agc	atta	aac	<u>ATG</u>	gatt	at	gg	gag	gc	gc	cc	tg	ag	tg	cc	gt	tg	gg
61	cg	cg	ag	ct	gc	tatt	tg	ta	ac	ga	acc	cag	ta	gc	tg	ca	at	gc	tc	gt	act	tg	tg	cc	tg	ag
121	ga	cc	ag	tg	tt	act	gc	gc	gg	ct	gg	att	ga	gc	gc	tg	ca	aa	c	gg	tg	cc	aa	ac	gg	gc
181	tc	ga	ac	gt	gc	tg	ca	at	gg	ct	gc	gt	gg	tt	ct	cc	at	cc	tact	gt	tt	at	gt	tt	ta	cg
241	tac	caa	ac	at	gga	gt	ca	ac	ct	gc	gg	ct	gg	gag	ga	ga	at	ct	at	gt	gt	gc	ta	tc	ga	ga
301	gt	ca	ag	gt	ga	tt	ct	gc	ag	tt	ct	ct	tc	gc	ag	tt	ta	aga	aac	cgt	cc	at	gt	gt	at	gc
361	ac	ag	gc	cc	acc	gc	gt	cc	ag	tg	gt	gc	gt	ta	cc	gc	ag	tg	gg	tt	ct	ac	ct	gc	ta	tt
421	ct	ca	tt	cc	acc	tg	tc	aa	ac	ct	gc	gg	ct	tg	tc	aa	cg	ac	ta	gc	ag	gg	gc	gc	gg	gt
481	ct	gc	tt	gt	gt	ct	ga	at	tt	gg	ca	ca	at	tt	gt	tg	gg	gc	gc	ca	ct	cc	gc	cc	at	gg
541	ta	cg	tc	aa	gg	tc	at	ct	tt	ct	ct	gc	ct	gg	gt	ct	gt	gt	ta	tg	gt	ta	ac	ac	gt	tc
601	gc	tg	cca	agg	cct	ac	at	cg	a	gg	gt	t	acc	ac	cg	tg	cc	ga	agg	gc	cg	gt	tg	tc	gc	ag
661	gt	ga	ct	gg	ca	tg	gt	tt	gg	ct	ct	ct	tc	ga	tc	at	gg	gg	gt	ta	gt	tc	cc	at	tc	at
721	ct	gc	gg	cccc	agg	gt	ct	tc	gg	cg	tc	ct	ga	gc	gt	gt	ac	gg	ct	gc	gc	cc	ac	cc	at	tc
781	att	ga	cc	ct	ga	tg	tc	ga	ag	aa	ct	gc	tg	gg	gt	ct	gc	tc	gg	cc	ac	ct	gc	gc	gt	gc

40

【0144】

【数 7】

```

841   cacgagcata tectcatcca oggcgacatt cgcaagacca ccaaattgaa cattgggtggc
901   actgagattg aggtcgagac gctgggtggag gacgaggccg aggctggcgc ggtcaacaag
961   ggcaccggca agtacgcctc ccgcgagtc ttcctggtca tgcgcgacaa gatgaaggag
1021  aaggggcattg acgtgcgcgc ctctctggac aacagcaagg aggtggagca ggagcaggcc
1081  gccagggctg ccatgatgat gatgaacggc aatggcatgg gtatgggaat gggaatgaac
1141  ggcatagaac gaatgggcgg tatgaacggg atggctggcg gcgccaagcc cggcctggag
1201  ctactccgc agctacagcc cggccgcgctc atcctggcgg tgccggacat cagcatggtt
1261  gacttcttcc gcgagcagtt tgctcagcta tcgggtgacgt acgagctggt gccggccctg
1321  ggcgctgaca acacactggc gctggttacg caggcgacga acctgggcgg cgtggacttt
1381  gtgttgattc accccgagtt cctgcgcgac cgctctagca ccagcatcct gagccgcctg
1441  cgcggcgcgg gccagcgtgt ggctgcgttc ggctgggcgc agctggggcc catgcgtgac
1501  ctgatcgagt ccgcaaacct ggacggctgg ctggagggcc cctcgttcgg acagggcctc
1561  ctgccggccc acatcgttgc cctggtggcc aagatgcagc agatgcgcaa gatgcagcag
1621  atgcagcaga ttggcatgat gaccggcgcc atgaacggca tgggcgcgcg tatggcgcg
1681  ggcatagaac gcatgggcgg cggcaacggc atgaacaaca tgggcaacgg catggcgcg
1741  ggcataggca acggcatggc cggcaatggc atgaacgaa tgggtggcgg caacggcatg
1801  aacaacatgg gcggcaacgg aatggccggc aacggaatgg gcggcgccat gggcgccaac
1861  ggtatgggtg gctccatgaa cggcatgagc tccggcgtgg tggccaacgt gacgccctcc
1921  gccgcggcgg gcatgggcgg catgatgaac ggcggcagtg ctgcgcccc gtcgcccgcc
1981  atgaacggcg gccgcctggg taccaaccgg ctcttcaacg ccgcgcccctc accgctcagc
2041  tcgcagctcg gtgcggaggc aggcattggg agcatgggag gcatgggcgg aatgagcgga
2101  atgggaggca tgggtggaat ggggggcatg ggcggcggcg gcgcccac gacgcaggct
2161  gcggcgccca acgcggaggc ggagatgctg cagaatctca tgaacgagat caatcgccctg
2221  aagcgcgagc ttggcgagta a

```

10

配列番号4のコード部分は、737個のアミノ酸のポリペプチドをコードする737個の三つ組コドン（プラス終止コドン）として組織化された配列番号5として下に示される。ATG開始コドンおよびTAA終止コドンは強調される。

20

【0145】

【数8】

```

ATG gat tat gga ggc gcc ctg agt gcc gtt ggg cgc gag ctg cta ttt
gta acg aac cca gta gtc gtc aat ggc tct gta ctt gtg cct gag gac
cag tgt tac tgc gcg ggc tgg att gag tgc cgt ggc aca aac ggt gcc
caa acg gcg tgc aac gtg ctg caa tgg ctt gct gct ggc ttc tcc atc
cta ctg ctt atg ttt tac gcc tac caa aca tgg aag tca acc tgc ggc
tgg gag gag atc tat gtg tgc gct atc gag atg gtc aag gtg att ctc
gag ttc ttc ttc gag ttt aag aac ccg tcc atg ctg tat cta gcc aca
ggc cac cgc gtc cag tgg ttg cgt tac gcc gag tgg ctt ctc acc tgc
ccg gtc att ctc att cac ctg tca aac ctg acg ggc ttg tcc aac gac
tac agc agg cgc acc atg ggt ctg ctt gtg tct gat att ggc aca att
gtg tgg ggc gcc act tcc gcc atg gcc acc gga tac gtc aag gtc atc
ttc ttc tgc ctg ggt ctg tgt tat ggt gct aac acg ttc ttt cac gct
gcc aag gcc tac atc gag ggt tac cac acc gtg ccg aag ggc cgg tgt
cgc cag gtg gtg act ggc atg gct tgg ctc ttc ttc gta tca tgg ggt
atg ttc ccc atc ctg ttc atc ctc ggc ccc gag ggc ttc ggc gtc ctg
agc gtg tac ggc tcc acc gtc ggc cac acc atc att gac ctg atg tgc
aag aac tgc tgg ggt ctg ctc ggc cac tac ctg cgc gtg ctg atc cac
gag cat atc ctc atc cac ggc gac att cgc aag acc acc aaa ttg aac
att ggt ggc act gag att gag gtc gag acg ctg gtg gag gac gag gcc
gag gct ggc gcg gtc aac aag ggc acc ggc aag tac gcc tcc cgc gag
tcc ttc ctg gtc atg cgc gac aag atg aag gag aag ggc att gac gtg
cgc gcc tct ctg gac aac agc aag gag gtg gag cag gag cag gcc gcc
agg gct gcc atg atg atg atg aac ggc aat ggc atg ggt atg gga atg
gga atg aac ggc atg aac gga atg ggc ggt atg aac ggg atg gct ggc
ggc gcc aag ccc ggc ctg gag ctc act ccg cag cta cag ccc ggc cgc

```

30

40

【0146】

【数 9】

gtc atc ctg gcg gtg ccg gac atc agc atg gtt gac ttc ttc cgc gag
 cag ttt gct cag cta tcg gtg acg tac gag ctg gtg ccg gcc ctg gcc
 gct gac aac aca ctg gcg ctg gtt acg cag gcg cag aac ctg gcc gcc
 gtg gac ttt gtg ttg att cac ccc gag ttc ctg cgc gac cgc tct agc
 acc agc atc ctg agc cgc ctg cgc gcc gcg gcc cag cgt gtg gct gcg
 ttc gcc tgg gcg cag ctg gcc ccc atg cgt gac ctg atc gag tcc gca
 aac ctg gac gcc tgg ctg gag gcc ccc tcg ttc gga cag gcc atc ctg
 ccg gcc cac atc gtt gcc ctg gtg gcc aag atg cag cag atg cgc aag
 atg cag cag atg cag cag att gcc atg atg acc gcc gcc atg aac gcc
 atg gcc gcc ggt atg gcc gcc gcc atg aac gcc atg gcc gcc gcc aac
 gcc atg aac aac atg gcc aac gcc atg gcc gcc gcc atg gcc aac gcc
 atg gcc gcc aat gcc atg aac gga atg ggt gcc gcc aac gcc atg aac
 aac atg gcc gcc aac gga atg gcc gcc aac gga atg gcc gcc gcc atg
 gcc gcc aac ggt atg ggt gcc tcc atg aac gcc atg agc tcc gcc gtg
 gtg gcc aac gtg acg ccc tcc gcc gcc gcc gcc atg gcc gcc atg atg
 aac gcc gcc atg gct gcg ccc cag tcg ccc gcc atg aac gcc gcc cgc
 ctg ggt acc aac ccg ctc ttc aac gcc gcg ccc tca ccg ctc agc tcg
 cag ctc ggt gcc gag gca gcc atg gcc agc atg gga gcc atg gcc gga
 atg agc gga atg gga gcc atg ggt gga atg ggg gcc atg gcc gcc gcc
 gcc gcc gcc acg acg cag gct gcg gcc gcc aac gcg gag gcg gag atg
 ctg cag aat ctc atg aac gag atc aat cgc ctg aag cgc gag ctt gcc
 gag taa **2214 nt's**

10

配列番号 3 および 4 によってコードされる *C. reinhardtii* (GenBank
 k アクセション番号 AF461397) の全長 Chop2 タンパク質は、以下のアミノ
 酸配列、配列番号 6 を有する：

20

【0147】

【数 10】

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQT 50
 ASNVLQWLAAGFSILLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFF 100
 EFKNPSMLYLATGHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTM 150
 GLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLCYGANTFFHAAKAYIEGY 200
 HTVPKGRRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFILGPEGFGVLSVYGSTVGH 250
 IIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV 300
 EDEAEAGAVNKGTKYASRESFLVMRDKMKEKIDVRASLDNSKEVEQEQ 350
 AARAAMMMNGNGMGMGMGMNGMNGMGMNGMAGGAKPGLELTPQLQPG 400
 VILAVPDISMVDFFREQFAQLSVTYELVPALGADNTLALVTQAQNLGGVD 450
 FVLIHPEFLRDRSSTSILSRLRGAGQRVAAGFWAQLGPMRDLIESANLDG 500
 WLEGPSFGQGILPAHIVALVAKMQMRKMQQMQQIGMMTGGMNGMGGG 550
 GGMNGMGGGNGMNNMGNGMGGGGMNGMGGGNGMNGMGGGNGMNNMG 600
 GNGMGGGGMGGNGMGGSMNGMSSGVVANVTPSAAGGMGGMNGMAAPQSP 650
 GMNGGRLGTNPLFNAAPSPLSSQLGAEAGMGSMGGMGGMSGMGGMGG 700
 MGGAGAATTQAAGGNAEAEMLQNLNMEINRLKRELGE 737

30

本発明に有用な別の有用な Chop2 配列は、310 アミノ酸のポリペプチド（全長の
 ネイティブな Chop2 の生物学的に活性なフラグメント）をコードする 933 スクレオ
 チド（終止コドンを含む）の核酸であり、*Chlamydomonas reinhardtii* 由来の合成構築物である（EF474017 および Zhang ら、2007、*Nature*（印刷中）を参照のこと）。この配列は、ヒト発現についてコドン最適化され
 る。下に示される nt 配列は配列番号 7 であり、示されるコードされたアミノ酸配列は、
 配列番号 8 である。アミノ酸配列である配列番号 8 を有するポリペプチドは、C 末端で短
 縮され、310 で Pro が Asn を置き換えている配列番号 6 のフラグメントである。

40

【0148】

【数 1 1】

atg gac tat ggc ggc gct ttg tct gcc gtc gga cgc gaa ctt ttg ttc	48	
M D Y G G A L S A V G R E L L F	16	
gtt act aat cct gtg gtg gtg aac ggg tcc gtc ctg gtc cct gag gat	96	
V T N P V V V N G S V L V P E D	32	
caa tgt tac tgt gcc gga tgg att gaa tct cgc ggc acg aac ggc gct	144	
Q C Y C A G W I E S R G T N G A	48	
cag acc gcg tca aat gtc ctg cag tgg ctt gca gca gga ttc agc att	192	
Q T A S N V L Q W L A A G F S I	64	
ttg ctg ctg atg ttc tat gcc tac caa acc tgg aaa tct aca tgc ggc	240	
L L L M F Y A Y Q T W K S T C G	80	
tgg gag gag atc tat gtg tgc gcc att gaa atg gtt aag gtg att ctc	288	10
W E E I Y V C A I E M V K V I L	96	
gag ttc ttt ttt gag ttt aag aat ccc tct atg ctc tac ctt gcc aca	336	
E F F F E F K N P S M L Y L A T	112	
gga cac cgg gtg cag tgg ctg cgc tat gca gag tgg ctg ctc act tgt	384	
G H R V Q W L R Y A E W L L T C	128	
cct gtc atc ctt atc cac ctg agc aac ctc acc ggc ctg agc aac gac	432	
P V I L I H L S N L T G L S N D	144	
tac agc agg aga acc atg gga ctc ctt gtc tca gac atc ggg act atc	480	
Y S R R T M G L L V S D I G T I	160	
gtg tgg ggg gct acc agc gcc atg gca acc ggc tat gtt aaa gtc atc	528	
V W G A T S A M A T G Y V K V I	176	
ttc ttt tgt ctt gga ttg tgc tat ggc gcg aac aca ttt ttt cac gcc	576	20
F F C L G L C Y G A N T F F H A	192	
gcc aaa gca tat atc gag ggt tat cat act gtg cca aag ggt cgg tgc	624	
A K A Y I E G Y H T V P K G R C	208	
cgc cag gtc gtg acc ggc atg gca tgg ctg ttt ttc gtg agc tgg ggt	672	
R Q V V T G M A W L F F V S W G	224	
atg ttc cca att ctc ttc att ttg ggg ccc gaa ggt ttt ggc gtc ctg	720	
M F P I L F I L G P E G F G V L	240	
agc gtc tat ggc tcc acc gta ggt cac acg att att gat ctg atg agt	768	
S V Y G S T V G H T I I D L M S	256	
aaa aat tgt tgg ggg ttg ttg gga cac tac ctg cgc gtc ctg atc cac	816	
E H I L I H G D I R K T T K L N	272	
gag cac ata ttg att cac gga gat atc cgc aaa acc acc aaa ctg aac	864	
I G G T E I E V E T L V E D E A	288	
atc ggc gga acg gag atc gag gtc gag act ctc gtc gaa gac gaa gcc	912	30
I G G T E I E V E T L V E D E A	304	
gag gcc gga gcc gtg cca taa	933	
E A G A V P 終止	310	

A A V ベクター注射

全ての動物実験は、施設のレベルで行い、そして実験動物の管理と使用についてのNIHのガイド (NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals) に従った。

【0149】

新生 (P1) ラットの仔犬 (Sprague-Dawley および Long-Evans) およびマウスの仔 (C57BL/6J および C3H/HeJ または rdl/rdl) を氷上で冷却することによって麻酔した。成体マウス (rdl/rdl) を、ケタミン (100mg/kg) およびキシラジン (10mg/kg) のIP注射によって麻酔した。解剖顕微鏡下で、眼瞼を通じてハサミで切開して強膜を露出した。ハリを用いてレンズの後ろの強膜領域で小さい穿孔 (目打ち) を行い、そして0.8~15μlのウイルスベクター懸濁液を、1mlあたり約10¹¹ゲノム粒子の濃度で、32ゲージの先端の丸い (blunt-ended) ハリを有するHamiltonシリンジでその孔を通して硝子体内腔に注射した。各々の動物について、通常は1つの眼だけに、Chop2-GFPを担持するウイルスベクターを注射して、他の眼は、GFP単独を担持するコントロールのウイルスベクターを注射しないかまたは注射した。注射後、動物を12/12時間の明/

暗サイクルに保持した。動物を飼育する部屋の光の照明は、500 nmの波長で測定して、 6.0×10^{14} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。

【0150】

組織学

動物をベクター注射後、種々の時点で屠殺した。Chop2-GFP蛍光の発現を、平坦なホール・マウントの網膜、垂直の網膜の、そして冠状の脳切片で検査した。切開した網膜および脳を、PBS中の4%パラホルムアルデヒドを用いて、それぞれ0.5~2時間室温で、そして24時間4℃で固定した。この固定された網膜(3%アガロースに包埋)および脳を、ビブラトームを用いることによって切断した。この網膜および脳の切片または網膜のホール・マウントを、スライド上にマウントして、Vectashield培地(Vector Laboratories)でカバーした。GFP蛍光は、それぞれ、465~495 nm、505 nm、および515~555 nmの励起フィルター、干渉フィルターおよび放射フィルターを装備した蛍光顕微鏡下で可視化し、そしてほとんどの画像はデジタルカメラで得た(Axiocam, Zeiss)。いくつかの画像を共焦点顕微鏡(TCS SP2, Leica)で得た。半薄垂直網膜切片の光学顕微鏡のために、眼を除核して、PBS中でリンスして、1%の四酸化オスミウム、2.5%のグルタルアルデヒドおよび0.2 MのSorensonのリン酸緩衝液(pH 7.4)中で、4℃で3時間固定した。次いで眼を段階的エタノールで脱水して、プラスチックに包埋して、1 μmの切片中に切断して、メチレンブルー／アズール混合物で染色した。

【0151】

パッチークランプ記録

解離した網膜細胞および網膜スライスを、以前に記載のとおり調製した(Pan, 2000およびCuiら, 2003)。ホール・セルの配置中でパッチ電極での記録を、EPC-9増幅器およびPULSEソフトウェア(Heka Electronics, Lambrecht, Germany)によって行った。記録は、以下を(mMとして)含むハanks溶液中で行った: NaCl, 138; NaHCO₃, 1; Na₂HPO₄, 0.3; KCl, 5; KH₂PO₄, 0.3; CaCl₂, 1.25; MgSO₄, 0.5; MgCl₂, 0.5; HEPES-NaOH, 5; グルコース, 22.2; フェノールレッドを、0.001% (v/v) で; pHを7.2に、0.3 NのNaOHを用いて調節した。

【0152】

電極溶液は以下を(mMとして)含んだ: K-グルコン酸塩, 133; KCl, 7; MgCl₂, 4; EGTA, 0.1; HEPES, 10; Na-GTP, 0.5; およびNa-ATP, 2; KOHを用いてpHを7.4に調節した。電極の抵抗は、13~15 MΩであった。記録は、室温で行った(~22℃)。

【0153】

多重電極アレイ記録

多重電極アレイ記録は、TianおよびCopenhagen(2003)によって報告された手順に基づいた。要するに、網膜を解剖して、ニトロセルロース濾紙ストリップ(Millipore Corp., Bedford, MA)上に光受容体を横倒しに置いた。マウントした網膜を、200 μm離れた30 μmの直径の電極のMEA-60多重電極アレイ記録チャンバに入れ(Multi Channel System MCS GmbH, Reutlingen, Germany)、ここでは神経節細胞層が記録電極に面している。網膜は、全ての実験の間34℃で酸素化された細胞外溶液中で連続してパルスした。この細胞外溶液は、以下を(mMとして)含んだ: NaCl, 124; KCl, 2.5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; NaH₂PO₄, 1.25; NaHCO₃, 26; およびグルコース, 22 (95%のO₂ および5%のCO₂ でpH 7.35)。記録は通常、網膜を記録チャンバに入れた後60分で開始した。各々の光刺激のオンセットの間隔は10~15秒であった。シグナルは、200 Hz (低カットオフ)と20 kHz (高カットオフ)との間でフィルタリングした。個体の神経細胞由来の応答は、O

ffline Sorterソフトウェア (Plexon, Inc., Dallas, TX) を用いて分析した。

【0154】

視覚誘発電位の記録

視覚誘発性電位の記録は、野生型マウスの C57BL/6 および 129/Sv 株の 4～6 か月齢で、そして rdl/rdl マウスで 6～11 か月齢で行った。記録は、ウイルスベクター注射後 2～6 か月で行った。

【0155】

全身麻酔 (ケタミン (100 mg/kg) およびアセプロマジン (0.8 mg/kg) の i.p. 注射) の後、動物を定位固定装置に装着した。体温は、調節しないか、または加熱パッドおよび直腸プローブを用いて 34℃ に維持した。瞳孔は、1% のアトロピンおよび 2.5% の accu-フェニレフリンで拡大させた。正中線から約 2.5 mm 中心で、かつラムダ縫合に 1 mm 吻側の頭がい骨の小部分 (～1.5×1.5 mm) を、穿孔して取り出した。記録は、刺激された眼の反対側で皮質の表面の真下 0.4 mm 進んだガラスのマイクロピペット (4 M の NaCl を充てんした後約 0.5 M の抵抗) によって、視覚野から行った (領域 V1)。刺激は 0.5 Hz で 20 ms のパルスであった。応答を増幅して (1,000～10,000)、バンドパス (帯域通過) フィルタリングして (0.3～100 Hz)、デジタル化 (1 kHz) して、30～250 のトライアルにわたって平均した。

【0156】

光刺激

解離した細胞および網膜のスライス記録のために、光刺激を、150 W のキセノンランプベースの走査単色光分光器によって、10 nm (TILL Photonics, Germany) のバンド幅で生成して、光ファイバーで顕微鏡に伝えた。多重電極アレイ記録のために、光応答は、単色光分光器または 175 W のキセノンランプベースのイルミネーター (Lambda LS, Sutter Instrument) (400～580 nm の帯域通過フィルターを備える) によって誘発させ、液体光ガイダー (liquid light guider) を通して記録チャンバの底に投射した。視覚誘発電位のために、光刺激を単色光分光器によって生成して、光ファイバーを通して眼に投射した。光の強度は、中性密度フィルターによって減弱させた。光エネルギーは、薄型センサー (TQ82017) および光強度測定器 (Model: TQ8210) (Advantest, Tokyo, Japan) によって測定した。

【0157】

(実施例 2)

インビボにおける網膜神経細胞での Chop2 の発現

Chop2 タンパク質の発現および局在化を直接可視化するために、Chop2 チャネルの C 末端部分を、GFP で置き換えて、Chop2-GFP キメラを作成した。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを選択して、網膜神経細胞中への Chop2-GFP 融合タンパク質の発現を標的とした。この理由は AAV ベクターが、内網膜神経細胞を含む非分裂細胞へ導入遺伝子を送達し (Harvey ら、, 2002 and Martin ら、2003)、そして宿主ゲノムへ導入遺伝子を組み込む能力 (Flotte, 2004) である。

【0158】

ウイルス発現カセットである rAAV2-CAG-Chop2-GFP-WPRE は、ハイブリッド CMV エンハンサー/ニワトリ β -アクチン (CAG) プロモーターを含む AAV 血清型-2 発現カセット中に Chop2-GFP キメラをサブクロニングすることによって作成した (図 1A)。一般には網膜神経細胞における Chop2 チャネルの発現および機能を確認するために、本発明者らは、最初に、非ジストロフィー網膜中で Chop2 の発現を検査した。このウイルスベクターを出生 1 日後のラットおよびマウスの眼の硝子体内腔に注射した。注射の 3～4 週後に、明るい GFP 蛍光を全ての注射した眼の

網膜神経細胞で観察し（図1B～1H）、これによってChop2-GFPが発現されたことを確認した。この発現は通常、網膜全体にわたってコンフルエントであった（図1B）。

【0159】

Chop2-GFP-蛍光は主に、網膜神経節細胞で観察された（図1Cおよび1D；また図1Hも参照のこと）。この蛍光シグナルは、内網状層（IPL）全体にわたって観察され（図1H）、このことは、ウイルスベクターが、ONおよびOFF神経節細胞の両方でChop2-GFPの発現を標的したことを示している。Chop2-GFPの発現はまた高頻度に、水平細胞（図1E）、アマクリン細胞（図1F）、および時には、双極細胞（図1G）で観察された。

10

【0160】

このGFPシグナルは主に、Chop2チャネルの7回膜貫通部分によって膜に固定されているGFPタグと一致して、原形質膜に局在した（図1D）。一旦細胞中で発現されれば、GFPシグナルは、遠位プロセスおよび軸索末端を含む全細胞にわたって広がった（図1Cおよび図1Eを参照のこと）。明るいGFP蛍光は、注射後12ヶ月以上安定であることが見出された（図1H）が、網膜の形態には大きな変化は注目されなかった（図1I）。これらの結果によって、Chop2-GFPの長期間の安定な発現が、インビボにおいて内網膜神経細胞で達成されたことが示された。

【0161】

実施例3

20

ChR2発現内網膜神経細胞の光誘発性電流の特性

Chop2チャネルの機能的な特性を、ホール・セルパッチクランプ記録を用いることによって内網膜神経細胞で検査した。これらの記録は、光受容体媒介性の光応答が確実に排除されるように、急性分離した細胞で行った。Chop2-GFP陽性細胞は、GFP蛍光によって特定した（図2A）。Chop2発色団、オール・トランスレチナールの前駆体は、添加されなかった。なぜなら、それは細胞中で普遍的に存在し得るからである（Kimら、1992、ならびにThompsonおよびGal, 2003）。光誘発性の応答は、全ての記録されたGFP蛍光細胞で観察され（ $n=34$ ）、このことは、機能的なChR2（発色団が結合したChop2）は、細胞中に既に存在する網膜発色団を有する網膜神経細胞で形成され得る。結果として、機能的なChR2チャネルの発現はまた、外因性網膜発色団の供給なしに、培養された海馬神経細胞で近年報告されている（Boydénら、2005；ただしLiら、2005を参照のこと）。

30

【0162】

ChR2-媒介性の光応答の特性は最初に、電圧クランプで試験された。光誘発性電流は、ChR2の報告されたピークスペクトル感度と一致して、約460nmの最も感受性の波長を用いて580nmの波長まで光刺激によってChop2-GFP発現内網膜神経細胞で観察された（Nagelら、2003）。電流の振幅および動態は、光強度に依存した（図2C）。図2Dおよび図2Eは、拡大時間スケールで、それぞれ光刺激の発生および終わりの直後に電流トレースを示す。検出可能な電流は、ほとんどのげっ歯類細胞において、 2.2×10^{-15} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度で観察された。いくつかの細胞では、電流は、 2×10^{-14} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度で観察された（示さず）。より高い光強度では、電流は、非融合ChR2の特性と同様の一過性および持続的な成分の両方を示した（Nagelら、2003）。光強度とピーク電流との間の関係を図2Fに示す（ $n=7$ ）。電流の活性化および不活性化動態はまた、光強度に依存した（図2D）。電流の初期段階は、図2Dに例示されるように（赤いトレース）、単一の活性化および不活性化定数を用いる指数関数によってよくフィットされ得る。光強度に対する活性化および不活性化時間定数は、それぞれ図2Gおよび2Hにプロットされる。他方では、ライト・オフ後の電流の不活性化動態は、光強度依存性ではなかった。電流減衰トレースは、図2Eに示されるような単一指数関数によってよくフィットされ得る（赤いトレース）。時間定数は $17.1 \pm 6.5 \text{ ms}$ であった（平均 $\pm \text{SD}$, $n=7$ ）。

40

50

【0163】

次の実験で、ChR2-媒介性の電流が膜脱分極を駆動するのに十分であったか否かを検査した。図3Aは、460nmの波長で4つの間欠的光強度に応答したスパイク非発射型神経細胞由来の代表的な応答を示す。検出可能な応答が、ほとんどの記録された細胞において、 2.2×10^{15} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ という光強度で観察された。より高い光強度では、膜脱分極は飽和レベルに近づいた。反復された光刺激に対するChR2-媒介性の光応答をさらに検査した。電流の過渡的成分は、反復された刺激まで減少したが、電流の持続成分は、安定であった（図3Bの上のトレース）。これは、重ね合わせた第一（赤いトレース）および第二（黒いトレース）の光誘発性電流を比較することによって図3Bの右のパネルで拡大時間スケールで明らかにみられた。同じ細胞について、電流クランプでは、この刺激が、強固な膜脱分極を誘発した（図3Bにおける下部のトレース）。膜脱分極は、応答の最初の部分を除いて、ほとんど同一レベルに達した。これはまた、第一（赤いトレース）および第二（黒いトレース）の光誘発性応答を重ね合わせた、拡大時間スケール（右パネル）で示された。図3Cは、繰り返された光刺激に対するスパイク発射神経細胞の代表的な記録を示す。ここでも、刺激で、複数のスパイクをとまなうほぼ同一の膜脱分極が誘発された。まとめると、これらの結果によって、第二および第三次の網膜神経細胞におけるChR2媒介性の電流は、膜脱分極および／またはスパイク発射を駆動するのに十分であることが実証された。

10

【0164】

実施例4

20

光受容体欠損のrdl/rdlマウスにおけるChop2の発現

野性型網膜におけるChR2の発現および機能が達成されているが、本発明者らは、ChR2の発現が、光受容体変性後の網膜における光応答を回復し得るか否かに取り組んだ。この目的を達するために、この実験は、ヒトでの網膜色素変性症のいくつかの形態と同様である（McLaughlinら、1993）、サイクリックGMOホスホジエステラーゼPDE6中でヌル変異を有する光受容体変性モデルである、ホモ接合性のrdl（rdl/rdl）マウスで（Bowesら、1990）で行った。Chop2-GFPのウイルスベクターを、2～12カ月齢で新生（P1）または成体マウスの眼に硝子体内注射した。野性型動物で観察された結果と同様、明るいGFPシグナルが、Chop2-GFP注射された網膜で、主に網膜神経節細胞で観察された（図4Aおよび4B）。記録実験の時点で（他に示さない限り4ヶ月以上の年齢）、光受容体細胞は存在しなかった（図4C）。Chop2-GFPの発現は、15月齢のrdl/rdlマウスから図4Aで示された例と同様、rdl/rdlマウスで、16ヶ月までの年齢（ウイルス注射の3～6カ月後）で観察された。これらの結果によって、この光受容体欠損モデルにおける内網膜神経細胞は、光受容体の完全な死滅後長期生存するだけでなく、Chop2-GFPの安定な発現の能力を保持していることが示される。

30

【0165】

実施例5

rdl/rdlマウスのChR2-発現生存内網膜神経細胞の光誘発性応答

rdl/rdlマウスにおけるChR2-発現網膜神経細胞の光応答特性を、網膜スライスにおけるホール・セル（whole-cell）パッチクランプ記録によって検査した。記録は、神経節細胞層に位置するGFP陽性の細胞から作成した。光誘発性の電流は、GFP陽性の細胞で観察された。電流の大きさは、ここでも光強度に依存性であった（図4Dおよび4Eにおける上のトレース；図4Fに示される光強度および電流の関係も参照のこと）。2群のChR2-発現網膜神経細胞が、それらの応答特性に基づいて観察された：一群の一過性スパイク発射神経細胞（図4D）および一群の徐放性スパイク発射神経細胞（図4E）。膜脱分極および／またはスパイク頻度はまた、光強度に依存した（図4Dおよび4Eにおける下部のトレース）。さらに、光は、より高い強度で、拡大時間スケールで第二のトレース（黒）および第四のトレース（赤）を重ね合わせることによって、図4Dおよび図4Eの右パネルで図示されるとおり電圧応答の動態を顕著に加速した。

40

50

膜脱分極、スパイク発火頻度、および第一スパイクピークまでの時間に対する光強度の関係を、それぞれ図 4 G、4 H および 4 I に示す。これらの結果により、ChR2 の発現を伴う生存している網膜第三次神経細胞が、膜脱分極および／または作用電圧発火および応答動態で、光強度をコードし得ることが実証される。

【0166】

実施例 6

ChR2-媒介性の網膜活性の多重電極アレイ記録

rdl / rdl マウスの光受容体欠損網膜のスパイクコード能力を、ホール・マウント網膜由来の多重電極アレイ記録の使用によって ChR2 の発現後に検査した。図 5 A におけるサンプル記録から示されるとおり、ライト・オンおよびオフに応答した高速動態でのスパイク発火が、Chop2-GFP-発現網膜で観察された (n = 11、網膜)。光誘発性スパイク発火は、CNQX (25 ~ 50 μ M) プラス APV (25 ~ 50 μ M) (n = 3) の適用によって影響されず、このことは、この応答が、記録された細胞の ChR2 に由来することを示している。このような光誘発性のスパイク発火は、GFP 単独を担持するウイルスベクターを注射された (n = 2 網膜) か、または注射されていない (n = 3) 網膜で観察された。後者によって、光受容体由来の光応答がないことが確認された。光誘発性のスパイク発火は、スラミン (100 μ M) では影響されず (n = 2)、これは、メラノプシン受容体媒介性の光電流をブロックし得ることが報告されている (Melyan ら、2005 および Qui ら、2005)。

【0167】

さらに、光のオンおよびオフの両方に対する応答動態 (図 5 B を参照のこと) は、内因性に光感受性の網膜神経節細胞によって生成される動態 (Tu ら、2005) よりもかなり高速であった。これらの結果によって、本発明者らの記録条件のもとで内因性に光感受性の神経節細胞から観察された光応答に対する有意な寄与はありそうにないことが示された。光誘発性の応答はしばしば、Chop2-GFP が網膜で広範に発現されたという観察と一致して、ほとんどの電極によってピックアップされることが見出された (図 5 A を参照のこと)。応答のかなりの部分が、光刺激の間に維持された。図 5 B は、3 つの漸増の光刺激に応答した単一電極によって記録された生のトレースを例示する。記録の単一神経細胞からソートしたスパイク活性のラスター・プロットを図 5 C に示した。発火頻度は、記録の経過の間に極めて安定であった。平均したスパイク頻度ヒストグラムを図 5 D に示す。ここでも、スパイク頻度は、より高い光強度まで増大した。光応答は、5 時間まで記録され得る。これらの結果、ChR2-発現網膜神経節細胞が、スパイク発火頻度で光強度を容易にコードできることがさらに実証される。

【0168】

(実施例 7)

視覚誘発性電位

rdl / rdl マウスの網膜における ChR2 媒介性の光応答が、視覚皮質に伝達されたか否かを試験するために研究を行なった。AAV 感染によって達成される網膜神経節細胞で、GFP のような導入遺伝子の発現は、脳でのより高次の視覚中心においてそれらの終わりまで拡大され得ることが報告された (Harvey ら、2002)。従って、Chop2-GFP-発現網膜神経節細胞の軸索末端の解剖学的突出を最初に検査した。一貫して、網膜神経節細胞の Chop2-GFP 標識軸索末端は、外側膝状体腹側核 (ventral lateral geniculate nucleus) および外側膝状体背側核 (dorsal lateral geniculate nucleus) (図 6 A)、ならびに上丘 (superior colliculus) (図 6 B) を含む脳のいくつかの領域で観察された。これらの結果によって、変性網膜における網膜神経節細胞の中央突出が維持されることが示される。

【0169】

次いで、視覚皮質由来の視覚誘発性電位 (VEP) を検査した。最初に、図 6 C で例示されるとおり、VEP は、460 および 580 nm の両方の波長で光刺激に応答して全て

の試験された野性型マウス（4～6カ月齢）で観察された（ $n=6$ つの眼）。 rdl/rdl マウス（6～11カ月齢）のChop2-GFP-注射した眼において試験した場合、VEPは、ChR2チャンネルの光感度と一致して（図2Bを参照のこと）、460nmの波長で光刺激に応答してほとんどの眼（13のうち9つ）で観察されたが、580nmの波長での光刺激に対しては観察されなかった（図6D）。460nmの波長で光刺激に
10
応答してChop2-GFP-注射された眼でVEPの平均振幅は $110 \pm 34 \mu V$ （平均 $\pm SE$ ； $n=10$ ）であって、これは、野性型マウスで観察された振幅（ $274 \pm 113 \mu V$ ； $n=6$ ）より小さいが、これらの2つの値は、有意に異なることはなかった（一元分散分析（ANOVA）検定、 $p<0.1$ ）。野性型マウスに比較したChop2-トランスフェクトマウスにおけるVEPでのより低い振幅は、驚くことではない。なぜなら、ChR2の発現はおそらく、網膜神経節細胞のわずかな部分でのみ達成されたからである。Chop2-GFP-注射した眼におけるVEPのピークに対する平均潜時は、 $45 \pm 1.7 ms$ （ $n=10$ ）であって、これは、野性型マウスで観察された潜時よりも短い（ $62 \pm 2.8 ms$ ； $n=6$ ）。これらの2つの値は、有意に異なった（ $p<0.01$ ）。
20
後者が予測される。なぜなら、網膜神経節細胞でのChR2によって媒介される光応答は、光受容体の下流の2つのシナプスに由来するからである。コントロールとして、GFP単独（ $n=5$ ）を担持するウイルスベクターを注射された年齢のマッチした rdl/rdl マウスの眼で460nmの波長での光刺激に対しては、検出可能なVEPは観察されなかった（図6E）。さらに、検出可能なVEPは、420～620nmにおよぶ波長に対しては（示さず）、注射されていない rdl/rdl マウス（ $n=3$ ；5ヶ月齢）では
20
観察されず、これによって、5ヶ月以上の年齢での rdl/rdl マウスはVEPに基づいて完全に盲目であることが確認された。

【0170】

盲目の rdl/rdl マウスにおけるVEPは、それらの網膜で発現されたChR2に由来することをさらに確実にするために、VEPの作用スペクトルを、それらの正規化された振幅を変化する光波長および強度に対応してプロットして、この応答の相対感度を得ることによって測定した（図6F）（ $n=3$ ）。このデータポイントは、約460nmでChR2の報告されたピーク作用スペクトルに対する良好なマッチである（Nagelら、2003）、461nmのピーク波長で（図6G）、ビタミンA₁ベースの視物質テンプレート（PartridgeおよびDe Grip, 1991）によって十分フィット
30
された。まとめると、これらの結果によって、光受容体欠損網膜におけるChR2の発現は、脳において視覚誘発された応答を回復し得ることが実証された。

【0171】

実施例8

実施例1～7の考察

本明細書に提示される結果によって、ChR2の発現に基づいた光受容体欠損げっ歯類網膜における光応答の回復の戦略は、機械的にかつ技術的に実現可能であることが実証された。最も重要な事には、この結果によって、ChR2が、網膜神経細胞における光センサーとしてその使用についてのいくつかの主な基準を満たすことが示された。第一に、融合されたChop2-GFPを担持するAAVベクターの送達によって、本発明者らは、網膜神経細胞がChop2の長期の発現に耐容する能力を示した。今まで、Chop2-GFPタンパク質の発現は、12ヶ月間の非ジストロフィーラットの神経細胞で、そして光受容体欠損 rdl/rdl マウスで6ヶ月間インビボにおいてウイルス注射後に達成されている。従って、本発明の結果によって、網膜神経細胞におけるChR2の発現が、正常な光周期条件下で生体適合性であることが示される。
40

【0172】

第二に、これらの結果によって、十分な数のChR2が、網膜神経細胞で形成され得、ここで内因性の発色団のみが、標準的な食餌によって供給され、強固な網膜脱分極および/または作用電位発火を網膜において、そしてVEPを視覚皮質において生じ得る。ここで、11-cisからall-トランスレチナルへの光異性化後に、それらの発色団を
50

急速に失う動物の視物質とは異なり (Wald, 1968)、微生物型ロドプシンについて、オール・トランス (all-trans) から 11-cis レチナールへの光異性化は可逆性であって、両方の異性体がタンパク質に結合したままであるということが価値のあることである (Oesterhelit, 1998)。一旦、ChR2 複合体が形成されれば、光感受性チャネルは、同じ発色団部分での光異性化の複数のサイクルを保持し得る。新規な ChR2 形成の有効性は、発色団の有効性に依存することが期待され得るが、新規な ChR2 を形成するための発色団の一定の再供給の必要性は、全体的な ChR2 機能に対する限界を課すとは思われない。多重電極アレイ記録において観察されるとおり、ChR2 は、活性の喪失なしにインビトロで数時間光刺激に対して反復して応答する。従って、これらの結果によって、ChR2 の代謝回転速度は、人工的に生成される光センサーとしての使用にさらなる利点である、かなり遅いということが示される。

10

【0173】

さらに、もともとは細胞発現系 (Nagel ら、2003) において、後には海馬神経細胞において (Boyden ら、2005, Ishizuka ら、2006 および Li ら、2005) 報告され、そして今では網膜神経細胞において示されているとおり、ChR2 チャネルの多数の特性が光センサーとしてのその使用について極めて有利である。

【0174】

最初に、ChR2 チャネルは、ニューロン膜興奮性の背景にある陽イオンに透過性である。従って、光による ChR2 チャネルの活性化は、膜脱分極を直接生成して内網膜神経細胞の ON 応答を模倣し得る。実際、本明細書に示されるとおり、スパイク非発射型およびスパイク発射型の網膜神経細胞において ChR2 によって媒介される光誘発性の応答は、ON 双極細胞および維持された ON-神経節細胞の光応答を顕著に模倣した (Werblin および Dowling, 1969、ならびに Kaneko, 1970)。

20

【0175】

第二に、光に応答する電流の活性化動態は、極めて速いが、電流の維持された成分は、連続的または反復した光照射に対して明らかな不活性化を示さない。従って、ChR2-発現神経細胞は、急速な動態を伴うが、色素不活性化を伴わずにシグナル伝達し得る。結果として、ChR2 の発現は、高い時間分解能を有する神経興奮性の光学的制御を可能にすることが示されている (Boyden ら、2005, Ishizuka ら、2006 および Li ら、2005)。さらに、光誘発性電流の大きさおよび活性化の動態は、3-対数-単位の範囲にわたって光照射量に依存するということがここで示されている。ホール・セルおよび多重電極アレイ記録において実証されるとおり、これによって、段階的な膜脱分極および／またはスパイク頻度での種々の光強度のコード化が可能になる。

30

【0176】

また、光受容体変性後の網膜における光感度回復のストラテジーの実現可能性についての重要性のうち、この研究の結果によって、多くの内網膜神経細胞が高齢の rdl / rdl マウス (最大 16 ヶ月齢まで) で生存しており、そして全ての光受容体の死滅後長く ChR2 を発現し得るということが示される。これは、このマウスモデルにおいて、いくつかの再構築にかかわらず、多くの内網膜神経細胞が生存するということを示す組織学的研究と一致する (Jimenez ら、1996, Strettoi and Pignatelli, 2000、および Chang ら、2002)。さらに、ChR2 を用いる本発明によって、生存している内網膜神経細胞が、膜脱分極および／または作用電位発火で、光シグナルをコードし、そして視覚シグナルを視覚皮質に対して伝達するそれらの生理学的な能力を保持することが示された。従って、ChR2 の発現に基づくストラテジーは、特定の段階での特定の網膜変性疾患について少なくとも適切である。

40

【0177】

光受容体変性によって誘発される内網膜神経細胞の再構築は、光受容体の死滅後に網膜ベースのレスキューストラテジーについてのいくつかの懸念を惹起した (Strettoi および Pignatelli, 2000, Jones ら、2003、ならびに Jones および Marc, 2005)。しかし、網膜変性疾患は、種々の細胞タイプの変性、生

50

存および機能的状態の時間経過に関して異種である (Changら、2002)。ChR2の使用は、このような研究を引き受けるための強力なツールである。

【0178】

網膜再構築は、求心路遮断によって生じると考えられる (JonesおよびMarc, 2005)。従って、内網膜神経細胞における光感度の回復は、再構築プロセスを予防または遅延することが可能であり得る。

【0179】

最終的に本発明によれば、ウイルスベースの遺伝子送達系、例えば、AAVベクター (Flanneryら、1997, Bennettら、1999, Aliら、2000およびAcclandら、2001) は、本明細書において実証されるような網膜神経細胞中にChop2を導入するためのツールである。

10

【0180】

本発明の結果、AAV血清型2およびCAGプロモーターを有するウイルス構築物は、神経節細胞におけるChop2の強固な発現を達成したことが示された。しかし、この構築物でのChop2の発現は、ONおよびOFF型の両方の神経節細胞を標的すると考えられるので、ON-およびOFF-の両方の神経節細胞のON型への変換が視覚知覚にどのように影響するかを決定すべきことが依然として残される。

【0181】

霊長類の行動研究によって、網膜中のONチャネルの薬理的遮断が、光減衰の検出および形状の知覚のような視覚機能を重篤に障害しないということが報告された (Schillerら、1986)。従って、ONチャネルに対する、例えば、ON型神経節細胞に対するChR2の標的は、有用な視覚を生じると期待される。

20

【0182】

双極細胞のような、より遠位の網膜神経細胞においてChR2を発現することも本明細書で考察される；このアプローチは、変性網膜の残留するシグナル処理機能を利用する。桿体双極細胞に対してChR2を標的化することは、特に魅力的である。なぜなら、桿体双極細胞の脱分極は、錐体双極細胞および網膜神経節細胞のレベルでONおよびOFF応答をもたらし得 (Wassle, 2004)、それによって、網膜中で固有のONおよびOFFチャネルを維持するからである。

【0183】

ChR2発現網膜における応答を産生するために必要な閾値光強度は、 $10^{14} \sim 10^{15}$ 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ に近いと考えられる。比較として、正常な桿体および錐体光受容体についての閾値は、それぞれ、約 10^6 および 10^{10} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ である (Daceyら、2005)。従って、ChR2発現網膜は、実質的に高い光子範囲で作動する。正常な網膜に比較してChR2発現網膜の比較的低い光感度は、多数の因子に起因し得る。第一に、桿体および錐体における視物質と比較したトランスフェクトされた網膜神経細胞におけるChR2分子の低横断面密度が存在し得る。第二に、ChR2発現内網膜神経細胞は、固有の多層光受容体膜組織化を、代表的には桿体および錐体の外節について欠き、これがより高い色素密度を達成するように発達し、これによって光子捕獲の確率を増大する (Steinbergら、1980)。第三に、増幅カスケードを通じてこれらのシグナルを伝達する視物質とは異なり (Stryer, 1991)、直接の光ゲートのChR2チャネルは、このような増幅能力を欠く。最終的に、正常な網膜では、視覚シグナルの増幅は、シグナルが複数の光受容体から神経節細胞を覆うにつれて生じる (Barlowら、1971)。このプロセスは、ChR2トランスフェクトされた網膜ではまだ達成されていなかった。これらの要因のどれが、ChR2発現網膜の減少した光感度に最も寄与するかということはまだ明らかでない。興味深いことに、ChR2は、緑藻における低強度の光に対する走光性を媒介した (Sineshchekovら、2002；ただしKateriyaraら、[2004]を参照のこと)。従って、網膜神経細胞におけるChR2の光感度は、異種発現のためにChop2分子に導入された改変によって変更されていてもよい。このような相違はまた、藻類および哺乳動物細胞の種々の構造的ま

30

40

50

たは機能的組織化に影響し得る。

【0184】

それにもかかわらず、臨床使用については、光増感デバイスが、光作動範囲を拡大するために用いられ得る。

【0185】

現在では、光受容体細胞が一旦失われれば、視覚回復に利用可能な処置はない。上記で注記されたとおり、正常な光受容体細胞または前駆体細胞の移植（B o k , 1 9 9 3 および L u n d ら、2 0 0 1）または網膜インプラントを介する生存する第二および第三次の網膜神経細胞の直接の電氣的刺激（Z r e n n e r , 2 0 0 2）は、桿体および錐体の変性後の網膜における光応答の回復についての可能なストラテジーとして提唱されている。本発明の重要な利点とは、網膜への組織またはデバイスの導入には関与せず、従って免疫反応および生体不適合性の合併症を大部分回避し得るということである。さらに、本発明のアプローチは、回復された「視覚」についての高い空間分解能を達成することが期待される。なぜなら、このアプローチは、細胞レベルを標的するからである。従って、生存している網膜神経細胞における、C h R 2 のような微生物型チャネルロドプシンの発現は、桿体および錐体の変性によって生じる完全な盲目の処置についてのストラテジーである。

【0186】

実施例の節に引用された参考文献

【0187】

【表 2】

Acland *et al.*, 2001 -- G.M. Acland, G.D. Aguirre, J. Ray, Q. Zhang, T.S. Aleman, A.V. Cideciyan, S.E. Pearce-Kelling, V. Anand, Y. Zeng and A.M. Maguire *et al.*, Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness, *Nat. Genet.* 28 (2001), pp. 92–95

Ali *et al.*, 2000 -- R.R. Ali, G.M. Sarra, C. Stephens, M.D. Alwis, J.W. Bainbridge, P.M. Munro, S. Fauser, M.B. Reichel, C. Kinnon and D.M. Hunt *et al.*, Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy, *Nat. Genet.* 25 (2000), pp. 306–310

Auricchio *et al.*, 2001 -- A. Auricchio, G. Kobinger, V. Anand, M. Hildinger, E. O' Connor, A.M. Maguire, J.M. Wilson and J. Bennett, Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001), pp. 3075–3081

Banghart *et al.*, 2004 -- M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner and R.H. Kramer, Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing, *Nat. Neurosci.* 7 (2004), pp. 1381–1386

Barlow *et al.*, 1971 -- H.B. Barlow, W.R. Levick and M. Yoon, Responses to single quanta of light in retinal ganglion cells of the cat, *Vision Res.* 3 (1971), pp. 87–101

Baylor, 1996 -- D. Baylor, How photons start vision, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), pp. 560–565

Bennett *et al.*, 1999 -- J. Bennett, A.M. Maguire, A.V. Cideciyan, M. Schnell, E. Glover, V. Anand, T.S. Aleman, N. Chirmule, A.R. Gupta and Y. Huang *et al.*, Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999), pp. 9920–9925

Bok, 1993 -- D. Bok, Retinal transplantation and gene therapy. Present realities and future possibilities, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34 (1993), pp. 473–476

Bowes *et al.*, 1990 -- C. Bowes, T. Li, M. Danciger, L.C. Baxter, M.L. Applebury and D.B. Farber, Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase, *Nature* 347 (1990), pp. 677–680

Boyden *et al.*, 2005 -- E.S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel and K. Deisseroth, Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.* 8 (2005), pp. 1263–1268

Chang *et al.*, 2002 -- B. Chang, N.L. Hawes, R.E. Hurd, M.T. Davisson, S. Nusinowitz and J.R. Heckenlively, Retinal degeneration mutants in the mouse, *Vision Res.* 42 (2002), pp. 517–525

Cui *et al.*, 2003 -- J. Cui, Y.P. Ma, S.A. Lipton and Z.-H. Pan, Glycine receptors and glycinergic synaptic input at the axon terminals of mammalian retinal rod bipolar cells, *J. Physiol.* 553 (2003), pp. 895–909

Dacey *et al.*, 2005 -- D.M. Dacey, H.W. Liao, B.B. Peterson, F.R. Robinson, V.C. Smith, J. Pokorny, K.W. Yau and P.D. Gamlin, Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN, *Nature* 433 (2005), pp. 749–754

Fitzsimons *et al.*, 2002 -- H.L. Fitzsimons, R.J. Bland and M.J. During, Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain, *Methods* 28 (2002), pp. 227–236

Flannery *et al.*, 1997 -- J.G. Flannery, S. Zolotukhin, M.I. Vaquero, M.M. LaVail, N. Muzyczka and W.W. Hauswirth, Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), pp. 6916–6921

Flotte, 2004 -- T.R. Flotte, Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors, *Gene Ther.* 11 (2004), pp. 805–810

Harvey *et al.*, 2002 -- A.R. Harvey, W. Kamphuis, R. Eggers, N.A. Symons, B. Blits, S. Niclou, G.J. Boer and J. Verhaagen, Intravitreal injection of adeno-associated viral vectors results in the transduction of different types of retinal neurons in neonatal and adult rats: a comparison with lentiviral vectors, *Mol. Cell. Neurosci.* 21 (2002), pp. 141–157

Humphries *et al.*, 1992 -- P. Humphries, P. Kenna and G.J. Farrar, On the molecular genetics of retinitis pigmentosa, *Science* 256 (1992), pp. 804–808

Ishizuka *et al.*, 2006 -- T. Ishizuka, M. Kakuda, R. Araki and H. Yawo, Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels, *Neurosci. Res.* 54 (2006), pp. 85–94

Jimenez *et al.*, 1996 -- A.J. Jimenez, J.M. Garcia-Fernandez, B. Gonzalez and R.G. Foster, The spatio-temporal pattern of photoreceptor degeneration in the aged rd/rd mouse retina, *Cell Tissue Res.* 284 (1996), pp. 193–202

【 0 1 8 8 】

【表 3】

- Jones and Marc, 2005 -- B.W. Jones and R.E. Marc, Retinal remodeling during retinal degeneration, *Exp. Eye Res.* 81 (2005), pp. 123–137
- Jones *et al.*, 2003 -- B.W. Jones, C.B. Watt, J.M. Frederick, W. Baehr, C.K. Chen, E.M. Levine, A.H. Milam, M.M. Lavail and R.E. Marc, Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations, *J. Comp. Neurol.* 464 (2003), pp. 1–16
- Kaneko, 1970 -- A. Kaneko, Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar, and amacrine cells in the goldfish retina, *J. Physiol.* 207 (1970), pp. 623–633
- Kateriya *et al.*, 2004 -- S. Kateriya, G. Nagel, E. Bamberg and P. Hegemann, “Vision” in single-celled algae, *News Physiol. Sci.* 19 (2004), pp. 133–137
- Kim *et al.*, 1992 -- C.I. Kim, M.A. Leo and C.S. Lieber, Retinol forms retinoic acid via retinal, *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (1992), pp. 388–393
- Li *et al.*, 2005 -- X. Li, D.V. Gutierrez, M.G. Hanson, J. Han, M.D. Mark, H. Chiel, P. Hegemann, L.T. Landmesser and S. Herlitze, Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005), pp. 17816–17821
- Lund *et al.*, 2001 -- R.D. Lund, A.S. Kwan, D.J. Keegan, Y. Sauve, P.J. Coffey and J.M. Lawrence, Cell transplantation as a treatment for retinal disease, *Prog. Retin. Eye Res.* 20 (2001), pp. 415–449
- Martin *et al.*, 2003 -- K.R. Martin, H.A. Quigley, D.J. Zack, H. Levkovitch-Verbin, J. Kielczewski, D. Valenta, L. Baumrind, M.E. Pease, R.L. Klein and W.W. Hauswirth, Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (2003), pp. 4357–4365
- McLaughlin *et al.*, 1993 -- M.E. McLaughlin, M.A. Sandberg, E.L. Berson and T.P. Dryja, Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa, *Nat. Genet.* 4 (1993), pp. 130–134
- Melyan *et al.*, 2005 -- Z. Melyan, E.E. Tarttelin, J. Bellingham, R.J. Lucas and M.W. Hankins, Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive, *Nature* 433 (2005), pp. 741–745
- Milam *et al.*, 1998 -- A.H. Milam, Z.Y. Li and R.N. Fariss, Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa, *Prog. Retin. Eye Res.* 17 (1998), pp. 175–205
- Nagel *et al.*, 2002 -- G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A.M. Musti, E. Bamberg and P. Hegemann, Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science* 296 (2002), pp. 2395–2398
- Nagel *et al.*, 2003 -- G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann and E. Bamberg, Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003), pp. 13940–13945
- Oesterhelt, 1998 -- D. Oesterhelt, The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8 (1998), pp. 489–500
- Oesterhelt and Stoeckenius, 1973 -- D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, Functions of a new photoreceptor membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973), pp. 2853–2857
- Olshevskaya *et al.*, 2004 -- E.V. Olshevskaya, P.D. Calvert, M.L. Woodruff, I.V. Peshenko, A.B. Savchenko, C.L. Makino, Y.S. Ho, G.L. Fain and A.M. Dizhoor, The Y99C mutation in guanylyl cyclase-activating protein 1 increases intracellular Ca^{2+} and causes photoreceptor degeneration in transgenic mice, *J. Neurosci.* 24 (2004), pp. 6078–6085
- Pan, 2000 -- Z.-H. Pan, Differential expression of high- and two types of low-voltage-activated calcium currents in rod and cone bipolar cells of the rat retina, *J. Neurophysiol.* 83 (2000), pp. 513–527
- Panda *et al.*, 2005 -- S. Panda, S.K. Nayak, B. Campo, J.R. Walker, J.B. Hogenesch and T. Jegla, Illumination of the melanopsin signaling pathway, *Science* 307 (2005), pp. 600–604
- Partridge and De Grip, 1991 -- J.C. Partridge and W.J. De Grip, A new template for rhodopsin (vitamin A₁ based) visual pigments, *Vision Res.* 31 (1991), pp. 619–630
- Qiu *et al.*, 2005 -- X. Qiu, T. Kumbalasiri, S.M. Carlson, K.Y. Wong, V. Krishna, I. Provencio and D.M. Berson, Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin, *Nature* 433 (2005), pp. 745–749
- Santos *et al.*, 1997 -- A. Santos, M.S. Humayun, E. de Juan Jr., R.J. Greenburg, M.J. Marsh, I.B. Klock and A.H. Milam, Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis, *Arch. Ophthalmol.* 115 (1997), pp. 511–515

【表 4】

- Schiller *et al.*, 1986 -- P.H. Schiller, J.H. Sandell and J.H. Maunsell, Functions of the ON and OFF channels of the visual system, *Nature* 322 (1986), pp. 824–825
- Sineshchekov *et al.*, 2002 -- O.A. Sineshchekov, K.H. Jung and J.L. Spudich, Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002), pp. 8689–8694
- Steinberg *et al.*, 1980 -- R.H. Steinberg, S.K. Fisher and D.H. Anderson, Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors, *J. Comp. Neurol.* 190 (1980), pp. 501–518
- Strettoi and Pignatelli, 2000 -- E. Strettoi and V. Pignatelli, Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), pp. 11020–11025
- Stryer, 1991 -- L. Stryer, Visual excitation and recovery, *J. Biol. Chem.* 266 (1991), pp. 10711–10724
- Sung *et al.*, 1991 -- C.H. Sung, C.M. Davenport, J.C. Hennessey, I.H. Maumenee, S.G. Jacobson, J.R. Heckenlively, R. Nowakowski, G. Fishman, P. Gouras and J. Nathans, Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), pp. 6481–6485
- Suzuki *et al.*, 2003 -- T. Suzuki, K. Yamasaki, S. Fujita, K. Oda, M. Iseki, K. Yoshida, M. Watanabe, H. Daiyasu, H. Toh and E. Asamizu *et al.*, Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (2003), pp. 711–717
- Tian and Copenhagen, 2003 -- N. Tian and D.R. Copenhagen, Visual stimulation is required for refinement of ON and OFF pathways in postnatal retina, *Neuron* 39 (2003), pp. 85–96
- Thompson and Gal, 2003 -- D.A. Thompson and A. Gal, Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases, *Prog. Retin. Eye Res.* 22 (2003), pp. 683–703
- Tu *et al.*, 2005 -- D.C. Tu, D. Zhang, J. Demas, E.B. Slutsky, I. Provencio, T.E. Holy and R.N. Van Gelder, Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, *Neuron* 48 (2005), pp. 987–999
- Wald, 1968 -- G. Wald, The molecular basis of visual excitation, *Nature* 219 (1968), pp. 800–807
- Wässle, 2004 -- H. Wässle, Parallel processing in the mammalian retina, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004), pp. 747–757
- Weleber, 1994 -- R.G. Weleber, Retinitis pigmentosa and allied disorders. In: S.J. Ryan, Editor, *Retina*, Mosby, St. Louis, MO (1994), pp. 335–466
- Werblin and Dowling, 1969 -- F.S. Werblin and J.E. Dowling, Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.* 32 (1969), pp. 339–355
- Zemelman *et al.*, 2002 -- B.V. Zemelman, G.A. Lee, M. Ng and G. Miesenböck, Selective photostimulation of genetically chARGed neurons, *Neuron* 33 (2002), pp. 15–22
- Zrenner, 2002 -- E. Zrenner, Will retinal implants restore vision?, *Science* 295 (2002), pp. 1022–1025

10

20

30

学術論文または要約、公開もしくは対応する米国特許もしくは外国特許出願、発効された米国特許もしくは外国特許、または任意の他の引用文献を含む、本明細書において引用される全ての参考文献は、本明細書において参照によって全体が援用されており、これには、この引用された参考文献に提示される全てのデータ、表、図およびテキストを包含する。さらに、本明細書に引用される引用文献内に引用される参考文献の全内容がまた全体として参照によって援用される。

【0190】

公知の方法工程、従来の方法工程、公知の方法または従来の方法に対する言及は、本発明の任意の局面、説明または実施形態が関連の当該分野で開示され、教示されまたは示唆されるということを承認するものでは決してない。

【0191】

特定の実施形態の前述の説明は、当該分野の技術の範囲内の知識（本明細書に引用される参考文献の内容を含む）を適用することによって、過度の実験なしに、本発明の一般的概念から逸脱することなく、特定の実施形態のような種々の適用について、他者が容易に改変および／または適応し得るという本発明の一般的な性質を従って完全に明らかにする。従って、このような適応および改変は、本明細書に提示される教示およびガイダンスに基づいて、開示された実施形態の意味および等価物の範囲内であるものとする。本明細書における表現または用語法は、説明の目的であって限定はせず、その結果、本発明の明細書のこの用語法または表現は、当業者の知識と組み合わせて、本明細書に提示される教示およびガイダンスの観点から当業者によって解釈されるべきである。

【図面の簡単な説明】

40

50

【0192】

【図1】図1A～1I。インビボでの網膜神経細胞におけるChop2-GFPの発現。図1Aは、rAAV-CAG-Chop2-GFP-WPRE発現カセットを示す。CAG：ハイブリッドCMVエンハンサー／ニワトリβ-アクチンプロモーター。WPRE：ウッドチャック転写後調節エレメント（woodchuck posttranscriptional regulatory element）。BGHPA：ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。（図1Bおよび図1C）ウイルスベクター注射2ヶ月後の眼からの低倍率（図1B）および高倍率（図1C）で見られたChop2-GFP蛍光。（図1D）神経節細胞の共焦点画像であって、積層画像（左）および単一光切片画像（右）を示す。（図1E）水平細胞におけるChop2-GFP蛍光であって、体細胞、軸索および遠位軸索末端におけるGFPを示す。（図1Fおよび1G）アマクリン細胞（図1F）および網膜双極細胞（図1G）におけるChop2-GFP蛍光。図1Hおよび1Iは、Chop2-GFPウイルスベクターの注入12ヶ月後の網膜から採取した蛍光画像（図1H）および位相差画像（図1I）を示す。（図1B～1E）における画像は、ラット網膜の平坦なホール・マウントから採取した。（図1F～1I）における画像は、ラットの網膜の垂直スライス切片からとった。スケール・バー：（図1B）では200μm；（図1C）では100μm；（図1D）では15μm；（図1E）では50μm、図1Hおよび（図1I）では50μm；（図1F）および（図1G）では25μm。ONL：外核層；INL：内核層；IPL：内網状層；GCL。

【図2】図2A～2H。ChR2発現網膜神経細胞の光誘発電流（Light-Evoked Currents）の特性。（図2A）ウイルスベクター注射した眼から分離したGFP陽性網膜ニューロンの位相差画像（左）および蛍光画像（右）。スケール・バー：25μm。（図2B）420～580nmにまたがる波長の光刺激に対するChop2-GFP蛍光網膜細胞の記録。光強度は、 $1.0 \sim 1.6 \times 10^{18}$ 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ にまたがっていた。（図2C）460nmの波長で光刺激によって誘発される電流の代表的な記録であって光強度は、 $2.2 \times 10^{15} \sim 1.8 \times 10^{18}$ 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ におよぶ。（図2D）延長された時間スケールで示される図2C由来の光刺激の発現後の電流トレース。この線は、指数関数による1電流トレースのフィッティングを示す： $I(t) = a_0 + a_1 \times (1 - \exp[-t/\tau_1]) + a_2 \times (\exp[-t/\tau_2])$ 、ここで τ_1 および τ_2 はそれぞれ興奮伝達時間および不活化時間定数に相当する。（図2E）延長された時間スケールで示される図2C由来の光刺激の終了後の電流トレース。この線は、単一指数関数による1電流トレースのフィッティングを示す： $I(t) = a_0 + a_1 \times (1 - \exp[-t/\tau])$ 、ここで τ は不活化時間定数に相当する。（図2F）光強度応答曲線。データポイントは、単一ロジスティック関数曲線に適合した。（図2FおよびH）図2Dに示されるフィッティングから得られた光強度および興奮伝達時間定数（図2G）ならびに光強度および不活化時間定数（図2H）の関係。全ての記録は、-70mVという保持電位で作成した。図2F～2Hにおけるデータポイントは平均±SD（n=7）として示す。

【図3】図3A～3C。ChR2発現網膜神経細胞の光誘発電圧応答（Light-Evoked Voltage Responses）の特性。（図3A）GFP陽性スパイク非発射型神経細胞由来の代表的な記録。この電圧応答は、460nmの波長で4つの間欠的な光刺激によって誘発され、強度は、電流クランプにおいて $2.2 \times 10^{15} \sim 1.8 \times 10^{18}$ 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ におよぶ。破線は、飽和した電圧レベルを示す。（図3B）光刺激を繰り返すためのGFP陽性スパイク非発射型神経細胞からの代表的な記録。同じ細胞由来の光誘発性の電流（上のトレース）および電圧応答（下のトレース）を示した。左のパネルは、延長時間スケールにおける第一（赤）および第二（黒）の重ね合わせを示す。破線は、電流の保持成分（上）およびプラトーな膜電位（下）を示す。（図3C）反復される光刺激に対するGFP陽性スパイク発射型神経細胞由来の代表的な記録。図3Bおよび3Cにおける応答は、460nmの波長で、 1.8×10^{18} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の光によって誘発された。

10

20

30

40

50

【図 4】図 4 A～4 I。rdl / rdl マウスの網膜神経細胞における ChR2 の発現および光応答特性 (Light-Response Properties)。(図 4 A) 9 ヶ月齢で Chop2-GFP ウイルスベクターを注射した 15 月齢のマウスの平坦な網膜ホール・マウントで見られた Chop2-GFP 蛍光。(図 4 B) 3 ヶ月齢で Chop2-GFP ウイルスベクターの注射した 6 月齢のマウスの網膜由来の垂直切片で見られた Chop2-GFP 蛍光。(図 4 C) 出生後 1 日で Chop2-GFP ウイルスベクター注射された 5 月齢のマウス由来の半薄垂直網膜切片の光学顕微鏡画像。スケール・バー：(図 4 A) では 50 μm 、そして (図 4 B および 図 4 C) では 30 μm 。(図 4 D～4 E) は、一過性スパイク発射 (図 4 D) および持続性スパイク発射 (図 4 E) の GFP 陽性神経細胞の代表的な記録を示す。この応答は、460 nm の波長での 4 つの漸増的強度の光によって誘発された。中性密度 (Log = I) なしの光強度は、 3.6×10^{17} 光子 $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ であった。この電流は、-70 mV の保持電位で記録した。重ね合わせた第二 (黒塗り) および第四 (破線または赤い) の電流および電圧トレースを、延長時間スケールの右パネルに示す。(図 4 F～4 I) は、光の強度に対する、電流の振幅 (図 4 F)、膜脱分極 (図 4 G)、スパイクの数 (図 4 H)、および第一スパイクピークまでの時間 (図 4 I) の関係を示す。記録は、rdl / rdl マウスから、4 ヶ月以上の月齢で行った。データポイントは、平均 $\pm$ SE である (図 4 F～4 H では $n = 6$ 、図 4 I では $n = 4$)。

10

【図 5-1】図 5 A～5 D。rdl / rdl マウスの ChR2 発現網膜の多重電極アレイの記録。(図 5 A) rdl / rdl マウス (年齢 $\geq$ 4 ヶ月) の網膜由来の光誘発性スパイク活性のサンプル記録。この記録は、CNQX (25 μM) および AP5 (25 μM) の存在下で行った。突出した光誘発性スパイク活性が、58 電極のうち 49 で観察された (電極 15 は、アース付きで、電極 34 は不完全であった)。(図 5 B) 3 つの漸増光強度に対する単一電極から記録したサンプルの光誘発スパイク。(図 5 C) 単一の神経細胞に由来する、30 連続した光誘発性のスパイクのラスタ・プロット (raster plots)。(図 5 D) 平均したスパイク・頻度のヒストグラム。中性密度フィルターなしの光強度 (Log I = 0) は、 8.5×10^{17} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。図 5 A に示された応答は、中性密度フィルターなしの単一光パルスによって誘発された。

20

【図 5-2】図 5 A～5 D。rdl / rdl マウスの ChR2 発現網膜の多重電極アレイの記録。(図 5 A) rdl / rdl マウス (年齢 $\geq$ 4 ヶ月) の網膜由来の光誘発性スパイク活性のサンプル記録。この記録は、CNQX (25 μM) および AP5 (25 μM) の存在下で行った。突出した光誘発性スパイク活性が、58 電極のうち 49 で観察された (電極 15 は、アース付きで、電極 34 は不完全であった)。(図 5 B) 3 つの漸増光強度に対する単一電極から記録したサンプルの光誘発スパイク。(図 5 C) 単一の神経細胞に由来する、30 連続した光誘発性のスパイクのラスタ・プロット (raster plots)。(図 5 D) 平均したスパイク・頻度のヒストグラム。中性密度フィルターなしの光強度 (Log I = 0) は、 8.5×10^{17} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。図 5 A に示された応答は、中性密度フィルターなしの単一光パルスによって誘発された。

30

【図 6-1】図 6 A～6 E。rdl / rdl マウスの Chop2-GFP 発現網膜神経節細胞の中心射影および視覚誘発性電位。(図 6 A) 外側膝状体腹側核および外側膝状体背側核における網膜神経節細胞の GFP 標識末端分枝。(図 6 B) 上丘における網膜神経節細胞の GFP 標識末端分枝。OT：光学トラック (optical track)；vLGN：外側膝状体腹側核 (ventral lateral geniculate nucleus)；dLGN：外側膝状体背側核 (dorsal lateral geniculate nucleus)；SC：上丘 (superior colliculus)。スケール・バー (Scale bar)：図 6 A) では 200 μm 、図 6 B) では 100 μm 。(図 6 C) 野性型マウスから記録した VEP。この応答は、460 nm および 580 nm の両方の波長で観察された。(図 6 D) Chop2-GFP ウイルスベクターを注射した rdl / rdl マウスから記録した VEP。この応答は、460 nm の波長での光によってのみ誘発され、580 nm の波長では誘発されなかった。(図 6 E) G

40

50

F Pのみを担持するウイルスベクターを注射された r d l / r d l マウスからは検出可能な V E P は観察されなかった。460 および 580 nm の波長で角膜表面において測定された光強度は、それぞれ 5.5×10^{16} および 5.2×10^{16} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。(図 6 F) 420、460、500、520、および 540 nm の波長で種々の光強度に対する、Chop2-GFP ウイルスベクターを注射した r d l / r d l マウス由来の V E P の振幅のプロット。各々の眼については、その応答は、460 nm で得たピーク応答に対して正規化する。そのデータは、平均 $\pm$ S D (n = 3 つの眼) である。各々の波長でのスペクトル感度は、破線によって示される、正規化されたピーク応答の 40 % を生じる補間光強度の逆数として規定された。(図 6 G) 感度データポイントは、461 nm のピーク波長を用いてビタミン A₁ ベースの視物質テンプレートによってフィットさせた。

【図 6-2】図 6 A ~ 6 E。r d l / r d l マウスの Chop2-GFP 発現網膜神経節細胞の中心射影および視覚誘発性電位。(図 6 A) 外側膝状体腹側核および外側膝状体背側核における網膜神経節細胞の GFP 標識末端分枝。(図 6 B) 上丘における網膜神経節細胞の GFP 標識末端分枝。OT: 光学トラック (optical track); v L G N: 外側膝状体腹側核 (ventral lateral geniculate nucleus); d L G N: 外側膝状体背側核 (dorsal lateral geniculate nucleus); S C: 上丘 (superior colliculus)。スケール・バー (Scale bar): 図 6 A) では 200 μm 、図 6 B) では 100 μm 。(図 6 C) 野性型マウスから記録した V E P。この応答は、460 nm および 580 nm の両方の波長で観察された。(図 6 D) Chop2-GFP ウイルスベクターを注射した r d l / r d l マウスから記録した V E P。この応答は、460 nm の波長での光によってのみ誘発され、580 nm の波長では誘発されなかった。(図 6 E) G F P のみを担持するウイルスベクターを注射された r d l / r d l マウスからは検出可能な V E P は観察されなかった。460 および 580 nm の波長で角膜表面において測定された光強度は、それぞれ 5.5×10^{16} および 5.2×10^{16} 光子 $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。(図 6 F) 420、460、500、520、および 540 nm の波長で種々の光強度に対する、Chop2-GFP ウイルスベクターを注射した r d l / r d l マウス由来の V E P の振幅のプロット。各々の眼については、その応答は、460 nm で得たピーク応答に対して正規化する。そのデータは、平均 $\pm$ S D (n = 3 つの眼) である。各々の波長でのスペクトル感度は、破線によって示される、正規化されたピーク応答の 40 % を生じる補間光強度の逆数として規定された。(図 6 G) 感度データポイントは、461 nm のピーク波長を用いてビタミン A₁ ベースの視物質テンプレートによってフィットさせた。

【図 7】図 7 は、Chop2-GFP フラグメント、作動可能に連結されたハイブリッド CMV エンハンサー/ニワトリ β -アクチンプロモーター (CAG)、ウッドチャック転写後調節エレメント (woodchuck posttranscriptional regulatory element) (WPRE)、およびウシ成長ホルモン (BGH) ポリアデニル化配列を含む、ウイルス発現構築物 r A A V 2 - C A G - C h o p 2 - G F P - W P R E (配列番号 1) のマップを示す。

【図 8-1】図 8 (シート 1 ~ 3) は、Grm6 遺伝子の mGluR6 プロモーター領域の配列 (配列番号 9) (11023ヌクレオチド) を示す (GenBank No. BC041684)。このゲノム配列は、GenBank No. AL627215 に示される。

【図 8-2】図 8 (シート 1 ~ 3) は、Grm6 遺伝子の mGluR6 プロモーター領域の配列 (配列番号 9) (11023ヌクレオチド) を示す (GenBank No. BC041684)。このゲノム配列は、GenBank No. AL627215 に示される。

【図 8-3】図 8 (シート 1 ~ 3) は、Grm6 遺伝子の mGluR6 プロモーター領域の配列 (配列番号 9) (11023ヌクレオチド) を示す (GenBank No. BC

041684)。このゲノム配列は、GenBank No. AL627215に示される。

【図 1】

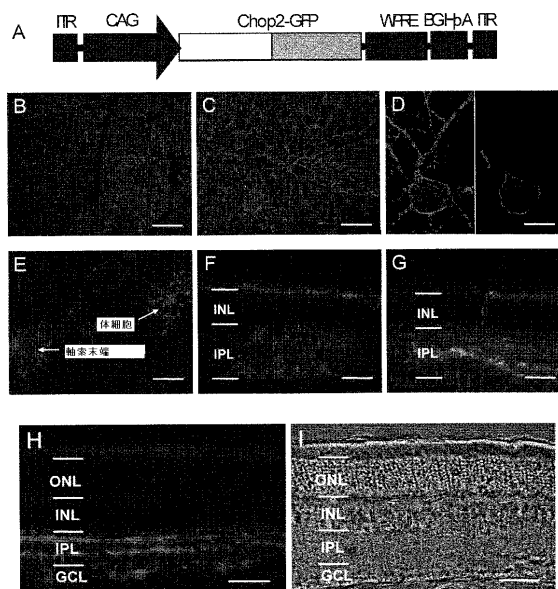


Fig. 1A – 1I

【図 2】

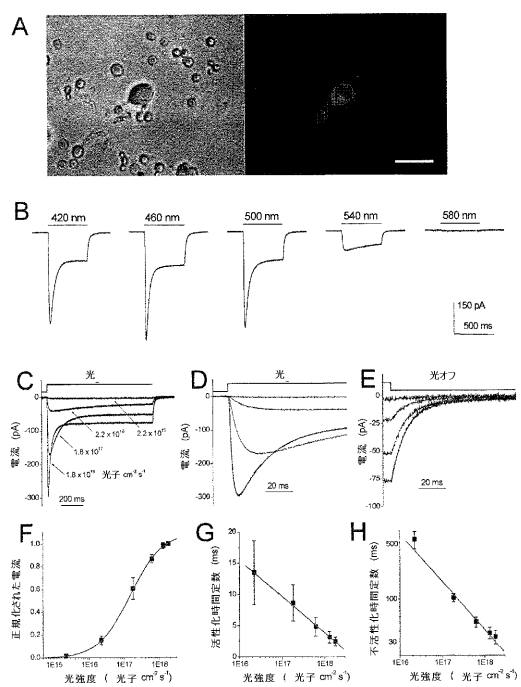


Fig. 2A – 2H

【図 3】

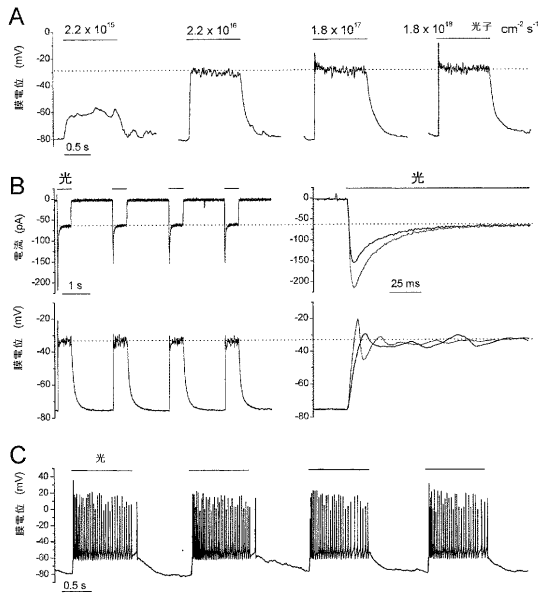


Fig. 3A - 3C

【図 4】

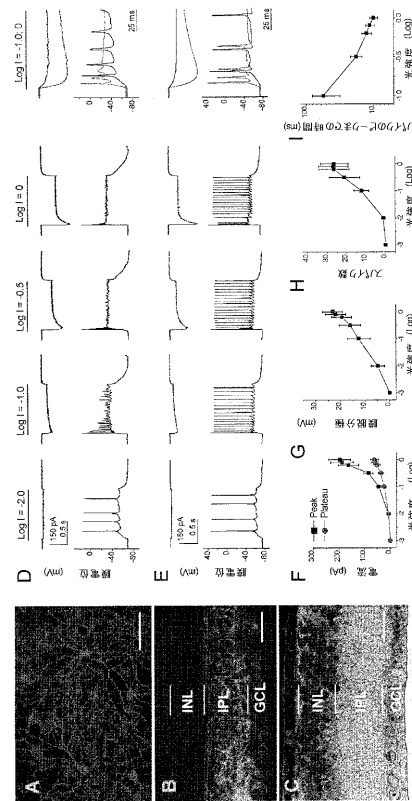


Fig. 4A - 4I

【図 5 - 1】

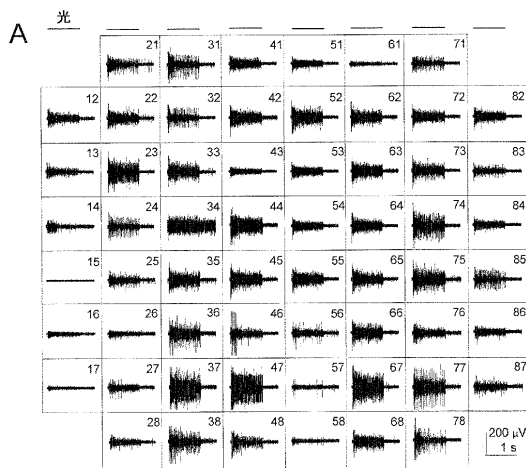


Fig. 5A

【図 5 - 2】

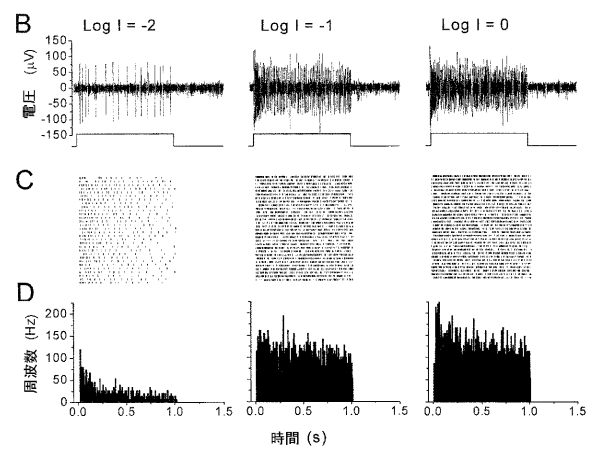


Fig. 5B - 5D

【図 6 - 1】

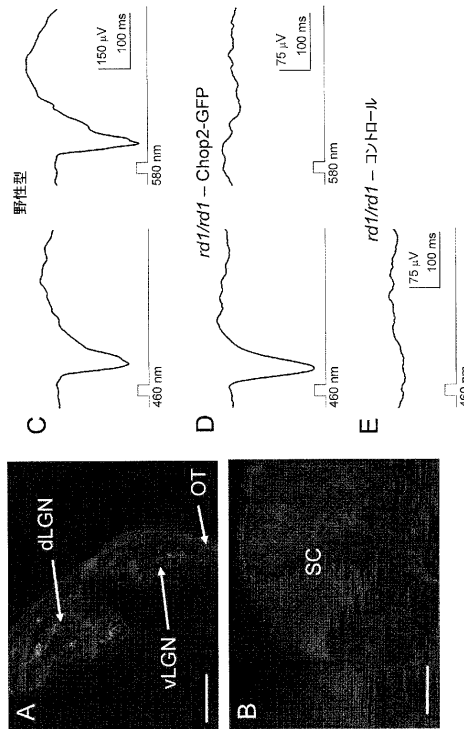


Fig. 6A - 6E

【図 6 - 2】

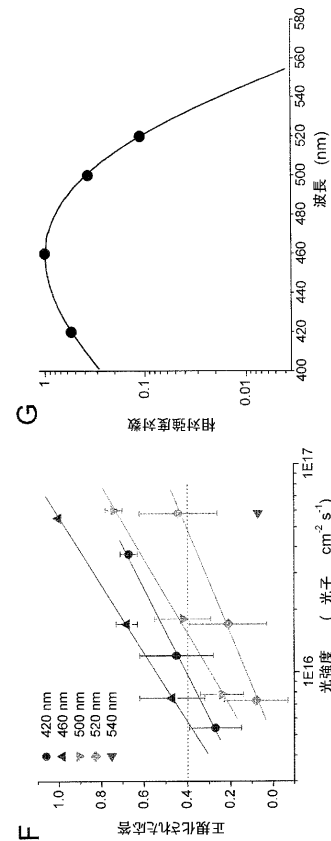


Fig. 6F - 6G

【図 7】

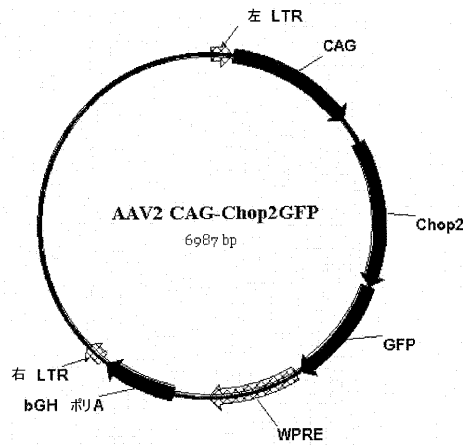


Fig. 7

【図 8 - 1】

FIG. 8/1
配列番号 9

TAGAAGTTAG	TCACCTCTTC	CTCATG6GCC	TTGCTCTCTG	GTCCAAAGTA	TTACCAAAAGT	60
CACCTTAAAT	AACAGAGACA	GACACACACA	CACCAAGCT	AGAACTAGCA	GCACCTAGCA	120
GAACCTCAAT	TACATTTTAG	AGAAAAGGG	GGTGAGGAC	AGCTCTCTGA	GAGGGAATGA	180
TATTAACACG	TTCTGGGCTC	CGTGCCGAGC	ATCGTTCTGC	TCCTTTCCAA	CAGTAAACCC	240
TTAGAGCAAA	GGCACAAGTG	GAATAAATGG	ACTGTGGAAT	TCAGTTTAA	TACTGTCCAC	300
CACCGAGAGC	TGACAGAAAC	TAAGTTTTCAC	CTCCAGGAT	GAAGGCTTAC	AGGCACTCTG	360
CTCAAGGCGC	ACTTGACATG	CTAACCTGAA	GCCGAGGCT	CTTTGACCG	CTGTTGGGCG	420
AGCAGAACCT	GGAGTCAGGG	CCCGAGGCCC	TCACACAGCAG	CTGAGGCTCT	TGCGTCTCTC	480
CGCCAGGCTC	TCAGCCTTGG	CCCGAGGCTT	CCCGGCGCTT	CCAGCTCTCG	CAGAAACCC	540
AGAAAGCTCA	ATGGCCAGAG	CGGTAAGAC	TAGGCTCAAC	TGCGGTGCG	CCGAGGCCAC	600
CTGCTTTCCA	CTGTGGACCT	CATTTCCAG	AAGGCACTGT	GACACTCTTA	CCCAAGCTGT	660
ATGCTGACAG	GTGGGACACA	GGGCCCTAAA	GACTGAGAT	CAACTTTTCA	GTGGCCACCA	720
GCCTTCAGGT	TTCTGTGACG	GCCTTCACTA	TAATTAACA	GGTAATCTA	CTAAGAGAGA	780
AAAGTGTAGT	GTGCATTAA	ATGTTGAAGA	ATAGGCTCT	GACTGCTTA	TTTCAGATAG	840
CGAAAGGACT	GTCTCTTCT	ATTTTAAAT	AGAAATTA	GCCTTTCTTA	GGTCAACAAA	900
GATACATAAC	ATACACAAT	TTTCATTTCT	GGCTCATACT	TTGTATTAAG	CAAAAACCTG	960
CCATATTAAGT	CATTACTCTG	ATGGACAAT	CAGATTTTCA	GGGGAAGCAA	ACAGGTAGAA	1020
ATAATTAAT	CATTGAGAT	ATGGAAGAT	TCTGTTTTT	ACAAAATTTT	TTTCTGTCT	1080
TTGCTCAGCT	TAAGAGTTCT	GAAGAATGAT	TATTCGGTCT	CAACAAGATA	CAAAATTAAT	1140
TCTCTAGGTA	GCAATTAACA	CAAGGAACGC	CTTGAGGTAT	GGGAGGGGTG	AGGAAGCTCA	1200
CAAGATAGAC	CTGTGTGCT	GGGAGGAGGA	CAGGCACTA	AGGTCTATAT	CACAGTGTCC	1260
CGGGAACCAA	CTGAAGGGC	TTTGTGCTTA	CAATGTGCG	AGAAATTTCT	CGTCAGAGGG	1320
CTCTGCAAG	GTCTGAAGT	CACGCACTC	TGTAAGTCT	TATCTGCTT	CTATTCTGT	1380
CAAAATATAC	CAGAAGGAAT	GGAACTACCC	CTCCAAAAA	ATAAATAAAC	AAACAAACCA	1440
CAAAACACAG	CACAGACAAA	GCAITTCATA	CACATGCTAA	ACACATACAC	TTTACTTTAA	1500
GGACTATAGT	GATTCCACAC	TAGGTAAAGT	GCCTTCTGTA	GGCTTTTAA	TAATAGTTTT	1560
GTCAAGCTAA	AGAAGATCTC	CAGATGGCTA	AACTTTTAAA	TCATGAATGA	AGTAGATATT	1620
ACCAAATTCG	TTTTTCAGCA	TCCATTTAGA	TAATCATGTT	TTTTGCTTT	AATCTGTTAA	1680
TGTAGTGAAT	TACAGAAATA	CATTCTCTAA	ATCATTACAT	CCCCCAATC	GTAAATCTGC	1740
TAAAGTACAT	TTCTGCTCTA	ACACAGACTG	GTGTGACAG	GTTTGTCTCT	GTCAAGTTGT	1800
GACTGTGGG	CTGGCTCTTC	CTACCCCTCT	GCCTTCTGTT	TTGGCTGAA	CAATTAATTT	1860
ATTTTATTTT	TTTAAATTTA	CTCAATATCA	ATTTCAATAT	GTGTGTGTC	ATTTCTCTCT	1920
ATTTGTGTAT	ATTTGTGAA	CAGAGAAAT	CTTTGCAAT	ATAACTGAGT	ATCATGGGTT	1980
AGTTTTTCT	TCAGTAGAG	GCCTTCAAGT	GGCTTTTCT	GCCTGAGTG	AGAGCAGCTC	2040
AATGCTGTGA	GCTGACACAG	CAGACTGCAA	TACAACTGT	TGTGTTTTAT	AAAAGATAA	2100
GGAGGAATGA	AATCTGTTTG	GTGGATGTGT	GGTCAGGTGT	GGGGAAGGG	GGTGCTCCA	2160
CGGGCCCATG	CTGAGGCTTT	CTTCCCTCT	GAAGGACAG	CCTCAGAGCA	GTATGTATTA	2220
GAATAGAGTT	TATTCAGGC	ATGAGGAGG	GAGTGTGAG	AAAGGAGAG	AGAGAGAGG	2280
AGAGAGAGAG	AGAGAGAGAG	AGAGATATA	TAGAGGAGTA	GAGGCTGACC	ATGAGCAGAG	2340
GGAGAGAGGG	GGAGAGGGGA	ATGGGGAGGG	AGAATAAGGA	ACAGGAGCAA	GAGAGCAAGA	2400
ACAAGAGAGA	CAGAGAGAGG	CAGCTGCTCC	CTGTTATAGT	GAGTCAGGCA	TACCTGGCTA	2460
TTGTCAGGTA	ACTGTGGGCG	GGATCCCAA	CTAATAGCCA	ACACAAACAG	AGAGGGGGA	2520
GATGTGTTTG	GTGTTCCTTC	GTCTCCCTCA	GCACACTGTG	TGTGCTGTT	CTCTGAAAA	2580
TGCTCTGGCC	ATTTCTTTTT	AACTCTCTCG	TGCTGAAGCT	GAACCCAGTT	GTGCAAGCGA	2640
GGCAGGAGCT	TACCTGTAGC	GCTAGATTTT	TACTTTTAAA	CCGGGATCTC	GCCTTGCATT	2700
AATGCCCTGC	CATCTCTACT	CTTAGAGCT	TAGTGTGTTG	TTTGTGTTT	ATCCCTCTCA	2760
CACCTCTAGT	TTTCTCTGTG	GAGTTTCA	CAAAAATTT	CAGCAGGAGC	ACCTCTTCTG	2820
GTCTCTTGAT	ATTACTGCTG	TTGTCAATTT	GACATTTGTT	TTGCTGCGG	CTCCAGCTAC	2880
TGTTCTTTCT	ACCTCCCAAG	CAACCAACT	CTGTTTCACT	CAGGTTTCTG	CCCATGCAAT	2940
ATCTACCTTG	CTGTGTATTC	AAGTGAATTT	CATATGAGAA	ATGTTGAAT	TTGGACCCAA	3000
CATCATATTA	CACCTCAAAA	TTCCCTCAAC	ATGGAATCAAC	GATCTAATAT	TTAGGCTAG	3060
AATCACAAAA	CACATAAAAT	AAAACAGGG	AGTGTTTAGT	GATGTCTTAG	TTATGGTTTC	3120
TATTTGCTGT	ATAAAGACT	GTGATTAATA	CAGCAGCAG	TGCGGTTAGG	CAGGTTAGGC	3180
AGGAAGGTT	CTTTTCAAG	TCAAAAGTT	ATAAGCTCA	GGCTTTTAC	CTTAACAAAG	3240
GAGTAAGAGC	AGGAACCTGA	GGCAGGAGCT	GATGCAGAGG	CCGAGAGGA	AGGAACCTGC	3300
TTACTGGCTT	GCTCTTGTG	GCTTGTCTCA	CCTACTTTCT	TGTTGACTCC	AGGACCACT	3360
GGCAAGGGCT	GGCACTCTCC	CTAGGGAGCT	GGACCTCTCC	ACTTCAATCA	TTAATCAAGA	3420
AAATGCCCA	CAGGGGACAT	TTTCAATTTG	GACTCTCTCT	TCTCAGAGGA	CTCTGTTTGT	3480
TTAACAAAAA	ACTAACAGG	CAGGTATATA	ATCTTCAATG	CTTTGGAATT	GCCTGTGGGA	3540
TCTCAGATGT	GCTATCCAAA	CACAAACAT	AAAAGAAAAA	TGCAATTTGA	ATCTTAACAA	3600
ATGTTTGTGA	TCTTAAGAT	TATGTATATA	TGAAGAAAGT	AAACGGATAA	CTCAGAGACA	3660
GGACAAAAA	TAACTTCAAG	GGCTTTACAC	AAATGAAGTCA	GGCTTTACAC	CTTAACAAAG	3720
AGACTGAGTC	TGTGGCTACA	TACCGTGGCA	CATATTACTA	CTAGAGCATG	GGATGCCCT	3780
GGTAACGGCA	ACTTCTGGGG	ACCACGTGGA	TGTCGGGGGA	CTGTGCTATA	CTTGTCCAC	3840

【図 8 - 2】

FIG. 8/2

配列番号 9

```
CCCTCACTGG ATGCGGCACT CTAGAGAGCT GCGCCATCT CTCACTATG GCGGCACTCT 3900
GGAGAGTGGG CCGGCGCAGCA CAGTGGAGCT GCTCTGGCT TCCGAGGGT TCCGAGGGT 3960
GCTCCAAAGG TGTGAAGTGT GGAAGCTTGA CCTGCGCACT TGTCTGCAT GGTAGACACA 4020
GGTGCGAGAT TGATACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACTGCC 4080
CCGCACTACT CCTGAAGTCA GAGACTAGTC CCACCCCTAC CAGCTACAGG TCTCAGAACA 4140
GTCCCGGGGAC CTGTGCTGGA GAGACACAGA GAACCTAACCT TGGTCTTGAG GGTGCAGGAA 4200
ACCACGCCCC AAGAGTGAAG GCTCGAAGAA GCTGGCTCCA TCATTGATCT GCTGTGAGGT 4260
GCCATGGGTG TGCAGGTGAT GCTCTCCCCA CCTCTCACT CCTCGCCACC TAAAGCAGTA 4320
GGGACGAGCT GTCCCCGAGG ACATCAGAGT GGGAGAGCTG GCTCTGCTCC TCACTGGCTG 4380
TAGAACTCAG AATGGGCGCT GCATCTTTGT TGGGAGGAC AATAGGCTG GCTTGTGG 4440
AGGAGAGAG GATGGGGGAG CCGAGAGGCT AGAGTGTAGG AAGAGTGACC CGACACTTGG 4500
TCTGGTGTGA GGTGGTGTGG ATGATGGGGC AATGCCCTCC CTGGGCCCCT CACTGCCTGA 4560
GGGACGACGG AGAACCTAAC CCAGGTCAT CAGAGCAGGT GAGCTGGCCC TGTCTCCACT 4620
GGGTGACACT GATGGGCGCT CCGAGAGGCT CCGCTGAATC TCTCTGGGAC AGCATAGTGG 4680
GGTAGAGGAG GCACGGGTGA ACTCCACCCC CCATCCCCCA CAGAGTTAAG AGCATGGGAG 4740
AGCTGGCCTT GCCACTTGTG TTGTGTGAGG TGGGTGCGGG GATTATGTTT TCTTCCCCA 4800
CCTCGAGTGG CTGGGAGAGT TGACCTTGA CCATGAGAGG GAGAGAGAGC TAATGGCCCC 4860
TGACTGACTT GTTGGGCGCT CCGAGAGGCT CCGCTGAATC ACAGTGGAGC 4920
TGCCCTGAT GGTGAAGAAT TGGGTGAGTT AGTCCAGAGG GTATGAGGT CTCGAAATG 4980
GCCACGCTCT TCACAGGCTG CAGCAGCTGG GAGAGCGCAC CCTGAACCTT GAATGATAG 5040
CTAGGTGGAG CGGCTCTGGA GGAATGGGTG CAAATGACCC ATCTCTGAGGG CAAAGAGCA 5100
GGAGTGTGA CTTGCGCTC TGGCAATGGA GGGAGGTATT GACTGGCTTA GCTGGAGAG 5160
TGCCTGGAGG TTTACTCTAG TGGTGTGGT AAGGGAGAGC TGGCAGCTG ACCAGCTCAG 5220
CTACTACCCA GGGCAAGATC TTGTGCTCTG CAGCAAGCTA CCTCAAAATC GATATCATCT 5280
GTGAACAGTT GACATCGATG AAAGGGGCACT CCTTGTCTAT CTAAGACTGC AGGCTCTCCA 5340
TGACACAGAG CAACACAGG ATAACCAGA GGGGTCTCAA TGAAGATCCA ATATTGATGG 5400
TATCACAGAA GCTAAAGACT TCAAACAGCA CGGTTGACTC ATTATAATGA ACACCTTACC 5460
TTCAAGTGA GATGTGTGGA CAGAGGGAAA TACTGTAGGA CACACTGTGA CACACTACAG 5520
TCTGTGTGGT GAGATGTTT CTATGCTTTG TTTTGTGTT GTTGTGGTGG GTGGTGGTGG 5580
TGGTGTGGT GGTGTGGTGG TGGTGAAGTG GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT 5640
GTGTATTATT TTGGGGGGAG GTTGTGAGGG TGAGAAATAG ATATGAGGAG ATGGGAGAT 5700
GAGCAGACAT GGGGTGCATG ATGTGGAAC CTCAAGAATC CAATAAAGTT TTTAAAACT 5760
CAGAAACTAA GCGGCGCGGT AGTGGCGCAC GCCTTTAACT CCAAGCACTG GAGGACAGAG 5820
CGAGGTGAT TTCTGAGTTC AAGCGAGGCT TGGTACAAA AGTGAGTTC AGGACAGCA 5880
GGGATACACA GAGAAACTGT GCTTTAAAAA AACAACAAAC AACAACAAAC ACGAGCAATC 5940
AAAACAATA AAAAAAATAA CCGCTCAGAA CTAGTTTAA AGCTTATCAA AGCAGACTCT 6000
ACTCGCTGTT TTACTGAATT TACTCAAGCT AAGTACTTTA GAGGAGAGAG AATCTCTCC 6060
TGAGCTGGA GTTCTATATA TACTGGACT TAAAAITCCC GAGAGTAAGA TATGAATCTT 6120
GGGCTGTAAA ATTATATTTA AACTAATATA TATTCAAAC AGTGAATTAT AGGGAATAAA 6180
AGAAAACCCC GTTTATATAG TCGTCTATTG AGCCTTAGTG AGCTATTTC CTGTTGCCA 6240
CCAGGCGACC CTGTGGTGGC AGCAGTGAGT ACCTTAGACT GCGCAAGTCA TCTTTGACA 6300
GCAGATTAC ATGGCGCTG AACCAAGAG CGTGTTTAAT GGTGCAGAGC TATATTGAAG 6360
GAGGCTTGGA TAGCTGGGTG TCAACAAGTG CTGATGGCTG ATTGTTTAA TACCCATCC 6420
TGTACATTTG AAAGGCTGCG AGTGTGCTTG GGCCTGGCAG AGGAGCGTAG CGGAAGACA 6480
GGTGTCAAA GCAGCAGTGG GATGAGGGAT GAGGTGATAG TTAGTCTCC CTGTCACTT 6540
ACTAGTTTGG AATCAACCTG GAGGACACTT GCTGAGTGA ACTGTGAGA GCTCTTAGG 6600
GAGGTTAAAC TGAGGGGGA ACACCCACCC TGAATGTGGC TGGCATATA ACTGAATGCA 6660
AACGGGAAG AAGAAACAA GCTGGCTGGG GAGCACAGA ATTCACTCT CTCTTCTTCC 6720
TGACTGTGGA CACCATGTGA CCAGTGACCT CAGACTTTT CACGACAAAC TTGCTGTGAT 6780
GGAAGACTGT GTTCTCTCA ACTGTGAGC AGATATGCC TTCTCTTGA TCACTGTCT 6840
TTGTCAAGTA TTTTGTGATA GCAATGAGAA ACATAACCCA ATGTGAGATT ACTTATGAC 6900
ACTTGTCTCA TACTGGTCCA CGGACGACCC TAAGGCTCT GTGGACAATC TCAATGACG 6960
ACATCTGCT TTTCACACCC TTGTGTGAGA GATGGTAGG AATGCTCAA CTCTCTGCC 7020
TACATGTCT CTAAAGCTGA GAGGTGGAC AGCACTCTTA GCACTCTAG TCAAGGGCA 7080
GAGGTTTAC CCATACATTG AACCTCAAA GGTATAGTCT TAAGTCTATT TGTGTGACA 7140
TGCTTGCACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CAGGTGCACG 7200
CTCCACACA GAAGCTCTGC TTGGTAGTTC TCTTCAAGT TCACCACTC TGGTCAAGC 7260
CCCTTAAGT GGTCTTCTC ACAGGATGA ACTGCTCTGG GTGTGACAA AGAAATGGA 7320
GGAATGGT TATATTCTG CTGCTTGCTC TCTCCACGAC TCATGTCCAG ATCTTCTGCT 7380
CCACCTTAAT CCACCTGAC TAATGACTGT AAGAGCCAT TAATCCCTGG AGGCTGGGG 7440
TCAGCAACTG TCTCCAAGAT GCTTCTGCTG TCCAGACATA GAGAGCTCAA TCTGTGCTC 7500
TGTGCAAT GATGGGAAAA TATCTTTGG TTGACACTT TCAACGGTGA AATCACTTCC 7560
AGAGAGTAG GAAACTCAGA AATGATGGT GAGGACACT GAGGCTCTCT GACCCACATG 7620
GGAGCTTCAG GGTGAACATA CCGCATCTTC CCCCCTCAA GGCAGTGGGT AGGCTGGTGT 7680
```

【図 8 - 3】

Fig. 8/3

配列番号 9

```
TTACACACAC TCTGAAATGC AAATCTAGTT GCTGACAAAG GCCAGCTGCA GAGCCTTAGG 7740
GCCATAGAGG AGCCAGTGCAT TTCTGAGGT GTCTATTGT CTGCTTCGAG ATGAGAGAT 7800
TCTCTGCAAG GCTTTGGTGT GTTTGCTGCT GCTGAAGTCT TGTTCAGCT TGTTCAGC 7860
CTTACCAAGG CTTCCTGCAT CTGTCTCTCA GATTCACTGT GCTGCGCAC CCTGCTGGC 7920
TCAGCTCTCA TCATCTGCA CTACGGGTT TGATTCAGAG AAAGTTGGGG TGGCTTTAT 7980
CGAGCTGCAT TAAAAAGAAC TACTAAATCT TGATAAGAT GCTCAGCTG TAAAGTGGC 8040
TGTCTGCAG ACTCAACAC TGTGTTGAGT CTTCAAGACC AACATGGTGA AAGGTGATG 8100
GTTATTTCTC TGCCGCTAGT GAAATGAGC AAGTTGGGAT ATGTTAAAG CAGGTTTAT 8160
GGGAAGCTG TCTTAGGTGA GTTCACAGAC CCGGAGGAT GAGGCGAGG CAGTTGCCAT 8220
GGGGGGAAGA GGGGAGGTGA GAGGAGATAG AAGCGAGAA AGGGGACCA GATGTCCGA 8280
CCCCAGAGC CAGTTATTTC AGGGGCTCTG AGGAGACCT TGCCTGAAAG AGAAACGGGC 8340
GGGAAATAG AGACAGACCA AGTAGATCCA TCAAGTCTG TTTATTGAGA GTAGGTTAC 8400
AGAAATAG AGCGAAGGAG GAAGGAAGTA AAGAGGGAA AACTTCCGC TGGCTCAGCC 8460
CGAGGCTGCA GGGGAGGTGA CCAACTGCC CGGGAAGTG CTATCTACT TTAGCTCAGC 8520
TGACATCTCT TGTTTTCA CAGAAAGTT GCAGATACTA TTTATGCTCC TTGATGTTGT 8580
TGACATCTCT TGTTTTCA GAGTATGCTG TCTCTCCAG GAGGAGCGG AACTTTGGCT 8640
TATGACTCAG TGTCACTCCC CAACATCTCT CAAAAGTCTC GAAGTTCTC ACGAAGGAG 8700
GGGAGCTTGT GCTTATGCT CATTGCGGT CTCCAGACA GAGAGAGAA AGAGAGACA 8760
GAGGAGAGC AGAAGAGAC CAAAATGCTT GGATCACATA GGAAGAACC TCTGGGAAA 8820
AGGCGACCCA GCCCTGGGCG TGGAAAGTTC AGGCTGGAG GCAAGGTATG TCAGGTAGGG 8880
ACTGGGGGAT GCTGGAGAT CCCTGAAGTC AGGTCTGCT TGAATGTCAA ACTATGCACC 8940
TTGTCCGAT CCAAAACCA AAGGAGAGA ACTAATCTC GCTGAGAGG CCACTGTGCG 9000
CATATCACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC 9060
AAAACCATGC ACGCTCGCAC ACGATAGATA ATACATACAC CAATATCTGA AAGAGAAAA 9120
GTTCTAGTGT GTACGAGAC AGAATGAAA CGGCAGGAG GCAAGAAAG TTGAGAAAG 9180
AGGGCTGGG GTAGGGAGAC ACTACAGGT GAAATAGCCA CGTTTGAGA ACCTTGAAG 9240
AGATACAGAA ATGCAGAAC CAGAGAGACC GAGACCAGAG CAGGCTCAGA TCTGGGACA 9300
GGCTTCTTGT AGGGGCTTTA GAAACACCTG TGTGCTTCC CGGAAGCTC GTGACCTAG 9360
AGAGGAAGCT TGTCTCCAG CACAGAGATGA CACAGTTTCA CAACTGTCT GACCACTTG 9420
CAGAGAGAC TGAACCCAC CACAGAGAC CACTTGGCTA TGCATGTCT TTTCTGTTA 9480
AACCTAAGTC TCTGAAGAC GACCAGGGA GTCCCTGAC TTCTTGTTC CTCTCTCGG 9540
GGTGGCGGGA CTGATTGTGT AAATCTCTTA TCTCAACTT TCACTCTTAT CTGCTCTTT 9600
AATCGGATA TTGAGGATGA GTGGCAAGC TTATTGGTGT TGTGGGTCA GACAAITTA 9660
AGGCACTGA GGGGAGAGC AGACCCAGC AGTCAGAGC GCAGAGAGC AAGAGAGCC 9720
TTCTCCACT CTCAAGCTCT GAGGGGGGTC TCTGCCCTCA CCTCATCCC TCTCCAGAT 9780
CCTTAAATCC TCTAGACTGT AGCTCTGATT TTACAGCTGT CACAGACTCG TCTCACTAGC 9840
CAGAGGTTG CTAGGTAG CACCACCTGG GAGGTAGCTT AGGCTGCCCT GGGGTGGGTC 9900
CAGAGAGA GCTGCCAGA ACTGTGGGG AAGGAGCGGG ACCGACATC AACAGGGGA 9960
CTTTTCAGG AGAATGAGG CAATCTCTG GAGGCTCGG AGAGGCTGCT GAGTGTCTG 10020
TGCGGAGTC ACCAACTTTT CCGCTGCTCT GGTGTCGG CAGAACTCC GAAGTGGCAG 10080
CTGAGCAGG GGTGGCAGCT TCGTCGCCA GCGGCGGGA TCC 11023
```

【手続補正書】

【提出日】平成21年1月20日(2009.1.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2009536219000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 07/68263
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 43/04; C12N 15/00 (2008.01) USPC - 514/44; 435/320.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 514/44; 435/320.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/455 (text search, see terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google/Scholar; PubMed (text search, see terms below) Search terms: Retina, adeno-associated virus, retinitis pigmentosa, macular degeneration, photoreceptor, rhodopsin, habituation, orientation, mobility, training, mGluR6, NK-3, neurokinin-3, Pep2, prosthesis, vector, promoter, retinal implant		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bi et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. Neuron, April 6, 2006, vol 50, pp 23-33, particularly Summary, (page 2, paras 2,5), (page 3, para 1), (page 4, para 3), (page 6, paras 2,3), (page 7, para 3), (page 9, para 1), (page 10, para 3).	1, 3-5, 7-8, 11, 13, 18-25, 28, 33-36
Y		9, 14-15, 17, 26, 29-30, 32, 37-40
Y	Ueda et al. The mGluR6 5' upstream transgene sequence directs a cell-specific and developmentally regulated expression in retinal rod and ON-type cone bipolar cells. Journal of Neuroscience, May 1, 1997, vol 17, pp 3014-3023, particularly Abstract.	9, 14-15, 17, 26, 29, 30, 32
Y	Casini et al. Developmental expression of neurokinin-1 and neurokinin-3 receptors in the rat retina. Journal of Comparative Neurology, May 29, 2000, vol 421, pp 275-287, particularly Abstract.	17, 32
Y	Veraart et al. Vision rehabilitation in the case of blindness. Expert Rev. Medical Devices, 2004, vol 1, pp 139-153, particularly (page 144, para 2), (page 147, paras 2, 3, 7).	37-40
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 March 2008 (25.03.2008)		Date of mailing of the international search report 15 MAY 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 07/68263

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 2, 6, 10, 12, 16, 27, 31
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The Applicant failed to provide a CRF in response to the ISA/225 mailed on 08 August 2007.
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 41
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

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

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 パン, チュオーホワ

アメリカ合衆国 ミシガン 48084, トロイ, ランサー ドライブ 2140

(72)発明者 ディズフーア, アレクサンダー エム.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19025, ドレッシャー, キャンプ ヒル アベニュー
927

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA02 DA02 EA02 FA02 FA06 GA11 HA17

4C084 AA13 BA44 CA53 DC50 NA14 ZA332

4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA33