

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】平成30年5月31日(2018.5.31)

【公表番号】特表2017-518738(P2017-518738A)  
 【公表日】平成29年7月13日(2017.7.13)  
 【年通号数】公開・登録公報2017-026  
 【出願番号】特願2016-564074(P2016-564074)  
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/0793 (2010.01)  
 G 0 1 N 33/50 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/15 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 Q 1/02  
 C 1 2 N 15/00 A  
 C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 N 5/0793  
 G 0 1 N 33/50 Z  
 G 0 1 N 33/15 Z

【手続補正書】

【提出日】平成30年4月13日(2018.4.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

てんかんを処置するための化合物をスクリーニングするための方法であって、  
 化合物を、てんかんの1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を有するニューロンを含む試料へと提示するステップであって、該ニューロンが、膜電位についての光レポーターおよび光依存性イオンチャネルを発現するステップと；

該化合物の提示の後で、該試料の光学的刺激に応答して該光レポーターにより発せられる光シグナルを、顕微鏡検査システムを介して受け取るステップと；

該光シグナルに基づき、該化合物を、てんかんを処置するための候補として同定するステップと  
 を含む方法。

【請求項2】

前記表現型特徴が、無病ニューロンと比較した電位依存性ナトリウムチャネル機能の減損および過剰興奮性からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記遺伝子型特徴が、SCN1A、WWOX、PRRT2、KCNC1、STXB1、CAR2、STXB1、KCNC2、CDKL5、ARX、SPTAN、BRAT1、KCNC3、SCN2A、GABA受容体、NIPA2、CDKL5、PCDH19、およびNAV1.1からなる群から選択される遺伝子における変異を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記顕微鏡検査システムが、前記光学的刺激をもたらすデジタル式マイクロミラーデバイスを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記顕微鏡検査システムが、前記ニューロンからの前記光シグナルを捕捉するように構成された電荷結合素子カメラをさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記ニューロンがまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ニューロンを、前記光依存性イオンチャネルを発現する第2のニューロンにより刺激する、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記第2のニューロンがまた、膜電位についての前記光レポーターも発現する、請求項7に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記光依存性イオンチャネルが、藻類チャンネルロドプシンを含み；  
細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質が、G C a M P バリエーションを含む、  
請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質が、j R C a M P 1 a、j R G E C O 1 a、および R C a M P 2 からなる群から選択される、請求項6に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記ニューロンが、h i P S C 由来のニューロンである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記ニューロンを前記化合物へと曝露したときの A P 波形の変化および前記細胞内カルシウムレベルの変化を検出するステップをさらに含む、請求項6に記載の方法。

**【請求項 13】**

複数のニューロンを、基材上の細胞培養物において、空間的にパターン化させるステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記化合物が、ラコサミドまたはレベチラセタムを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記同定するステップが、前記試料の前記光シグナルを、対照細胞から得られる光シグナルと比較することを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 16】**

膜電位についての前記光レポーターが、微生物型ロドプシンを含む、請求項1に記載の方法。

**【手続補正 2】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 2 2】

方法は、ニューロンを化合物へと曝露するステップと、化合物の A P 波形に対する効果を検出するステップとを含みうる。ニューロンは、化合物へと、異なる濃度で曝露することができる。ある特定の実施形態では、ニューロンはまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現し、方法は、ニューロンの化合物への曝露と関連する、細

胞内カルシウムレベルの変化を決定するステップを含む。本発明の方法は、電位またはニューロン活動に対する任意の効果を測定するステップを含みうる。さらに、 $Ca^{2+}$ の振幅および $Ca^{2+}$ スパークの存在も測定しうる。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

アルツハイマー病を処置するための化合物をスクリーニングするための方法であって、化合物を、アルツハイマー病の1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を有するニューロン細胞を含む試料へと提示するステップであって、該ニューロン細胞が、膜電位についての光レポーターおよび光依存性イオンチャネルを発現するステップと；

該化合物の提示の後で、該試料の光学的刺激に応答して該光レポーターにより発せられる光シグナルを、顕微鏡検査システムを介して受け取るステップと；

該光シグナルに基づき、該化合物を、アルツハイマー病を処置するための候補として同定するステップと

を含む方法。

(項目2)

前記表現型特徴が、アミロイド および過リン酸化タウタンパク質の細胞外沈着から選択される、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記遺伝子型特徴が、アミロイド前駆体タンパク質 (APP)、プレセニリン1 (PS1)、およびプレセニリン2 (PS2) からなる群から選択される遺伝子における変異を含む、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記顕微鏡検査システムが、前記光学的刺激をもたらすデジタル式マイクロミラーデバイスを含む、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記顕微鏡検査システムが、前記ニューロン細胞からの前記光シグナルを捕捉するように構成された電荷結合素子カメラをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記ニューロン細胞がまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記ニューロン細胞を、前記光依存性イオンチャネルを発現する第2のニューロン細胞により刺激する、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記第2のニューロン細胞がまた、膜電位についての前記光レポーターも発現する、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記光依存性イオンチャネルが、藻類チャネルロドプシンを含み；  
細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質が、GCaMPバリエーションを含む

項目6に記載の方法。

(項目10)

前記ニューロン細胞が、hiPSC由来のニューロンである、項目1に記載の方法。

(項目11)

前記ニューロン細胞を前記化合物へと曝露したときのAP波形の変化および前記細胞内カルシウムレベルの変化を検出するステップをさらに含む、項目6に記載の方法。

(項目12)

複数のニューロン細胞を、基材上の細胞培養物において、空間的にパターン化させるステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目13)

前記光シグナルを得るステップを、光学顕微鏡検査システムを使用して実施する、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記光学顕微鏡検査システムが、少なくとも 1 つのデジタル式マイクロミラーデバイスを含む、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記光シグナルを分析するステップが、前記化合物の A P 波形に対する効果を検出することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記細胞培養物を、 $\beta$ -アミロイド 1 ~ 4 2 ならびに前記化合物へと曝露するステップと、作用物質を有する前記化合物の前記ニューロンに対する効果を決定するステップとをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 7)

光遺伝学的アクチュエーターを発現する第 1 のニューロンと；

該第 1 のニューロンと電氣的に近接する第 2 のニューロンであって、活動についての遺伝子コード型光レポーターを発現する第 2 のニューロンと  
を含み、

該第 1 のニューロンまたは該第 2 のニューロンのうちの少なくとも 1 つが、アルツハイマー病の 1 または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を有する、  
細胞培養物。

(項目 1 8)

前記表現型特徴が、アミロイド および過リン酸化タウタンパク質の細胞外沈着から選択される、項目 1 7 に記載の細胞培養物。

(項目 1 9)

前記遺伝子型特徴が、アミロイド前駆体タンパク質 ( A P P )、プレセニン 1 ( P S 1 )、およびプレセニン 2 ( P S 2 ) からなる群から選択される遺伝子における変異を含む、項目 1 7 に記載の細胞培養物。

(項目 2 0)

前記光遺伝学的アクチュエーターが、チャンネルロドプシンを含む、項目 1 7 に記載の細胞培養物。

(項目 2 1)

活動についての前記遺伝子コード型光レポーターが、膜電位についての微生物型光レポーターを含む、項目 1 7 に記載の細胞培養物。

(項目 2 2)

前記第 2 のニューロンが、遺伝子コード型  $Ca^{++}$  インジケーターを発現する、項目 2 1 に記載の細胞培養物。

(項目 2 3)

前記遺伝子コード型  $Ca^{++}$  インジケーターが、G C a M P 6 f、j R C a M P 1 a、j R G E C O 1 a、および R C a M P 2 からなるリストから選択される少なくとも 1 つを含む、項目 2 2 に記載の細胞培養物。

(項目 2 4)

前記第 1 のニューロンが、前記第 2 のニューロンから空間的に分けられているが、該第 2 の運動ニューロンと電氣的に接触している、項目 1 7 に記載の細胞培養物。

(項目 2 5)

活動についての前記遺伝子コード型光レポーターが、膜電位についての微生物型光レポーターを含む、項目 2 4 に記載の細胞培養物。

(項目 2 6)

前記第 2 のニューロンが、遺伝子コード型  $Ca^{++}$  インジケーターを発現する、項目 2 5 に記載の細胞培養物。

(項目 2 7)

前記遺伝子コード型 C a + + インジケーターが、G C a M P 6 f、j R C a M P 1 a、j R G E C O 1 a、および R C a M P 2 からなるリストから選択される少なくとも1つを含む、項目 2 6 に記載の細胞培養物。

(項目 2 8)

自閉症を処置するための化合物をスクリーニングするための方法であって、化合物を、自閉症の1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を有するニューロンを含む試料へと提示するステップであって、該ニューロンが、膜電位についての光レポーターおよび光依存性イオンチャネルを発現するステップと；

該化合物の提示の後で、該試料の光学的刺激に応答して該光レポーターにより発せられる光シグナルを、顕微鏡検査システムを介して受け取るステップと；

該光シグナルに基づき、該化合物を、自閉症を処置するための候補として同定するステップと

を含む方法。

(項目 2 9)

前記表現型特徴が、無病ニューロンと比較した S H A N K 3 タンパク質の発現の低減、無病ニューロンと比較したシナプス機能の低下、無病ニューロンと比較した樹状突起棘の数の低減および長さの増大、ならびに無病ニューロンと比較したシナプス後肥厚部の厚さおよび長さの低減からなる群から選択される、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記遺伝子型特徴が、S H A N K 3、C D H 9、C D H 1 0、M A P K 3、S E R T、C A C N A 1 G、G A B R B 3、G A B R A 4、E N 2、3 q 2 5 ~ 2 7 遺伝子座、S L C 2 5 A 1 2、H O X A 1、H O X A 2、P R K C B 1、M E C P 2、U B E 3 A、N L G N 3、M E T、C N T N A P 2、F O X P 2、G S T P 1、P R L、P R L R、および O X T R からなる群から選択される遺伝子における変異を含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記顕微鏡検査システムが、前記光学的刺激をもたらすデジタル式マイクロミラーデバイスを含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記顕微鏡検査システムが、前記ニューロンからの前記光シグナルを捕捉するように構成された電荷結合素子カメラをさらに含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記ニューロンがまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記ニューロンを、前記光依存性イオンチャネルを発現する第2のニューロンにより刺激する、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記第2のニューロンがまた、膜電位についての前記光レポーターも発現する、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記光依存性イオンチャネルが、藻類チャネルロドプシンを含み；細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質が、G C a M P バリエーションを含む、

項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 7)

細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質が、j R C a M P 1 a、j R G E C O 1 a、および R C a M P 2 からなる群から選択される、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記ニューロンが、h i P S C 由来のニューロンである、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記ニューロンを前記化合物へと曝露したときのAP波形の変化および前記細胞内カルシウムレベルの変化を検出するステップをさらに含む、項目33に記載の方法。

(項目40)

複数のニューロンを、基材上の細胞培養物において、空間的にパターン化させるステップをさらに含む、項目28に記載の方法。

(項目41)

前記光依存性イオンチャンネルが、 $< 450\text{ nm}$ の波長で励起極大を有する青方偏移アクチュエーターを含み、前記細胞内カルシウムレベルの前記変化を報告する前記タンパク質が、端点を含む $520\text{ nm} \sim 570\text{ nm}$ の間で励起極大を有する赤方偏移カルシウムインジケーターを含む、項目33に記載の方法。

(項目42)

前記同定するステップが、前記試料の前記光シグナルを、対照細胞から得られる光シグナルと比較することを含む、項目28に記載の方法。

(項目43)

膜電位についての前記光レポーターが、微生物型ロドプシンを含む、項目28に記載の方法。

(項目44)

前記微生物型ロドプシンが、QuasAr1またはQuasAr2を含む、項目43に記載の方法。

(項目45)

前記微生物型ロドプシンを、前記ニューロンへと組み入れられた遺伝子から発現させる、項目43に記載の方法。

(項目46)

前記光依存性イオンチャンネルが、青方偏移アクチュエーターを含む、項目28に記載の方法。

(項目47)

前記青方偏移アクチュエーターが、TsChRまたはPsChRを含む、項目46に記載の方法。

(項目48)

光依存性イオンチャンネルを発現する第1のニューロンと；

該第1のニューロンと電氣的に近接する第2のニューロンであって、活動についての遺伝子コード型光レポーターを発現する第2のニューロンと  
を含み、

該第1のニューロンまたは該第2のニューロンのうちの少なくとも1つが、自閉症の1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を含む、  
細胞培養物。

(項目49)

前記表現型特徴が、無病ニューロンと比較したSHANK3タンパク質の発現の低減、無病ニューロンと比較したシナプス機能の低下、無病ニューロンと比較した樹状突起棘の数の低減および長さの増大、ならびに無病ニューロンと比較したシナプス後肥厚部の厚さおよび長さの低減からなる群から選択される、項目48に記載の細胞培養物。

(項目50)

前記遺伝子型特徴が、SHANK3、CDH9、CDH10、MAPK3、SERT、CACNA1G、GABRB3、GABRA4、EN2、3q25~27遺伝子座、SLC25A12、HOXA1、HOXA2、PRKCB1、MECP2、UBE3A、NLGN3、MET、CNTNAP2、FOXP2、GSTP1、PRL、PRLR、およびOXTRからなる群から選択される遺伝子における変異を含む、項目48に記載の細胞培養物。

(項目51)

前記光依存性イオンチャンネルが、チャンネルロドプシンを含む、項目48に記載の細胞培

養物。

(項目52)

前記第2のニューロンが、遺伝子コード型Ca<sup>++</sup>インジケータを発現する、項目48に記載の細胞培養物。

(項目53)

てんかんを処置するための化合物をスクリーニングするための方法であって、化合物を、てんかんの1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を有するニューロンを含む試料へと提示するステップであって、該ニューロンが、膜電位についての光レポーターおよび光依存性イオンチャネルを発現するステップと；

該化合物の提示の後で、該試料の光学的刺激に応答して該光レポーターにより発せられる光シグナルを、顕微鏡検査システムを介して受け取るステップと；

該光シグナルに基づき、該化合物を、てんかんを処置するための候補として同定するステップと

を含む方法。

(項目54)

前記表現型特徴が、無病ニューロンと比較した電位依存性ナトリウムチャネル機能の減損および過剰興奮性からなる群から選択される、項目53に記載の方法。

(項目55)

前記遺伝子型特徴が、SCN1A、WWOX、PRRT2、KCNC1、STXB1、CARP2、STXB1、KCNQ2、CDKL5、ARX、SPTAN、BRAT1、KCNQ3、SCN2A、GABA受容体、NIPA2、CDKL5、PCDH19、およびNAV1.1からなる群から選択される遺伝子における変異を含む、項目53に記載の方法。

(項目56)

前記顕微鏡検査システムが、前記光学的刺激をもたらすデジタル式マイクロミラーデバイスを含む、項目53に記載の方法。

(項目57)

前記顕微鏡検査システムが、前記ニューロンからの前記光シグナルを捕捉するように構成された電荷結合素子カメラをさらに含む、項目53に記載の方法。

(項目58)

前記ニューロンがまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目53に記載の方法。

(項目59)

前記ニューロンを、前記光依存性イオンチャネルを発現する第2のニューロンにより刺激する、項目58に記載の方法。

(項目60)

前記第2のニューロンがまた、膜電位についての前記光レポーターも発現する、項目59に記載の方法。

(項目61)

前記光依存性イオンチャネルが、藻類チャネルロドプシンを含み；細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質が、GCAMPバリエントを含む

、項目60に記載の方法。

(項目62)

細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質が、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなる群から選択される、項目58に記載の方法。

(項目63)

前記ニューロンが、hiPSC由来のニューロンである、項目53に記載の方法。

(項目64)

前記ニューロンを前記化合物へと曝露したときのAP波形の変化および前記細胞内カル

シウムレベルの変化を検出するステップをさらに含む、項目58に記載の方法。

(項目65)

複数のニューロンを、基材上の細胞培養物において、空間的にパターン化させるステップをさらに含む、項目53に記載の方法。

(項目66)

前記化合物が、ラコサミドまたはレベチラセタムを含む、項目53に記載の方法。

(項目67)

前記同定するステップが、前記試料の前記光シグナルを、対照細胞から得られる光シグナルと比較することを含む、項目53に記載の方法。

(項目68)

膜電位についての前記光レポーターが、微生物型ロドプシンを含む、項目53に記載の方法。

(項目69)

前記微生物型ロドプシンが、QuasAr1またはQuasAr2を含む、項目68に記載の方法。

(項目70)

前記微生物型ロドプシンを、前記ニューロンへと組み入れられた遺伝子から発現させる、項目68に記載の方法。

(項目71)

前記光依存性イオンチャネルが、青方偏移アクチュエーターを含む、項目53に記載の方法。

(項目72)

前記青方偏移アクチュエーターが、TsChRまたはPsChRを含む、項目71に記載の方法。

(項目73)

前記光依存性イオンチャネルが、 $< 450\text{ nm}$ の波長で励起極大を有する青方偏移アクチュエーターを含み、前記細胞内カルシウムレベルの前記変化を報告する前記タンパク質が、端点を含む $520\text{ nm} \sim 570\text{ nm}$ の間で励起極大を有する赤方偏移カルシウムインジケーターを含む、項目58に記載の方法。

(項目74)

光依存性イオンチャネルを発現する第1のニューロンと；

該第1のニューロンと電氣的に近接する第2のニューロンであって、活動についての遺伝子コード型光レポーターを発現する第2のニューロンとを含む、

該第1のニューロンまたは該第2のニューロンのうちの少なくとも1つが、てんかんの1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を含む、細胞培養物。

(項目75)

前記表現型特徴が、無病ニューロンと比較した電位依存性ナトリウムチャネル機能の減損および過剰興奮性からなる群から選択される、項目74に記載の細胞培養物。

(項目76)

前記遺伝子型特徴が、SCN1A、WWOX、PRRT2、KCNC1、STXB1、CARS2、STXB1、KCNQ2、CDKL5、ARX、SPTAN、BRAT1、KCNQ3、SCN2A、GABA受容体、NIPA2、CDKL5、PCDH19、およびNAV1.1からなる群から選択される遺伝子における変異を含む、項目74に記載の細胞培養物。

(項目77)

前記光依存性イオンチャネルが、チャネルロドプシンを含む、項目74に記載の細胞培養物。

(項目78)



前記第2のニューロンが、遺伝子コード型Ca<sup>++</sup>インジケーターを発現する、項目74に記載の細胞培養物。

(項目79)

前記遺伝子コード型Ca<sup>++</sup>インジケーターが、GCaMP6f、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなるリストから選択される少なくとも1つを含む、項目78に記載の細胞培養物。

(項目80)

前記第1のニューロンが、前記第2のニューロンから空間的に分けられ、かつ、該第2の運動ニューロンと電氣的に接触している、項目74に記載の細胞培養物。

(項目81)

結節性硬化症を処置するための化合物をスクリーニングするための方法であって、化合物を、結節性硬化症の1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を有するニューロンを含む試料へと提示するステップであって、該ニューロンが、膜電位についての光レポーターおよび光依存性イオンチャネルを発現するステップと；

該化合物の提示の後で、該試料の光学的刺激に応答して該光レポーターにより発せられる光シグナルを、顕微鏡検査システムを介して受け取るステップと；

該光シグナルに基づき、該化合物を、結節性硬化症を処置するための候補として同定するステップと

を含む方法。

(項目82)

前記表現型特徴が、無病ニューロンと比較したサイズの肥大、ホスホ-S6発現の増大、顕著なリソソーム、無病ニューロンと比較したより多いマイクロフィラメントおよび微小管、無病ニューロンと比較したより少ないリポフスチン顆粒、およびTSC2遺伝子産物、ツベリン、ピメンチン、またはグリア線維性酸性タンパク質に対する免疫反応性からなる群から選択される、項目81に記載の方法。

(項目83)

前記遺伝子型特徴が、TSC1またはTSC2からなる群から選択される遺伝子における変異を含む、項目81に記載の方法。

(項目84)

前記顕微鏡検査システムが、前記光学的刺激をもたらすデジタル式マイクロミラーデバイスを含む、項目81に記載の方法。

(項目85)

前記顕微鏡検査システムが、前記ニューロンからの前記光シグナルを捕捉するように構成された電荷結合素子カメラをさらに含む、項目81に記載の方法。

(項目86)

前記ニューロンがまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目81に記載の方法。

(項目87)

前記ニューロンを、前記光依存性イオンチャネルを発現する第2のニューロンにより刺激する、項目86に記載の方法。

(項目88)

前記第2のニューロンがまた、膜電位についての前記光レポーターも発現する、項目87に記載の方法。

(項目89)

前記光依存性イオンチャネルが、藻類チャネルロドプシンを含み；細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質が、GCaMPバリエーションを含む

、項目88に記載の方法。

(項目90)

細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質が、jRCaMP1a、jR

G E C O 1 a、および R C a M P 2 からなる群から選択される、項目 8 6 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記ニューロンが、h i P S C 由来のニューロンである、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 2)

前記ニューロンを前記化合物へと曝露したときの A P 波形の変化および前記細胞内カルシウムレベルの変化を検出するステップをさらに含む、項目 8 6 に記載の方法。

(項目 9 3)

複数のニューロンを、基材上の細胞培養物において、空間的にパターン化させるステップをさらに含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 4)

前記光依存性イオンチャンネルが、 $< 450\text{ nm}$ の波長で励起極大を有する青方偏移アクチュエーターを含み、前記細胞内カルシウムレベルの前記変化を報告する前記タンパク質が、端点を含む $520\text{ nm} \sim 570\text{ nm}$ の間で励起極大を有する赤方偏移カルシウムインジケーターを含む、項目 8 6 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記同定するステップが、前記試料の前記光シグナルを、対照細胞から得られる光シグナルと比較することを含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 6)

膜電位についての前記光レポーターが、微生物型ロドプシンを含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記微生物型ロドプシンが、Q u a s A r 1 または Q u a s A r 2 を含む、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 9 8)

前記微生物型ロドプシンを、前記ニューロンへと組み入れられた遺伝子から発現させる、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 9 9)

前記光依存性イオンチャンネルが、青方偏移アクチュエーターを含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 1 0 0)

化合物の神経学的状態に対する効果を決定するための方法であって、

化合物を、複数のニューロンを含む試料へと提示するステップであって、該複数のニューロンのうちの少なくとも1つが、膜電位についての光レポーターを発現するステップと

;  
該化合物の提示の後で、該試料中の光依存性イオンチャンネルの光学的刺激に応答して該光レポーターにより発せられる光シグナルを、顕微鏡検査システムを介して受け取るステップと;

該光シグナルに基づき、該化合物を、該神経学的状態を処置するための候補として同定するステップと  
を含む方法。

(項目 1 0 1)

前記光依存性イオンチャンネルが、前記複数のニューロンのうちの前記少なくとも1つとシナプス連絡した第2のニューロンによって発現される藻類チャンネルロドプシンを含み、膜電位についての前記光レポーターが、微生物型ロドプシンの野生型形態と比べて1~10の間のアミノ酸置換を有する微生物型ロドプシンを含む、項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 2)

前記複数のニューロンのうちの前記少なくとも1つがまた、細胞内カルシウムレベルについての遺伝子コード型インジケーターも発現し、

前記受け取られた光シグナルが、細胞内カルシウムレベルについての該遺伝子コード型インジケーターからのシグナルを含み、さらに、前記神経学的状態が、自閉症、てんかん

、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、および結節性硬化症のうちの1つである、  
項目101に記載の方法。

(項目103)

光依存性イオンチャネルを発現する第1のニューロンと；

該第1のニューロンと電氣的に近接する第2のニューロンであって、活動についての遺  
伝子コード型光レポーターを発現する第2のニューロンと

を含み、

該第1のニューロンまたは該第2のニューロンのうちの少なくとも1つが、結節性硬化  
症の1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を含む、

細胞培養物。

(項目104)

前記表現型特徴が、無病ニューロンと比較したサイズの肥大、ホスホ-S6発現の増大  
、顕著なリソソーム、無病ニューロンと比較したより多いマイクロフィラメントおよび微  
小管、無病ニューロンと比較したより少ないリポフスチン顆粒、およびTSC2遺伝子産  
物、ツベリン、ピメンチン、またはグリア線維性酸性タンパク質に対する免疫反応性から  
なる群から選択される、項目103に記載の細胞培養物。

(項目105)

前記遺伝子型特徴が、TSC1またはTSC2からなる群から選択される遺伝子におけ  
る変異を含む、項目103に記載の細胞培養物。

(項目106)

前記光依存性イオンチャネルが、チャンネルロドプシンを含む、項目103に記載の細胞  
培養物。

(項目107)

前記第2のニューロンが、遺伝子コード型Ca<sup>++</sup>インジケーターを発現する、項目1  
03に記載の細胞培養物。

(項目108)

前記遺伝子コード型Ca<sup>++</sup>インジケーターが、GCAMP6f、jRCaMP1a、  
jRGECO1a、およびRCaMP2からなるリストから選択される少なくとも1つを  
含む、項目107に記載の細胞培養物。

(項目109)

前記第1のニューロンが、前記第2のニューロンから空間的に分けられ、かつ、該第2  
の運動ニューロンと電氣的に接触している、項目103に記載の細胞培養物。

(項目110)

ALSを処置するための化合物をスクリーニングするための方法であって、

化合物を、ALSの1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を有する運動ニュー  
ロンを含む試料へと提示するステップであって、該運動ニューロンが、膜電位についての  
光レポーターおよび光依存性イオンチャネルを発現するステップと；

該化合物の提示の後で、該試料の光学的刺激に応答して該光レポーターにより発せられ  
る光シグナルを、顕微鏡検査システムを介して受け取るステップと；

該光シグナルに基づき、該化合物を、ALSを処置するための候補として同定するステ  
ップと

を含む方法。

(項目111)

前記表現型特徴が、プニナ小体、レビー小体様封入体(LBI)、スケイン様封入体(  
SLI)の存在、変性の徴候、神経突起の短縮または非存在、細胞体の空胞化、核の断片  
化、および切断型カスパーゼ3からなる群から選択される、項目110に記載の方法。

(項目112)

前記遺伝子型特徴が、C9orf72、SOD1、TARDBP、FUS、UBQL2  
、ALS2、およびSETXからなる群から選択される遺伝子における変異を含む、項目  
110に記載の方法。

(項目113)

前記顕微鏡検査システムが、前記光学的刺激をもたらすデジタル式マイクロミラーデバイスを含む、項目110に記載の方法。

(項目114)

前記顕微鏡検査システムが、前記運動ニューロンからの前記光シグナルを捕捉するように構成された電荷結合素子カメラをさらに含む、項目110に記載の方法。

(項目115)

前記運動ニューロンがまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目110に記載の方法。

(項目116)

前記運動ニューロンを、前記光依存性イオンチャネルを発現する第2のニューロンにより刺激する、項目115に記載の方法。

(項目117)

前記第2のニューロンがまた、膜電位についての前記光レポーターも発現する、項目116に記載の方法。

(項目118)

前記光依存性イオンチャネルが、藻類チャネルロドプシンを含み；  
細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質が、GCaMPバリエーションを含む

、  
項目117に記載の方法。

(項目119)

細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質が、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなる群から選択される、項目115に記載の方法

(項目120)

前記運動ニューロンが、hiPSC由来の運動ニューロンである、項目110に記載の方法。

(項目121)

前記運動ニューロンを前記化合物へと曝露したときのAP波形の変化および前記細胞内カルシウムレベルの変化を検出するステップをさらに含む、項目115に記載の方法。

(項目122)

複数のニューロンを、基材上の細胞培養物において、空間的にパターン化させるステップをさらに含む、項目110に記載の方法。

(項目123)

前記光依存性イオンチャネルが、 $< 450\text{ nm}$ の波長で励起極大を有する青方偏移アクチュエーターを含み、前記細胞内カルシウムレベルの前記変化を報告する前記タンパク質が、端点を含む $520\text{ nm} \sim 570\text{ nm}$ の間で励起極大を有する赤方偏移カルシウムインジケーターを含む、項目115に記載の方法。

(項目124)

前記同定するステップが、前記試料の前記光シグナルを、対照細胞から得られる光シグナルと比較することを含む、項目110に記載の方法。

(項目125)

膜電位についての前記光レポーターが、微生物型ロドプシンを含む、項目110に記載の方法。

(項目126)

前記微生物型ロドプシンが、QuasAr1またはQuasAr2を含む、項目125に記載の方法。

(項目127)

前記微生物型ロドプシンを、前記運動ニューロンへと組み入れられた遺伝子から発現させる、項目125に記載の方法。

(項目128)

前記光依存性イオンチャンネルが、青方偏移アクチュエーターを含む、項目110に記載の方法。

(項目129)

前記青方偏移アクチュエーターが、TsChRまたはPsChRを含む、項目128に記載の方法。

(項目130)

光依存性イオンチャンネルを発現する第1の運動ニューロンと；  
該第1のニューロンと電氣的に近接する第2のニューロンであって、活動についての遺伝子コード型光レポーターを発現する第2のニューロンと

を含み、

前記第1の運動ニューロンまたは前記第2の運動ニューロンのうちの少なくとも1つが、ALSの1または複数の表現型特徴または遺伝子型特徴を含む、細胞培養物。

(項目131)

前記表現型特徴が、プナ小体、レビー小体様封入体(LBI)、スケイン様封入体(SLI)、変性の徴候、神経突起の短縮または非存在、細胞体の空胞化、核の断片化、および切断型カスパーゼ3からなる群から選択される、項目130に記載の細胞培養物。

(項目132)

前記遺伝子型特徴が、C9orf72、SOD1、TARDBP、FUS、UBQL2、ALS2、およびSETXからなる群から選択される遺伝子における変異を含む、項目130に記載の細胞培養物。

(項目133)

前記光依存性イオンチャンネルが、チャンネルロドプシンを含む、項目130に記載の細胞培養物。

(項目134)

前記第2の運動ニューロンが、遺伝子コード型Ca<sup>++</sup>インジケーターを発現する、項目130に記載の細胞培養物。

(項目135)

前記遺伝子コード型Ca<sup>++</sup>インジケーターが、GCaMP6f、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなるリストから選択される少なくとも1つを含む、項目134に記載の細胞培養物。

(項目136)

前記第1の運動ニューロンが、前記第2の運動ニューロンから空間的に分けられ、かつ、該第2の運動ニューロンと電氣的に接触している、項目130に記載の細胞培養物。

(項目137)

イオンチャンネルモジュレーターをスクリーニングするための方法であって、  
化合物を、電気興奮性細胞を含む試料へと提示するステップであって、該電気興奮性細胞が、膜電位についての光レポーターとして発現するステップと；

該化合物の提示の後で、該試料の光学的刺激に应答して該光レポーターにより発せられる光シグナルを、検出システムを介して受け取るステップと；

該光シグナルを分析して、該化合物の該電気興奮性細胞に対する効果を決定するステップと

を含む方法。

(項目138)

前記光シグナルを分析して、前記化合物の前記電気興奮性細胞に対する効果を決定するステップが、該化合物がイオンチャンネルモジュレーターとして機能することを決定することを含む、項目137に記載の方法。

(項目139)

前記化合物のイオンチャンネルモジュレーション効果を定量するステップをさらに含む、

項目 1 3 7 に記載の方法。

( 項目 1 4 0 )

前記ステップを、少なくとも 9 0 の細胞培養物に対して並列的に実施することをさらに含む、項目 1 3 7 に記載の方法。

( 項目 1 4 1 )

前記電気興奮性細胞が、哺乳動物ニューロンである、項目 1 3 7 に記載の方法。

( 項目 1 4 2 )

前記ニューロンがまた、光依存性イオンチャネルも発現する、項目 1 4 1 に記載の方法

。

( 項目 1 4 3 )

前記ニューロンがまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目 1 4 1 に記載の方法。

( 項目 1 4 4 )

前記ニューロンがまた、光依存性イオンチャネルも発現し、細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質、光依存性イオンチャネル、および膜電位についての前記光レポーターの各々が、微生物型ロドプシンによりもたらされる、項目 1 4 3 に記載の方法。

( 項目 1 4 5 )

前記電気興奮性細胞が、哺乳動物ニューロンであり、光依存性イオンチャネルを発現する第 2 の電気興奮性細胞により刺激される、項目 1 3 7 に記載の方法。

( 項目 1 4 6 )

前記哺乳動物ニューロンがまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目 1 4 5 に記載の方法。

( 項目 1 4 7 )

前記光依存性イオンチャネルが、藻類チャネルロドプシンを含み；

細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質が、G C a M P バリエーション

。

項目 1 4 6 に記載の方法。

( 項目 1 4 8 )

前記哺乳動物ニューロンが、h i P S C 由来のニューロンである、項目 1 4 1 に記載の方法。

( 項目 1 4 9 )

前記ニューロンを前記化合物へと曝露したときの A P 波形の変化および前記細胞内カルシウムレベルの変化を検出するステップをさらに含む、項目 1 4 3 に記載の方法。

( 項目 1 5 0 )

複数のニューロンを、基材上の細胞培養物において、空間的にパターン化させるステップをさらに含む、項目 1 3 7 に記載の方法。

( 項目 1 5 1 )

前記光シグナルを得るステップを、光学顕微鏡検査システムを使用して実施する、項目 1 3 7 に記載の方法。

( 項目 1 5 2 )

前記光学顕微鏡検査システムが、前記細胞培養物を照射するのに使用される光を空間的にパターン化させるために使用される少なくとも 1 つのデジタル式マイクロミラーデバイスを含む、項目 1 5 1 に記載の方法。

( 項目 1 5 3 )

前記光シグナルを分析するステップが、前記化合物の A P 波形に対する効果を検出することを含む、項目 1 3 7 に記載の方法。

( 項目 1 5 4 )

電氣的に活性な細胞を用意するステップと；

該電氣的に活性な細胞へと、光活性化因子と、電気活動についての光レポーターとを組

み込むステップと；

該細胞を、少なくとも1つの化合物へと曝露するステップと；

該細胞の光学的刺激に応答して該光レポーターにより発せられるシグネチャーを得るステップと；

該得られたシグネチャーに基づき、該少なくとも1つの化合物の細胞表現型に対する効果を同定するステップと

を含む化合物スクリーニング法。

(項目155)

複数の前記電氣的に活性な細胞を、複数の異なる化合物へと曝露する、項目154に記載の方法。

(項目156)

前記効果が、細胞の活動を表す、項目155に記載の方法。

(項目157)

前記電氣的に活性な細胞の各々に、前記光活性化因子および前記電気活動についての光レポーターの両方を発現させる、項目154に記載の方法。

(項目158)

前記組み込むステップが、前記電氣的に活性な細胞を、前記光活性化因子および前記電気活動についての光レポーターをコードする核酸を含むベクターで形質転換することを含む、項目154に記載の方法。

(項目159)

前記電氣的に活性な細胞が、ニューロン、心筋細胞、およびグリア細胞からなる群から選択される、項目154に記載の方法。

(項目160)

前記光活性化因子が、前記光学的刺激に応答して、活動電位を惹起する、項目154に記載の方法。

(項目161)

前記細胞の前記刺激が、前記光活性化因子を照射することを含む、項目160に記載の方法。

(項目162)

前記細胞を前記用意するステップが、多能性幹細胞を、前記電氣的に活性な細胞へと転換することを含む、項目154に記載の方法。

(項目163)

前記同定するステップが、電気シグネチャーを、対照細胞から得られる対照シグネチャーと比較することを含む、項目154に記載の方法。

(項目164)

対照細胞と前記電氣的に活性な細胞とが、該電氣的に活性な細胞における変異を除き同系となるように、該電氣的に活性な細胞のゲノムを編集して、該対照細胞を作製するステップをさらに含む、項目154に記載の方法。

(項目165)

前記得るステップが、細胞のクラスターを顕微鏡で観察すること、およびコンピュータを使用して、前記光レポーターにより発せられたシグナルを、細胞のクラスターに由来する複数のシグナルの中から単離することを含む、項目154に記載の方法。

(項目166)

前記コンピュータで、独立成分分析を実施すること、および1つの単一細胞によって生じたスパイク列を同定することにより、前記シグナルを単離する、項目165に記載の方法。

(項目167)

イオンチャネルモジュレーターのアッセイにおける使用のための細胞であって、真核生物ゲノムを含み、電位を示す微生物型ロドプシンおよび光依存性イオンチャネルを発現する細胞。

(項目168)

前記微生物型ロドプシンが、膜電位についての光レポーターを含む、項目167に記載の細胞。

(項目169)

前記微生物型ロドプシンが、QuasAr1およびQuasAr2からなるリストから選択される微生物型ロドプシンである、項目168に記載の細胞。

(項目170)

前記細胞がまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目167に記載の細胞。

(項目171)

前記細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質が、GCaMPバリエーションを含む、項目170に記載の細胞。

(項目172)

細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質が、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなるリストから選択されるタンパク質である、項目167に記載の細胞。

(項目173)

前記光依存性イオンチャンネルが、 $< 450\text{ nm}$ の波長で励起極大を有する青方偏移アクチュエーターを含み、前記細胞内カルシウムレベルの前記変化を報告する前記タンパク質が、端点を含む $520\text{ nm} \sim 570\text{ nm}$ の間で励起極大を有する赤方偏移カルシウムインジケーターを含む、項目170に記載の細胞。

(項目174)

前記光依存性イオンチャンネルが、藻類チャンネルロドプシンを含む、項目167に記載の細胞。

(項目175)

前記光依存性イオンチャンネルが、TsChRおよびPsChRからなるリストから選択される青方偏移アクチュエーターである青方偏移アクチュエーターを含む、項目167に記載の細胞。

(項目176)

前記微生物型ロドプシンが、QuasAr1およびQuasAr2からなるリストから選択される微生物型ロドプシンである、項目175に記載の細胞。

(項目177)

前記微生物型ロドプシンを、前記真核生物ゲノムへと組み入れられた遺伝子から発現させる、項目167に記載の細胞。

(項目178)

前記微生物型ロドプシンが、QuasArタンパク質を含み、前記光依存性イオンチャンネルが、チャンネルロドプシンを含み、前記細胞が、コード型カルシウムインジケーターをさらに発現する、項目167に記載の細胞。

(項目179)

前記コード型カルシウムインジケーターが、GCaMP6f、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなる群から選択されるコード型カルシウムインジケーターである、項目178に記載の細胞。

(項目180)

前記光依存性イオンチャンネルが、紫励起光遺伝学的アクチュエーターを含み、細胞が、赤方偏移遺伝子コード型カルシウムインジケーターをさらに含む、項目167に記載の細胞。

(項目181)

前記紫励起光遺伝学的アクチュエーターが、チャンネルロドプシンを含み、前記赤方偏移遺伝子コード型カルシウムインジケーターが、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなる群から選択される赤方偏移遺伝子コード型カルシウムインジケ



ーターを含む、項目180に記載の細胞。

(項目182)

前記細胞が、心筋細胞である、項目167から181のいずれかに記載の細胞。

(項目183)

前記細胞が、ニューロンである、項目167から181のいずれかに記載の細胞。

(項目184)

前記細胞が、ヒト人工多能性幹細胞である、項目167から181のいずれかに記載の細胞。

(項目185)

細胞を特徴付けるための方法であって、

幹細胞に転写因子を発現させることにより、該幹細胞をニューロンへと転換するステップと；

該ニューロンへと、膜電位についての光レポーターおよび光依存性イオンチャネルを組み込むステップと；

該ニューロンの刺激に応答する該光レポーターからのシグナルを得るステップと；

該シグナルを評価し、これにより、該ニューロンを特徴付けるステップとを含む方法。

(項目186)

前記転写因子が、NgN2である、項目185に記載の方法。

(項目187)

膜電位についての前記光レポーターが、微生物型ロドプシンを含む、項目186に記載の方法。

(項目188)

前記微生物型ロドプシンが、QuasAr1およびQuasAr2からなるリストから選択される微生物型ロドプシンである、項目187に記載の方法。

(項目189)

前記ニューロンがまた、細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目185に記載の方法。

(項目190)

前記細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質が、GCaMPバリエーションを含む、項目189に記載の方法。

(項目191)

細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質が、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなるリストから選択されるタンパク質である、項目189に記載の方法。

(項目192)

前記光依存性イオンチャネルが、 $< 450\text{ nm}$ の波長で励起極大を有する青方偏移アクチュエーターを含み、前記細胞内カルシウムレベルの前記変化を報告する前記タンパク質が、端点を含む $520\text{ nm} \sim 570\text{ nm}$ の間で励起極大を有する赤方偏移カルシウムインジケーターを含む、項目189に記載の方法。

(項目193)

前記ニューロンの前記刺激が、デジタル式マイクロミラーデバイスを使用して、前記ニューロンを選択的に照射するように、光を空間的にパターン化することを含む、項目189に記載の方法。

(項目194)

前記光依存性イオンチャネルが、藻類チャネルロドプシンを含む、項目185に記載の方法。

(項目195)

前記光依存性イオンチャネルが、TsChRおよびPsChRからなるリストから選択される青方偏移アクチュエーターである青方偏移アクチュエーターを含む、項目185に

記載の方法。

(項目196)

前記微生物型ロドプシンを、ニューロンへと組み入れられた遺伝子から発現させる、項目185に記載の方法。

(項目197)

前記微生物型ロドプシンが、QuasArタンパク質を含み、前記光依存性イオンチャンネルが、チャンネルロドプシンを含み、前記ニューロンが、コード型カルシウムインジケータをさらに発現する、項目185に記載の方法。

(項目198)

前記ニューロンの前記刺激が、該ニューロンと第2の細胞との間にシナプスを形成することと、デジタル式マイクロミラーデバイスを使用して、該第2の細胞を選択的に照射するように、光を空間的にパターン化することを含む、項目185に記載の方法。

(項目199)

前記光依存性イオンチャンネルが、紫励起光遺伝学的アクチュエーターを含み、前記ニューロンが、赤方偏移遺伝子コード型カルシウムインジケータをさらに含む、項目185に記載の方法。

(項目200)

前記紫励起光遺伝学的アクチュエーターが、チャンネルロドプシンを含み、前記赤方偏移遺伝子コード型カルシウムインジケータが、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなる群から選択される赤方偏移遺伝子コード型カルシウムインジケータを含む、項目199に記載の方法。

(項目201)

外因性転写因子、膜電位についての光レポーター、および光依存性イオンチャンネルを発現するニューロンであって、該転写因子もまた内因的に発現しているニューロン。

(項目202)

前記転写因子が、NgN2である、項目201に記載のニューロン。

(項目203)

膜電位についての前記光レポーターが、微生物型ロドプシンを含む、項目202に記載のニューロン。

(項目204)

前記微生物型ロドプシンが、QuasAr1である、項目203に記載のニューロン。

(項目205)

細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質も発現する、項目203に記載のニューロン。

(項目206)

前記細胞内カルシウムレベルの変化を報告するタンパク質が、GCaMPバリエーションを含む、項目205に記載のニューロン。

(項目207)

細胞内カルシウムレベルの変化を報告する前記タンパク質が、jRCaMP1a、jRGECO1a、およびRCaMP2からなるリストから選択されるタンパク質である、項目205に記載のニューロン。

(項目208)

前記光依存性イオンチャンネルが、 $< 450\text{ nm}$ の波長で励起極大を有する青方偏移アクチュエーターを含み、前記細胞内カルシウムレベルの前記変化を報告する前記タンパク質が、端点を含む $520\text{ nm} \sim 570\text{ nm}$ の間で励起極大を有する赤方偏移カルシウムインジケータを含む、項目205に記載のニューロン。