

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6696974号
(P6696974)

(45) 発行日 令和2年5月20日(2020.5.20)

(24) 登録日 令和2年4月27日(2020.4.27)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 D
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
請求項の数 22 (全 29 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2017-511687 (P2017-511687)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月28日 (2015. 8. 28)
 (65) 公表番号 特表2017-526921 (P2017-526921A)
 (43) 公表日 平成29年9月14日 (2017. 9. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/047567
 (87) 国際公開番号 W02016/033542
 (87) 国際公開日 平成28年3月3日 (2016. 3. 3)
 審査請求日 平成30年8月24日 (2018. 8. 24)
 (31) 優先権主張番号 62/043, 346
 (32) 優先日 平成26年8月28日 (2014. 8. 28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(73) 特許権者 514135801
 シーダーズ-サイナイ メディカル センター
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス ビバリー ブールバード 8700
 (73) 特許権者 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94607-5200, オークランド, フランクリン ストリート 1111, 12番フロア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 痰由来細胞のDNAメチル化表現型決定による早期肺癌検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞が癌性または前癌性であるかどうかの評価を補助するための方法であって、
 前記細胞の核内におけるグローバル5 - メチルシトシン (5 mC) 含量並びに 5 mC 及びグローバルDNA (gDNA) の空間的核共分布を決定するステップを含み、前記細胞の核内におけるグローバル5 mC 含量並びに 5 mC 及び gDNA の空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団とは有意に異なる場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると示されるか、或いは、グローバル核5 mC 含量並びに 5 mC 及び gDNA の空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団のものとは有意に異なる場合に、前記細胞が癌性でもなく前癌性でもないとして示される、
 方法。

【請求項2】

前記グローバル5 mC 含量が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団よりも有意に低い場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると示される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細胞が生物学的サンプルから得られる、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記生物学的サンプルが痰を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記痰が呼吸器細胞を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

癌性の前記細胞または前癌性の前記細胞が肺癌起源である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記生物学的サンプルが、喫煙歴を有する対象から得られる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記生物学的サンプルが、喫煙歴のない対象から得られる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記生物学的サンプルが、肺癌を有しており且つ肺癌について治療されたことのない対象から得られる、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 10】

前記生物学的サンプルが、放射線療法、化学療法、外科手術、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される肺癌治療を受けたことのある対象から得られる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】

グローバル 5 m C 及び g D N A の含量が、前記細胞を (a) 5 m C に特異的な抗体を用いた免疫蛍光染色に、及び (b) 4 ' , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (D A P I) を用いた対比染色に供した後に、顕微鏡を用いて決定される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 12】

5 m C 及び g D N A の空間的核共分布が、前記細胞を (a) 5 m C に特異的な抗体を用いた免疫蛍光染色に、及び (b) 4 ' , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (D A P I) を用いた対比染色に供した後に、顕微鏡を用いて決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

高張食塩水を対象の気道に投与するステップと、
前記高張食塩水を吸入した結果として前記対象から吐き出されたある量の痰を回収するステップと
を含む方法により、痰サンプルが前記対象から得られた、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記高張食塩水がネブライザーを介して投与される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記高張食塩水が 3 ~ 5 % の N a C l である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記顕微鏡が、500 ナノメートルまたはそれ未満の分解能を有する共焦点走査顕微鏡である、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 17】

癌を発症する高いリスクを対象が有するかどうかの評価を補助するための方法であって

40

前記対象の生物学的サンプルから得られた細胞の核内におけるグローバル 5 - メチルシトシン (5 m C) 含量並びに 5 m C 及びグローバル D N A (g D N A) の空間的核共分布を決定するステップを含み、前記細胞の核内におけるグローバル 5 m C 含量並びに 5 m C 及び g D N A の空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び / または非癌性もしくは非前癌性の細胞集団とは有意に異なる場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると示され、前記細胞が癌性または前癌性であると示された場合に、臨床的に検証可能な癌を発症する高いリスクを前記対象が有すると示される、
方法。

【請求項 18】

前記生物学的サンプルが痰を含む、請求項 17 に記載の方法。

50

【請求項 19】

前記痰が呼吸器細胞を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

癌性の前記細胞または前癌性の前記細胞が肺癌起源である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記対象が喫煙歴を有する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記対象が喫煙歴を有さない、請求項 18 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、35 U.S.C. の下に、2014年8月28日に出願された現在係属中の米国仮特許出願第62/043,346号の優先権を主張するものであり、その内容の全体を本明細書の一部として援用する。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般には癌、特に肺癌の診断、予後予測、及び治療に関する。

【背景技術】

【0003】

20

背景

以下の説明は、本発明の理解に有用な情報を含んでいる。ここで提供される情報は、その何れかが先行技術であること、または現在の特許請求の範囲に記載されている発明に関連することを認めるものではない。

【0004】

肺癌のスクリーニングにおける伝統的な方法には、縦隔鏡検査、並びにコンピュータ断層撮影(CT)及び陽電子放射断層撮影(PET)等の放射線撮影方法が含まれる。残念なことに、これらの方法は高価であり、及び/または潜在的に有害な電離放射線に患者を晒すことを必要とする。更に、放射線探査は、放射線撮影法で検出するには小さすぎる可能性がある初期段階の肺癌を検出するには信頼性に欠けるにもかかわらず、患者に重大な危険をもたらす。早期肺癌の検出は後期検出よりもはるかに有利な予後に関連するので、これは特に重要である。

30

【0005】

当該技術においては、特に早期段階で肺癌を検出するための、安全で、比較的安価で、且つ鋭敏な方法が明らかに必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

種々の実施形態において、本発明は、細胞が癌性または前癌性であるかどうかを判定するための方法であって、前記細胞の核内におけるグローバル5-メチルシトシン(5mC)含量並びに/または5mC及びグローバルDNA(gDNA)の空間的核共分布を決定するステップと;前記細胞の核内におけるグローバル5mC含量並びに/または5mC及びgDNAの空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団とは有意に異なる場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると判定するか、或いは、グローバル核5mC含量並びに/または5mC及びgDNAの空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団のものとは有意に異なる場合に、前記細胞が癌性でもなく前癌性でもないとは判定するステップとを含む、方法を教示する。幾つかの実施形態において、グローバル5mC含量が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団よりも有意に低い場合に、当該細胞は癌性または前癌性であると判定される。特定の実施形態において、前記細胞は生物学的サンプルから得られる。

40

50

幾つかの実施形態では、前記生物学的サンプルは痰を含む。特定の実施形態において、該痰は呼吸器細胞を含む。特定の実施形態において、癌性の前記細胞または前癌性の前記細胞は肺癌起源である。幾つかの実施形態において、前記生物学的サンプルは喫煙歴を有する対象から得られる。幾つかの実施形態において、前記生物学的サンプルは喫煙歴のない対象から得られる。幾つかの実施形態において、前記生物学的サンプルは、肺癌を有しており且つ肺癌について治療されたことのない対象から得られる。特定の実施形態において、前記生物学的サンプルは、放射線療法、化学療法、外科手術、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される肺癌治療を受けたことのある対象から得られる。幾つかの実施形態において、前記グローバル5 mC及びg DNAの含量は、前記細胞を(a) 5 mCに特異的な抗体を用いた免疫蛍光染色に、及び(b) 4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を用いた対比染色に供した後に、顕微鏡を用いて決定される。特定の実施形態において、5 mC及びg DNAの空間的核共分布は、前記細胞を(a) 5 mCに特異的な抗体を用いた免疫蛍光染色に、及び(b) 4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を用いた対比染色に供した後に、顕微鏡を用いて決定される。幾つかの実施形態において、前記痰サンプルは、高張食塩水を対象の気道に投与するステップと、前記高張食塩水を吸入した結果として前記対象から吐き出されたある量の痰を回収するステップとを含む方法により対象から得られた。幾つかの実施形態において、前記高張食塩水は、ネプライザーを介して投与される。特定の実施形態において、前記高張食塩水は3~5%のNaClである。特定の実施形態において、前記顕微鏡は、500ナノメートルまたはそれ未満の分解能を有する共焦点走査顕微鏡である。

10

20

【0007】

種々の実施形態において、本発明は、対象から、細胞を含む生物学的サンプルを得るステップと；前記細胞の核内におけるグローバル5-メチルシトシン(5mC)含量並びに/または5mC及びグローバルDNA(gDNA)の空間的核共分布を決定するステップと；前記細胞の核内におけるグローバル5mC含量並びに/または5mC及びgDNAの空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の細胞集団とは有意に異なる場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると判定するステップと；前記細胞が癌性または前癌性であると判定された場合に、臨床的に検証可能な癌を発症する高いリスクを前記対象が有すると判定するステップとを含む方法を教示する幾つかの実施形態において、前記方法はまた、臨床的に検証可能な癌を発症する高いリスクを前記対象が有すると判定された場合、または臨床的に検証可能な癌を前記対象が発症していると判定された場合に、前記対象を治療するステップを含む。幾つかの実施形態において、前記生物学的サンプルは痰を含む。幾つかの実施形態において、前記痰は呼吸器細胞を含む。幾つかの実施形態において、癌性の前記細胞または前癌性の前記細胞は肺癌起源のものである。特定の実施形態において、前記対象は喫煙歴を有する。幾つかの実施形態において、前記対象は喫煙歴を有さない。

30

[本発明1001]

細胞が癌性または前癌性であるかどうかを判定するための方法であって、
前記細胞の核内におけるグローバル5-メチルシトシン(5mC)含量並びに/または5mC及びグローバルDNA(gDNA)の空間的核共分布を決定するステップと、
前記細胞の核内におけるグローバル5mC含量並びに/または5mC及びgDNAの空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団とは有意に異なる場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると判定するか、或いは、グローバル核5mC含量並びに/または5mC及びgDNAの空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団のものとは有意に異なる場合に、前記細胞が癌性でもなく前癌性でないと判定するステップと
を含む、方法。

40

[本発明1002]

前記グローバル5mC含量が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性

50

もしくは非前癌性の参照細胞集団よりも有意に低い場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると判定される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記細胞が生物学的サンプルから得られる、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記生物学的サンプルが痰を含む、本発明1003の方法。

[本発明1005]

前記痰が呼吸器細胞を含む、本発明1004の方法。

[本発明1006]

癌性の前記細胞または前癌性の前記細胞が肺癌起源である、本発明1005の方法。

10

[本発明1007]

前記生物学的サンプルが、喫煙歴を有する対象から得られる、本発明1005の方法。

[本発明1008]

前記生物学的サンプルが、喫煙歴のない対象から得られる、本発明1005の方法。

[本発明1009]

前記生物学的サンプルが、肺癌を有しており且つ肺癌について治療されたことのない対象から得られる、本発明1005の方法。

[本発明1010]

前記生物学的サンプルが、放射線療法、化学療法、外科手術、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される肺癌治療を受けたことのある対象から得られる、本発明1005の方法。

20

[本発明1011]

グローバル5mC及びgDNAの含量が、前記細胞を(a)5mCに特異的な抗体を用いた免疫蛍光染色に、及び(b)4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を用いた対比染色に供した後に、顕微鏡を用いて決定される、本発明1001の方法。

[本発明1012]

5mC及びgDNAの空間的核共分布が、前記細胞を(a)5mCに特異的な抗体を用いた免疫蛍光染色に、及び(b)4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を用いた対比染色に供した後に、顕微鏡を用いて決定される、本発明1001の方法。

[本発明1013]

高張食塩水を対象の気道に投与するステップと、
前記高張食塩水を吸入した結果として前記対象から吐き出されたある量の痰を回収するステップと
を含む方法により、痰サンプルが前記対象から得られた、本発明1005の方法。

30

[本発明1014]

前記高張食塩水がネブライザーを介して投与される、本発明1012の方法。

[本発明1015]

前記高張食塩水が3~5%のNaClである、本発明1013の方法。

[本発明1016]

前記顕微鏡が、500ナノメートルまたはそれ未満の分解能を有する共焦点走査顕微鏡である、本発明1011または1012の方法。

40

[本発明1017]

対象から、細胞を含む生物学的サンプルを得るステップと、
前記細胞の核内におけるグローバル5-メチルシトシン(5mC)含量並びに/または5mC及びグローバルDNA(gDNA)の空間的核共分布を決定するステップと、
前記細胞の核内におけるグローバル5mC含量並びに/または5mC及びgDNAの空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の細胞集団とは有意に異なる場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると判定するステップと、

前記細胞が癌性または前癌性であると判定された場合に、臨床的に検証可能な癌を発症

50

する高いリスクを前記対象が有すると判定するステップとを含む、方法。

[本発明1018]

臨床的に検証可能な癌を発症する高いリスクを前記対象が有すると判定された場合、または臨床的に検証可能な癌を前記対象が発症していると判定された場合に、前記対象を癌について治療するステップを更に含む、本発明1017の方法。

[本発明1019]

前記生物学的サンプルが痰を含む、本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記痰が呼吸器細胞を含む、本発明1019の方法。

10

[本発明1021]

癌性の前記細胞または前癌性の前記細胞が肺癌起源である、本発明1020の方法。

[本発明1022]

前記対象が喫煙歴を有する、本発明1019の方法。

[本発明1023]

前記対象が喫煙歴を有さない、本発明1019の方法。

【図面の簡単な説明】

【0008】

例示的な実施形態が、参照された図に示されている。本明細書に開示された実施形態及び図面は、限定ではなく例示的なものとみなされるべきものである。

20

【図1】本発明の一実施形態による3D定量的DNAメチル化画像化(3D-qDMI)のワークフローは、三つの工程、即ち(1)細胞学的検体の調製/染色、(2)検体の3D画像化、及び(3)検体を特徴付けするためのコンピュータによる画像/データの分析を含んでいる。

【図2】本発明の一実施形態による3D画像解析(DU145ヒト前立腺癌細胞で示される例)のワークフローを示している。5-メチルシトシン(5mC)及び4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)の2つのチャンネルからの共焦点2D画像スタックがロードされる。DAPIは、グローバル核DNA(gDNA)を表す。抽出された核5mC/DAPIパターンは、2つのチャンネルのボクセル強度の2D密度散布図として表示される。選択された2つの核についてのパターン例が示されている。集団全体の5mC/DAPI共分布パターンは、核5mC及びDAPIシグナルの非常に異なる共分布を表す外観/統計において異なり得る、個々の核からのパターンを重ね合わせることによって作成される。散布図の軸上に示される単位は、任意の強度単位である。

30

【図3】本発明の一実施形態による、3D-qDMIの診断出力(左)を示す：蛍光画像における5mC(緑色)及びgDNA/DAPI(青色)のテクスチャ特徴(DNAメチル化表現型)に基づく痰細胞集団の特徴付け。細胞は、色コードに関連した増大する数値範囲に亘る「ソフト修飾子」(右)によって、異なる類似度に分類できる。3D-qDMIソフトウェアは、得られたデータをより良く可視化及び解釈するために、このコードを使用して、元の蛍光画像を(全ての共焦点画像層に亘って)カラーマップ及び対応する表形式の表示に変換する。このデータは、細胞集団におけるDNAメチル化表現型の不均一性を決定するための、異なるタイプの細胞の同定及び一覧表を導く。

40

【図4】本発明の一実施形態に従い、新たに診断され外科的に切除された肺癌由来の蛍光標識された切片の、正常な実質領域及び腫瘍領域を示す。正常小葉(A)及び拡大ボックス副区域(B)内の細胞核(青色)は、同じ切片での腫瘍(C)及び拡大ボックス副区域(D)の管区域における重度低メチル化核と比較して、高い程度のDNAメチル化(5mC, 緑色)を示している；サイトケラチン8(赤色)は上皮区画の輪郭を描くためのマーカーとして使用した。

【図5】図5A及び図5Bは、本発明の一実施形態に従い、3D-qDMIを用いた細胞及び組織のグローバルなDNAメチル化表現型を示す。この方法は、差分5mC/DAPI分布パターン(散布図)に基づいて、異なる細胞タイプを首尾よく区別することができ

50

た：参照プロットとしての全体の細胞集団について、並びに各細胞カテゴリーの選択された核 N 1 及び N 2 について示された各々の核について、個々のヒートマップ散布図 (D A P I = x 軸、5 m C = y 軸) として計算及び表示された。非小細胞肺癌 (N S C L C) 細胞株 A 5 4 9 及び H 1 5 7 は、不死化上皮呼吸器細胞 (B E A S - 2 B) と比較して、グローバル 5 m C の減少を示す。A 5 4 9 細胞よりも転移能が高いと報告されている H 1 5 7 細胞は、更に低メチル化されている (平坦な曲線) 。同じ比較関係は、肺癌患者から外科的に除去された組織及び隣接する正常な肺組織においても見ることができ、また肺癌患者対健常者 (癌を有さない) の一致する痰サンプルからも見出すことができる：健常者の痰細胞中に見られる細胞計測 5 m C / D A P I シグネチャーは、表現型的には正常な領域 (実際の画像については図 3 参照) 及び B E A S - 2 B 細胞で見られるパターンに非常に類似している。対照的に、重度の低メチル化は、正常な 5 m C 表現型 (N 1 型) を有する多数の細胞のバックグラウンドにおいて、腫瘍領域由来の細胞のシグネチャーに一致する癌患者の少数の痰細胞 (N 2 型) 及び更に攻撃的な H 1 5 7 細胞株 (より高い転移能) で観察することができる。換言すれば、異常な 5 m C 表現型をもった稀な痰細胞は、よく特徴付けられた攻撃的な癌細胞 (腫瘍及び腫瘍由来細胞株) と非常に類似している。回帰線 (黄色の点線) 並びに上下のシグナル境界線 M L 1 及び M L 2 は特徴的であり、各プロトタイプタイプの細胞型について 4 つの角度、及び を決定する。得られる係数 $F = [(\quad / \quad) \times (\quad / \quad)]$ は、各細胞型に特異的なものである。全ての細胞集団は高い均一性を示す：即ち、それぞれのカテゴリーマップにより判断されるように、それぞれの全体の集団のプロットと比較して、細胞間での 5 m C - 表現型の類似度、及び個々の核 (N 1 及び N 2) の散布図間の類似性が高い。図 5 A 及び図 5 B における散布図の軸上に示された単位は、任意の強度単位である。

10

20

【図 6】本発明の実施形態に従って、誘導された痰に由来する比較的平坦なヒト上皮細胞の明視野顕微鏡画像を示している。(A) 細胞を痰の粘液 - 液体画分から単離し、培養技術を用いてガラススライド上に捕捉した。数ミリリットルの痰は、数百から数千の細胞を含むことができる。(B) 領域の拡大は、単核である層状細胞の相対的な基礎構造を明らかにする。

【図 7】本発明の実施形態に従って、蛍光標識された痰由来ヒト細胞の共焦点画像を示す。細胞質は、上皮細胞マーカーサイトケラチン 19 (赤色 C K 19) によって描写され、細胞核は D A P I (青色) によって描写され、グローバル核 D N A メチル化は 5 m C に特異的な抗体 (緑色) によって可視化される。健康な個体 (対照) の痰には、圧倒的に多数の高度にメチル化された細胞 (1 型、左欄) 及び散発的に少数の C K 19 陽性低メチル化細胞 (2 型、左欄) が含まれている。低メチル化は、細胞分裂後の初期段階に通性であると考えられる。対照的に、肺癌患者の痰は、これに加えて、細胞質を殆ど持たないかなりの数の円形細胞を含んでいる (2 型、右欄) 。これらの細胞は C D 3 4 / C D 4 5 陰性であり、造血性及び / または白血球性ではないことを示している。散布図として提示されたそれぞれの核 5 m C / D A P I 共分布パターンは、両方の痰 - ドナー群における正常にメチル化された (1 型) 細胞が急勾配の回帰線 ($> 45^\circ$) を示した一方、低メチル化細胞 (2 型) は遥かに平らな回帰直線 ($< < 45^\circ$) を生じることを示している。更に、肺癌特異的な丸い細胞の典型的なシグネチャーは、5 m C 及び D A P I の分散が遥かに小さい狭い共分布である。散布図の軸上に示される単位は、任意の強度単位である。

30

40

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 9 】

発明の説明

本明細書で引用される全ての参照文献は、その全体が完全に記載されているかのように、本明細書の一部として援用される。他に定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。次の参照文献は、当業者に対して、本出願で使用される多くの用語の一般的ガイドを提供する：Allen et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22nd ed.

50

, Pharmaceutical Press (September 15, 2012); Hornyak et al., Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, CRC Press (2008); Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 7th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, Dictionary of DNA and Genome Technology 3rd ed., Wiley-Blackwell (November 28, 2012); 及び Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012)。抗体の調製法については、次の文献を参照されたい: Greenfield, Antibodies A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Kohler and Milstein, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7): 511-9; Queen and Selick, Humanized immunoglobulins, U.S. Patent No. 5,585,089 (1996 Dec); 及び Riechmann et al., Reshaping human antibodies for therapy, Nature 1988 Mar 24, 332(6162): 323-7。

【0010】

当業者は、本明細書に記載されたものと類似または同等で、本発明の実施に用い得る多くの方法及び材料を認識するであろう。実際に、本発明は、記載された方法及び材料には全く限定されない。本発明の目的のために、特定の用語を以下に定義する。

【0011】

本明細書で使用する「状態」及び「疾患状態」は、限定されるものではないが、癌または前癌に関連する状態を含み、これには肺癌、頭部または頸部の癌、上部消化管癌、子宮頸癌、卵巣癌、尿道癌、膀胱癌及び結腸直腸癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0012】

本明細書で使用される「哺乳動物」は、哺乳動物分類の任意のメンバーを意味し、ヒト及び非ヒト霊長類、例えばチンパンジー及び他の類人猿及びサル種；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ及びウマなどの家畜；犬及び猫のような家畜動物；マウス、ラット及びモルモット等のげっ歯類を含む実験動物が含まれるが、これらに限定されない。この用語は、特定の年齢または性別を示すものではない。従って、成人及び新生児の対象は、雌雄かにかかわらず、この用語の範囲内に含まれることが意図されている。本明細書に記載される本発明の方法に従えば、癌または前癌がヒトにおいて検出され得るが、本発明の方法に従って任意の哺乳動物において癌を検出することは本発明の範囲内である。

【0013】

「グローバル5mC」及び「5mC含量」の用語は、本明細書では互換的に使用され、それぞれの場合において、細胞核に存在する5-メチルシトシン分子の総量として定義することができる。

【0014】

本明細書中で使用される「グローバルDNA (gDNA)」の用語は、細胞核に存在するDNAの総量を意味する。

【 0 0 1 5 】

本明細書で使用する「臨床的に検証可能な癌」の用語は、癌検出の従来的手段により検証可能な癌を意味し、該方法には低侵襲性縦隔鏡検査、並びにコンピュータ断層撮影（CT）、陽電子放射断層撮影（PET）及び磁気共鳴イメージング（MRI）等の非侵襲的放射線撮影等が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 1 6 】

更なる背景として、DNAメチル化のようなエピジェネティックな機構が、遺伝子変異と共に、または遺伝子変異の共存なしに、多細胞系の発生、健康維持、並びに老化の際の構造的及び機能的な低下において、癌等の疾患により促進された速度で強い影響を有することがますます明らかになってきている。従って、DNAメチル化を測定するための方法は、癌との闘い及び健康な老化の確保のために、これらのメカニズムを理解する上で重要である。イメージング法が、分子技術と並んで、細胞及び組織におけるDNAメチル化の差分定量化に不可欠な役割を果たすことは間違いない。

10

【 0 0 1 7 】

DNAメチル化の変化を測定することは、それが発癌及び腫瘍の進行における初期事象と関連し、早期診断及び治療モニタリングにおけるシグネチャーとして役立つので有用である。この意味で、肺癌の早期検出のために定量的DNAメチル化イメージングを適用する本明細書の特定の実施形態に記載した本発明者らのアプローチは、細胞毎の病理診断について、剥離した呼吸器細胞におけるDNAメチル化のようなエピジェネティックな特徴を、それらの特徴付けのためにインサイチューで測定するというアイデアを復活させる。

20

【 0 0 1 8 】

1990年代の終わりに向けて組織の特徴付けのために導入されたDNAメチル化のイメージングは、以下の2つの理由のため、PCRベース、アレイベース、シーケンシング、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及び質量スペクトル分析含む同時代に開発された分子的方法と比較して一般的ではなかった：（i）それは検出のための放射標識または酵素レポーターと組み合わせることで適用され、これは感度、多重化能に欠けており、または検定の再現性／一貫性に影響するため；並びに（ii）画像解像度が低いため、差分的結果において十分な意義を提供しなかったため。近年の高解像度イメージング及びコンピュータ処理能力の大幅な改善は、生物医学研究及び臨床診断に適用可能な細胞ベースの検定において、より高度なツールの開発を支持している。これはまた、グローバルなDNAメチル化のようなエピジェネティックなレポーターによる高次クロマチン構造に対する大規模変化の非破壊イメージングの概念に立ち戻るための、3D-qDMI開発の前提条件でもあった。

30

【 0 0 1 9 】

要するに、本明細書に記載の3D-qDMIアプローチは、（1）5-メチルシトシン（5mC）及びグローバルDNA（gDNA）の高分解能イメージング、及び（2）初期肺癌検出のための診断シグネチャーとして、次の3つの5mCに関連する特徴のデジタル抽出を可能にするので、特に有利である：即ち、痰サンプル中の呼吸器上皮細胞を特徴付けするための（i）5mC負荷（含量）、（ii）5mC及びgDNAの空間的核共分布、並びに（iii）最初の2つの5mC特徴に基づく細胞集団不均一性の測定（図2）である。

40

【 0 0 2 0 】

大規模な細胞集団で平均5mC測定を行うか、または細胞核における平均5mC強度値を測定するだけの、現在の分子アプローチ及び幾つかの以前の低解像度イメージングベースの試みと比較して、3D-qDMIは、細胞形質転換、特にgDNAの低メチル化を通じて起こるDNAメチル化不均衡の副次的影響を考慮することにより、差分5mC関連情報の抽出に力点を置く。特に、後者の機構は細胞核内のゲノム再編成を誘発し、核構造に影響を及ぼす。この現象は、基本的な細胞生物学的研究において十分に記載されているが、癌の病理学では未だ十分に活用されてはいない。本発明の方法の幾つかの実施形態で適

50

用される画像解析はこのギャップをカバーし、前記現象を反映する下記2つのタイプのシグナルの強度分布として、関連の変化を表示する：(a) 免疫蛍光ターゲティングにより作成された5mCシグナル、及び(b) DAPIが、高度に反復したコンパクトなヘテロクロマチン配列の主成分であるATリッチDNAにインターカレートするとき、同じ細胞のその後の対比染色によって生成されるDAPIシグナルにより示されるgDNA。全体的に、この方法は、細胞形態(上皮細胞及び間充織細胞表現型)及び増殖挙動(高増殖性癌細胞、中程度に増殖する正常細胞、及び成長停止老化細胞)と相関する差分DNAメチル化表現型(5mC/DAPIテクスチャ特徴)のスペクトルを伴った、痰細胞のマップを表す画像を生じる。

【0021】

肺癌細胞は、本明細書に記載の方法に従って検出できる癌細胞の一種であるが、5mC含量並びに/または5mC及びgDNAの空間的核共分布の分析は、任意の癌細胞を検出するために用いることができる。

【0022】

上記の追加の背景を念頭に置いて、特定の具体的で非限定的な実施形態を以下に記載する。

【0023】

種々の実施形態において、本発明は、細胞が癌性または前癌性であるかどうかを判定するための方法を教示する。幾つかの実施形態において、本方法は、前記細胞の核内における5-メチルシトシン(5mC)含量並びに/または5mC及びグローバルDNA(gDNA)の空間的核共分布を決定するステップと；前記細胞の核内の5mC含量並びに/または5mC及びgDNAの空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団と有意に異なる場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると判定するか、或いは、前記細胞の核内の5mC含量並びに/または5mC及びgDNAの空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団のものとは有意に異なる場合に、細胞が癌性でもなく前癌性でもないか、これらのステップからなるか、またはこれらのステップから実質的になる。これに関連して、有意差は5mC含量において25%またはそれ以上、及び/または本明細書において または と称する回帰直線(傾向線とも呼ばれる)の角度が20度またはそれ以上であることと定義され、それにより、DAPI値がx軸を定義し、且つ5mC値がy軸を定義するとき、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞または非癌性もしくは非前癌性の細胞集団と比較して、癌性もしくは前癌性の細胞はより少ない5mC含量及び/または5mC/DAPI共局在化散布図のより小さい回帰直線角度を示す。幾つかの実施形態では、5mC含量において25~99%、または30~80%、または40~60%の差が有意である。幾つかの実施形態では、回帰直線の角度において20~90度、または30~80度、または40~70度、または50~60度が有意である。特定の実施形態において、5mC含量が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団よりも有意に低い場合に、前記細胞は癌性または前癌性であると判定される。特定の実施形態において、前記細胞は生物学的サンプルから得られる。幾つかの実施形態において、前記生体サンプルは痰を含む。特定の実施形態において、前記痰は呼吸器細胞を含む。幾つかの実施形態において、前記癌性細胞もしくは前癌性細胞の起源は上部気道消化管のものであり、これには肺から唇または鼻孔への経路における任意の解剖学的構造または構造セットに関連する細胞が含まれる。これは、肺、気管、食道、口、鼻及び洞の細胞を含み得るが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、前記癌性細胞または前癌性細胞は肺癌起源のものである。幾つかの実施形態において、前記癌性細胞または前癌性細胞は肺腫瘍起源である。幾つかの実施形態において、前記癌性細胞または前癌性細胞は食道起源である。特定の実施形態において、前記生体サンプルは、喫煙歴を有する対象から得られる。幾つかの実施形態において、前記生体サンプルは、喫煙歴のない対象から得られる。種々の実施形態において、前記生物学的サンプルは肺癌治療を受けた対象から得られ、該治療には放

10

20

30

40

50

射線療法、化学療法、外科手術、及びそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、前記生物学的サンプルは肺癌治療を受けていない対象から得られる。特定の実施形態において、個々の細胞核のグローバル5 mC及びgDNAの含量、並びに5 mC及びgDNAの空間的核共分布は、細胞が(a)5 mCに対して特異的な抗体を用いた免疫蛍光染色に、及び(b)4',6-ジアミジノ-2-フェニールインドール(DAPI)を用いた対比染色に供された後に、顕微鏡を用いて決定される。

【0024】

5 mCに対して特異的な任意の市販のモノクローナル抗体を、ここに記載した本発明の方法と共に利用することができる。例えば、5 mC抗体は、幾つかを列挙すれば、Aviva Systems Biology, Corp. (San Diego, CA)、GeneTex, Inc. (Irvine, CA)、Active Motif, Inc. (Carlsbad, CA)、及びDiagenode, Inc. (Denville, NJ)等の販売者から入手した。幾つかの実施形態において、5 mC抗体は、Reynaud C、Bruno C、Boullanger P、Grange J、Barbesti S、Niveleau A. Monitoring of urinary excretion of modified nucleosides in cancer patients using a set of six monoclonal antibodies. Cancer Lett 1992 Mar 31; 63(1): 81に記載された抗体であり、該文献はその全体が完全に記載されているかの如く、本明細書の一部として援用する。

【0025】

特定の実施形態において、個々の痰由来細胞の表現型は、細胞が細胞型特異的マーカーに対する抗体を用いた免疫蛍光染色に供された後に顕微鏡を用いて決定される。これらには、限定されるものではないが、サイトケラチン及び細胞表面分子に対して特異的な抗体が含まれる。

【0026】

幾つかの実施形態において、上記の痰サンプルは、前記対象の気道に高張食塩水を投与するステップと、前記高張食塩水を吸入した結果として対象から吐き出された痰の量を収集するステップとを含む方法により得られた。特定の実施形態において、前記高張食塩水は、超音波ネブライザーまたは非超音波ネブライザーを介して投与される。幾つかの実施形態では、前記高張食塩水は3~5%のNaClである。

【0027】

5 mC含量、gDNA、及び/または5 mC及びgDNAの空間的核共分布の可視化及び/または定量化が必要とされる本発明の実施形態において、これらの特徴は、例えば、広視野落射蛍光顕微鏡及びスキャナ、多重光子顕微鏡及びスキャナ、超解像度顕微鏡(ナノスコープ)及びスキャナ、並びにそれらの組み合わせ様式のような、光学イメージングシステムの使用を介して可視化及び/または定量化されてよい。幾つかの実施形態では、この可視化及び/または定量化のために顕微鏡が使用される。特定の実施形態において、前記顕微鏡は共焦点走査型顕微鏡である。幾つかの実施形態において、前記共焦点走査型顕微鏡は、100~200 nmの範囲の横方向解像度(x軸及びy軸)及び約500 nmの縦方向解像度(z軸)を有する。

【0028】

種々の実施形態において、本発明は、対象から、細胞を含む生物学的サンプルを得るステップと; 5-メチルシトシン(5 mC)含量並びに/または細胞の核内における5 mC及びグローバルDNA(gDNA)の空間的核共分布を決定するステップと; 前記細胞の核内における5 mC含量並びに/または5 mC及びgDNAの空間的核共分布が、非癌性もしくは非前癌性の参照細胞及び/または非癌性もしくは非前癌性の細胞集団と有意に異なる場合に、前記細胞が癌性または前癌性であると判定するステップと; 前記細胞が癌性または前癌性であると判定された場合に、本明細書に記載の任意の方法に従って前記対象の癌を治療するステップとを含み、これらのステップからなるか、またはこれらのステッ

10

20

30

40

50

プから実質的になる方法を教示する。幾つかの実施形態において、前記対象が癌性または前癌性の状態を有すると判定された場合、前記被験体は、治療を実施するのではなく、疾患の進行についてモニターされる。幾つかの実施形態において、前記癌性細胞または前癌性細胞は、本明細書に記載したように気道消化管に由来する。特定の実施形態において、前記生体サンプルは痰を含む。幾つかの実施形態において、痰は呼吸器細胞を含む。特定の実施形態において、前記癌性細胞または前癌性細胞は、肺癌起源である。幾つかの実施形態において、前記対象は、本明細書に記載の任意の癌タイプを含む癌について以前に治療されたことがある。幾つかの実施形態において、前記対象は、本明細書に記載の任意の癌タイプを含む癌について、以前に治療されたことがない。幾つかの実施形態において、前記対象は喫煙歴を有する。特定の実施形態において、前記対象は喫煙歴を有さない。

10

【0029】

種々の実施形態において、本発明は、複数の細胞を含む生物学的サンプルにおいて、癌性細胞または前癌性細胞の存在または非存在を判定するための方法を教示する。幾つかの実施形態において、この方法は、高分解能イメージングを利用して、前記生物学的サンプル中の複数の細胞の各々について、5 - メチルシトシン (5 mC) 負荷 / 含量並びに / または 5 mC 及びグローバル DNA (gDNA) の空間的核共分布を決定するステップと ; 任意に、前記 MeC 負荷並びに 5 mC 及び gDNA の空間的核共分布に基づき複数の細胞について細胞集団不均一性を決定するステップとを含む方法を教示する。特定の実施形態において、前記生物学的サンプル中の任意の細胞における 5 mC 負荷並びに / または 5 mC 及び gDNA の空間的核共分布が非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団と有意に異なる場合、並びに / または前記生物学的サンプル中の任意の細胞が、5 mC 負荷並びに / または 5 mC 及び gDNA の空間的核共分布に関して、前記生物学的サンプル中の可視化された細胞集団全体のグローバルパターンと比較して有意に異なる場合に、前記癌性または前癌性の細胞が前記生物学的サンプル中に存在すると判定される。幾つかの実施形態において、5 mC 負荷並びに / または 5 mC 及び gDNA の空間的核共分布が非癌性もしくは非前癌性の参照細胞集団のものとは有意に異なる場合、並びに / 或いは、前記生物学的サンプル中の細胞が、前記生物学的サンプル中の細胞集団全体のグローバルパターンと比較して、5 mC 負荷並びに / または 5 mC 及び gDNA の空間的核共分布に関して有意に異なる場合、癌性細胞または前癌性細胞が前記生物学的サンプル中に存在しないと判定される。幾つかの実施形態において、前記生物学的サンプルは痰を含む。特定の実施形態において、前記痰は呼吸器細胞を含む。幾つかの実施形態において、検出 / 判定された癌性細胞または前癌性細胞は肺癌と関連している。特定の実施形態において、検出 / 判定された癌性の前記細胞または前癌性の前記細胞は、非小細胞肺癌 (NSCLC) と関連する。特定の実施形態において、本方法は、前記生物学的サンプル中の癌性細胞の存在に基づいて、任意の段階での NSCLC を含む肺癌患者を診断するために使用することができる。特定実施形態において、前記痰は、喫煙歴を有する対象から得られる。幾つかの実施形態において、前記痰は、限定されるものではないが放射線療法、化学療法、外科手術、及びそれらの組み合わせを含む何らかの肺癌治療を受けたことのある対象から得られる。幾つかの実施形態において、前記痰は、上記の癌治療の 1 つまたは複数を受けたことのない対象から得られる。幾つかの実施形態において、前記痰は、癌のための治療を受けたことのない対象から得られる。幾つかの実施形態において、前記痰は、癌と診断されたことのない個体から得られる。特定の実施形態において、5 mC パターンは、5 mC に対して特異的な抗体を用いた免疫蛍光染色の後に可視化される。幾つかの実施形態において、gDNA は、4' , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (DAPI) を用いた対比染色の後に可視化される。

20

30

40

【0030】

特定の実施形態において、本発明は、上記の試験方法を実施することにより、癌性もしくは前癌性と同定された前記サンプル中の細胞の数を定量することと、その癌性もしくは前癌性の細胞の数を、癌または前癌を有する個体における癌性もしくは前癌性の細胞の参照数と比較すること、及び / または前記試験されたサンプルを、癌性もしくは前癌性を持

50

たない個体における癌性もしくは前癌性の細胞の参照数と比較することを教示する。

【0031】

特定の実施形態において、ここに記載の本発明の方法は、前記対象から痰サンプルを得るステップを含む。幾つかの実施形態において、前記痰サンプルは、高張食塩水を対象の気道に投与することと、前記高張食塩水を吸入した結果として前記対象から吐き出された量の痰を収集することにより得ることができる。特定の実施形態において、前記高張食塩水は、超音波ネブライザーを介して投与される。幾つかの実施形態において、前記高張食塩水は約3～5%のNaClである。幾つかの実施形態において、前記超音波ネブライザーは約1～2mL/分の出力を有する。幾つかの実施形態において、前記生理食塩水は約5～20分間吸入される。幾つかの代替的な実施形態において、前記痰サンプルは、手持ち型噴霧器を用いて、高張食塩水を対象の気道に投与することにより得られる。幾つかの実施形態において、前記高張食塩水は、上記NaClの範囲内である。幾つかの実施形態において、前記高張食塩水は、上記の範囲内の期間において投与される。

10

【0032】

前記高張食塩水の投与は、痰を誘発する1つの方法であるが、本発明の方法において使用できるサンプルを得るために、痰を誘導する別の方法も使用できることが容易に理解されるであろう。単に非限定的な例として言えば、気管支鏡及び気管支肺胞洗浄も使用できる。

【0033】

種々の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の1つまたは複数の方法に従って、癌または前癌状態を伴うと診断された対象を治療するための方法を教示する。幾つかの実施形態において、該方法は、化学療法及び/または放射線療法の投与、及び/または対象の腫瘍の全部または一部を切除するための手術の実施を含むか、またはそれらからなるか、または実質的にそれらからなるものであり、ここで前記対象は、本明細書に記載の任意の方法により癌もしくは前癌状態を有すると診断されたものである。幾つかの実施形態において、前記対象は肺癌と診断されている。

20

【0034】

前述の方法は、上記のように被験体における肺癌及び前癌性病変を検出することを目的としているが、本明細書に記載の本発明の方法の同じ基本原理を利用して、サンプルを分析し、異なる起源の癌または前癌性病変を検出することも可能であろう。単なる非限定的な例として言えば、唾液及び/または粘液分泌物を検定して、頭部癌及び/または頸部癌の有無を判定することができるであろう。結腸及び/または直腸分泌物を検定して、大腸及び/または直腸の癌の有無を判定できるであろう。子宮頸部分泌物を検定して、子宮頸癌の有無を判定することができるであろう。膣及び/または子宮頸部の分泌物を検定して卵癌の有無を判定し、また尿道からの液体を検定して、尿道、膀胱または腎臓の癌の有無を判定することができるであろう。

30

【0035】

更に、5mCを含む試験が本明細書に記載される実施例の主要な焦点であるが、当業者は、3-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-ホルミルシトシン、及び5-カルボキシルシトシンのような他のシトシンの変異体もまた、本明細書に記載の本質的に同じ検出法及び分析法を適用することにより、癌性（または前癌性）の細胞と非癌性細胞とを区別するための基礎として使用できることを容易に理解するであろう。従って、本明細書に記載の方法を用いることによって任意のシトシンメチル化を評価することが、本出願の範囲内にあることが意図されている。更に、本明細書に記載の具体的な実施例に記載された試験は、gDNA並びに核容積を描写するための主要な色素としてDAPIを含むが、当業者は、配列非特異的に二本鎖DNAに結合する他の色素が、gDNAの定量のために使用できることを理解するであろう。これらには、限定されるものではないが、ヨウ化プロピジウム、Hoechst染料（Hoechst 33258及びHoechst 33342を含む）、臭化エチジウム、SYBR緑、SYBR金、Pico緑、SYTOX染料（SYTOX緑、SYTOX青、及びSYTOX橙を含む）、SYTO染料

40

50

、YOYO及びTOTOファミリーの色素(YOYO、TOTO、JOJO、BOBO、POPO、YO-PRO、及びPO-PROを含む)、並びにアクチノマイシンD及び7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD)のような同じ目的で使用するものが含まれる。

【0036】

前癌性または癌性の細胞とそれらの正常な対応細胞の間でのグローバル核5mC負荷及び分布の顕著な差異が与えられれば、これらの差異は、生物学的サンプル内の数千の細胞を特徴付けするために、光学顕微鏡を用いて単一細胞の解像度で迅速かつ並列的に可視化及び測定することができる。幾つかの実施形態において、痰由来の細胞及び細胞集団におけるグローバル核含量、及び5mC対グローバルgDNAの相対的分布(DAPIによって描写される)が分析される。これら核の実体は静的ではなく、正常な健康細胞の前癌性の細胞及び癌性の細胞への細胞形質転換の際に再編成される。この関係において、散布図の強力な特徴は、変数間の単純な関係の混合モデルを描く能力である。これらの関係は、特異的な特徴として細胞パターンを反映し、ここでは前記変数が、核5mCパターン対DAPI染色gDNAの場合に示されるような核構造であり得る(Tajbakhsh J, Wawrowsky KA, Gertych A, Bar-Nur O, Vishnevsky E, Lindsley EH, Farkas DL). Characterization of tumor cells and stem cells by differential nuclear methylation imaging. In: Farkas DL, Nicolau DV, Leif RC, editors. Proceedings Vol. 6859 Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues VI 2008. p 68590F)。本発明者らは、そのような再編成が、グローバル5mC及びgDNAのシグナル分布をプロットした散布図によって動的にモニターすることができ、その差異分布が、プロットされたパターンの変化として可視的であることを示した。換言すれば、この2D散布図は、標的とされた2つの核エンティティのシグナル周波数共分布を表し、該共分布プロットは、細胞特異的な特徴とみなすことができる(Tajbakhsh J, Wawrowsky KA, Gertych A, Bar-Nur O, Vishnevsky E, Lindsley EH, Farkas DL参照)。Characterization of tumor cells and stem cells by differential nuclear methylation imaging. In: Farkas DL, Nicolau DV, Leif RC, editors. Proceedings Vol. 6859 Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues VI 2008. p 68590F); Gertych A, et al. Automated quantification of DNA demethylation effects in cells via 3D mapping of nuclear signatures and population homogeneity assessment. Cytometry A 2009; 75: 569~83; Gertych A, et al. Measuring topology of low-intensity DNA methylation sites for high-throughput assessment of epigenetic drug-induced effects in cancer cells. Exp Cell Res 2010; 316(19): 3150-60; Oh JH, et al. Nuclear DNA methylation and chromatin condensation phenotypes are distinct between normally proliferating/aging, rapidly growing/immortal, and senescent cells. Oncotarget 2013; 4: 474-93。幾つかの実施形態において、これ

10

20

30

40

50

ら 5 m C / g D N A 共分布の特徴は、グローバル 5 m C 及び g D N A の含量と共に、前癌性及び癌性細胞の同定のために、痰由来の個々の細胞及び細胞集団の特徴付けにおいて考慮される 3 つのパラメータ / バイオマーカーである。

【 0 0 3 7 】

当業者は、本発明の実施に使用できる、本明細書に記載のものと類似または同等の多くの方法及び材料を認識するであろう。実際に、本発明は、ここに記載した方法及び材料に限定されなるものではない。

【実施例】

【 0 0 3 8 】

実施例 1

追加の背景

肺癌及び診断現状

2 0 1 0 年には、米国で新たに発症した肺癌の症例は 2 0 万件以上であり、これは全ての新たな癌症例の 1 5 % を占めている。同時期の肺癌死亡者の推定数は約 1 6 万人で、全癌関連死亡者の約 2 8 % を占めている。残念ながら、限られた治療選択肢のために、肺癌は癌関連死の最も一般的な原因である。この病気が初期段階で診断されれば、腫瘍の完全な外科的切除が治癒の好機を提供する。従って、この疾患の早期発見は過去数十年に亘って多くの試みの焦点になってきた。胸部 X 線検査、胸部コンピュータ断層撮影 (C T)、陽電子放出断層撮影 (P E T) スキャンを含む放射線撮影技術を使用した幾つかの臨床試験では、結果がまちまちであり、臨床上的メリットが不明確で且つ非常に高いコストを伴うことが示されてきた。上記のように、胸部 C T スキャンを含む肺癌の早期発見のための放射線撮影方法は高線量の放射線を必要とし、それ自体が、頻繁に使用されると二次悪性腫瘍を発症する高いリスクを課す。その結果、胸部 C T スキャンを肺癌のスクリーニングに頻繁に使用することは、おそらく安全でも経済的でもない。

【 0 0 3 9 】

重要なこととして、以前の試験では、肺癌の早期発見のために痰細胞診を利用していたが、それらは主に剥離した上皮呼吸器細胞の形態変化を評価することに依存しており、それぞれが臨床的に意味の或る利点を示し得る点にまで肺癌症例を検出することはできなかった。

【 0 0 4 0 】

一方、高リスク患者の痰サンプルにおける特定の遺伝子のメチル化状態の評価は、肺癌病変の早期発見に成功している。残念ながら、肺癌は不均一な疾患群であり、全ての症例において様な異常は同定されていない。同様に重要なことは、多数の細胞に亘って遺伝子メチル化状態を平均化する細胞サンプルの分析は、痰の中の癌性の細胞のより小さなサブグループに特有で重要な微妙な情報を隠蔽し、分析結果を偏らせる可能性がある。従って、肺腫瘍を検出するために全ての痰細胞に亘る遺伝子サブセットの異常に依存することは、恐らく症例のあるサブグループのみをカバーできるに過ぎない可能性がある。以前に利用可能な診断方法の欠点を考慮した後、本発明者等は、肺癌の早期検出のためのツールとして、痰中の剥離した呼吸器細胞のグローバルな D N A メチル化状態を細胞ごとに分析しようとした。

【 0 0 4 1 】

癌診断における D N A のメチル化

正常細胞の完全なエピジェネティック平衡は、細胞が形質転換されると実質的に変化する。得られた D N A レベルのエピジェネティック変化は、次の二つのカテゴリーに分類される： (i) C p G 島と称する遺伝子の豊富なゲノム領域の遺伝子プロモーターにおける C p G の遺伝子特異的な過剰メチル化、及び (i i) ゲノム規模の低メチル化であり、その多くは反復 D N A 要素において生じる。異常なメチル化パターンは、幾つかの癌のタイプに関連している。ゲノム規模での低メチル化は、悪性度に密接に類似しており、普遍的な所見である。D N A 低メチル化の分析は、殆ど未開拓のまま残されている。研究モデルとして広く使用されている癌細胞株は、ゲノム全体の脱メチル化において大きな変動を示

10

20

30

40

50

し、これは組織特異性を反映するものであり、確率過程から生じる可能性は低い。悪性細胞は、正常な対応物よりも20～60%少ないゲノムメチルシトシンを含み得る。メチル基の消失は主に、ヒトゲノムの90%超を占める反復DNA配列の低メチル化によって達成され、これには、多くは進化を通してレトロウイルスとして獲得された、短鎖及び長鎖の散在した核要素（SINES及びLINES等の移入可能な要素（ゲノムの約48%）を含む）が含まれる。グローバルなメチル化はまた、多くの癌タイプにおける臨床的結果とグローバルなメチル化レベルの間の関連により示されるように、臨床的に関連性がある。前癌病変が進行するにつれてグローバルなメチル化の損失がより顕著になる傾向があるため、グローバルな低メチル化は癌の進行と関連しているように考えられる。今日まで、差分DNAメチル化分析は、主に電気泳動技術、クロマトグラフィー技術、PCRベースの技術、アレイベースの技術及び配列決定技術を含む分子アプローチによって、定量的に評価されてきた。これら方法の特異性、感度、及び固有の単一塩基分解能の大幅な改善にもかかわらず、それらは単一細胞の高スループット分析においては技術的に困難なままである。これには、PCRに基づく手法の多重化における限界、並びに全ゲノム配列決定、特に反復要素のインターロゲーションについての困難な感度及びコストの問題が含まれる。或いは、DNAメチル化の不均衡、特に反復要素の低メチル化の広がり及び負荷を考慮すると、グローバル核5mCパターンのイメージングに基づく評価は、基礎をなす分子のプロセスが光学顕微鏡で見える大規模のクロマチン再編成を含んでいるので、多数の細胞を同時に分析及び特徴付けるための強力なツールを提供する。

【0042】

定量的DNAメチル化イメージングの重要性

本明細書で実証されるように、定量的DNAメチル化イメージング（3D-qDMI）の方法が開発され、肺癌に適用されている。この非破壊的方法是、細胞及び組織を特徴付けるために、5-メチルシトシン負荷及び空間核分布の並列的な定量的測定を必要とする（次の文献を参照されたい。Tajbakhsh J, et al. Characterization of tumor cells and stem cells by differential nuclear methylation imaging. In: Farkas DL, Nicolau DV, Leif RC, eds. Imaging, Manipulation, and Analysis of biomolecules, Cells, and Tissues. San Jose, CA: Proceedings of the SPIE 2008; 6856: 6859 F1-10; Gertych A, et al. Automated quantification of DNA demethylation effects in cells via 3D mapping of nuclear signatures and population homogeneity assessment. Cytometry A 2009; 75: 569-83; Gertych A, et al. Measuring topology of low-intensity DNA methylation sites for high-throughput assessment of epigenetic drug-induced effects in cancer cells. Exp Cell Res 2010; 316: 3150-60; Gertych A, et al. Homogeneity assessment of cell populations for high-content screening platforms. In: Information Technology in Biomedicine. Vol. 2. Advances in intelligent and soft computing, Vol. 69. Ewa Pietka and Jacek Kawa, Editors, Springer Verlag, Heidelberg, Germany; Tajbakhsh, J. et al. (2012). 3-D Quantitative DNA Methylation Imaging for Chromatin Texture Analysis in Pharmacoepigenomics and

10

20

30

40

50

Toxicogenomics. In Epigenomics: From Chromatin Biology to Therapeutics. K. Appasani, editor. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom; これらの各々は、その内容がここに完全に記載されたと同様に、その全体を本明細書の一部として援用する)。3D-qDMIの実施形態のワークフローが図1に示されている。

【0043】

5mCの負荷及び分布において大きなダイナミックレンジが得られれば、3D-qDMIは、不均一標本内における数千個の細胞の迅速、並行、形態計測的な、単細胞分解能での特徴付けを可能にする。以下は、肺癌診断及び臨床的意思決定における痰サンプル等の非侵襲的代用物の使用に適用可能な、3D-qDMIの利点の一部を強調している：(i) 3D-qDMIは、エラーを生じやすい分離法による細胞濃縮を必要としない；(ii) この方法は、時間のかかるDNA抽出及びDNA増幅を必要としない；(iii) 3D-qDMIは、細胞ごとの分析を提供する；(iv) この方法は、DNAメチル化の特徴に関する異なる細胞型の頻度を含めて、細胞集団の不均一性評価を可能にする；(v) 無関係な細胞を同定して分析から除外することができ、これは浸潤性造血細胞によるサンプル不純物を介したデータ歪曲を防止する；(vi) 費用対効果の高い細胞数測定アプローチは自動化が可能で規模に合わせ易く、従って容易に開発でき且つ臨床現場で実施できる。細胞数測定アプローチは、同時且つ多色のハイコンテンツイメージングに適用することができる。従って、関心のある細胞及び/または浸潤性造血細胞を、細胞特異的マーカーについて更に標識することができる。その後、無関係な細胞を出力されたデータ内で識別し、データ分析の前に除去することができる。更に、この方法は、痰由来細胞を付着させるための支持体として顕微鏡スライド及び生体分子科学協会(SBS)フォーマットのマイクロプレートを使用することに適合している。従って、この方法は、癌診断のために前記フォーマットを日常的に適用する、高スループットの臨床及び診断環境において実施の可能性を有する。詳細に言えば、サンプル調製、染色及び走査の3つの工程は、既存の市販されている高スループット機器を用いて自動化することができる。画像及びデータ分析はコンピュータ化されたプロセスであり、当然ながら自動化された方法で実行され、計算能力によってのみ制限される。

【0044】

サンプルの分析

本明細書に記載の特定の実施形態で実施される3D-qDMIソフトウェアは、画像フレーム内において、(集団解析と結果出力ではなく)個々の細胞の洗練された3次元画像解析を実行するように設計され、従って、可変統計のための細胞のフレキシブルな除去及び組み合わせを可能にする。幾つかの実施形態において、5mC/DAPI共局在パターンの結果は、散布図として表すことができる(図2参照)。しかしながら、当業者は、この種類のデータを表す他の多くの方法があることを容易に理解するであろう。

【0045】

図2に示すように、5mC/DAPI共局在パターンのような5mCの特徴は、集団内の細胞間で変化し得る。従って、細胞集団の不均一性評価は、細胞の組成、即ち攻撃的な癌細胞に類似した異常なMeC表現型を示す可能性のある少数の細胞の同定に重要な、表現型変化の程度を決定する上で重要な特徴である。均質性は、個々の核5mC/DAPIパターンと、全ての個々の核パターンの合計を表す細胞集団全体のグローバルなパターン(参照パターン)との関係を表現することにより、細胞集団全体内での構造的類似性を比較することによって評価することができる。

【0046】

痰検査

本発明者らは、健康な個体(癌歴のない非喫煙者)の痰由来のヒト上気道細胞、並びに肺癌患者(喫煙者)由来の痰細胞及び一致する組織標本、並びに3つの人細胞株における3D核5mCパターンを調査した。細胞株には、不死化正常ヒト上皮細胞株(BEAS-

10

20

30

40

50

2 B)、及びNSCLC株A549(肺基底上皮細胞)、及びH157(高度浸潤性肺癌細胞)が含まれた。図4は、新たに診断され、外科的に切除された肺癌由来の、蛍光標識された切片の正常な柔組織及び腫瘍領域を示す。本発明者らは、著しくグローバルに低メチル化された癌患者の癌性の細胞、及び異常な痰細胞の5mC/DAP Iパターンとは有意に異なる健康な細胞の間で、共通のグローバルなDNAメチル化パターン(図5)を観察した。3つの異なる細胞株及び痰由来細胞並びに正常組織の全ての集団は、その5mC/DAP I共分布に関して、細胞集団レベル及び個々の代表的な核種についての散布図として表示された、高度の均一性(KLカテゴリーマップによって可視化された)を示した。

【0047】

本発明者らは、各細胞型の測定可能な記述子を導入した(図5):プロットの回帰直線及び上方及び下方シグナル境界線ML1及びML2は特徴的であり、それぞれのプロトタイプ細胞型について4つの角度、及び を決定する。得られた差分因子 $F = [(/) \times (/)]$ は各細胞型に特異的であった:0.54(BEAS-2B)、0.42(A549)、0.12(H157)、0.78(典型的な正常組織細胞)、0.45(正常痰細胞)、0.44(癌患者の痰中のN1型細胞の大部分)、0.01(癌患者の痰中のN2型細胞)、及び0.05(典型的な癌組織細胞)。この尺度は、正常細胞及び悪性細胞の検出のためのグローバルなメチル化パターンの識別力を強調している。特に、癌患者の痰中における(N2型)細胞識別特性と典型的な腫瘍組織細胞との類似性は、痰サンプルにおける異常細胞を腫瘍形成の初期段階で検出する上で中心的な役割を果たすことができる。3D核DNAメチル化パターンは、気道の悪性細胞の非侵襲的検出のための新規なバイオマーカーとして役立つとの所見が、図4及び図5に示されている。幾つかの態様において、本発明の方法は、3D-qDMIを利用して、肺癌を発症するリスクの高い個体の痰サンプル中において、剥離された呼吸器細胞の異なるグローバルなDNAメチル化パターンを決定する。詳細に言えば、各痰細胞集団は、細胞組成の評価を提供する決定されたF因子の統計により特徴付けすることができ、これは悪性細胞の検出を容易にすることができるであろう。

【0048】

実施例2

方法

細胞検体の調製

痰の誘導は、高張食塩水(3~5%NaCl)の吸入によって行うことができる。ネブライザーを使用して、1.5mL/分の出力でエアロゾルを生成することができる。対象は、生理食塩水のエアロゾルを最大20分間吸入する。対象は、5分毎に水道水で口を濯いだ後に痰を吐き出すことが推奨される。剥離した上部呼吸器細胞を単離し、スライド/カバースリップまたはマイクロプレートウェル上に固定する。プラスチック容器内に採取したサンプルを、処理するまで4に維持する。10%のスプトリシン溶液として一般に知られる0.1%ジチオスレイトール(DTT)含有のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液でサンプルを希釈し、20分間インキュベートしてから、細胞及び液体(粘液)相を分離するために、300~1500xgにおいて室温で5~10分間遠心分離する。このプロセスは、細胞懸濁液が均質かつ透明に見えるようになるまで繰り返される。次いで、細胞ペレットをPBS中に再懸濁させ、細胞を40~100µmのナイロンメッシュ(細胞ストレーナー)で濾過して、残留粘液及び残屑を除去する。次いで、細胞を300~1500xgで5~10分間遠心分離する。その細胞ペレット(全ての収穫された細胞を含む)を、1~2マイクロリットルの上皮細胞培地に再懸濁させ、顕微鏡ガラスカバースリップ上に移し、37及び5%CO₂で16~48時間培養して、細胞を該カバースリップに付着させる。幾つかの実施形態では、遠心分離されたサンプル(サイトスピン)に対して細胞計数を行い、細胞サンプルを顕微鏡スライド/カバースリップまたはマイクロプレートウェル上に広げる。続いて、細胞を4%パラホルムアルデヒド中で15分~45分間固定し、4でPBS中に維持する。次に、本明細書に記載の3D定量的DNAメチル

10

20

30

40

50

化イメージング(3D-qDMI)により、固定細胞の特徴付けが達成される。

【0049】

上述した気道痰処理方法の代わりに、気道痰を、当該技術分野で知られている任意の方法で処理してよい。単なる一例として、気道痰処理は、Hamid et al. *Eur Respir J* 2002; 20 Suppl. 37, 19s-23sに記載または参照された任意の方法に従って行ってよい。

【0050】

生化学

サンプルの解析は、細胞核における5-メチルシトシンに対して特異的なマウスモノクローナル抗体(クローン33D3)を用いたオーバーレイメチルシトシンパターンの可視化のための免疫蛍光染色と、グローバル核DNAの描写のための4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を用いた対比染色との組み合わせにより達成される。5-メチルシトシン及びgDNAの染色及び可視化のために多くの公的に入手可能なプロトコールが存在するが、幾つかの実施形態では以下の参照文献のプロトコールが使用される: Tajbakhsh J, et al. Characterization of tumor cells and stem cells by differential nuclear methylation imaging. In: Farkas DL, Nicolau DV, Leif RC, eds. *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues*. San Jose, CA: Proceedings of the SPIE 2008; 6856: 6859F1-10; 33: Gertych A, et al. Automated quantification of DNA demethylation effects in cells via 3D mapping of nuclear signatures and population homogeneity assessment. *Cytometry A* 2009; 75: 569-83; Gertych A, et al. Measuring topology of low-intensity DNA methylation sites for high-throughput assessment of epigenetic drug-induced effects in cancer cells. *Exp Cell Res* 2010; 316: 3150-60; Gertych A, et al. Homogeneity assessment of cell populations for high-content screening platforms. In: *Information Technology in Biomedicine. Vol. 2. Advances in intelligent and soft computing*, Vol. 69, 2010; Gertych A, et al. 3-D DNA methylation phenotypes correlate with cytotoxicity levels in prostate and liver cancer cell models. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2013 Feb 11; 14: 1; Tajbakhsh J, et al. Early In Vitro Differentiation of Mouse Definitive Endoderm is Not Correlated with Progressive Maturation of Nuclear DNA Methylation Patterns. *PLoS ONE* 2011; 6(7): e21861; Tajbakhsh J. Covisualization of methylcytosine, global DNA, and protein biomarkers for In Situ 3D DNA methylation phenotyping of stem cells. *Methods Mol Biol*. 2013; 1052: 77-88;; Oh JH, et al. Nuclear DNA methylation and chromatin condensation phenotypes a

10

20

30

40

50

re distinct between normally proliferating/aging, rapidly growing/immortal, and senescent cells. *Oncotarget* 2013;4:474-93; Tajbakhsh J, et al. Dynamic heterogeneity of DNA methylation and hydroxymethylation in embryonic stem cell populations captured by single-cell 3D high-content analysis. *Exp Cell Res*. 2015;332:190-201。これらの各々は、その全体を本明細書の一部として援用する)。染色に使用される5mC抗体は、(www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Reynaud%20C%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=1739950) Boullanger P, Grange J, Barbesti S, Niveleau A. Monitoring of urinary excretion of modified nucleosides in cancer patients using a set of six monoclonal antibodies. *Cancer Lett* 1992 Mar 31;63(1):81に記載されたものであることができる。抗5mC抗体の特異性は、免疫細胞化学と組み合わされた、シトシン変異体を含むDNAマイクロアレイ及び標準対照実験を用いて確認することができる。下流の分析において造血細胞、特に白血球(白血球)を排除するために、抗CD34抗体及び抗CD45抗体で検体を免疫共表現型決定することができる。幾つかの実施形態において、本発明者らは、CK8、CK18、及びCK19等のサイトケラチンに対する抗体を用いて、上皮細胞マーカーのための同時標識を行う。しかしながら、悪性呼吸器細胞は、多数の正常な上皮細胞(スライド上)に分散している。従って、上皮マーカーは正常細胞と異常細胞の区別には役立たない。

【0051】

免疫蛍光(IF)

以下の非限定的なプロトコールは、18mmの丸いガラスカバースリップ(No.1)上に捕捉され、12ウェルのマイクロプレートにおいて処理される痰由来細胞の簡便な処理のためのものである。試薬の量は、他の細胞支持体及び反応チャンバについて調節する必要がある。

【0052】

1日目

(a) 組織切片の固定

1) 痰由来細胞を、4%パラホルムアルデヒド(PFA)/PBS中において室温で30~45分間固定し、次いで室温で3~5分間PBSで3回洗浄する。直ちに処理しない細胞は、2~8において、0.002%NaN₃/PBS中で更に保存すべきである。

【0053】

(b) 細胞のIF前処理

2) 細胞をPBS(2mL)中で5分間洗浄する。

3) 室温で20分間、0.5%サポニン/0.5%Triton X-100/PBS(5mL)で細胞を透過性処理し、室温において3~5分間PBS(2mL)で3回洗浄する。

4) 細胞を100µg/mLのRNアーゼA/PBS(0.2mL)を用いて37で30分間処理し、室温においてPBS(2mL)で3~5分間3回洗浄する。

5) 37で30分間、3%ウシ血清アルブミン(BSA)/PBS(1mL)を用いて組織をブロックする(一次抗体を適用する前に)。

【0054】

(c) 第1の免疫蛍光

6) 組織を、細胞表現型を決定するための一次抗体または適合性抗体のカクテル(例えば、ウサギ抗CK19ポリクローナル抗体、Abcamカタログ番号ab15463、1

10

20

30

40

50

: 1000希釈液; ヒツジ抗CD34ポリクローナル抗体、R&Dシステムズ、カタログ番号AF7227、1 μ g/mLの濃度で; ニワトリ抗CD45、GeneTexカタログ#GTX82139、1:500希釈)と共に、3%BSA/PBS(0.7mL)中において2~8で一晚インキュベートする。

【0055】

2日目

7) 細胞を、室温において0.1%BSA/0.1%Tween20/PBS(2mL)で5分間、4回洗浄する。

8) 組織を、3%BSA/PBS(0.7mL)中の各々5 μ g/mL濃度の2次抗体(例えば、ロバ抗ヤギIgG(H+L)-Alexa568、Invitrogen、A11057)と共に、37で1時間インキュベートする。

9) 組織を、0.1%BSA/0.1%Tween20/PBS(2mL)で4回、室温において3~5分間洗浄し、また0.1%BSA/PBS(2mL)で1回洗浄する。

10) 室温で15分間、4%PFA/PBS(1mL)中で組織を固定する。細胞を、PBSで3~5分間、3回洗浄する。

11) 2N HCl(1mL)を用いて、細胞を室温で正確に40分間脱プリン化し、室温で3~5分間PBS(2mL)で3回洗浄する。

12) 37で30分間、3%BSA/PBS(1mL)で細胞をブロックする(一次抗体を適用する前)。

【0056】

(d) 第2の免疫蛍光

13) 3%BSA/PBS(0.7mL)中の1~2 μ g/mL濃度の一次抗体(例えばマウス抗MeC、クローン33D3mAb、Aviva Systems Biology、カタログ番号AMM99021)と共に、2~8で細胞を一晚インキュベートする。

【0057】

3日目

14) 細胞を、室温において5分間、0.1%BSA/0.1%Tween20/PBS(2mL)で4回、0.1%BSA/PBS(2mL)で1回洗浄する。

15) 細胞を、2次抗体(例えば、ロバ抗マウスAlexa488 IgG(H+L)、Invitrogen A21202、及びニワトリ抗ウサギIgG(H+L)-Alexa647、Invitrogen A21443)と共に、両者共3%BSA/PBS(0.2mL)中5 μ g/mLの濃度で、37において2時間インキュベートする。

16) 組織を、室温において、0.1%BSA/0.1%Tween20/PBS(5mL)で4回5分間、0.1%BSA/PBSで1回5分間洗浄する。

17) 組織を、室温において20分間、DAPI/PBS溶液(室温に温める)5mL中でインキュベートし、非特異的DAPI染色をリンスのためにPBS中で約30秒間リンスする。

18) マイクロプレートからカバースリップを取り出し、室温または37のオープン(10~30分)中において、暗所で完全に乾燥させる。

19) 清潔で乾燥したガラススライド区画に7~10 μ Lのマウント溶液(例: Prolong-Gold、Invitrogen)を移し、該マウント液滴上にカバースリップ(スライドガラスに面した細胞を含む)を置く(厳格に気泡を避ける)。

【0058】

分子的確認方法

分子的確認方法は、画像サイトメトリー(3D-qDMI)5mCの特徴的結果を確認するために、単離された細胞(選択された痰サンプルから)から抽出したDNAに対して並行して行うことができる: (i) 5mC負荷及び(ii) 反復DNA要素類の低メチル化(Alu/LINE-1/Sat/Sat2)-the major causat

10

20

30

40

50

ive of global DNA hypomethylation - 両者共に Repeat-Sequence MethyLightによって評価することができる (Weisenberger DJ et al., Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res.* 2005 Dec 2; 33(21): 6823-36 を参照のこと、その全体を本明細書の一部として援用する)。この方法は、グローバル5mCの含量測定に従来使用されていた、5mC負荷の測定における高速液体クロマトグラフィー (HPLC) または高性能キャピラリー電気泳動 (HPCE) の正確な代用品であることが証明されている。Repeat-Seq MethyLight及び3D-qDMIによって比較的に行われた5mCの含量測定値は、非常に高い相関 (0.86-0.96) を示した (Gertych A, et al. 3-D DNA methylation phenotypes correlate with cytotoxicity levels in prostate and liver cancer cell models. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2013 Feb 11; 14: 11 に記載されており、その全体を本明細書の一部として援用する)。

10

【0059】

画像取得

画像取得は、高分解能共焦点走査顕微鏡法を利用して行うことができる。幾つかの非限定的な実施形態では、Leicaの市販されているTCS SP5 X Supercontinuum顕微鏡 (Leica Microsystems) が利用される。このシステムは、470~670nmの連続範囲内において1nm刻みで励起及び発光に完全な自由度及び適応性を提供する。顕微鏡は、DAPI蛍光の励起のために、405nmのダイオードレーザーラインと結合させることができる。シリアル光学セクションは、Plan-Apo 63X 1.4オイル浸漬レンズ及びピンホールサイズ1.0のエアリーユニットを使用して、200~300nm単位で収集することができる。表面滲みを回避するために、各チャネルの画像化を順次取得することができる。非限定的な例として、典型的な画像サイズは、約116nm×116nm×230.5nm (x、y、及びz軸) のそれぞれのボクセルサイズ、及び全てのチャネルにおいて画素当たり8~16ビットの分解能で、1024×1024~2048×2048の範囲に亘ることができる。出力ファイルフォーマットは、3D画像解析に利用できる一連のTIFF画像であることができる。

20

30

【0060】

3D画像解析

下記文献に記載されているように、パターン認識及びマルチパラメトリックハイコンテンツ分析のために開発された専用のアルゴリズムを適用することによって3D画像解析を行うことができる: Gertych A, et al. Automated quantification of DNA demethylation effects in cells via 3D mapping of nuclear signatures and population homogeneity assessment. *Cytometry A* 2009; 75: 569-83; Gertych A, et al. Measuring topology of low-intensity DNA methylation sites for high-throughput assessment of epigenetic drug-induced effects in cancer cells. *Exp Cell Res* 2010; 316: 3150-60; Gertych A, et al. (2010). Homogeneity assessment of cell populations for high-content screening platforms. In: *Information Technology in Biomedicine. Vol. 2. Advances in intelligent and soft computing*, Vol. 69. Ewa Pietka and Jacek Ka

40

50

wa, Editors, Springer Verlag, Heidelberg, Germany; 及び Tajbakhsh J, (2012). 3-D Quantitative DNA Methylation Imaging for Chromatin Texture Analysis in Pharmacoepigenomics and Toxicopigenomics. In Epigenomics: From Chromatin Biology to Therapeutics. K. Appasani, editor. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. これらの各々は、その全体がここに記載されているかのように本明細書の一部として援用される。

【0061】

10

幾つかの実施形態において、画像解析ツールは次の3つのステップで動作する：1) 全ての細胞（画像化された集団内における）が3Dセグメンテーションのために処理される；2) 核内に存在する蛍光シグナルが、(a) 核全体の5-メチルシトシン負荷を決定するため、(b) 5mCシグナルの共通分布図（散布図）及びグローバル核DNA（DAPIによって可視化される）を作成するため、及び(c) 2つの最初の5mC特徴に関する変動性/異質性のために測定される。各検体内において、DNAメチル化負荷及び全ての細胞間の作成された2Dダイアグラムの類似性分析を行い、細胞集団の均質性を決定する。

【0062】

20

類似性分析に関して、一般的に適用される類似性測度は、目的表現に従って次の三つのグループに分類される：(a) ユークリッド距離及びミンコウスキ距離を含む点ベースのもの、(b) Jaccard、Tanimoto及びDiceの指標を含む集合ベースのもの、及び(c) それぞれ Bhattacharyya、Kullback-Leiblerの距離、及び相関ベースのマハラノビス距離を用いた確率的なもの (Dice LR. Measures of the amount of ecological association between species. J Ecology 1945; 26: 297-302; Bhattacharyya A. On a measure of divergence between two statistical populations defined by probability distributions. Bull Calcutta Math Soc 1943; 35: 99-109; Mahalanobis PC. On the generalized distance in statistics. Proc Nat Inst Sci India 1936; 2: 49-55; Kullback S, Leibler RA. (1951), "On Information and Sufficiency". Annals of Mathematical Statistics 22(1): 79-86; Jaccard P. (1912), "The distribution of the flora in the alpine zone", New Phytologist 11: 37-50; Rogers DJ, Tanimoto TT. (1960), "A Computer Program for Classifying Plants". Science 132(3434): 1115-1118; Elena Deza & Michel Marie Deza (2009) Encyclopedia of Distances, page 94, Springer; Levandowsky M, Winter D. (1971), "Distance between sets", Nature 234(5): 34-35を参照されたい。これらの全てを、その全体がここに記載されているかのように本明細書の一部として援用する)。

30

40

【0063】

上記に示したように、非限定的な一例において、Kullback-Leibler (KL) 発散測定、即ち堅固な幾何学的形状及び位置を有さない核標的の分析に非常に適した数学的操作を用いることができる (Gertych A, et al. Automat

50

ed quantification of DNA demethylation effects in cells via 3D mapping of nuclear signatures and population homogeneity assessment. *Cytometry A* 2009; 75: 569-83を参照されたい、これはその内容が完全に記載されているかのように本明細書の一部として援用される)。KL発散は、細胞の集団内評価を可能にするために、個々の核の正規化された散布図と参照散布図との間の類似性尺度として適用することができる。KL値をより解り易くするために、4つのソフト修飾子をソフトウェアに導入して、細胞集団全体に対する細胞の類似度を定義することができる。これらの程度は、類似しているKL [0, 0.5)、類似している可能性が高いKL [0.5, 2)、類似している可能性が低いKL [2, 4.5)、及び類似していないKL [4.5,)等のように、KL発散の特定の範囲に関連付けることができる(図3)。

【0064】

上記の様々な方法及び技術は、本発明を実施するための多くの方法を提供する。当然のことながら、記載された全ての目的または利点が、必ずしも本明細書に記載の任意の特定の実施形態に従って達成されるわけではないことが理解されるべきである。従って、例えば、当業者は、必ずしも本明細書で教示または示唆された他の目的または利点を達成することなく、本明細書に教示された1つの利点または一群の利点を達成または最適化するように、当該方法を実施できることを認識するであろう。ここには種々の選択肢が記載されている。幾つかの好ましい実施形態は、特に、1つ、別の、または幾つかの特徴を含む一方、他の実施形態は、特に、1つ、別の、または幾つかの特徴を排除し、また更に他の実施形態は、1つ、別の、または幾つかの有利な特徴を含むことにより、特別な特徴を軽減することを理解すべきである。

【0065】

更に、当業者は、異なる実施形態に由来する種々の特徴が適用可能であることを認識するであろう。同様に、上述の様々な要素、特徴及び工程、並びにそのような各要素、特徴または工程の他の既知の均等物は、ここに記載した原理に従って当該方法を実施するために、当業者の1人が様々な組み合わせで使用することができる。種々の要素、特徴、及び工程の中で、幾つかは多様な実施形態において特に含められ、また他は特に除外されるであろう。

【0066】

本出願は、特定の実施形態及び実施例の文脈で開示されているが、当業者は、本出願の実施形態が具体的に開示された実施形態を超えて、他の代替の実施形態及び/または使用、並びにその変形及び均等物にも及ぶことを理解するであろう。

【0067】

幾つかの実施形態において、本願の特定の実施形態を説明する文脈(特に、添付の特許請求の範囲のある特定の文脈において)で使用される「1つの(a)」及び「1つの(an)」並びに「その(the)」、並びに類似の言及は、単数及び複数の両者をカバーするように解釈することができる。本明細書における数値範囲の記載は、単に、その範囲内の個々の値を個別に参照する略式の方法として役立つことを意図したものである。本明細書中で別途示されない限り、それぞれの個々の値は、本明細書に個別に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書中に記載される全ての方法は、本明細書中で別途指示しない限り、または文脈において明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施され得る。本明細書の特定の実施形態に関して提供される任意の、及び全ての例、または例示的な用語(例えば、「~のような」)の使用は、単に当該適用をより良く浮かび上がらせることを意図しており、特許請求の範囲に記載の適用範囲を限定するものではない。明細書中の言語は何れも、該適用の実施に不可欠な、特許請求の範囲に記載されない任意の要素を示すものと解釈されるべきではない。

【0068】

本出願を実施するために本発明者等が知っている最良の形態を含めて、本出願の好まし

10

20

30

40

50

い実施形態を本明細書に記載する。これらの好ましい実施形態の変形例は、上記の説明を読んだときに当業者に明らかになるであろう。当業者は、このような変形例を適切に用いることができ、また本明細書に具体的に記載されている以外の方法で本願を実施できると考えられる。従って、本出願の多くの実施形態は、適用される法が許容するように、本明細書に添付の特許請求の範囲に記載した主題の全ての改変例及び均等物をも含むものである。更に、本明細書中で別途に指示しない限り、または文脈によって明確に否定されない限り、その可能な全ての変形例における上記要素の任意の組み合わせが、本出願に含まれる。

【0069】

本明細書中で参照される全ての特許、特許出願、特許出願の刊行物、並びに記事、書籍、明細書、刊行物、文書、物などの他の資料は、全ての目的のために、その全体が本明細書の一部として援用される。但し、本文書と一致しないか、または矛盾している同資料、または同資料の何れか、または現在または後で本文書と関連する特許請求の範囲の最も広い範囲について限定的な影響を及ぼし得る同資料の何れかに関連した、出願手続ファイル履歴を除く。一例として、援用された資料の何れかに関連した用語の説明、定義及び/または使用と、本文書に関連したものととの間に不一致または矛盾があるとするれば、本文書における当該用語の説明、定義及び/または使用が優先する。

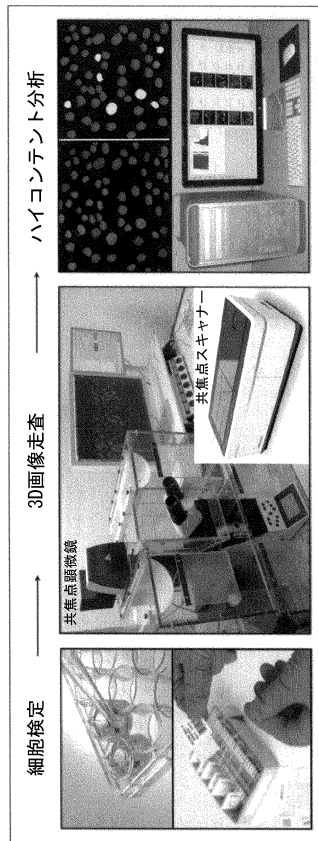
【0070】

最後に、本明細書に開示される本願の実施形態は、本願の実施形態の原理の例示であることが理解されるべきである。採用できる他の改変は、本願の範囲内であることができる。こうして、限定ではなく例として、本明細書の教示に従い、本願の実施形態の代替構成を利用することができる。従って、本願の実施形態は、図示及び説明したものに厳密に限定されるものではない。

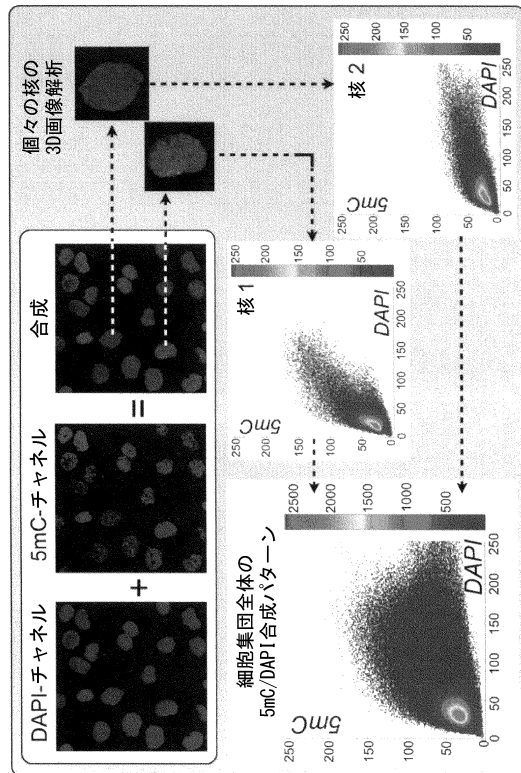
10

20

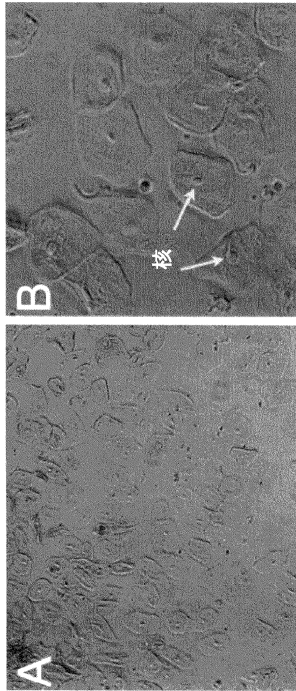
【図1】



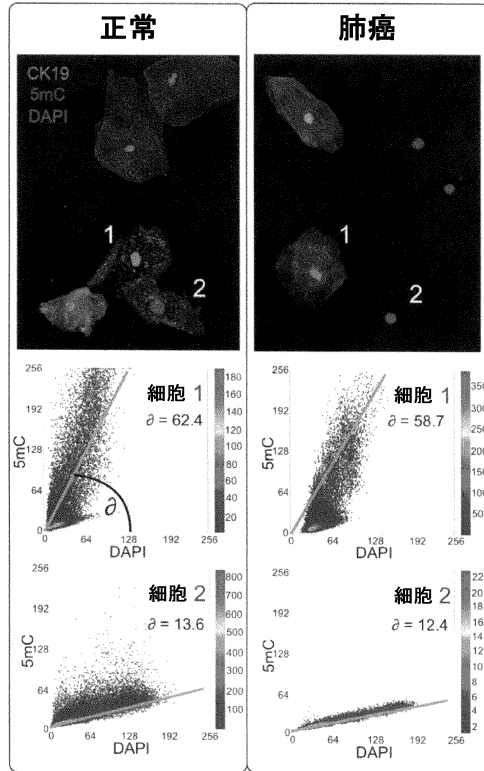
【図2】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 33/574 Z
 G 0 1 N 21/64 F

(73)特許権者 508229390

アメリカ合衆国

アメリカ合衆国 2 0 4 2 0 ディストリクト オブ コロンビア パーモント アベニュー ノースウエスト 8 1 0

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 タジバクシュ ジアン

アメリカ合衆国 9 1 4 3 6 カリフォルニア州 エンシノ エスカロン ドライブ 1 7 1 2 8

(72)発明者 モルタザヴィ ファリボルズ

アメリカ合衆国 9 1 3 2 6 カリフォルニア州 ポーター ランチ モンダヴィ ウェイ 1 1 5 0 8

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 1 3 4 7 5 (U S , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 1 5 1 4 6 8 (U S , A 1)

Scheicher M. E. et al. , Sputum Induction: Review of Literature and Proposal for a Protocol , Sao Paulo Medical Journal , 2 0 0 3 年 1 月 1 日 , Vol.121, No.5 , PP.213-219

Gertych A. et al. , 3-D DNA Methylation Phenotypes Correlate with Cytotoxicity Levels in Prostate and Liver Cancer Cell Models , BMC Pharmacology and Toxicology , 2 0 1 3 年 2 月 1 1 日 , Vol.14, No.11 , PP.1-21

Kim C. E. et al. , Sputum-Based Molecular Biomarkers for the Early Detection of Lung Can

cer: Limitations and Promise, *Cancers*, 2011年 1月 1日, Vol.3, No.3, PP.2975-2989

Gertych A. et al., Measuring Topology of Low-Intensity DNA Methylation Sites for High-Throughput Assessment of Epigenetic Drug-Induced Effects in Cancer Cells, *Experimental Cell Research*, 2010年, 316, PP.3150-3160

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	通过确定痰液衍生细胞的dna甲基化表型检测早期肺癌的方法		
公开(公告)号	JP6696974B2	公开(公告)日	2020-05-20
申请号	JP2017511687	申请日	2015-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	雪松-西奈医学中心 加利福尼亚大学董事会 美国政府		
申请(专利权)人(译)	雪松 - 西奈医疗中心 加州大学董事会 美国		
当前申请(专利权)人(译)	雪松 - 西奈医疗中心 加州大学董事会 美国		
[标]发明人	タジバクシュジアン モルタザヴィファリボルズ		
发明人	タジバクシュ ジアン モルタザヴィ ファリボルズ		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/02 G01N33/48 G01N33/53 G01N21/64		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/154 G01N1/30 G01N33/57423 G01N2440/12 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/574.D C12Q1/02 G01N33/48.P G01N33/53.M G01N33/53.Y G01N33/574.Z G01N21/64.F		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/043346 2014-08-28 US		
其他公开文献	JP2017526921A JP2017526921A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在某些实施方案中，本申请公开了检测肺癌的方法。该方法包括表征从人体痰液中提取的细胞，这是有价值的组织替代物，是上呼吸道细胞的来源，在肺癌的发展过程中，上呼吸道细胞在5早期就开始癌变。该方法包括用荧光报道分子对提取的细胞进行染色，该荧光报道分子在标记细胞的细胞核中产生特定模式，可以通过光学显微镜观察到这种模式。该模式与一种称为DNA甲基化的DNA的表观遗传编码有关，与正常的呼吸细胞相比，它在癌症发展过程中在肺的特定细胞中发生了变化。

(45) 発行日 令和2年5月20日(2020.5.20)

(24) 登録日 令和2年4月27日(2020.4.27)

(5) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	D
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	M
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y

請求項の数 22 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-511687 (P2017-511687)	(73) 特許権者	514135801
(86) (22) 出願日	平成27年8月28日(2015.8.28)		シーダース-サイナイ メディカル センター
(65) 公表番号	特表2017-526921 (P2017-526921A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス ビバリー プールバード 8700
(43) 公表日	平成29年9月14日(2017.9.14)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/047567	(73) 特許権者	506115514
(87) 国際公開番号	W02016/033542		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
(87) 国際公開日	平成28年3月3日(2016.3.3)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94607-5200、オークランド、フランクリン ストリート 1111、12番フロア
審査請求日	平成30年8月24日(2018.8.24)		
(31) 優先権主張番号	62/043,346		
(32) 優先日	平成26年8月28日(2014.8.28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 痕由来組織のDNAメチル化表現型決定による早期肺癌検出方法