

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6757935号
(P6757935)

(45) 発行日 令和2年9月23日(2020.9.23)

(24) 登録日 令和2年9月3日(2020.9.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q	1/6809	(2018.01)	C 12 Q	1/6809	Z
G 01 N	33/53	(2006.01)	G 01 N	33/53	D
A 61 K	31/704	(2006.01)	G 01 N	33/53	M
A 61 K	31/337	(2006.01)	A 61 K	31/704	
A 61 K	39/395	(2006.01)	A 61 K	31/337	

請求項の数 17 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-570087 (P2016-570087)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月2日(2015.6.2)
 (65) 公表番号 特表2017-527775 (P2017-527775A)
 (43) 公表日 平成29年9月21日(2017.9.21)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2015/033827
 (87) 國際公開番号 WO2015/187727
 (87) 國際公開日 平成27年12月10日(2015.12.10)
 審査請求日 平成30年5月31日(2018.5.31)
 (31) 優先権主張番号 62/007,830
 (32) 優先日 平成26年6月4日(2014.6.4)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 516355586
アトッサ ジェネティックス インク.
アメリカ合衆国 98104 ワシントン
州 シアトル スプリング・ストリート
107
(74) 代理人 100082072
弁理士 清原 義博
(72) 発明者 チエン, シューチー¹
アメリカ合衆国 98102 ワシントン
州 シアトル イーストレイン・アヴェニ
ュー・イースト 2345 スイート 2
O 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】分子マンモグラフィ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B I - R A D S I I I または B I - R A D S I V の病変を有すると特徴づけられた個人の非全身性の乳房の異常を処置する方法に使用するための薬剤の製造における治療薬の使用であって、

前記方法は、マンモグラフィ装置によって加えられた圧力によるマンモグラム画像化中に取得された個人の管内流体において、乳房の異常と関連付けられた少なくとも1つのバイオマーカーの増加した存在または減少した存在を検出することを含み、

少なくとも1つのバイオマーカーは、変化したm i R N A シグネチャまたはプロファイルを含む、使用。

【請求項 2】

個人の管内流体の圧出は、個人の乳頭へのアトロピンまたはオキシトシンの投与により刺激される、請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

少なくとも1つのバイオマーカーは、C K 5、C K 14、C K 7、C K 18、およびp 6 3からなる群から選択される抗原をさらに含む、請求項1に記載の使用。

【請求項 4】

少なくとも1つのバイオマーカーは、u P A、P A I - 1、またはG a l - G a l N A c、またはu P A、P A I - 1またはG a l N a c トランスフェラーゼ遺伝子の変化したD N Aメチル化のパターンをさらに含む、請求項1に記載の使用。

【請求項 5】

治療薬は、アントラサイクリン、プラチナ製剤、タキサン、またはこれらの組み合わせである、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

治療薬は、アド - ト拉斯ツズマブエムタンシン、アルブミン結合パクリタキセル、アナストロゾール、酪酸、カペシタビン、カルボプラチニン、シスプラチニン、シクロホスファミド、ドセタキセル、ドキソルビシン H C 1、エピルビシン H C 1、エリブリン、エベロリムス、エキセメスタン、フルオロウラシル、フルベストラント、ゲムシタビン H C 1、酢酸ゴセレリン、イクサベピロン、ラパチニブジトシラート、レトロゾール、リポソームドキソルビシン、酢酸メゲストロール、メトレキセート、ミトキサントロン、パクリタキセル、パミドロン酸二ナトリウム、ペルツズマブ、ラロキシフェン、タモキシフェン、タモキシフェン派生体、N - デスマチルタモキシフェン、エンドキシフェン、シス - タモキシフェン、トレミフェン、トラスツズマブ、ビノレルビン、またはこれらの組み合わせである、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の使用。 10

【請求項 7】

治療薬は、S E R M、S E R D、A I、これらの薬学的な塩、またはこれらの組み合わせである、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】

S E R M は、タモキシフェン、タモキシフェン派生体、シス - タモキシフェン、エンドキシフェン、デスマチルタモキシフェン、ラソフォキシフェン、ラロキシフェン、ベンゾチオフェン、バゼドフォキシフェン、アルゾキシフェン、ミプロキシフェン、レボルメロキシフェン、ドロロキシフェン、クロミフェン、イドキシフェン、トレミフェン、E M 6 5 2、およびE R A - 9 2 からなる群から選択される、請求項 7 に記載の使用。 20

【請求項 9】

治療薬は、少なくとも 1 つのオメガ 3 脂肪酸および少なくとも 1 つのビタミン D 化合物をさらに含む、請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 10】

個人は、C C H、A D H、D C I S、またはI D C を有するとさらに特徴づけられる、請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 11】

治療薬は、タモキシフェンまたはタモキシフェン派生体である、請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の使用。 30

【請求項 12】

治療薬は、エンドキシフェンである、請求項 1 1 に記載の使用。

【請求項 13】

治療薬は、フルベストラントをさらに含む、請求項 1 1 に記載の使用。

【請求項 14】

治療薬は、抗腫瘍抑圧遺伝子m i R N A の抑制物質を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 15】

治療薬は、o n c o m i r の活性化剤を含む、請求項 1 に記載の使用。 40

【請求項 16】

治療薬は、D N A メチル化の活性化剤またはD N A メチル化剤を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 17】

m i R N A は、L e t - 7 c、m i R - 2 7 a、m i R - 9 2 a、m i R - 3 8 3、m i R - 2 0 2、m i R - 1 0 7、m i R - 1 4 1、m i R - 1 8 3、m i R - 4 5 4、m i R - 6 5 0、m i R - 3 3 5、m i R - 5 6 6、m i R - 4 9 7、m i R - 2 0 4、m i R - 2 0 a、m i R - 1 3 2、m i R - 5 3 9、m i R - 2 2 1、m i R - 2 1、m i R - 2 0 0 c、m i R - 2 0 0 b、m i R - 6 3 8、m i R - 5 7 2、m i R - 6 7 1 - 5 p、m i R - 3 0 d、m i R - 1 2 7 5、m i R - 1 5 b、m i R - 6 4 4、m i R - 50

195、miR - 557、miR - 1207 - 5p、miR - 874、miR - 556 - 3p、miR - 933、miR - 96、miR - 575、Let - 7f、miR - 15a、miR - 1202、miR - 143、miR - 19b、miR - 1915、miR - 1274b、miR - 1268、miR - 106b、miR - 634、miR - 129、miR - 572、miR - 17、miR - 29b、miR - 877、miR - 425、miR - 181a、miR - 193a、miR - 193b、miR - 145、miR - 17 - 5p、miR - 30b、miR - 34a、miR - 125b、miR - 146a、miR - 128、miR - 340、miR - 20、miR - 26a、miR - 322、miR - 93、miR - 519c、miR - 23b、miR - 548a - 3p、miR - 183*、miR - 124、miR - 29a*、miR - 506、miR - 3143、miR - 4324、miR - 569、miR - 548e、miR - 491 - 3p、miR - 3672、miR - 544b、miR - 135b、miR - 2117、miR - 590 - 3p、miR - 378*、miR - 135a、およびこれらの組み合わせから選択される、請求項1乃至16のいずれか1項に記載の使用。
10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2014年6月4日に出願された米国仮特許出願第62/007,830号の利益を主張し、参照によってその全体が本明細書中に組み込まれる。

20

【背景技術】

【0002】

乳癌は女性の癌において際立って最も一般的な形態であり、かつ人間の癌による死において2番目の主要な死因である。乳癌の診断および処置における進歩にもかかわらず、この疾患の罹患率は、1940年以来1年当たり約1%の比率で着実に上昇している。現在は、北アメリカ在住の女性が生涯のうちに乳癌になる可能性は、8人のうち1人である。

【0003】

現在においてマンモグラフィの広範囲に普及した使用は、乳癌の改善された検知をもたらした。それにもかかわらず、乳癌による死亡率は、女性100,000人当たり約27人の死亡から変化しなかった。マンモグラフィにおいて広く容認された予測値リスク診断および品質保証ツールである乳腺画像報告データシステム(BI-RADS)は、乳房の病変を0からVIまでのいくつかのBI-RADSカテゴリに分類し、BI-RADSの分類に基づいて、診断上および疾患管理の提案を行うため、内科医に利用されている。おそらくは高い程度に間違ったBI-RADSカテゴリへの誤った指定、およびその臨床の要素に対する影響により、極めて頻繁に、処置の選択肢および生存率が厳しく制限されてしまう進行し過ぎた段階で乳癌は発見される。実際に、女性がBI-RADS分類に基づいて入手する情報は、追加の診断のために呼び戻されるか呼び戻されないかの違い、および早期発見の失敗を意味する可能性がある。スケールの小さい側(すなわち、BI-RADS IまたはII)、およびスケールの大きい側(BI-RADS IVまたはV)において放射線専門医中の高いレベルの一一致または合意が存在する一方、カテゴリIIおよびIIIへの乳房の病変の指定においては放射線専門医の間でより高い程度の不一致が観察されるようである。Inter- and intra-radiologist variability in the BI-RADS assessment and breast density groups categories for screening mammograms. Redondo et al. Br J Radiol. 85(1019); 2012 Nov, pages 1465 - 1470; Use of the American College of Radiology BI-RADS guidelines by community radiologists: concordance of assessments and recommendations assigned to screening mammog
30
40
50

rams. Lehman et al. Am. J. Roentgenology. 2002 179 (1), pages 15 - 20. したがって、より効果的な疾患分類、乳房の病変の早期発見、および乳房の異常の診断に対する未だ対処されていない必要性が存在する。

【発明の概要】

【0004】

特定の実施形態では、マンモグラフィ中に個人の乳頭から取得した管内流体をスクリーニングして、乳房の異常と関連付けられた少なくとも1つのバイオマーカーを得る工程を含む、診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法が本明細書に記載される。特定の実施形態では、診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法は、B I - R A D S I I I またはB I - R A D S I V の病変を持っている個人の診断または予後判定のために特に有用である。いくつかの実施形態では、方法はさらに乳頭を収集装置に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、収集装置はさらに装置を乳房に接続する乳房結合部材を含む。いくつかの実施形態では、固体相のサンプル収集媒体は、吸収性の紙、顕微鏡用のスライドガラス、毛細管チューブ、収集チューブ、カラム、マイクロカラム、ウェル、プレート、膜、フィルタ、樹脂、無機のマトリックス、ビーズ、微粒子のクロマトグラフィーの媒体、プラスチック微粒子、ラテックス粒子、コーティングされたチューブ、コーティングされたテンプレート、コーティングされたビーズ、コーティングされたマトリックス、およびそれらの組み合わせより選択される。
いくつかの実施形態では、方法はさらに、マンモグラフィ前に個人の乳房の乳管からケラチンを取り除く工程を含む。いくつかの実施形態では、方法はさらに、マンモグラフィ前に個人の乳頭にアトロピンを投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、方法はさらに、マンモグラフィの実施前に個人にオキシトシンを投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、スクリーニングは管内流体からの細胞を、C K 5、C K 14、C K 7、C K 18、およびp 6 3 からなる群より選択された抗原に結合する抗体に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのバイオマーカーは、細胞学、タンパク質、糖タンパク質、D N A、R N A、遺伝子突然変異、一塩基変異多型、D N Aコピー数、D N A、ヒストンおよび/またはタンパク質のメチル化、m i R N A、マイクロバイオーム、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、スクリーニングは管内流体からの細胞を、C K 5、C K 14、C K 7、C K 18、およびp 6 3 からなる群より選択された抗原に結合する抗体に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、スクリーニングは管内流体のサンプル中において、少なくとも1つ以上のm i R N A (m i R N A) の存在および/またはレベルを判断する工程、m i R N Aシグネチャをプロファイリングする工程、あるいはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、m i R N A は表3、表4、表5、およびそれらの組み合わせより選択される。いくつかの実施形態では、管内流体サンプル中のm i R N A はエクソソームである(e x o s o m a l) 。いくつかの実施形態では、スクリーニングは増幅、シーケンシング、制限長多型性解析、マイクロアレイ解析、多重の解析、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、管内流体の細胞をu P A、P A I - 1 およびG a 1 - G a 1 N A c に結合する抗体に接触させる工程、表5に記載されている変化したm i R N Aシグネチャを管内流体のサンプル中で検知する工程、または、u P A、P A I - 1 およびG a 1 N A c トランスフェラーゼ遺伝子の変化したD N Aメチル化のパターンを管内流体のサンプル中で検知する工程を含む。

【0005】

いくつかの実施形態では、方法はさらに、スクリーニングの結果に基づいた個人のための処置レジメンを決定または修正する工程を含む。いくつかの実施形態では、処置レジメンは治療薬、放射線処置および/または乳房組織の外科的な切除を含む。いくつかの実施形態では、治療薬は、アントラサイクリン(例えばドキソルビシン、またはエピルビシン)、プラチナ製剤、タキサン(例えば、パクリタキセルまたはドセタキセル)またはそれ

らの組み合わせである。いくつかの実施形態では、治療薬は、アド - トラスツズマブエムタンシン、アルブミン結合パクリタキセル、アナストロゾール、酪酸、カペシタビン、カルボプラチニン、シスプラチニン、シクロホスファミド、ドセタキセル、ドキソルビシン H C 1、エピルビシン H C 1、エリブリン、エベロリムス、エキセメスタン、フルオロウラシル、フルペストラント、ゲムシタビン H C 1、酢酸ゴセレリン、イクサベピロン、ラパチニブジトシラート、レトロゾール、リポソームドキソルビシン、酢酸メゲストロール、メトトレキセート、ミトキサンtron、パクリタキセル、パミドロン酸二ナトリウム、ペルツズマブ、ラロキシフェン、タモキシフェン、またはタモキシフェン派生体（4 - ヒドロキシタモキシフェン、N - デスマチルタモキシフェン、およびシス - タモキシフェン等）、トレミフェン、トラスツズマブ、ビノレルビン、またはそれらの組み合わせである。
10 いくつかの実施形態では、治療薬は、アド - トラスツズマブエムタンシン、アルブミン結合パクリタキセル、アナストロゾール、酪酸、カペシタビン、カルボプラチニン、シクロホスファミド、ドセタキセル、ドキソルビシン H C 1、エピルビシン H C 1、エリブリン、エベロリムス、エキセメスタン、フルオロウラシル、フルペストラント、ゲムシタビン H C 1、酢酸ゴセレリン、イクサベピロン、ラパチニブジトシラート、レトロゾール、リポソームドキソルビシン、酢酸メゲストロール、メトトレキセート、ミトキサンtron、パクリタキセル、パミドロン酸二ナトリウム、ペルツズマブ、ラロキシフェン、タモキシフェン、タモキシフェン派生体、4 - ヒドロキシタモキシフェン、N - デスマチルタモキシフェン、エンドキシフェン、シス - タモキシフェン、トレミフェン、トラスツズマブ、ビノレルビン、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、治療薬は、S E R M、S E R D、A I、それらの薬学的な塩、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、治療薬は、さらに少なくとも 1 つのオメガ 3 脂肪酸、および少なくとも 1 つのビタミン D 化合物を含む。
20

【0006】

特定の実施形態では、個人の乳房のマンモグラフィ中に取得した管内流体のサンプルに対してスクリーニングを行い乳房の異常のマーカーを選別する工程を含む、診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプルは乳房液、細胞全体、細胞の小片、細胞膜、選択された液体、管内流体の細胞または他の固体の破片、同様にタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、脂質、糖、オリゴサッカライド、糖脂質、ヌクレオチド（D N A と R N A ポリヌクレオチドを含む）、および他の、管内流体の生化学的かつ分子的な成分を含む。
30 いくつかの実施形態では、方法は収集装置を乳房に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、マンモグラフィ装置によって加えられた圧力は、乳房からの管内流体の圧出をもたらす。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプルは収集装置によって収集される。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプルは乳房の異常のバイオマーカーを選別するために、スクリーニング行われる。

【0007】

定義

用語「個人」、「対象」または「患者」は、互換的に使用される。本明細書において使用されるように、それらはあらゆる哺乳類（すなわち、分類学の分類における動物界脊索動物門脊椎動物亜門哺乳毛の範囲内のあらゆる目、科、および属）を意味する。いくつかの実施形態では、哺乳類はヒトである。前記の用語はいずれも、医療従事者（例えば医者、正看護師、ナースプラクティショナー、医師助手、用務員またはホスピス職員）の監督（例えば、持続的または断続的）を特徴とする状態を必要とせず、その状態に限定されない。
40

【0008】

本明細書において使用されるように、「乳房の異常」は乳房のあらゆる異常を意味する。乳房の異常は、乳房の良性の病変、および乳癌を含む。良性の乳房の病変は、限定されないが、乳腺密度の高い乳房、乳腺炎、円柱細胞過形成、非定型性を有する円柱細胞の過形成、管の過形成、小葉過形成、異型乳管過形成および異型の小葉過形成を含む。
50

【 0 0 0 9 】

本明細書において使用されるように、「乳癌」は乳腺細胞のあらゆる悪性腫瘍を意味する。いくつかのタイプの乳癌が存在している。典型的な乳癌は、限定されないが、非浸潤性乳管内癌、上皮内小葉癌、侵襲性の（または浸潤性の）腺管癌、侵襲性の（または浸潤性の）小葉癌、炎症性乳癌、三種陰性乳癌、E R + 乳癌、H E R 2 + 乳癌、腺様囊胞性（または腺様囊胞の）癌、低級な腺扁平上皮癌、髓様癌、ムチンの（またはコロイドの）癌、乳頭状癌、管状腺癌、化生性癌、および微小乳頭状癌を含む。単一の乳房腫瘍はこれらのタイプの組み合わせ、または侵襲性および原位置の癌の混合体になり得る。

【 0 0 1 0 】

本明細書において使用される用語「診断」は、乳房の異常、または乳房の異常の分子サブタイプの同定等、分子的または病理学的な状態、疾患または症状の同定を意味する。10

【 0 0 1 1 】

本明細書において使用される用語「予後判定」は、乳房の異常の再発、転移の伝播および薬剤抵抗性を含む、乳癌に起因する死または進行の可能性の予測を意味する。用語「予測」は、観察、経験または科学的な推論に基づいて、予想または推定する行為を言及する場合がある。一実施例において、医師は、患者が、一次腫瘍の外科的な摘出および／または癌再発のない一定の期間の化学療法の後に生存する可能性を予測する場合がある。

【 0 0 1 2 】**現行の診断方法**

マンモグラムは乳房のX線である。これは、腫瘍および／または微細石灰化の視覚化を可能にする、乳房組織の画像を作成するためにイオン化放射線を使用する。マンモグラムは異常のサインや症状のない女性の乳房の異常を検査する、および、しこりまたは他の疾患のサインまたは症状が発見された後に乳房の異常を検査するために使用される。20

【 0 0 1 3 】

マンモグラフィは、年齢40歳から74歳の女性の癌による死亡数を減少させる。しかし、マンモグラフィには次のものを含むいくつかの欠点がある：偽陽性の結果および過剰診断、偽陰性の結果および過小診断、および放射線被曝。偽陽性の結果は、乳癌が存在していない時に、存在を示すとして放射線専門医がマンモグラムを誤って解釈する場合に生じる。偽陽性の結果は過剰診断および過剰処置を導く。研究は、10年に1回のマンモグラム後に偽陽性の結果を起こす可能性は約50～60パーセントであると示している。偽陽性は特に、マンモグラムが非浸潤性乳管内癌（DCIS、異常細胞が胸管の裏で癌の構造になり得る非侵襲性の腫瘍）を明らかにする際に、特に見られる。これは過剰診断および過剰処置を導く。偽陰性の結果は癌の過小診断および進行を導く。偽陰性の結果は、乳腺密度の高い乳房である、あるいは、小葉状の癌、ムチンの癌または急速に成長する癌になっている個人においてよく見られる。多くの更年期前の女性は乳腺密度の高い乳房を有し、多くの閉経後の女性がさらに乳腺密度の高い乳房を有している。マンモグラフィは、15%から30%までの乳腺密度の乳房である女性から癌を発見する感度を有する事が出来る。30

【 0 0 1 4 】

マンモグラフィにおける広く容認された予測値リスク診断、および品質保証ツールは、乳腺画像報告データシステム（B I - R A D S）である。乳房の病変は0からV IまでのいくつかのB I - R A D S カテゴリに分類される。医師は乳房の異常の管理ツールとしてB I - R A D S を使用して、勧告をする。40

【 0 0 1 5 】

【表1】

表1

BI-RADS 評価カテゴリおよび 対応の勧奨			
BI-RADS カテゴリ	病変の状態	対応	癌／悪性の可能性
0	不完全	追加の画像診断／前の検査との比較のため再診	N/A
I	陰性	定期的なマンモグラフィのスクリーニング	実質的に 0%
II	良性	定期的なマンモグラフィのスクリーニング	実質的に 0%
III	おそらく良性	短い間隔のスクリーニング (6 m) による経過観察または継続したマンモグラフィによる監視	0% - ≤ 2%
IV	悪性の疑い • IVa • IVb • IVc	組織の診断	> 2% - ≤ 95% > 2% - ≤ 10% > 10% - ≤ 50% > 50% - ≤ 95%
V	悪性を強く示唆する	組織の診断	≥ 95%
VI	悪性が証明されている	臨床的に適切な時に外科的に切除	N/A

【0016】

スケールの小さい側（すなわち、BI-RADS IまたはII）、およびスケールの大きい側（BI-RADS IVまたはV）において観察者間の高いレベルの一一致が存在する一方、BI-RADS カテゴリ II および III の間で観察者間の一一致のより高いレベルの欠落（すなわち不一致）が報告された。（Inter- and intra-radiologist variability in the BI-RADS assessment and breast density groups categories for screening mammograms. Redondo et al. Br J Radiol. 85(1019); 2012 Nov, pages 1465 - 1470; Use of the American College of Radiology BI-RADS guidelines by community radiologists: concordance of assessments and recommendations assigned to screening mammograms. Lehman et al. Am. J. Roentgenology. 2002; 179(1). pages 50 40 50

15 - 20) 最も高い不一致を有する診断は「恐らく良性の所見」(カテゴリー I II)で、53.5%であった。例えば、B I - R A D S カテゴリ I I および I I I 、またはカテゴリー I V a および I V b への分類に関する放射線技師の間の不一致は、放射線技師の一人は良性の病変を検出しても個人にさらなる診断のために呼び戻す理由を見出さず、別の放射線技師はおそらく良性である病変を発見してさらなる診断を推奨するという事を意味し、これは主観的な評価のようである。(Redondo et al.; B I - R A D S Lexicon for US and Mammography: Interobserver variability and Positive Predictive Value. Lazarus et al. Radiology. 2006, 239(2), pages 385 - 391) 実際のところ、次にとる手段を変更するために女性が得る情報は、さらなる診断のための再診である。しかし、放射線技師コミュニティー内において、B I - R A D S カテゴリ I I および I V の最終診断の指定に関して、高度の誤った指定とその臨床的な要素への影響から、いくらかの緊張状態が存在している。したがって、より優れた疾患の分類、乳房の病変の早期発見、および乳房の異常の診断の未解決の必要性が存在する。

【0017】

乳房の異常

正常な乳房は2層構造の管および小葉から成る。管腔の分泌細胞は、中空の内腔を囲み、これは、基底膜と直接接觸する位置にある筋上皮細胞の層に囲まれる。

【0018】

乳房の過形成

過形成(上皮過形成、または増殖性の乳房の疾患としても知られている)は、管または小葉を覆う細胞の異常増殖である。過形成が管内にある場合、それを乳管過形成または管上皮過形成と呼ぶ。それが小葉に影響を与える場合、小葉過形成として言及される。

【0019】

通常コア針生検または外科的生検で過形成を診断する。細胞が顕微鏡でどのように見えるかに基づいて、過形成は軽度の過形成、通常の過形成または異型の過形成であると区別する。軽度の過形成は、乳癌の危険を増大しない。通常の過形成としても知られている、通常の型(異型性のない)の過形成は、乳房に異常を持たない女性の約1.5から2倍まで癌の危険を増大する。異型の過形成(異型乳管過形成[A D H]または異型の小葉過形成[A L H]のいずれか)は、乳房に異常を持たない女性の4倍から5倍まで癌の危険を増大する。

【0020】

さらに、マンモグラフィのスクリーニングの広範囲の採用によって、円柱細胞の過形成(C C H)を含む乳房の円柱細胞の病変(C C L)は乳房生検中に頻繁に発見されるようになった。既知の前癌性、および癌性の変化の付近にC C Lが存在する事は、C C Lは前悪性であり得る事を示唆し、C C L、および低悪性度のD C I Sが高い頻度で発生する事は、一般に同一または隣接している乳管終末組織(T D L U)に発生するC C L、およびD C I Sと同一の乳房で存在するとして知られている。より高度なC C L、および異型の過形成、およびD C I Sにおける細胞学的および構造的な変化の類似性により、C C Lは異型の乳房増殖および乳癌の前兆を示すものとして提案される。

【0021】

乳癌

乳癌は、通常は小葉の細胞または管のいずれかにおいて発症する。乳癌は、癌性の管の細胞および小葉の細胞の混合物を含む事を意味する「混合腫瘍」である場合がある。そのような場合は、癌は腺管癌として処置される。乳房に1つを超える腫瘍がある場合、乳癌は多巣性または多中心性であるとして記述される。多巣性の乳癌では、腫瘍は全て最初の腫瘍から発生し、それらは通常は乳房の同じ部分に存在する。癌が多中心性の場合、それは腫瘍が全て別々に生じたことを意味し、それらは多くの場合乳房の異なる領域にある。

【0022】

10

20

30

40

50

侵襲性対非侵襲性：マンモグラフィの現在の欠点への取り組み

非侵襲性の癌は乳房の管または小葉内に留まる。それらは乳房内または乳房を超えて正常組織内へ成長せず、または侵入もしない。時々、非侵襲性の癌は上皮内癌（「同じ場所中の」）と呼ばれ、多数がそれらを前癌と考える。

【0023】

侵襲性の癌は正常で健康な組織へ拡大または移動する。大半の乳癌は侵襲性である。癌が非侵襲性か侵襲性かは処置選択および処置に対する反応に影響する事になる。

【0024】

乳癌は侵襲性かつ非侵襲性であり得る。これは、癌の一部が正常組織内へと成長し、癌の一部が乳管または乳腺小葉の内部に留まった事を意味する。この場合、これらの癌は侵襲性として処置される事になる。10

【0025】

大半の場合、乳癌は下記の1つとして分類される：D C I S（乳管上皮内癌）；M I C（微侵襲性の乳癌）；M I C BおよびD C I M。D C I Sは乳管の内部で留まる非侵襲性の癌である。M I CはD C I Sのサブタイプである。それは、1.0 mm未満であるサイズを有し、10%以下のM I C細胞が管組織（本来の腫瘍部位）を離れている。

【0026】

L C I S（上皮内小葉癌）：L C I Sは小葉の内部に留まる細胞の異常増殖である。これは侵襲性の癌を形成する危険の増大を示す。I D C（侵襲性の腺管癌）は最も一般的なタイプの乳癌である。侵襲性の腺管癌（I D C）は乳管で発症するが、乳房の内部の周囲の正常組織内へと成長する。I L C（侵襲性の小葉癌）は小葉の内部で発症するが、乳房の内部の周囲の正常組織内へと成長する。20

【0027】

【表2】

表2

侵襲性の乳癌の異なるタイプおよび特異的な形態の罹漢率及び腫瘍の特徴			
侵襲性の乳癌のタイプ	全ての侵襲性の乳癌の比率	腫瘍の特徴	予後
侵襲性腺管癌 (IDC)	50-75%	<ul style="list-style-type: none"> • 固い腫瘍の組織 • 腫瘍は不規則で、星型である • 細胞の特徴は変化する • DCIS がしばしば存在する 	<ul style="list-style-type: none"> • 予後は腫瘍のステージと悪性度によって異なる
侵襲性の小葉癌 (ILC)	10-15%	<ul style="list-style-type: none"> • 通常、わずかに固いまたは硬質な腫瘍の組織 • 細胞は縦並びの状態で現れる • 腫瘍の大半は ER陽性および HER2/neu陰性である。 	<ul style="list-style-type: none"> • 予後は腫瘍のステージと悪性度によって異なる • どのステージまたは悪性度に関しても、予後は IDC のものと類似する。 • 転移のパターンはわずかに IDC とは異なる（消化管に転移する可能性がより高い）
髓様癌	1-5%	<ul style="list-style-type: none"> • 柔らかい腫瘍 • 細胞はシート状の外観を有する • 腫瘍はしばしば ER陰性である 	<ul style="list-style-type: none"> • 若い女性およびBRCA 1 遺伝子変異を持つ女性でより好発する • この時点では、予後は IDC や ILC より良い、またはか類似しているかは不明である

【表3】

侵襲性の乳癌の異なるタイプおよび特異的な形態の罹患率及び腫瘍の特徴			
侵襲性の乳癌のタイプ	全ての侵襲性の乳癌の比率	腫瘍の特徴	予後
粘液性の(コロイド)癌	1-5%	<ul style="list-style-type: none"> 柔らかい腫瘍 しばしば明白な腫瘍が無い 細胞は過剰な粘液(ムチン)に囲まれる 腫瘍のほとんどはER陽性およびHER2/neu陰性 	<ul style="list-style-type: none"> 高齢の女性により多い 良い予後になる傾向である 癌がリンパ節に広がる事はより少ない。
乳頭癌	1-5%	<ul style="list-style-type: none"> 柔らかい腫瘍 細胞は指の形をした枝のように見える 	<ul style="list-style-type: none"> 閉経後の女性により多い 良い予後になる傾向である
管状癌	1-5%*	<ul style="list-style-type: none"> 腫瘍はほとんどが小さい しばしば明白な腫瘍が無い 細胞はチューブ状の構造を形成する 腫瘍のほとんどはER陽性およびHER2/neu陽性である 	<ul style="list-style-type: none"> 予後は通常IDCよりも良い(5年後の生存率は88%である) 癌がリンパ節または他の部分に拡散する事は稀である

【0029】

40

分子のサブタイプ

遺伝子発現解析は4つの主要な生物学上別個である内因性のサブタイプに乳癌を分類する: 管腔様A、管腔様B、ヒト表皮成長因子受容体-2(HER2)過剰発現、および基底様/三種陰性。これらの分子のサブタイプは予後判定および予測値を有する。異なる分子のサブグループの予後判定および化学療法の感受性は異なっている。

【0030】

ER+乳癌は、癌細胞の表面上のエストロゲン受容体の存在を特徴とする。ER+癌細胞の増大は、エストロゲンの有効性に関係している。処置の選択肢としてエストロゲン(例えばタモキシフェン)を遮断するER+乳癌化学療法剤が存在する。

【0031】

50

H E R 2 + 乳癌は、癌細胞の細胞表面のH E R 2 の過剰を特徴とする。H E R 2 + 癌は多くの場合付加的な化学療法剤と組み合わせてトラスツズマブで処置される。

【 0 0 3 2 】

三種陰性乳癌は、エストロゲン受容体およびプログステロン受容体を欠き、表面上にH E R 2 タンパク質の過剰が無い細胞を特徴とする乳癌である。三種陰性乳癌は、多くの場合他の乳癌より侵襲性である。腫瘍細胞がエストロゲンとプログステロン受容体を欠くため、ホルモン療法（例えばタモキシフェン）は有効ではない。さらに、細胞がH E R 2 タンパク質を欠くため、H E R 2 を標的とする薬（例えばトラスツズマブ）は効果がない。

【 0 0 3 3 】

管腔様癌

10

大半の乳癌は管腔様腫瘍である。管腔様腫瘍細胞は、乳管を覆う内部の（管腔）細胞で発症する乳癌の細胞のように見える。

【 0 0 3 4 】

管腔様A乳癌はE R + および / またはP R + 、H E R 2 - 、低K i 6 7 値である。乳癌の約4 2 - 5 9 % は管腔様Aである。管腔様A腫瘍は低い、または中程度の腫瘍悪性度になる傾向である。4つのサブタイプのうち、管腔様A腫瘍は、かなり高い生存率およびかなり低い再発率で、最良の予後判定を持つ傾向である。管腔様A腫瘍の約1 5 % のみがp 5 3 変異、すなわちより悪い予後判定に繋がる要素を持つ。

【 0 0 3 5 】

管腔様B乳癌は、E R + および / またはP R + 、H E R 2 + （または高K i 6 7 値を有するH E R - ）である。乳癌の約6 - 1 7 % は管腔様Bである。管腔様B乳癌を持つ女性は管腔様A乳癌を持つ女性よりも若い年齢の時に診断される。管腔様A腫瘍と比較して、管腔様B腫瘍は、さらに次のものを含むより悪い予後判定を導く要素を持つ傾向がある：より悪性の腫瘍悪性度；より大きな腫瘍サイズ；およびp 5 3 遺伝子変異。一般に、管腔様B腫瘍を持った女性は、管腔様A腫瘍を持つ女性ほど高くないが、かなり高い生存率を有する。

20

【 0 0 3 6 】

基底様

乳癌のおよそ1 4 - 2 0 % は基底様である。基底様の乳癌は、免疫表現型のマーカーE R - / P R - / H E R 2 が三種陰性であるがC K 5 / 6 が発現している点で管腔様癌と異なる。基底様の乳癌は増加した低酸素症および高い腫瘍悪性度を示し、高度な細胞増殖、および悪い臨床の結果が特徴である悪性の表現型を有する。大半のB R C A 1 乳癌および多くのB R C A 2 乳癌は両方とも三種陰性 / 基底様である。三種陰性 / 基底様の腫瘍は多くの場合、エストロゲン受容体陽性のサブタイプ（管腔様Aおよび管腔様B腫瘍）と比較して悪性で、より悪い予後判定である。三種陰性 / 基底様の腫瘍は、通常は手術、放射線処置、および化学療法のある程度の組み合わせで処置される。これらの腫瘍は、ホルモン受容体陰性、およびH E R 2 / n e u 陰性であるため、ホルモン療法またはトラスツズマブ（Herceptin（登録商標））で処置することが出来ない。

30

【 0 0 3 7 】

乳房の異常の診断または予後判定の方法

40

特定の実施形態では、個人の乳房のマンモグラフィ中に取得した管内流体のサンプルに対してスクリーニングを行い乳房の異常のマーカーを選別する工程を含む、診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法が本明細書に記載される。これらの診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法は、B I - R A D S I I - V の病変、好ましくは、B I - R A D S I I - I V の病変、および、さらに好ましくは、B I - R A D S I I I - I V の病変を持つ個人の診断または予後判定に特に有用である。いくつかの実施形態では、方法は管腔様、および基底様の癌を区別するために有用である。他の実施形態では、方法は、前癌と癌、過形成と癌、および侵襲性と非侵襲性の癌を区別するために有用である。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプルは乳房液を含む、細胞全体、細胞の小片、細胞膜、選択された液体、管内流

50

体の細胞または他の固体の破片、同様にタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、脂質、糖、オリゴサッカライド、糖脂質、ヌクレオチド（細胞結合性、および無細胞のDNA（例えばc f DNA、ミトコンドリアDNA）、ならびに細胞結合性および無細胞のRNAポリヌクレオチド、無細胞のDNAおよび無細胞のRNA（例えばm RNA、ミトコンドリアRNAおよびm i c r o RNA）を含む）および他の同様の管内流体の生化学的かつ分子的な成分を含む。いくつかの実施形態では、方法は収集装置を乳房に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、マンモグラフィ装置によって加えられた圧力は、乳房からの管内流体の圧出をもたらす。いくつかの実施形態では、圧出される流体の量は1マイクロリットル未満である。いくつかの実施形態では、圧出される流体の量は1ナノリットル未満である。いくつかの実施形態では、圧出される流体の量は1ナノリットルから1ピコリットルの間である。いくつかの実施形態では、圧出される流体の量は1ピコリットル、2ピコリットル、3ピコリットル、4ピコリットル、5ピコリットル、6ピコリットル、7ピコリットル、8ピコリットル、9ピコリットル、10ピコリットル、10から15ピコリットルの間、または15から20ピコリットルの間である。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプルは収集装置によって収集される。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプルは、乳房の異常のバイオマーカーを選別するためにスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、方法はさらに乳房の乳頭の清浄化を含む。いくつかの実施形態では、方法はさらにマンモグラフィ前に個人にオキシトシンを投与する工程を含む。

【0038】

収集装置

10

特定の実施形態では、個人の乳房のマンモグラフィ中に取得した管内流体のサンプルに対してスクリーニングを行い乳房の異常のマーカーを選別する工程を含む、診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、方法は収集装置を乳房に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプルは収集装置によって収集される。いくつかの実施形態では、収集装置は装着可能である。

【0039】

いくつかの実施形態では、収集装置は固体相のサンプル収集媒体を含む。いくつかの実施形態では、収集装置はさらに装置を乳房に接続する乳房結合部材を含む。

【0040】

20

いくつかの実施形態では、固体相のサンプル収集媒体は吸収性の紙である。いくつかの実施形態では、吸収性の紙は流体を吸収する。いくつかの実施形態では、吸収性の紙はタンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、吸収性の紙はヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、またはそれらの組み合わせに結合する。いくつかの実施形態では、吸収性の紙は細胞に結合しない。

【0041】

いくつかの実施形態では、収集装置は吸収性の紙を含む。いくつかの実施形態では、吸収性の紙は流体を吸収する。いくつかの実施形態では、吸収性の紙はタンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、吸収性の紙はヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、またはそれらの組み合わせに結合する。いくつかの実施形態では、吸収性の紙は細胞に結合しない。

30

【0042】

本明細書において記載された方法における使用のための吸収性の紙（それらはまた、本明細書において「膜」と呼ばれる場合がある）は、上皮細胞、および、例えばタンパク質、炭水化物、脂質、核酸、RNA、DNA、その他のようなバイオマーカーの収集に適している任意の物質で製造される。吸収性の紙は、例えば、ニトロセルロース、微細セルロース、混合セルロースエステル、または他の管内流体のサンプルの収集のために適正な物質で製造されたものを含む。

【0043】

いくつかの実施形態では、吸収性の紙は乳頭および/または乳輪の切り傷（paper

40

50

c u t s) を引き起こさない。いくつかの実施形態では、吸収性の紙は乳頭および／または乳輪の切り傷を引き起こさないよう形作られる。

【 0 0 4 4 】

吸収性の紙は、大型の紙材料から金属の鋳型で紙を打ち抜く事で形成される。吸収性の紙は乳頭を覆う、または部分的に覆うのに十分な大きさである。いくつかの実施形態では、吸収性の紙は乳頭を覆うのに十分な大きさである。従って、吸収性の紙は、任意の大きさの吸収性の紙における平均の寸法 A における直径または長さで約 1 . 0 インチから約 3 . 0 インチであり得る。吸収性の紙は、例えば直径が、約 1 . 0 、約 1 . 1 、約 1 . 1 5 、約 1 . 2 、約 1 . 2 5 、約 1 . 3 、約 1 . 3 5 、約 1 . 4 、約 1 . 4 5 、約 1 . 5 、約 1 . 5 5 、約 1 . 6 、約 1 . 6 5 、約 1 . 7 、約 1 . 7 5 、約 1 . 8 、約 1 . 8 5 、約 1 . 9 、約 1 . 9 5 、約 2 . 0 、約 2 . 1 、約 2 . 1 5 、約 2 . 2 、約 2 . 2 5 、約 2 . 3 、約 2 . 3 5 、約 2 . 4 、約 2 . 4 5 、約 2 . 5 、約 2 . 5 5 、約 2 . 6 、約 2 . 6 5 、約 2 . 7 、約 2 . 7 5 、約 2 . 8 、約 2 . 8 5 、約 2 . 9 、約 3 . 0 インチであり得る。
いくつかの実施形態では、吸収性の紙は乳房の乳輪を覆う、または部分的に覆う。いくつかの実施形態では、吸収性の紙は乳房の乳輪を覆う。いくつかの実施形態では、吸収性の紙は乳房の乳輪を部分的に覆う。いくつかの実施形態では、吸収性の紙は乳頭を覆い、乳房の乳輪までは広がらない。

【 0 0 4 5 】

吸収性の紙の厚さは最適なサンプルの収集を可能にするために変更され、厚さが約 0 . 0 0 0 1 インチから約 0 . 1 インチである材料を含む場合がある。例えば、吸収性の紙は、約 0 . 0 0 0 1 、約 0 . 0 2 、約 0 . 0 3 、約 0 . 0 4 、約 0 . 0 5 、約 0 . 0 6 、約 0 . 0 7 、約 0 . 0 8 、約 0 . 0 9 、または約 0 . 1 インチの厚さであり得る。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態では、固体相のサンプル収集媒体は顕微鏡のスライドガラス、毛細管チューブ、収集チューブ、カラム、マイクロカラム、ウェル、プレート、膜、フィルタ、樹脂、無機のマトリックス、ビーズ、微粒子のクロマトグラフィーの媒体、プラスチック微粒子、ラテックス粒子、コーティングされたチューブ、コーティングされたテンプレート、コーティングされたビーズ、コーティングされたマトリックス、またはそれらの組み合わせを含む。

【 0 0 4 7 】

オキシトシン

特定の実施形態では、個人の乳房のマンモグラフィ中に取得した管内流体のサンプルに対してスクリーニングを行い乳房の異常のマークを選別する工程を含む、診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、方法はさらに、マンモグラフィ実施前にオキシトシン、またはカルベトシンを含むその類似体を個人に投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、方法はさらに、マンモグラフィ実施前にカルベトシンを個人に投与する工程を含む。

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、オキシトシン、またはカルベトシンを含むその類似体は、肺胞管の組織の筋上皮性の短縮を刺激し、個人の乳頭からの管内流体の圧出をもたらす。いくつかの実施形態では、オキシトシン、またはカルベトシンを含むその類似体は、鼻腔内に投与される。いくつかの実施形態では、オキシトシン、またはカルベトシンを含むその類似体は、筋肉内、または血管内の注入によって投与される。いくつかの実施形態では、オキシトシン、またはカルベトシンを含むその類似体は、乳頭からの管内流体の圧出を刺激するのに有効な量で投与される。

【 0 0 4 9 】

一度十分な投与後の期間が経過し、オキシトシンが標的に達して標的の肺管組織を刺激することが可能になったならば、管内流体は乳頭から直接収集される。管内流体を収集した後、乳房の異常のバイオマーカーの存在および／または量を判断するために管内流体上で生物検定を行う。

10

20

30

40

50

【0050】

任意の適切なオキシトシン、またはカルベトシンを含むその類似体は、本明細書に記載される方法の調製に使用される。

【0051】**乳房の事前準備**

特定の実施形態では、個人の乳房のマンモグラフィ中に取得した管内流体のサンプルに対してスクリーニングを行い乳房の異常のマーカー、および／またはT細胞マーカー等の特定の乳房の異常においてより良い臨床的な結果と関連するマーカーを選別する工程を含む、診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、方法はさらに、乳房の乳頭の清浄化を含む。

10

【0052】

乳頭は任意の適した方法で清浄化される。いくつかの実施形態では、乳頭は無菌化される。いくつかの実施形態では、乳頭から細片（例えばケラチン栓）が取り除かれ、乳頭の管への接触を増大させる。いくつかの実施形態では、乳頭は非角質化ゲルを含むマイルドスクラップで洗浄（scrubbed）される。いくつかの実施形態では、乳頭は剥離剤を用いて洗浄される。本明細書において記載された方法により任意の適切な剥離剤が使用され得る。適切な剥離剤の例は、限定されないが、マイクロファイバー布、粘着性の剥離シート、微細なビーズのスクラップ洗顔料、クレープ紙、粉碎されたアンズの種またはアーモンドの殻、糖または食塩の結晶、軽石、およびスポンジ、ヘチマの纖維、ブラシ、サリチル酸、グリコール酸、果物の酵素、クエン酸、リンゴ酸、アルファヒドロキシ酸（AHA）、およびベータヒドロキシ酸（BHA）等の研磨剤を含む。いくつかの実施形態では、乳頭の洗浄は乳頭の腺管の開放をもたらす。いくつかの実施形態では、洗浄後の乳頭の腺管は直径が約0.1から約0.3mmである。

20

【0053】

乳頭の腺管には、腺管の管腔を閉ざしたまま保つ傾向がある円形の平滑筋が存在する。いくつかの実施形態では、個人にアトロピン、または、トロピカミドまたはフェニレフリン等の関連する筋弛緩剤が投与される。

【0054】**管内流体の処理**

特定の実施形態では、個人の乳房のマンモグラフィ中に取得した管内流体のサンプルに対してスクリーニングを行い乳房の異常のマーカーを選別する工程を含む、診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法が本明細書に記載される。いくつかの実例では、固体相のサンプルの収集媒体は、マンモグラフィ中に取得された管内流体の収集に続いて洗浄される。

30

【0055】

いくつかの実施形態では、固体相のサンプルの収集媒体の洗浄は、粘着性の干渉する物質を除去する。いくつかの実施形態では、固体相の収集媒体の洗浄は、緩衝液、洗剤、または水に媒体を接触させる工程を含む。典型的な洗浄剤は、限定されないが、Tween 20（ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート）、Tween 80（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート）、Triton X-100（オクチルフェノキシボリエトキシエタノール）、TRIZOL（登録商標）（Life Technologies, CA）、およびミリスチルトリメチルアンモニウムプロミドを含む。いくつかの実施形態では、限定されないが、顕微鏡検査法、免疫細胞化学、および流動細胞計測法を含む方法を使用して、このような洗浄液の流出を分析する。例えば、いかなる細胞も除去するために管内流体のサンプルを含んでいる吸収性の紙または細胞膜を洗浄した後に、洗浄液は顕微鏡検査法によって評価され、流出液中の細胞の数量が定量される。いくつかの実施形態では、流出液中に存在するあらゆる細胞の形態が判定される。いくつかの実施形態では、流出液中に存在する細胞は、細胞が通常のプロフィールを有するか癌細胞を示す1つ以上のマーカーを持つかを判定するために、1つまたはそれ以上の細胞外および／または細胞内のマーカーに染色される。例えば、細胞は、細胞が癌細胞か通常の細胞かを示し

40

50

得るB R C A 1、B R C A 2、p 6 3、サイクリン、サイトケラチン、H e r 2、または任意の他のマーカーの存在、欠落、またはレベルに基づいて、そのようなマーカーの存在または欠落を解析され得る。

【 0 0 5 6 】

他の実施形態では、管内流体のサンプルを含んでいる吸収性の紙または膜を洗浄した後、洗浄液は、タンパク質、c f D N A およびミトコンドリアD N A等のD N A、ならびに無細胞のR N Aおよびm i c r o R N A (p r i - m i R N A 、 p r e - m i R N A 、 10 および成熟しているm i R N Aを含む) 等のR N Aの存在を評価される。D N AまたはR N Aは抽出され、その後、本明細書において記載されるようなさらなる解析の対象とされる。実行され得る解析の例は、限定されないが、D N Aコピ一数の変化、染色体異常、D N A変異(重複、欠失、逆位等)および一塩基多型(S N P s)、D N Aメチル化、ヒストンメチル化、およびタンパク質メチル化m i R N A発現またはシグネチャ、レクチンシグネチャの変化、およびマイクロバイオームの変化の判定を含む。

【 0 0 5 7 】

さらに他の実施形態では、管内流体のサンプルを含んでいる吸収性の紙または膜等の固体相の収集媒体を洗浄した後、固体相の収集媒体は本明細書において記載されるようなさらなる解析の対象とされる。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、アッセイに先立って、または同時的に、サンプルの起源および/またはマンモグラフィに収集された管内流体のサンプルの品質を確認するために、予備的評価が実施される。そのような予備的診断の焦点は、マンモグラフィ中に取得された管内流体から収集されたサンプルが確かに乳房由来であり、乳頭を覆う皮膚からの汗等他の可能性のある不純物で汚染されていないかを確認する事である。サンプルの確認のための他の乳房流体のマーカーは、限定されないが、正常および癌の乳房の上皮細胞で特徴的に示されるサイトケラチン、および人乳の脂質グロブリン(H M F G)タンパク質の糖タンパク質成分に対応するヒト乳房の上皮の抗原(H M E - A g s)を含む。 20

【 0 0 5 9 】

スクリーニングと分類

特定の実施形態では、個人の乳房のマンモグラフィ中に取得した管内流体のサンプルに対してスクリーニングを行い乳房の異常のマーカーを選別する工程を含む、診断または予後判定が必要な個人の乳房の異常の診断または予後判定の方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、本明細書において記載される方法は、特にB I - R A D S カテゴリI I - I Vを持つ個人において、マンモグラフィに付随して使用されるコンパニオン診断法として有用である。従って、いくつかの好ましい実施形態では、個人の乳房のマンモグラフィ中に取得した管内流体のサンプルに対してスクリーニングを行い乳房の異常と関連付けられた少なくとも1つのマーカーを選別する工程を含む、B I - R A D S I I I またはB I - R A D S I Vの病変を持っている個人の乳房の病変の診断または予後判定の方法が、本明細書において記載される。 30

【 0 0 6 0 】

他の実施形態では、方法は、処置の選択、患者の再発および疾患の再発のような治療の結果、および化学療法、ホルモン療法、放射線処置等の療法に対する生存率と反応を予測する際に有用である。さらに他の実施形態では、本明細書において記載される方法は、個人の治療上の処置に対する反応をモニタリングする際に有用である。 40

【 0 0 6 1 】

管内流体のサンプルで判断可能な乳房の病変のマーカーは、細胞学、遺伝子変異(置換、欠失および逆位を含む)、一塩基変異多型(S N P s)、D N Aコピ一数、D N Aメチル化のパターンまたはシグネチャ、ヒストンメチル化のパターンまたはシグネチャ、m i c r o R N Aパターン、マイクロバイオームのパターン、他の疾患バイオマーカーまたはそれらの組み合わせを含む。本発明の目的で有用な乳房の疾患マーカーの一般的かつ、非網羅的な検討には、H i r a t a e t a l . Disease M a r k e r s , 50

2014, vol 2014, article ID 513158; Pultz, et al. J. Cancer. 2014, vol 5, pages 559 - 571; Lari and Keurer, J. Cancer. 2011, vol 2, pages 232 - 261を参照、上記の全体が、本明細書に組み込まれる。

【0062】

いくつかの実施形態では、スクリーニングは細胞学、免疫組織化学、免疫細胞化学、FISH、ICH、RIA、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、スクリーニングはELISAを含む。他の実施形態では、スクリーニングは、遺伝子、ポリヌクレオチド、DNA (cfDNA、およびミトコンドリアDNAを含む)、RNA (mRNA、無細胞またはエクソソームに含まれるmiRNA、およびミトコンドリアRNAを含む)、脂肪酸および糖タンパク質、ならびにレクチンの、増幅、シーケンシング、制限酵素断片長多型、およびマイクロアレイまたは多重の診断を含む。10

【0063】

いくつかの実施形態では、増幅は、限定されないが、逆転写酵素 (RT-PCR)、定量的PCR (qPCR)、定量的RT-PCR (qRT-PCR) リアルタイムPCR、等温のPCR、多重のPCR、メチル化に特異的なPCR等を含むリガーゼ連鎖反応 (LPCR) またはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、実施される。

【0064】

他の実施形態では、シーケンシングはジデオキシシーケンシング、逆停止 (reverse termination) シーケンシング、次世代シーケンシング、バーコードシーケンシング、ペアエンドシーケンシング、ピロシーケンス、多重のシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、連結によるシーケンシング、単一の分子のシーケンシング、合成による単一の分子のリアルタイムのシーケンシング、亜硫酸水素塩シーケンシング、全ゲノムシーケンシング、および全エクソームシーケンシングである。さらに他の実施形態では、シーケンシングはRNA-seq、全トランスクリプトームショット癌シーケンシング、およびmRNA-Seqによる。20

乳房の異常が微生物の腸内毒素症に関連するいくつかの実施形態では、16S RNAシーケンシングが好ましい。いくつかの好ましい実施形態では、シーケンシングはディープシーケンシング、またはウルトラディープシーケンシングである。30

【0065】

当業者は、スクリーニングは本明細書において記載される方法の任意の組み合わせを含み、当該技術分野で既知の他の方法を含む事が、本発明の範囲内である事を認識するだろう。

【0066】

いくつかの好ましい実施形態では、単離細胞、複数細胞、管内流体のサンプルの単一の核および複数の核を使用して検査を実施する。他の好ましい実施形態では、スクリーニングは無細胞の管内流体のサンプル上で実施される。

【0067】

いくつかの実施形態では、DNAのメチル化のスクリーニングまたは評価は、重亜硫酸塩シーケンシング、メチル化感受性PCR、メチル化されたDNA免疫沈降 (MeDIP) 、メチル感受性の単一のヌクレオチドプライマーエクステンション (MS-SSNUP) 、ゲノム全域に渡るメチル化プロファイリング、メチル化感受性の制限酵素分析、COBRA法 (combined bisulfite restriction analysis) 、メチル化に特異的な量子ドット蛍光共鳴エネルギー移動 (MS-qFRET) 、全体のゲノムマッピング、またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上を使用して、実施される。いくつかの実施形態では、DNAメチル化のスクリーニングはさらに、マイクロアレイまたは多重のハイブリダイゼーション、遺伝子発現、コピー数の解析、次世代シーケンシング、またはこれらの組み合わせを含む。4050

【0068】

乳管は2つのタイプの上皮細胞、すなわち内部の管腔の細胞および外部の基底状／筋上皮性の細胞を含む。いくつかの実施形態では、バイオマーカーの発現（例えば、免疫組織化学的な染色による、差次的な遺伝子発現による、mRNAパターン／シグネチャ、およびDNAメチル化のパターン／シグネチャ、ヒストンメチル化のパターン／シグネチャなど）、遺伝子型判定、遺伝子変異（欠失、挿入、重複および逆位）、SNP等を含む遺伝標識の欠如または存在の判断は、管腔様および基底様の乳癌、過形成、前癌、非侵襲性および侵襲性の癌および転移した癌を識別するために使用される。いくつかの好ましい実施形態では、バイオマーカーの発現（例えば、免疫組織化学的な染色、mRNAパターン／シグネチャの変化、および、DNAおよび／またはヒストンメチル化のパターン／シグネチャ）は、通常のタイプの過形成および異型の過形成、CCLおよび過形成、前癌と癌、侵襲性および非侵襲性の癌等を識別するために使用される。腫瘍タンパク質p63（または形質転換関連のタンパク質63）は、核の転写因子のp53ファミリーのメンバーである。p63の存在は基底の上皮の層を特徴づける。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプル中のp63の存在は、乳癌が基底様の乳癌であることを示す。10

【0069】

サイトケラチン（CK）5、およびCK14の存在は基底の上皮の層を特徴づける。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプル中のCK5およびCK14の存在は、乳癌が基底様の乳癌であることを示す。さらに、CK5およびCK14の存在は前駆体および筋上皮細胞を特徴づける。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプル中のCK5およびCK14の存在は、細胞が筋上皮細胞または前駆細胞であることを示す。20

【0070】

CK7およびCK18の存在は管腔の上皮の層を特徴づける。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプル中のCK7およびCK18の存在は、乳癌が管腔の乳癌であることを示す。

【0071】

通常の管の過形成は、CK5／14およびCK7／18の両方の発現を有する管腔の染色パターンを表示する。残基p63は筋上皮の核内で観察される。いくつかの実施形態では、CK5、CK14、CK7およびCK18の存在は、過形成が通常の送管の過形成であることを示す。30

【0072】

異型乳管過形成または非浸潤性乳管内癌は差異がある腺の免疫表現型（CK7／CK18陽性）を表示するが、筋上皮を除いてCK5／14陰性である。いくつかの実施形態では、CK7／CK18の存在およびCK5／14の欠如は、過形成が異型乳管過形成であることを示す。

【0073】

侵襲性の乳房の病変は、筋上皮細胞（CK5／14および／またはp63）の数量の減少または欠如、および腺の上皮細胞（CK7／18）の存在によって同定される。いくつかの実施形態では、乳癌が疑われる状況における減少した、またはストレス下の筋上皮細胞の存在は、浸潤性への過渡期、および、おそらく侵襲性の状態を示す。主要な乳癌は、管腔（管壁）細胞の数量の増加、および筋上皮細胞の数量の減少を示す。乳癌が生体内原位置から浸潤性して、最終的に侵襲性に進化するに従って、筋上皮細胞の相対数は減少する。発見物が管腔の細胞の正常数より大きい場合、それは、筋上皮細胞が数量において減少していることを示唆し、故に懸念材料が存在する。いくつかの実施形態では、筋上皮細胞の欠如または数量の減少、および腺の上皮細胞の存在は、病変が侵襲性であることを示す。40

【0074】

いくつかの実施形態では、バイオマーカーの発現は免疫組織化学によって判断される。いくつかの実施形態では、免疫組織化学的な方法は直接的な方法である。いくつかの実施形態では、マンモグラフィと同時に取得された管内流体のサンプルから分離された細胞は50

、標的の抗原（例えば p 6 3 、 C K 5 、 C K 7 、 C K 1 4 、 C K 1 8 、 E R 、 P R 、 H e r - 2 、 K i 6 7 、 u P A 、 P A I - 1 およびガラクトース - N - アセチルガラクトサミン（ G a l - G a l N A c ））に結合する標識抗体に接触させられる。本明細書において記載される方法により任意の適切な標識が使用される。いくつかの実施形態では、標識は色素（または染料）である。いくつかの実施形態では、各抗体に対して異なる色素が使用される。いくつかの実施形態では、同一の細胞タイプの中にあるバイオマーカーに結合する抗体に対して同一の色素が使用される。例えば、第 1 の色素が管腔様の乳癌細胞（ C K 7 / 1 8 ）中に存在するバイオマーカーに結合する抗体に対して使用され、第 2 の色素が基底様の乳癌細胞（ C K 5 / 1 4 および p 6 3 ）中に存在するバイオマーカーに結合する抗体に対して使用される。

10

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態において、免疫組織化学的な方法は間接的な方法である。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプルから分離された細胞は、標識化されていない主要な抗体に接触させられ、標的抗原（例えば p 6 3 、 C K 5 、 C K 7 、 C K 1 4 、 C K 1 8 ）に結合し、標識化された二次抗体は主要な抗体に結合する。いくつかの実施形態では、主要な抗体はバイオマーカー（例えば、 C K 5 、 C K 7 、 C K 1 4 、 C K 1 8 , または p 6 3 ）に結合する。いくつかの実施形態では、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ H R P ）二次抗体は、 C K 5 / 1 4 および p 6 3 に結合する抗体に結合する。いくつかの実施形態では、アルカリホスファターゼ（ A P ）二次抗体は、 C K 7 / 1 8 に結合している抗体に結合する。いくつかの実施形態では、例えば主要な抗体がマウスの抗体である場合二次抗体は、例えば、ウサギの抗マウスの抗体になるように、二次抗体は主要な抗体の出所の種に基づく主要な抗体と反応するように産生される。好ましい実施形態では、抱合型のヤギの抗マウスのポリアルカリホスファターゼ（ A L P ）および抱合型のヤギの抗ウサギのポリホースラディッシュペルオキシダーゼ（ H R P ）は、二次抗体として使用され、マウスおよびウサギの I g G の重鎖および軽鎖の両方と反応する。

20

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、クロモゲン（例えば 3 、 3' デアミノベンジジン（ D A B ））は H R P に結合し、発色性の反応生成物を生成する。クロモゲンが D A B である場合、クロモゲン反応生成物は茶色である。クロモゲンが B a j o r a n P u r p l e である場合、クロモゲン反応生成物はラベンダーパープルである。

30

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態では、クロモゲン（例えば F a s t R e d （ F R ））は A P に結合し、発色性の反応生成物を生成する。クロモゲンが F R である場合、クロモゲン反応生成物は赤またはピンクである。いくつかの実施形態では、管内流体のサンプルから分離された細胞は、主要な抗体との接触前に過酸化物プロックと接触させられる。クロモゲンが F e r a n g i B l u e である場合、クロモゲン反応生成物は明るいロイヤルブルーである。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、細胞は対比染色される。いくつかの実施形態では、細胞はヘマトキシリン、ヌクレアファストレッド（ N u c l e a r F a s t R e d ）、メチルグリーン、またはメチルブルーで対比染色される。

40

【 0 0 7 9 】

特定の実施形態において、乳癌を基底様として分類する以下を含む方法が本明細書において記載される：(a) マンモグラフィ中に得た管内流体のサンプル中の複数の細胞を C K 5 、 C K 1 4 、 C K 7 および C K 1 8 に結合する抗体に接触させる工程；および(b) C K 5 と C K 1 4 の抗体が細胞へ結合する場合に、基底様として癌を分類すること。いくつかの実施形態では、基底様として、乳癌を分類する方法は次のものを含む：(a) マンモグラフィ中に得た管内流体のサンプル中の複数の細胞を C K 5 、 C K 1 4 、 C K 7 、 C K 1 8 、および p 6 3 に結合する抗体に接触させる工程；および(b) C K 5 、 C K 1 4 および p 6 3 の抗体がマンモグラフィ中に収集された管内流体のサンプル中の複数細胞へ結

50

合する場合、基底様として癌を分類する工程。

【0080】

ある実施形態において、管腔として乳癌を分類する方法が本明細書に開示され、以下を含む：(a) マンモグラフィの間に取得された管内流体のサンプル中の複数の細胞と、CK5、CK14、CK7、CK18およびp63に結合する一次抗体とを接触させる工程；および(b)(i) 抗CK7および抗CK18一次抗体が複数の細胞に結合する場合、および(ii) 抗CK5、抗CK14および抗p63一次抗体がマンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプル中の複数の細胞と結合しない場合に、癌を管腔として分類する工程。

【0081】

10

ある実施形態において、通常の乳管過形成として、過形成を分類する方法が本明細書に開示され、次のものを含む：(a) マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプル中の複数の細胞と、CK5、CK14、CK7、CK18およびp63と結合する一次抗体とを接触させる工程；および、(b) CK5、CK14、CK7、CK18およびp63一次抗体が、マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプル中の複数の細胞と結合する場合に、過形成を通常の乳管過形成として分類する工程。

【0082】

20

ある実施形態において、異型乳管過形成として過形成を分類する方法が本明細書に開示され、次のものを含む：(a) マンモグラフィ中に取得された管内の流体のサンプル中の複数の細胞と、CK5、CK14、CK7、CK18およびp63に結合する一次抗体とを接触させる工程；および、(b)(i) CK7とCK18の一次抗体が、マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプル中の複数の細胞と結合する場合に、異型乳管過形成として過形成を分類する工程。いくつかの実施形態において、異型乳管過形成として過形成を分類する方法があり、次のものを含む：(a) マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプル中の複数の細胞とCK5、CK14、CK7、CK18およびp63に結合する一次抗体とを接触させる工程；および、(b) CK5、CK15およびp63がマンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプル中の複数の細胞と結合する場合に、異型乳管過形成として過形成を分類する。

【0083】

30

ある実施形態において、侵襲的こととして乳癌を分類する方法が本明細書に開示され、次のものを含む：(a) マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプル中の複数の細胞とCK5、CK14、CK7、CK18およびp63に結合する一次抗体とを接触させる工程；および(b) CK5、CK14およびp63一次抗体に結合する細胞の、CK7およびCK18一次抗体に結合する細胞に対する比率が、侵襲的コントロールに対し等しいかそれ以下の場合に、侵襲的として癌を分類する工程。いくつかの実施形態において、管内流体のサンプル中の細胞は、CK5、CK14およびp63と結合しない。

【0084】

40

ある実施形態において、非侵入性として乳癌を分類する方法が本明細書に開示され、次のものを含む：(a) マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプル中の複数の細胞をCK5、CK14、CK7、CK18およびp63に結合する一次抗体と接触させる工程；および(b) CK5、CK14およびp63一次抗体に結合する細胞の、CK7およびCK18一次抗体に結合する細胞に対する比率が、非侵襲性コントロールと等しいか、それ以上である場合に、非侵襲性として癌を分類する工程。

【0085】

乳腺疾患を検出する方法が本明細書に開示され、マンモグラフィ中に個人から収集された管内流体サンプルからの細胞と、uPA、PAI-1およびGal-GalNAcに結合する抗体とを接触させる工程を含む。いくつかの好ましい実施形態において、乳腺疾患を検出する方法は、マンモグラフィ中にBI-RADS II、BI-RADS IIIまたはBI-RADS IV病変を有する個人から収集された管内流体サンプルからの細胞を、uPA、PAI-1およびGal-GalNAcに結合する抗体と接触させる工程

50

を含む。

【0086】

いくつかの実施形態において、方法は、管内流体サンプルをインドールアミン2、3-ジオキシゲナーゼ-1 (IDO-1)、インドールアミン2、3-ジオキシゲナーゼ-2 (IDO-2)、チロシン2、3のジオキシゲナーゼ (TDO) またはそれらの組合せのような、酵素を分解するトリプトファンのうちのいずれか1つ以上に対する抗体と接触させる工程を含む。IDO-1、IDO-2およびTDO活性はTregsによって制御T細胞活性に関係し、癌被処置者の免疫抑制を制御し、および、腫瘍の免疫耐性を与える。IDO-1、IDO-2およびTDOは腫瘍回避を援助すると言われている。¹⁰したがって、ここで開示された方法は、侵襲的として乳癌を分類するのに有用であり、次のものを含む：(a) マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプル中の1以上の細胞とIDO-1、IDO-2、TDOまたはそれらの組合せに結合する一次抗体とを接触させる工程；および(b) IDO-1、IDO-2、TDOまたはその組合せに結合する細胞の比率が非侵入性コントロールと等しいか、それ以上の場合に、侵襲的として癌を分類する工程。いくつかの好ましい実施形態において、乳腺疾患を検出する方法が本明細書に開示され、マンモグラフィ中に収集された管内流体サンプルから細胞を、BI-RADS II、BI-RADS IIIまたはBI-RADS IV病変を有する個人からのIDO-1、IDO-2 TDOまたはそれらの組合せに結合する抗体を接触させる工程を含む。

【0087】

いくつかの実施形態において、管内流体サンプルの収集に続けて、吸収紙が洗浄され、流出液が収集され、細胞数が評価される。サンプルが無細胞である場合、いくつかの実施形態において乳癌に対する低い危険性を持つとして、患者が同定される。サンプルが1個の細胞を含む場合、いくつかの実施形態において、乳癌に対する低い危険性を持つとして、患者が同定され、および随意に、細胞はバイオマーカー表現のために分析される。サンプルが2個以上の細胞を含む場合には、いくつかの実施形態において、乳癌に対する危険性をゆするとして、患者は同定される。また、細胞はバイオマーカー表現のために分析される。²⁰

【0088】

いくつかの実施形態において、もし在れば、前記サンプルにおいて、限定されないが、細胞の細胞学、顕微鏡検査法、流動細胞計測法、免疫組織化学またはそれらの組合せを含む任意の適切な方法も使用して分析される。1つの限定されない実施例において、細胞サンプルは溶血素とエオシンで色付けされてもよい。³⁰

【0089】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された方法によって測定されたタンパク質は、サンプルの蛋白含有量の合計である。いくつかの実施形態において、吸収紙はコロイド金またはコロイド銀製剤に暴露され、全蛋白内容物（濃縮）は任意の適切な方法も使用して決定される。いくつかの実施形態において、吸収紙は、個人の乳房と接触する前に、あらかじめロードされるか、または、あらかじめコロイド金またはコロイド銀製剤で覆われる。この関係において使用される用語「コロイド金属粒子状物質」は、粒子状物質の分散、好ましくは金属または金属化合物で覆われた金属、金属化合物または核から成るゾルを含むことを意味する。⁴⁰

【0090】

本明細書で使用される用語「金コロイド」および「コロイド金組成物」は流体において平等に分散した、サブマイクロメーター大の金粒子の懸濁液（例えば水または水性緩衝液）を意味する。定量化分析において利用されたコロイド金組成物は高度に濃縮された金粒子を含んでいる。1実施例において、コロイド金組成物は、 3.5×10^{-2} から 7.0×10^{-2} 粒子状物質 / m¹までの範囲、例えば($3.5 - 5.25$) $\times 10^{-2}$ 粒子状物質 / m¹、の金粒子濃縮を有する。

【0091】

いくつかの実施形態において、マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプルの全

10

20

30

40

50

蛋白濃縮は決定され、サンプルの全蛋白濃縮が300ngを超える場合、患者は乳癌のさらに検査のために同定される。いくつかの実施形態において、マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプルの全蛋白濃度が決定され、サンプルの全蛋白濃縮が200ngタンパク質以下の場合、患者は乳癌に対する低い危険にあることとして同定される。いくつかの実施形態において、マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプルの全蛋白濃度は決定され、サンプルの全蛋白濃度が約300ngから約2ugまでである場合、患者は乳癌に対する高い危険度にあることとして同定される。

【0092】

いくつかの実施形態において、マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプルが約50pgから約0.5ngまでのタンパク質を含み、細胞を含んでいない場合、患者は乳癌に対する低い危険度にあるとして同定される。10

【0093】

いくつかの実施形態において、マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプルが少なくとも約300ngのタンパク質および2個以上の細胞を含んでいるならば、患者は乳癌のさらなる評価のために同定されるか、または、乳癌用、中程度または高度の危険性であると診断される。いくつかの実施形態において、マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプルの細胞分画は、約2個から約50個の細胞を含む。いくつかの実施形態において、マンモグラフィ中に取得された管内流体のサンプルの細胞分画は、少なくとも10個の細胞を含む。

【0094】

いくつかの実施形態において、管内流体サンプルはmiRNAを含む。いくつかの実施形態において、miRNAは、無細胞またはエキソームである。いくつかの実施形態において、管内流体サンプルのスクリーニングは、管内流体サンプルにおける、1以上のmiRNAの存在及び/又レベルを決定する工程、miRNAシグネチャの分析、あるいはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態において、miRNAは、oncomirs、腫瘍抑制因子miRNA、またはそれらの組合せを含む。当業者は、miRNAパターンまたはシグネチャはoncomirsおよび腫瘍抑制因子miRNAの両方を含み、このシグネチャは乳腺疾患のない個人と比較して、乳腺疾患を持った個人において変化するかもしれないことを認識するだろう。ある実施形態において、miRNAシグネチャは、乳腺疾患を持った個人の1または両乳房で変化するかもしれない。ある実施形態において、管内流体サンプルは、管内流体サンプルにおいて、miRNAの少なくとも一部に結合することができる少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを含む個人を階層化するか分類するためにスクリーニングされる。他の実施形態において、管内流体サンプルは、管内の流体サンプル中のmiRNAの少なくとも一部に結合することができる複数のオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを含む個人を階層化するか分類するためにスクリーニングされる。他の実施形態において、管内流体サンプルは、B I - RADS IIIまたはB I - RADS IV病変を有する個人をさらに分類するためにスクリーニングされる。30

【0095】

いくつかの実施形態において、乳腺疾患有するとして個人を分類する方法が本明細書に開示され、次のものを含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体サンプルを取得する工程、およびb) 管内流体における表3、表4、表5またはそれらの組合せから選択した、1以上のmiRNAの存在を検出する工程であって、そこにおいて、miRNAがmiRNAに対する閾値より上の測定値を有する場合に、miRNAの存在が検出される工程；およびc) 検出されたmiRNAが前記閾値より上の測定値を有するならば乳腺疾患有する個人を分類する工程。40

【0096】

いくつかの実施形態において、乳腺疾患有することを有するとして個人を分類する方法が本明細書に開示され、次のものを含む：a) マンモグラフィを受ける個人の乳頭からの管内流体サンプルを取得する工程、および、b) 管内流体において表3、表4、表5また50

はそれらの組合せから選択した、1以上の中RNAの減少した存在を検出する工程であつて、そこにおいて、mRNAは、mRNAに対する閾値よりも下の測定値を有する場合に、mRNAの減少した存在を検出する工程；およびc)検出されたmRNAが前記閾値より下の測定値を有するならば乳腺疾患有する個人を分類する工程。

【0097】

【表4】

表3：乳房異常における変化したm i R N A

円柱細胞過形成	表現	
上皮細胞		
Let-7c	下降	
miR-27a	下降	
miR-92a	下降	
miR-383	下降	
miR-202	下降	10
miR-107	下降	
miR-141	下降	
miR-183	上昇	
miR-454	上昇	
円柱細胞過形成	表現	
間質細胞		
miR-650	下降	
miR-335	下降	20
miR-566	下降	
miR-497	下降	
miR-27a	下降	
miR-204	下降	
miR-20a	下降	
miR-132	上昇	
miR-539	上昇	
miR-221	上昇	
		30
異型乳管過形成	表現	
miR-21	上昇	
miR-183	上昇	
miR-200c	上昇	
miR-200b	上昇	
miR-638	下降	
miR-572	下降	
miR-671-5p	下降	
miR-30d	上昇	40
miR-1273	下降	
miR-15b	上昇	
miR-644	上昇	
miR-141	上昇	

【表5】

表3 (続き)

DCIS	
miR-195	下降
miR-557	下降
miR-1207-5p	下降
miR-874	下降
miR-556-3p	上昇
IDC	
miR-933	下降
miR-141	上昇
miR-96	上昇?
miR638	下降
miR-575	下降
Let-7f	上昇
miR-15a	上昇
miR-671-5p	下降
miR-20a	上昇
miR-1202	下降
miR-183	上昇
miR-143	上昇
miR-19b	上昇
miR-1915	下降
miR-107	上昇
miR-21	上昇
miR-1274b	上昇
miR-1268	下降
miR-200b	上昇
miR-106b	上昇
miR-634	下降
miR-129	下降
miR-572	下降
miR-933	下降
miR-17	上昇
miR-29b	上昇
miR-877	上昇
miR-425	上昇
miR-181a	下降
miR-193a	下降
miR-193b	下降
miR-145	下降

10

20

30

40

【表6】

表3 (続き)

miR-17-5p	下降
miR-20a	下降
miR-30b	上昇
miR-30d	上昇

【0100】

10

【表7】

表4：乳癌における腫瘍抑制m i RNA

細胞増殖／過形成	侵襲／転移
miR-34a	miR-340
miR-17-5p	miR-34a
miR-125b	miR-145
miR-146a	miR-183
miR-128	miR-17
	miR-20
細胞生存	miR-26a
miR34a	
免疫認識	血管新生
miR-322	miR-145
miR-93	miR519c
miR-181a	miR340

20

30

【0101】

40

いくつかの実施形態において、m i RNAの存在は、この技術分野において公知のPCR方法のうちの任意のものを使用して検出される。そのようなPCR方法は、限定されないが、RT-PCR、リアルタイムPCR、半量的PCR、qPCR、多重PCRまたは等温のPCRを含む。他の実施形態において、m i RNAは、マイクロアレイまたはバイオチップ上で、またはハイブリダイゼーション溶液において含まれるかもしれない1以上のm i RNAプローブへのハイブリダイゼーションによって検出され得る。いくつかの好みの実施形態において、m i RNAシグネチャはm i RNAマイクロアレイまたは多重のハイブリダイゼーション、および分析によって決定され得る。いくつかの実施形態において、1以上のm i RNAプローブは固体相サンプル収集培地（多重状態で、またはマイクロアレイ上で）に結合され得る。いくつかの実施形態において、m i RNAプローブは、ガラス、修正済か機能的にされたガラス、プラスチック、ナイロン、セルロースまたはニトロセルロース紙剤のような物質、樹脂剤、シリカまたはシリカ系物質で製作された、固体相サンプル収集培地などに結合され得る。m i RNAプローブは、固体相サンプル収集培地に共有結合または非共有結合で結合され得る。

50

【0102】

診断または予後は、乳腺疾患の被処置者からのサンプルと比較した、通常の被処置者からの管内流体サンプル中のm i R N A の差異の表現に基づいてもよい。

【0103】

いくつかの実施形態において、C C H、A D H、D C I S またはI D C に対する危険性または保有状態として個人を分類する方法は、次のものを含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体を取得する工程、b) 表3から選択された少なくとも1つのm i R N A の変更された表現を検出する工程。

【0104】

いくつかの実施形態において、円柱細胞過形成を有するとして個人を分類する方法は、次のものを含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体を取得する工程、b) 表3から選択されたm i R N A の変更された表現を検出する工程。C C Hを有するとして個人を分類するための好適な実施形態は、以下の群から選択された、少なくとも1以上のm i R N A をスクリーニングする工程を含む；マンモグラフィ中に個人の乳頭から取得されたB I - R A D S I I 、B I - R A D S I I I またはB I - R A D S I V 病変を有する個人の管内流体サンプルにおける、L e t - 7 c 、m i R - 2 7 a 、m i R - 9 2 a 、m i R - 3 8 3 、m i R - 2 0 2 、m i R - 1 0 7 、m i R - 1 4 1 、m i R - 1 8 3 、m i R - 4 5 4 、m i R - 6 5 0 、m i R - 3 3 5 、m i R - 5 6 6 、m i R 4 9 7 、m i R - 2 7 a 、m i R - 2 0 4 、m i R - 2 0 a 、m i R - 1 3 2 、m i R - 5 3 9 およびm i R - 2 2 1 、L e t - 7 c 、m i R - 2 7 a 、m i R - 9 2 a 、m i R - 3 8 3 、m i R - 2 0 2 、m i R - 1 0 7 、m i R - 1 4 1 、m i R - 1 8 3 、及び／又はm i R - 4 5 4 の表現の変更は、上皮細胞のC C Hを示し、一方、m i R - 6 5 0 、m i R - 3 3 5 、m i R - 5 6 6 、m i R 4 9 7 、m i R - 2 7 a 、m i R - 2 0 4 、m i R - 2 0 a 、m i R - 1 3 2 、m i R - 5 3 9 、及び／又はm i R - 2 2 1 の表現の変更は、ストロマの起原のC C Hを示すだろう。

【0105】

いくつかの実施形態において、異型乳管過形成を有するとして個人を分類する方法は、次のものを含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体を取得する工程、および

b) 表3から選択された少なくとも1つのm i R N A の変更された表現を検出する工程。A D Hを有するとして個人を分類するための好適な実施形態は、マンモグラフィ中に個人の乳頭から取得された、B I - R A D S I I I またはB I - R A D S I V 病変を有している個人の管内流体サンプルにおける、m i R - 2 1 、m i R - 1 8 3 、m i R - 2 0 0 c 、m i R - 2 0 0 b 、m i R - 6 3 8 、m i R - 5 7 2 、m i R - 6 7 1 - 5 p 、m i R - 3 0 d 、m i R - 1 2 7 5 、m i R - 1 5 b およびm i R - 6 4 4 から成る群から選択された少なくとも1以上のm i R N A をスクリーニングする工程を含む。

【0106】

いくつかの実施形態において、D C I S を有するとして個人を分類する方法は、次のものを含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体を取得する工程、およびb) 表3から選択された少なくとも1つのm i R N A の変更された表現を検出する工程。D C I S を有するとして個人を分類するための好適な実施形態は、マンモグラフィ中に個人の乳頭から取得された、B I - R A D S I I I またはB I - R A D S I V 病変を有している個人の管内流体サンプルにおいて、m i R - 1 9 5 、m i R - 5 5 7 、m i R - 5 5 4 、m i R - 1 2 0 7 - 5 p 、m i R - 8 7 4 、m i R - 5 5 6 - 3 p およびm i R - 5 5 6 - 3 p から成る群から選択された少なくとも1以上のm i R N A をスクリーニングする工程を含む。

【0107】

いくつかの実施形態において、I D C を有するとして個人を分類する方法は、次のものを含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体を取得する工程、b) 表3から選択された少なくとも1つのm i R N A の変更された表現を検出する工程。I D C を有

10

20

30

40

50

するとして個人を分類するための好適な実施形態は、マンモグラフィ中に個人の乳頭から取得された、B I - R A D S III または B I - R A D S IV 病変を有している個人の管内流体サンプルにおいて、miR - 933、miR - 141、miR - 96、miR 638 および miR - 575、Let7 - f、miR - 15a、miR - 671 - 5p、miR - 20a、miR - 1202、miR - 183、miR - 141、miR - 19b、miR - 1915、miR - 107、miR - 21、miR - 1274b、miR - 1268、miR - 200b、miR - 106b、miR - 634、miR - 129、miR - 572、miR - 933、miR - 17、miR - 29b、miR - 877、miR - 425、miR - 23b、miR - 193a、miR - 193b、miR - 181a、miR - 143、miR - 145、miR - 17 - 5p、miR - 20a、miR - 30b および miR - 30d から成る群から選択された少なくとも 1 以上の miRNA をスクリーニングする工程を含む。 10

【0108】

表4に開示された腫瘍抑制因子miRNAの標的は、乳癌に関係し、この技術分野において公知である (Modulation of Cancer Traits by tumor Suppressor microRNAs Grammatikakis, I. et al. Int. J. Mol. Sci. 2013, vol 14, pages 1822 - 1842; microRNA 17 / 20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. Yu, e et al. Proc. Natl. Acad. Sciences. 2010, vol. 107 (18), pages 8231 - 8236, each incorporated in its entirety herein)。当業者は、そのような標的が、本発明の範囲内に落ち着き、本明細書に開示される方法が、乳腺疾患のバイオマーカーとしての標的を含むことを認識するだろう。 20

【0109】

【表8】

表5：侵襲性乳癌における標的表現の変化と関連するm.i RNA

uPA	PAI-1	GalNAc トランスフェラーゼ	IDO-1	
miR-23b (down)	miR-143	miR-30b (Up)	miR-181a (down)	10
miR-193a (down)	miR-145	miR-30d (Up)		
miR-193b (down)	miR-17-5p (down)	miR-548a-3p		
miR-181a (down)	miR-20a (down)	miR-183*		
		miR-124		
		miR-29a*		
		miR-506		
		miR-3143		
		miR-4324		20
		miR-569		
		miR-548c		
		miR-491-3p		
		miR-3672		
		miR-544b		
		miR-135b		
		miR-2117		
		miR-590-3p		
		miR-378*		
		miR-135a		30

【0110】

いくつかの実施形態において、マンモグラフィを受ける個人を、乳癌（CCH, ADH, DCIS, IDC, またはLCIS）の危険性がある、または保有しているとして分類する方法は、マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体サンプルを取得する工程、および、表5にリストされた、個人における、uPA、PAI-1およびGal-GalNAc表現を制御するm.i RNAの変更された表現をスクリーニングする工程、を含む。いくつかの好ましい実施形態において、表5にリストされたIDO1表現を制御するm.i RNAの表現がスクリーニングされる。好適な実施形態は、マンモグラフィ中に個人の乳頭から取得された、BI-RADS IIIまたはBI-RADS IV病変を有している個人の管内流体サンプルにおいて、uPA、PAI-1およびGal-GalNAcトランスフェラーゼ表現を制御する、miR-23b、miR193a、miR193b、miR181a、miR143、miR145、miR-17-5p、miR-20a、miR30bおよびmiR-30dから成る群から選択されたm.i RNAの変更された表現をスクリーニングする工程を含む。いくつかの好ましい実施形態において、IDO-1 40

40

50

を制御するm i R N A 1 8 1 aもスクリーニングされる。いくつかの実施形態において、管腔A様乳癌を有するとして被処置者を分類する方法は、次のものを含む：a) マンモグラフィを受ける被処置者の乳頭からの管内流体サンプルを取得する工程、およびb) m i R - 2 9 a、m i R 1 8 1 aおよびm i R - 6 5 2から成る群から選択された少なくとも1つのm i R N Aの変更された表現を検出する工程。

【0111】

いくつかの実施形態において、浸潤性乳癌の危険性があるまたは保有しているとして被処置者を分類する方法は、マンモグラフィを受ける被処置者から管内流体サンプルを取得する工程、およびu P A、P A I - 1およびG a l N a cトランスフェラーゼを制御するm i R N Aの変更されたシグネチャをスクリーニングする工程を含む。G a l N a cトランスクレーゼ3、6および7は好ましいG a l N a cトランスフェラーゼである。より好ましいG a l N a cトランスフェラーゼは、B 3 G A L T 1やB 3 G A L T 5のような、ベータ1 - 3ガラクトシルトランスフェラーゼである。そのような方法は、u P A、P A I - 1およびG a l - G a l N a c表現をアップレギュレートする変更されたm i R N Aシグネチャをスクリーニングする工程を含む。いくつかの実施形態において、方法は、I D O - 1、I D O - 2、T D Oまたはそれらの組合せを制御するm i R N Aの変更されたシグネチャのスクリーニングを含む。I D O 1および- 2、および、T D Oは腫瘍回避を支援するものとして知られており、癌関連の免疫抑制に関連している。いくつかの実施形態において、方法は、u P A、P A I - 1、G a l N a cトランスフェラーゼおよびI D O - 1を制御するm i R N Aの変更されたシグネチャのスクリーニングを含む。従っていくつかの好ましい実施形態において、浸潤性乳癌の危険性がある 保有しているとして被処置者を分類する方法は、次のものを含む：a) マンモグラフィを受ける被処置者の乳頭からの管内流体サンプルを取得する工程、およびb) m i R - 2 3 b、m i R 1 9 3 a、m i R - 1 9 3 b、m i R - 1 8 1 a、m i R - 1 4 3、m i R - 1 4 5、m i R - 1 7 - 5 p、m i R - 2 0 a、m i R - 5 4 8 a - 3 p、m i R - 1 8 3 *、m i R - 1 2 4、m i R - 2 9 a *、m i R - 5 0 6、m i R - 3 1 4 3、m i R - 4 3 2 4、m i R - 5 6 9、m i R - 5 4 8 e、m i R - 4 9 1 - 3 p、m i R - 3 6 7 2、m i R - 5 4 4 b、m i R - 1 3 5 b、m i R - 2 1 1 7、m i R - 5 9 0 - 3 p、m i R - 3 7 8 *、m i R - 1 3 5 a、m i R 3 0 bおよびm i R - 3 0 dの変更されたレベルを検知する工程。m i R 1 9 3 a、m i R - 1 9 3 b、およびm i R - 1 8 1 aレベルの下降、およびm i R 3 0 bおよびm i R - 3 0 dレベルの上昇は、浸潤性乳癌の増加した危険性を示すであろう。

【0112】

いくつかの実施形態において、m i R - 2 1、m i R - 4 9 4およびm i R - 1 8 3の増加した存在またはアップレギュレーションは、癌転移または癌進行の増加した危険度及び／又は予後不良を示すだろう。他の実施形態において、l e t - 7 a、l e t - 7 b、l e t - 7 cおよびm i R - 1 3 0 8のアップレギュレーションは、乳腺疾患の転移のボテンシャルを示すだろう。いくつかの好ましい実施形態において、m i R - 2 0 0 bおよびm i R - 2 0 0 cのような、m i R - 2 0 0 ファミリーのm i R N Aメンバーは、好ましい診断的、兆候的、及び／又は予測的な転移性疾患マーカーである。

【0113】

いくつかの実施形態において、乳腺疾患有するとして個人を分類する方法が本明細書に開示され、次のものを含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内の流体サンプルを取得する工程；b) 管内の流体サンプルを使用して、個人のD N Aメチル化シグネチャを評価する工程；およびc) 個人のD N Aメチル化シグネチャに基づいて、乳腺疾患有するとして個人を分類する工程。いくつかの実施形態において、個人は、管内流体サンプル中のD N Aメチル化シグネチャに基づいて、管腔のA、管腔のBまたは基底様乳癌である乳腺疾患有するとして分類される。他の実施形態において、特定遺伝子のD N Aメチル化シグネチャに基づいて、低生存率及び／又は再発の危険性または保有しているとして、個人は診断または予後判定され得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 4 】

いくつかの実施形態において、個人は、表 6 にリストされた遺伝子の少なくとも 1 以上の DNA 超メチル化を有する。

【 0 1 1 5 】

いくつかの実施形態において、個人は DNA 超メチル化を有する、の DNA メチル化に弱い遺伝子で少なくとも 1 以上である。例えば限定なしで、遺伝子の超メチル化または脱メチル化 u P A および P A I - 1 のように乳癌の増加した危険度を示すだろう。

【 0 1 1 6 】

いくつかの好ましい実施形態において、B I - R A D S I I I または B I - R A D S I V 病変を有する個人における乳腺疾患を診断または予後判定する方法は、次のものを含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体サンプルを取得する工程；および

b) 管内流体サンプルを使用して、個人の DNA メチル化シグネチャを評価する工程。

【 0 1 1 7 】

この発明の目的において有用な、広範囲のゲノムおよび特定遺伝子 DNA メチル化プロファイリングに対する方法は、この技術分野において知られており、上に述べたそのような方法の非徹底的なリストを含む。いくつかの実施形態において、DNA メチル化をスクリーニングし、または評価することが、亜硫酸水素塩シーケンシング、メチル化感受性 PCR、メチル化 DNA 免疫沈降 (M e D I P) 、メチル感受性単一のヌクレオチド・プライマー伸張 (M S - S N u P E) 、ゲノム規模メチル化プロファイリング、メチル化感受性制限酵素分析、結合した亜硫酸水素塩限定解析、メチル化特異性量子ドット蛍光共鳴エネルギー転移 (M S - q F R E T) 、全ゲノムマッピングまたはそれらの組合せによって行なわれる。いくつかの実施形態において、好ましい査定方法はゲノム規模での DNA メチル化プロファイリングである。DNA メチル化プロファイリング方法は、この技術分野において公知である (De deurwaerder, et al. EMBO Molecular Medicine, 2011)。たとえば Illumina Infinium Human Methylation27 Bead chip (Illumina) などの、このような分析の商用資源が利用可能である。

【 0 1 1 8 】

10

20

【表9】

表6：DNAメチル化パターンシグネチャに対する標的遺伝子分析

ABCA3	GSTP1	UAPIL1	RASSF1	FZD9	PTGS2
COX7A1	PTPRO	SYDE1	B3GALT5	B4GALT3	B4GALT7
SST	RECK	UGT3A2	SCGB3A1	FGFP3	GAS7
CDKL2	ACADL	TNFRSF10D	HDAC9	HOXA11	MME
ZNF154	SFRP2	Clorf114	POMC	RBPI	BCR
APC	ITR	COLIA2	C4B	DAB2IP	MEST
CCND2	UGT3A1	SIT1	RARA	SEPT5	TFF1
LAX1	HCLSI	CD3D	THY1	SERPINAS	ASCL2
ICOS	CD6	CD79B	DLK1	EYA4	HOXA5
LCK	CCL5	UBASH3A	HOXA9	HOXB13	JHH
CD3G	Gal-NAc トランスフェラーゼ	B3GALT1	IPF1	ISL1	PAV6
B3GALT5	uPA	PAI-1	TBX1	SOX1	SOX17
MUC1	P16	FABP3	CDH17	EWPHX1	B3GALT1
APC	BIN1	BRCA1	B3GALT5	B4GALT3	B4GALT7
BRCA2	CST6	GSTP1	TIMP3	P21	PTEN

10

20

30

【0119】

ある実施形態において、乳房CpG島メチル化剤表現型（B-CIMP）であるとして個人を分類する方法が本明細書に開示され、は、次のものを含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体を取得する工程；および、b) 個人のCpG島メチル化表現型を区別する工程；であって、そこでは、個人がB-CIMPであると特徴づけられた場合に、個人が乳癌転移の低い危険度及び／又は生存率の向上を有すると言われる。B-CIMPとして個人の表現型を区別する方法は、この技術分野において公知である（Fang, F et al, Sci Transl Med. 2011, 3: 75ra25）。

40

【0120】

いくつかの実施形態において、乳腺疾患有するとして個人を分類する方法が本明細書に開示され、次を含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体サンプルを取得する工程、b) 管内流体サンプルを使用して個人のDNAメチル化表現型を決定する工程；およびc) 乳房CpG島メチル化剤表現型として、個人のDNAメチル化シグネチャを区別する工程を含み、そこでは、個人が乳房CpG島メチル化剤表現型を有していると分類される場合に、乳癌転移の低い危険度及び／又は生存率の向上を有するといわれる。

【0121】

いくつかの実施形態において、管腔乳癌の危険性がある、または保有しているとして個人を分類する方法は、次のものを含む：a) マンモグラフィ中の個人の乳頭からの管内流

50

体サンプルの取得、および、b) RASSF1、FZD9、PTGS2、MME、HOXA9、PAX6、SCGB3A1、FABP3、FGFP3、GAS7、HDAC9、HOXA11、MME、PAX6、POMC、およびRBP1から成る群から選択された、1以上の遺伝子のDNAメチル化状態を決定する工程であって、そこにおいて、遺伝子が超メチル化された場合に、管腔乳癌の危険性がある、または保有しているとして、個人が特徴づけられる。

【0122】

いくつかの実施形態において、基底様に乳癌の危険性がある、または保有しているとして、個人を分類する方法は、次を含む：a) マンモグラフィ中の個人の乳頭からの管内流体サンプルを取得する工程、および、b) CDH17、EWPHX1、TFF1、RARα、MEST、BCR、C4B、SEPT5、SERPINA5、およびTHY1から成る群から選択される、1以上の遺伝子のDNAメチル化状態を決定する工程であって、そこにおいて、遺伝子が超メチル化された場合に、管腔乳癌の危険性がある、または保有しているとして、個人が特徴づけられる。10

【0123】

いくつかの実施形態において、管腔乳癌の危険性がある、または保有しているとして、個人を分類する方法は、次を含む：a) マンモグラフィ中に個人の乳頭からの管内流体サンプルを取得する工程、および、b) DNAメチル化状態uPAおよびPAI-1を決定する工程であって、そこにおいて、遺伝子が超メチル化された場合に、管腔乳癌の危険性がある、または保有しているとして、個人が特徴づけられる。20

【0124】

他の好ましい実施形態は、マンモグラフィ中に個人の乳頭から得られた管内流体サンプルを使用して、BI-RADS IIIまたはBI-RADS IV病変を有する個人における、ACADL、RECKおよびSFR2の変更されたDNAメチル化を評価する工程を含む。個人における、1以上のACADL、RECKおよびSFR2遺伝子の増加したDNAメチル化は、再発の増加した危険度及び／又は低い生存率を示し得る。いくつかの好ましい実施形態において、マンモグラフィ中に個人の乳頭から得られた管内流体サンプルを使用して、BI-RADS IIIまたはBI-RADS IV病変を有する個人におけるuPAおよびPAI-1遺伝子の変更されたDNAメチル化を評価する工程を含む。uPAおよびPAI-1遺伝子の超メチル化は乳癌の増加した危険を示すだろう。30

【0125】

治療法

本明細書に開示される、ある実施形態において、診断するまたは予後判定を必要とする個人における乳腺疾患を診断または予後判定する方法は、個人の乳房のマンモグラフィ中に取得された管内流体サンプルから乳腺疾患のマーカーをスクリーニングする工程を含む。いくつかの実施形態において、さらに方法は、スクリーニングの結果に基づいて、被処置者に対する処置コースを決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、方法はBI-RADS IIIまたはBI-RADS IV病変を有する個人に対する処置コースを決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、医師は、スクリーニングの結果に基づいて、個人への処置レジメンを処方する。いくつかの実施形態において、処置レジメンは治療薬、放射線治療、及び／又は乳房組織の外科的切除を含む。いくつかの実施形態において、処置レジメンは複数の治療薬を含む。40

【0126】

いくつかの実施形態において、治療薬は、アントラサイクリン（例えばドキソルビシンまたはエピルビシン）、白金剤、タキサン（例えばパクリタキセルまたはドセタセル）またはそれらの組合せである。いくつかの実施形態において、治療薬は、トラスツズマブ・エムタンシン、アルブミン結合パクリタキセル、アナストロゾール、カペシタビン、カルボプラチニン、シスプラチニン、シクロホスファミド、ドセタセル、ドキソルビシンHC1、エピルビシンHC1、エリブリン、エベロリムス、エキセメスタン、フルオロウラシル、フルベストラント、ゲムシタビンHC1、酢酸ゴセレリン、イクサベピロン、ラバチニブ50

ジトシラート、レトロゾール、リポソーム・ドキソルビシン、酢酸メゲストロール、メトトレザト、ミトキサントロン、パクリタキセル、パミドロン酸二ナトリウム、ペルツマブ、ラロキシフェン、タモキシフェン、トレミフェン、トラスツズマブ、ビノレルビンまたはそれらの組合せである。

【0127】

いくつかの実施形態において、治療薬は、S E R M、S E R D、A I、それらの薬学的塩、または、それらの組合せである。いくつかの実施形態において、S E R Mは、タモキシフェン、シス形タモキシフェン、4 - ハイドロキシタモキシフェン(4 - O H T)、エンドキシフェン、デスマチルタモキシフェン、ラソフォクシフェン、ラロキシフェン、ベンゾチオフェン、ベンズドフォキシフェン、アルゾキシフェン、ミプロキシフェン、レボルメロキシフェン、ドロロキシフェン、クロミフェン、イドキシフェン、トレミフェン、E M 6 5 2 およびE R A - 9 2 から成る群から選択される。好ましくは、いくつかの実施形態において、治療薬は、タモキシフェンまたはタモキシフェン派生物(たとえば4 - ヒドロキシタモキシフェン、N - デスマチルタモキシフェン、エンドキシフェンおよびシス形タモキシフェン)である。いくつかの実施形態において、S E R Dはフルベストラント、A R N - 8 1 0 またはC H 4 9 8 6 3 9 9を含む。いくつかの実施形態において、A Iはアナストロゾール、エキセメスタンおよびレトロゾールから成る群から選択される。いくつかの実施形態において、複数の治療薬は、S E R D(S E R M)、A I、製薬の塩、それら、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態において、治療薬は少なくとも1つのオメガ-3脂肪酸および少なくとも1つのビタミンD化合物を含む。

10

【0128】

いくつかの実施形態において、治療薬は酪酸である。いくつかの実施形態において、治療薬はドキソルビシンである。いくつかの実施形態において、治療薬はエピルビシンである。いくつかの実施形態において、治療薬はパクリタキセルである。いくつかの実施形態において、治療薬はドセタセルである。

20

【0129】

いくつかの実施形態において、治療薬は、表3、表4、表5またはそれらの組合せにおいて本明細書に開示される抗腫瘍抑圧遺伝子m i R N Aの抑制物質である。そのような抗腫瘍抑圧遺伝子m i R N Aの限定しない実施例はp 6 3である。他の実施形態において、治療薬は、表3、表4、表5またはそれらの組合せにおいて本明細書に開示されるo n c o m i rの活性化剤である。いくつかの実施形態において、治療薬は本明細書に開示される人間または人類以外のm i R N Aの配列に基づく。いくつかの実施形態において、m i R N Aの阻害剤はアンチセンス・オリゴヌクレオチドである。抗感覚オリゴヌクレオチドはリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、またはそれらの組合せを含むことができる。アンチセンスヌクレオチドは例えば糖や骨格修飾物などの1以上の化学的修飾を有するかもしれない。

30

【0130】

いくつかの実施形態において、治療薬は、本明細書に開示されるような、乳腺疾患において超メチル化される遺伝子のD N A超メチル化の阻害剤である。当業者は、D N A超メチル化の阻害が、乳腺疾患に関係される特定遺伝子の遺伝子抑制効果を低減するだろうということを認識するだろう。他の実施形態において、治療薬はD N Aメチル化の活性化剤またはD N Aメチル化剤である。そのような場合、細胞増殖と腫瘍形成に関係する遺伝子は沈黙させられるか、または発現が抑制されるであろう。

40

【0131】

いくつかの実施形態において、治療薬は併用療法である。併用療法が投与される場合、各薬剤は他の薬剤と組み合わせて(例えば同時に)または単独で投与されてもよい。さらに、薬剤はすべて請求項に記載の方法に従って投与されてもよい。代わりに、薬剤のうちの一部は、請求項に記載の方法に従って投与されてもよく、一方、他のものは体系的に投与される。

50

【0132】

いくつかの実施形態において、併用療法は C A F : シクロホスファミド、ドキソルビシンおよび 5 - FU である。いくつかの実施形態において、併用療法は T A C : ドセタセル、ドキソルビシンおよびシクロホスファミドである。いくつかの実施形態において、併用療法は A C - T : パクリタキセルまたはドセタセルにより後続される、ドキソルビシンとシクロホスファミドである。いくつかの実施形態において、併用療法は F E C : - T : ドセタセルまたはパクリタキセルにより後続される、5 - FU、エピルビシン、およびシクロホスファミドである。いくつかの実施形態において、併用療法は T C : ドセタセルとシクロホスファミドである。いくつかの実施形態において、併用療法は T C H : H E R 2 / n e u 陽性腫瘍に対する、ドセタセル、カルボプラチニンおよびトラスツズマブである。いくつかの実施形態において、併用療法は C M F : シクロホスファミド、メトトレザトおよび 5 - フルオロウラシルである。いくつかの実施形態において、併用療法は A - C M F : C M F が後続するドキソルビシンである。いくつかの実施形態において、併用療法は E C : エピルビシンとシクロホスファミドである。いくつかの実施形態において、併用療法は A C : ドキソルビシンとシクロホスファミドである。

【実施例】**【0133】**

本発明は、次の実施例の参照を通じて一層よく理解され得る。これらの実施例は、典型的な実施形態だけについて記述するために含まれており、本発明の全体を包含すると解釈されるべきでない。

20

【0134】**実施例 1**

マンモグラフィ中に取得された管内流体サンプルの検査

【0135】

吸収紙は固体の相収集媒体として利用される。個人は、マンモグラフィの前にオキシトシンが投与された。両乳房の乳頭は清浄化され、ケラチン栓が除去される。ニトロセルロースフィルターが両方の乳頭に取り付けられる。各乳房がマンモグラフィ装置に配置され、マンモグラフィが実行される。

【0136】

マンモグラフィ中に取得された管内流体サンプルの収集に続いて、ニトロセルロースフィルターは任意の適切なバッファ洗浄溶液（例えば磷酸塩緩衝食塩水）を使用して洗浄される。流出液は修飾された細胞学バイアルに収集され、遠心分離される。細胞は流出液から単離され清潔なガラス顕微鏡スライドガラスの中央部に転送され、カバーグラスが適用される。スライドは大気乾燥に可能にされ、次に、例えば、無水アルコールで固定される。

30

【0137】

モノクローナル抗体 CK 5、CK 14、p 6 3、およびラビットモノクローナル抗体 CK 7 および CK 18 は、単一の抗体希釈剤で多重化され、顕微鏡検査法スライドに適用される。

その後、ヤギ抗マウス H R P およびヤギ抗ラビット - A P のカクテルからできているビオチンフリー多重染色検出試薬が適用される。D A B および高速レッド・クロモゲンが連続して適用される。細胞はヘマトキシリソで逆染色される。

40

【0138】

【表10】

表7

抗体	クロモゲン	細胞タイプ
CK5	DAB 茶色	前駆細胞 筋上皮／管腔 基底表現型
CK14	DAB 茶色	前駆細胞 筋上皮／管腔 基底表現型
P63	DAB 茶色	筋上皮／管腔 基底表現型
CK7	FR 赤	正常乳房細胞 腺上皮 管腔上皮
CK18	FR 赤	正常乳房細胞 腺上皮 管腔上皮

10

【0139】

分析の結果は、マンモグラムX線の結果と比較される。結果が一貫しているならば、追加分析は実行されない。結果が一貫しない場合、追加分析または試験が実施される。

20

【0140】

実施例2

マンモグラフィ中に取得された管内流体サンプルの処置

【0141】

吸収紙は固体の相収集媒体として利用される。個人はマンモグラフィの前にオキシトシンが投与される。両乳房の乳頭は正常化され、ケラチン栓が除去される。ニトロセルロースフィルターが両方の乳頭に取り付けられる。各乳房がマンモグラフィ装置に配置されて、マンモグラフィが実行される。

【0142】

マンモグラフィ中に取得された管内流体サンプルの収集に続いて、ニトロセルロースフィルターが、任意の適切なバッファ洗浄溶液（例えば磷酸塩緩衝食塩水）を使用して洗浄される。流出液は、修飾された細胞学バイアルに収集され、遠心分離される。細胞は流出液から単離され清潔なガラス顕微鏡スライドガラスの中央部に転送され、カバーガラスが適用される。スライドは大気乾燥に可能にされ、次に、例えば無水アルコールで固定される。

30

【0143】

前処理

細胞は、過酸化物ブロック - BiocareのPeroxidased 1に接触される。

【0144】

40

次に、熱回収前処理を実行する。BiocareのDecloakingチャンバーで、30分間95℃に、Div-a溶液をあらかじめ加熱する。次に、あらかじめ加熱した溶液にスライドを入れ、40分間95℃で、加圧下で回収する。代わりに、45-60分間組織切片に蒸気を当てるか、または95℃で40分の水浴を使用する。溶液は20分間冷却され、次いで、蒸留水で洗浄される。

【0145】

タンパク質ブロックの適用 BiocareのBackground Sniperを用いて、室温で10-15分間、インキュベートする。

【0146】

室温で30-60分間、一次抗体（すなわちCK5、CK14、CK7、CK18およ

50

び p 6 3 に対する抗体）とともに、スライドをインキュベートする。

【0147】

B i o c a r e の M A C H 2 D o u b l e S t a i n 2 を使用して、室温で 30 分間スライドをインキュベートする。

【0148】

B i o c a r e の B e t a z o i d D A B を使用する場合は、室温で 5 分間インキュベートする。

【0149】

B i o c a r e の V u l c a n F a s t R e d を用いて、室温で 10 - 20 分間インキュベートする。脱イオン水ですすぐ。 10

【0150】

脱イオン水ですすぐ。ヘマトキシリンで 30 - 60 秒間インキュベートする。脱イオン水ですすぐ。 T a c h a のブルーイング溶液を 1 分間適用する。

【0151】

光学顕微鏡で、細胞を視覚化する。

【0152】

実施例 3

管内流体の検査

【0153】

この試験は 3 人の健康で、妊娠していない、乳を分泌しない女性被処置者に関する単一施設試験であった。被処置者はクリニックを訪問した順序で登録された。 20

【0154】

原発性の試験目的は、ニトロセルロースフィルター上のタンパク質の存在によって決定されるような、マンモグラム処置の間に管内流体を生成する 30 - 65 歳の女性のパーセンテージを決定することだった。

【0155】

第 2 の目的は、（もしあれば）細胞の存在およびタイプに対して、管内流体を細胞学的に評価することであった。

【0156】

方法論：

簡潔に言えば、風袋重量を計られたニトロセルロースフィルターが、これを各乳頭（各乳房に対し 1 つ）に取着することによって、マンモグラフィ中に圧出された管内流体を収集するために使用された。被処置者の 1 つの組において、マンモグラムが実行された。被処置者の第 2 の組において、マンモグラムは実行されなかった（対照群）。管内流体試料を含んでいるフィルタの洗浄から収集された細胞は、細胞診を行った。

【0157】

検査：

試験の主要評価項目は、マンモグラフィを受ける場合に、ニトロセルロースフィルター上のタンパク質の存在によって決定されるものとして、管内流体を生成する試験を完了した女性のパーセンテージであった。 40

【0158】

第 2 の評価項目は、細胞学的評価によって決定されるものとして、管内流体サンプル中の細胞の存在であった。

【0159】

結果：

これらの被処置者群から得られたフィルタになされたタンパク質試験に関し、対照群から得られたサンプルのどれも、タンパク質の存在を示さなかった。マンモグラムを受けた群からのフィルタはすべて、タンパク質の存在を示した。

【0160】

実施例 4

50

管内流体サンプル中のm i R N A の検出

【0161】

管内流体サンプルは、乳房に装置を取着する乳房係合部材を含む収集装置を使用して、マンモグラフィを受ける女性の被処置者の両乳房の乳頭から吸引される。管内流体サンプルは、吸収紙のような固体相サンプル収集媒体上に収集される。吸収紙上で吸収された管内流体サンプルは洗浄され、R N A (m i R N A を含む) の全量が、引き続き単離される。

【0162】

400 μ L の Trizol (登録商標) (Invitrogen (登録商標) 、 Carlsbad , CA) が、 1 cm × 1 cm および 1 インチ × 1 インチの寸法の管内流体サンプルを含む吸収紙を含む 2 本の mL 微量遠心管チューブに添加された。チューブは、 vortexer 上で、 4 ° で、 30 分間 2000 rpm で攪拌される。引き続き、 1.2 mL の Trizol (登録商標) 、次いで 0.24 mL のクロロホルムがさらに添加された後、チューブは室温で 5 分間再び攪拌され、さらにあと 2 分後に、 15 分間 4 ° で、 14000 g で遠心分離された。頂部水相が収集され、等容積の 75 % のエタノールと混合され、製造業者のプロトコルに従って、 24 プラス装置 (Qiagen (登録商標) 、 Valencia , CA) に対し、 PureLink (登録商標) R N A 回転カラム上で処理された (QIAvac (登録商標) 上の Invitrogen (登録商標)) 。 R N A は 100 μ L の水を使用して、回転カラムから溶出され、さらなる使用まで -80 ° で保存された。

【0163】

200 μ L の BAN および 10 μ L のポリアクリルキャリヤーを含むれ棄却された TRIZOL 試薬は、 R N A 回収および産生を向上させるためのいくつかのサンプルと共に使用されてもよい。随意に、単離された R N A の可視化を向上させるため、および単離プロトコルからクロロホルムとブロモクロロプロパンを除去するために、ブロモアニゾールがこの相分離の間に混合物に加えられてもよい。

【0164】

他のサンプルからの m i R N A を含んでいる R N A が、 NanoDrop 吸光度測定法またはアジレント定量化方法を使用して定量される。少なくともいくつかのサンプル中の m i R N A の濃度および完全性が、アジレントバイオアナライザー (Agilent Bioanalyzer) を用いた R N A 6000 nano Labchip Series II Assay を使用して、確認される。

【0165】

R N A は、各 m i R N A 標的に特異的であるステムループ R T プライマーを使用して逆転写され、標準的な時間および条件に従って、 1 反応当たり 50 μ M 濃度となるように又クレアーゼ除外水で希釈される。その後、 D N A はさらなる使用まで、約 -20 ° で保存され得る。 m i R N A 表現レベルの相対的な定量化は、標的 m i R N A の発現レベルを標準化するために、 m i R - 16 及び / 又は他の安定表現された小型 R N A の発現レベルを使用して、リアルタイム P C R によって実施され得る。反応はすべて 3 回繰り返して実行され、インターフィアセイントロール (interassay control) を使用する。データは、標的 m i R N A の相対量を決定するために、 2 - デルタデルタ C T 法を使用して分析され得る。

【0166】

いくつかのサンプルについては、成熟 m i R N A のレベルは、 TaqMan (登録商標) m i R N A を使用して、測定される (Biosystems (登録商標) 適用 , foster City , CA) 。 TaqMan m i R N A 逆転写キットは、 m i R N A 特異性オリゴヌクレオチドを使用して、 30 分間、 42 ° で、 9.9 μ L R N A を逆転写するために使用される。 m i R N A 特異性プライマーおよび 1.33 μ L の R T 反応物が、 40 または 42 - サイクル量的 P C R の 3 倍にするのに使用され、 S D S T M ソフトウェア (バージョン 2.3 、 Biosystems (登録商標) 作製) が、定量化サイクル (C q 50

) 値を、3倍PCR反応から得られた平均値として同定するために使用される。

【0167】

スクリーニングされる、管内流体サンプルにおいて循環している標的mRNAは、表3、表4および表5にリストされる。例えば、循環miR-195は、心筋梗塞(MI)と同様、初期段階の乳癌に対するマーカーである(Long et al . PLOS ONE . 2012 , vol . 7 (12) e 50926)。血液中におけるmiR-195レベルの増加は、乳癌患者およびMIにおいて観察される。他の実施例として、高miR-26aは、減少したEZH2表現、および転移性乳癌中のタモキシフェン上の好ましい結果と関連づけられる(Jansen et al . Breast Cancer Res . Treat . 2012 , 133 : 937 - 947)。しかしながら、NAFにおける、循環miR-195またはmiR26aのレベルは、知られていない。NAFにおける循環mRNA-195およびmiR-26aが判定される。
10

【0168】

統計分析および画像的プロットが、Prism(登録商標)(GraphPad software, La Jolla CA)およびエクセルソフトウェア(Microsoft)を使用して、実行される。全てのT検定およびマン・ホイットニーU検定は、すべて両側検定である。

【0169】

当業者は、mRNAに対するスクリーニング、およびタモキシフェンのような薬剤による処置に対する個人の反応、および、mRNA表現およびシグネチャに基づいて、タモキシフェンを用いた処置の結果としてのMIのような副作用の可能性を予測する能力を含む、本明細書に開示される方法が、本発明の範囲に含まれることを容易に認識するだろう。
20

【0170】

実施例5

管内流体サンプル中のDNAメチル化シグネチャの検出

【0171】

管内流体サンプルは、乳房に装置を取着する乳房結合部材を含む収集装置を使用して、マンモグラフィを受ける女性の被処置者の両乳房の乳頭から吸引される。管内流体サンプルは、吸収紙のような、固体相サンプル収集媒体上に収集される。吸収紙上で吸収された管内流体サンプルは洗浄され、Qiagen-DNAeasy Blood & Tissue Kit(登録商標)を使用し、提供者の指示(Qiagen, Valencia, CA)に従って、洗浄液からDNAが抽出される。DNAは、メーカーの取り扱い説明書に従って、QIAamp DNA Mini Kit(登録商標)(Qiagen)を用いて抽出される。DNAは、NanoDrop ND-1000 UV-visスペクトロフォトメーター(NanoDrop(登録商標)Technologies, Wilmington, DE)を使用して定量化される。位置特異性CpGメチル化は、Illumina Infinium(登録商標)Human Methylation 27 Bead Chips based technique(Illumina)を使用して分析される。このアレイは、14,000を超える遺伝子から選択された27と、578のCpG部位を分析するために開発された。これは、単一ヌクレオチド分析において、1サンプル当たりすべての部位の照合を可能にする。ゲノムDNAは、Zymo EX DNAメチル化キット(Zymo Research, Orange, CA)を使用して、製造業者のプロトコルおよびチップ処理に従って、亜硫酸水素ナトリウムで処置され、データ解析は製造業者のプロトコルを使用して実行される。ビード配列データの品質はGenome Studio(登録商標)メチル化モジュールソフトウェアを用いて、チェックされる。
30
40

【0172】

特定の実施形態の前述の説明は、非常に十分に本発明の一般的な性質を明らかにし、それは、他者が、現在の知識を適用することによって、様々な適用のために、不適当な実験
50

作業をせず、類似の概念から離れることなく、そのような特定の実施形態を容易に変更及び／又は適合することが可能であり、したがって、そのような適応および変更は、開示された実施形態の相当物の意味および範囲内で理解されることを意図していると言うべきである。本発明は、特定の実施形態との関連性に基づいて記載されるが、多くの代替案、修飾および変化が当業者において容易に理解されることは明白である。従って、それは、添付された特許請求の範囲の精神内および広い範囲内にあるような代替案、変更および変化をすべて包含することが意図される。

【 0 1 7 3 】

本発明の精神および範囲内の様々な変化および修飾が、この記載から当業者に明白になるので、詳細説明と具体例は例示のためにのみ与えられると、理解されるべきである。当業者は同様に、本発明のある特徴は、別の実施形態の文脈において記載されるが、明瞭性のために、単一の実施形態の組合せにおいて提供されてもよいと認識するだろう。反対に、本発明の様々な特徴は、簡潔さのために、単一の実施形態において記載され、同様に別々にまたは任意の適切な副次的組合せにおいて提供されてもよい。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
	C 1 2 N 15/09 Z

(72)発明者 クウェイ , スティーブン , シー .
アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州 シアトル イーストレイク・アヴェニュー・イース
ト 2 3 4 5 スイート 2 0 1

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表2 0 0 0 - 5 1 4 5 6 4 (J P , A)
国際公開第2 0 1 3 / 0 6 3 1 5 0 (WO , A 1)
Ann. Surg. Oncol. , 2 0 1 5 年 5 月 , vol.22, suppl.3 , pp.S536-S544
J. Am. Board Fam. Med. , 2 0 0 6 年 , vol.19, no.2 , pp.161-164

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 1 2 Q 1 / 6 8 - 1 / 6 8 9 7
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S /
W P I D S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d