



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102947446 A

(43) 申请公布日 2013.02.27

(21) 申请号 201180015422.0 *A61K 31/713* (2006.01)

(22) 申请日 2011.03.29 *A61K 39/395* (2006.01)

(30) 优先权数据 *A61K 45/00* (2006.01)
2010-078772 2010.03.30 JP *A61K 48/00* (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日 *C12Q 1/02* (2006.01)
2012.09.21 *C12Q 1/68* (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据 *G01N 33/48* (2006.01)
PCT/JP2011/057866 2011.03.29 *G01N 33/53* (2006.01)

(87) PCT申请的公布数据 *G01N 33/574* (2006.01)
W02011/122634 JA 2011.10.06

(71) 申请人 日本健康科学财团
地址 日本东京

(72) 发明人 本田一文 山田哲司 野吕林太郎
广桥说雄

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201
代理人 贾玉 李志东

(51) Int. Cl.
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 15 页
序列表 10 页 附图 8 页

(54) 发明名称

肺腺癌的预后预测方法、肺腺癌的检测试剂盒以及用于治疗肺腺癌的医药组合物

(57) 摘要

本发明提供了一种肺腺癌的预后预测方法、肺腺癌的检测试剂盒以及用于治疗肺腺癌的医药组合物,所述肺腺癌的预后预测方法为通过检测在哺乳动物中的预后不良的 I 期肺腺癌来预测预后的预后预测方法,测定由所述哺乳动物得到的 I 期肺腺癌组织的细胞中的 ACTN4 的复制数。当所述基因的复制数超过 4 时,预测为来自所述哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。

1. 一种肺腺癌的预后预测方法,是通过检测在哺乳动物中的预后不良的 I 期肺腺癌来预测预后的预后预测方法,其特征在于,

包括测定由所述哺乳动物得到的 I 期肺腺癌组织的细胞中的 α -辅肌动蛋白-4 基因 (ACTN4) 的复制数的步骤而成,

当所述基因的复制数超过 4 时,预测来自所述哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。

2. 根据权利要求 1 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于,所述基因的复制数的测定是通过对基因组上的该基因使用特异性的探针的 FISH 法来进行的。

3. 根据权利要求 2 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于,所述特异性探针由人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的核苷酸序列构成。

4. 一种肺腺癌的检测试剂盒,其为用于检测在哺乳动物中的预后不良的 I 期肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,含有能够测定细胞中的 ACTN4 基因的复制数的试剂而成。

5. 根据权利要求 4 所述的肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂对基因组上的所述基因为特异性的探针。

6. 根据权利要求 5 所述的肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,所述特异性探针由人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的核苷酸序列构成。

7. 一种肺腺癌的预后预测方法,是通过检测在哺乳动物中的预后不良的 I 期肺腺癌来预测预后的预后预测方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤 (a) 在由所述哺乳动物而得到的 I 期肺腺癌的组织或者细胞中,测定 ACTN4 基因表达量;以及

步骤 (b) 将步骤 (a) 得到的表达量与对应的正常组织或者细胞中的 ACTN4 基因表达量相比较,

相对于所述正常组织或者细胞,当所述 I 期肺腺癌的组织或者细胞中的所述基因表达增强时,预测来自所述哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。

8. 根据权利要求 7 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于,在所述步骤 (a) 中,检测所述组织或者细胞内的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质。

9. 根据权利要求 8 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质含有以序列号 2 表示的氨基酸序列。

10. 根据权利要求 8 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的检测是通过使用特异性抗体的免疫组织化学染色来进行的。

11. 根据权利要求 7 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于,在所述步骤 (a) 中,检测所述组织或者细胞内的 α -辅肌动蛋白-4 的 mRNA。

12. 根据权利要求 11 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于, α -辅肌动蛋白-4 的 mRNA 含有以序列号 1 表示的核苷酸序列(只是,序列中的 t 变换成 u)。

13. 根据权利要求 7 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于,进一步包括以下步骤:

步骤 (c) 测定由所述哺乳动物而得到的血清中的癌胚抗原 (CEA) 浓度;以及

步骤 (d) 将步骤 (c) 中得到的浓度与正常的血清中的癌胚抗原 (CEA) 的浓度相比较,

相对于所述正常的组织或者细胞,所述 I 期肺腺癌的组织或者细胞中的所述基因表达

增强,且相对于所述正常的血清由所述哺乳动物而得到的血清中的癌胚抗原(CEA)浓度为有意义高时,则预测来自所述哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。

14. 根据权利要求 13 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于,当由所述步骤(c)得到的浓度超过 5.0ng/mL 时,判断相对于所述正常的血清为有意义地高。

15. 根据权利要求 7 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于,进一步包括以下的步骤:

步骤(e)测定由所述哺乳动物而得到的 I 期肺腺癌组织的细胞中的 ACTN4 基因的复制数的步骤,

相对于所述正常的组织或者细胞,所述 I 期肺腺癌的组织或者细胞中所述基因的表达增强,且所述基因的复制数超过 4 时,则预测来自所述哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。

16. 根据权利要求 15 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于,所述基因的复制数的测定是通过对基因组上的该基因使用特异性探针的 FISH 法来进行的。

17. 根据权利要求 16 所述的肺腺癌的预后预测方法,其特征在于,所述特异性探针由人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的核苷酸序列构成。

18. 一种肺腺癌的检测试剂盒,是用于检测在哺乳动物中的预后不良的 I 期肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,含有能够测定组织或者细胞内的 ACTN4 基因表达量的试剂。

19. 根据权利要求 18 所述的肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂为用于定量所述组织或者细胞内的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的试剂。

20. 根据权利要求 19 所述的肺腺癌的检测试剂盒,其中,用于定量 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的试剂为特异性地结合在 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的抗体。

21. 根据权利要求 18 所述的肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂为用于定量所述组织或者细胞内的 α -辅肌动蛋白-4 的 mRNA 的试剂。

22. 根据权利要求 18 所述的肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,进一步含有能测定血清中的癌胚抗原(CEA)浓度的试剂。

23. 根据权利要求 18 所述的肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,进一步含有能测定细胞中的 ACTN4 基因的复制数的试剂。

24. 根据权利要求 23 所述的肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂对基因组上的所述基因为特异性的探针。

25. 根据权利要求 24 所述的肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,所述特异性探针由人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的核苷酸序列构成。

26. 一种用于治疗肺腺癌的医药组合物,其特征在于,含有 α -辅肌动蛋白-4 抑制剂和医药上允许的载体而成。

27. 根据权利要求 26 所述的用于治疗肺腺癌的医药组合物,其特征在于, α -辅肌动蛋白-4 抑制剂为小分子。

28. 根据权利要求 26 所述的用于治疗肺腺癌的医药组合物,其特征在于, α -辅肌动蛋白-4 抑制剂为特异性地结合在 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质上的抗体。

29. 根据权利要求 26 所述的用于治疗肺腺癌的医药组合物,其特征在于, α -辅肌动蛋白-4 抑制剂为特异性地抑制 ACTN4 基因表达的反义核酸分子。

30. 根据权利要求 26 所述的用于治疗肺腺癌的医药组合物,其特征在于, α -辅肌动蛋白-4 抑制剂为特异性地抑制 ACTN4 基因表达的 siRNA 核酸分子。

31. 根据权利要求 26 所述的用于治疗肺腺癌的医药组合物,其特征在于, α -辅肌动蛋白-4 抑制剂为对特异性地抑制 ACTN4 基因表达的 siRNA 核酸分子进行表达的媒介物。

32. 一种肺腺癌的检测试剂盒,是用于测定人体细胞中的 ACTN4 基因的复制数的检测试剂盒,其特征在于,含有可利用于 FISH 法中的、对基因组上的所述基因具有特异性的探针而成,该特异性探针由人体第 19 号染色体上第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的核苷酸序列构成。

肺腺癌的预后预测方法、肺腺癌的检测试剂盒以及用于治疗肺腺癌的医药组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肺腺癌的预后预测方法、肺腺癌的检测试剂盒以及用于治疗肺腺癌的医药组合物。

背景技术

[0002] 肺腺癌的临床病期 I 期为没有发现向原发性以外的部位扩散的早期病变。在现行的分类中, I 期肺腺癌进一步分为 IA 期(肿瘤直径不到 3cm)和 IB 期(肿瘤直径为 3cm 以上)。在非专利文献 1 中报告有, 肺腺癌的临床病期 I 期的术后五年生存率为 85%, 术后化学治疗法(替加氟尿嘧啶(UFT)二年内服)对 I 期中的预后的改善作有意义地贡献。现在, 相对于 I 期肺腺癌症病例虽然推荐进行术后化学治疗法, 但是并不是 I 期肺腺癌的全体都可以通过术后化学治疗法获益。因此, 可以认为如果能够进行 I 期的术后预后预测, 对预后良好的患者群就可以减轻进行不必要的化学治疗法的风险。

[0003] 在这里, α -辅肌动蛋白-4 是一种作为参与癌细胞的浸润、扩散的肌动蛋白结合蛋白而被分离的分子(参照非专利文献 2)。另外, 也报告有 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达参与细胞运动和浸润性(参照非专利文献 3)。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献 1 :Kato H. et al., N. Engl. J. Med., 2004 Apr 22 ;350(17) :1713-21

[0006] 非专利文献 2 :Honda et al., J Cell Biol. 1998 Mar 23 ;140(6) :1383-93

[0007] 非专利文献 3 :Honda et al., Gastroenterology. 2005 Jan ;128(1) :51-62。

发明内容

[0008] 发明所要解决的问题

[0009] 本发明者们发现 :I 期肺腺癌组织中的 α -辅肌动蛋白-4(ACTN4) 蛋白质表达增强的病例, 与并非如此的病例相比, 具有统计学上的有意义差且总生存期(OS)短。另外, 本发明者们发现 :I 期肺腺癌组织的细胞中的 α -辅肌动蛋白-4 基因(ACTN4)的基因组上的复制数增加了的群, 与非增加群相比 OS 短。进一步, 本发明者们发现 :通过 ACTN4 基因的基因组的复制数和 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达水平的组合, 与基因复制数或者蛋白质表达各自的单独解析相比, 可以精密地预测 I 期肺腺癌的 OS。本发明是基于这些见解而完成的发明。

[0010] 因此, 本发明的目的在于提供一种肺腺癌的预后预测方法、肺腺癌的检测试剂盒以及用于肺腺癌治疗的医药组合物。

[0011] 解决问题的手段

[0012] 根据本发明第一方式的肺腺癌的预后预测方法,

[0013] 是通过检测在哺乳动物中的预后不良的 I 期肺腺癌来预测预后的预后预测方法, 其特征在于,

[0014] 包括测定由所述哺乳动物得到的 I 期肺腺癌组织的细胞中的 α -辅肌动蛋白-4 基因 (ACTN4) 的复制数的步骤,

[0015] 当所述基因的复制数超过 4 时,预测来自所述哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。

[0016] 根据本发明第二方式的肺腺癌的检测试剂盒,

[0017] 是用于检测在哺乳动物中的预后不良的 I 期肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,含有能够测定细胞中的 ACTN4 基因的复制数的试剂而成。

[0018] 根据本发明第三方式的肺腺癌的预后预测方法,

[0019] 是通过检测在哺乳动物中的预后不良的 I 期肺腺癌来预测预后的预后预测方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0020] 步骤 (a) 在由所述哺乳动物而得到的 I 期肺腺癌的组织或者细胞中,测定 ACTN4 基因表达量;以及

[0021] 步骤 (b) 将步骤 (a) 得到的表达量与对应的正常组织或者细胞中的 ACTN4 基因表达量相比较,

[0022] 相对于所述正常组织或者细胞,当所述 I 期肺腺癌的组织或者细胞中的所述基因表达增强时,预测来自所述哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。

[0023] 根据本发明第四方式的肺腺癌的检测试剂盒,

[0024] 是用于检测在哺乳动物中的预后不良的 I 期肺腺癌的检测试剂盒,其特征在于,含有能够测定组织或者细胞内的 ACTN4 基因表达量的试剂。

[0025] 根据本发明第五方式的用于治疗肺腺癌的医药组合物,其特征在于,

[0026] 含有 α -辅肌动蛋白-4 抑制剂和医药上允许的载体而成。

[0027] 根据本发明第六方式的肺腺癌的检测试剂盒,

[0028] 是用于测定人体细胞中的 ACTN4 基因的复制数的检测试剂盒,其特征在于,含有可利用于 FISH 法中的、对基因组上的所述基因具有特异性的探针而成,该特异性探针由人体第 19 号染色体上第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的核苷酸序列构成。

[0029] 发明效果

[0030] 根据本发明,可以预测 I 期肺腺癌的预后,选择适宜的治疗方法。例如,在本发明中,当判断该 I 期肺腺癌为预后不良时,推荐在其摘出手术后进行使用了替加氟·尿嘧啶混合剂、顺铂等药剂的化学治疗。而另一方面,在本发明中判断该 I 期肺腺癌为非预后不良时,可以避开不必要的化学治疗。进一步,根据本发明提供治疗 I 期肺腺癌、例如预后不良的 I 期肺腺癌的方法。

附图说明

[0031] 图 1 为显示对于在肺腺癌组织 (I 期和 IA 期) (队列 1) 中 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达亢进的阳性病例和阴性病例的 2 群根据 Kaplan-Meier 法而绘制的生存曲线图。

[0032] 图 2 为显示对于在肺腺癌组织 (I 期和 IA 期) (队列 2) 中的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达亢进的阳性病例和阴性病例的 2 群根据 Kaplan-Meier 法而绘制的生存曲线图。

[0033] 图 3 为,将 I 期肺腺癌患者分为接下来的 3 群:血清 CEA5ng/mL 以下且辅肌动蛋白-4 阴性的群;血清 CEA 超过 5ng/mL 或者 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质阳性的群;以及血清

CEA 超过 5ng/mL 且 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质阳性的群,显示对于各群根据 Kaplan-Meier 法而绘制的生存曲线图。

[0034] 图 4 为将 I 期肺腺癌患者分为接下来的 3 群:ACTN4 扩增(-)且 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达阴性的群;ACTN4 基因扩增(-)且 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达阳性的群;以及 ACTN4 基因扩增(+)且 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达阳性的群,显示在各自的群中的根据 Kaplan-Meier 法而绘制的生存曲线图。

[0035] 图 5 为显示因免疫组织化学染色的表达状态的肺腺癌细胞的显微镜照片。

[0036] 图 6 为显示对于在肺腺癌组织(I ~ III 期和 I 期)(队列 1 和 2)中的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达亢进的阳性病例和阴性病例的 2 群根据 Kaplan-Meier 法而绘制的生存曲线图。

[0037] 图 7 为通过荧光原位杂交(FISH)法标识的肺腺癌细胞的显微镜照片。

[0038] 图 8 为,显示对于在肺腺癌组织(I 期)中的组织微阵列的阳性病例和阴性病例的 2 群根据 Kaplan-Meier 法而绘制的生存曲线图。

[0039] 图 9 为显示对于在肺腺癌组织(I 期和 IA 期)(队列 1 和 2)中的、 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达亢进、以及组织微阵列的阳性病例和阴性病例的群根据 Kaplan-Meier 法而绘制的生存曲线图。

具体实施方式

[0040] 成为本发明对象的癌是 I 期肺腺癌。肺癌大致分为非小细胞癌和小细胞癌。肺腺癌分类在非小细胞癌中。I 期肺腺癌是肺腺癌中的最早期的癌,为还没有向淋巴结或其它的内脏器官转移的肺腺癌。根据由本发明的方法,可以判断哺乳动物所患的 I 期肺腺癌是否为预后不良。另外,本发明中的治疗对象为 I 期肺腺癌,优选为预后不良的 I 期肺腺癌。在其它的优选实施方式中,本发明中的治疗对象为在其癌细胞中发现了 ACTN4 基因的扩增或表达增强的 I 期肺腺癌,特别是根据本发明的预后预测方法而被判断为预后不良的 I 期肺腺癌。

[0041] 在本说明书中,「预后不良」的用语意味着,例如,在癌的切除 5 年后中的生存率不到 90%,优选为不到 85%,更优选为不到 70%,最优选为不到 60%。另外,本说明书中「预后不良」是指,癌的切除后需要化学治疗法。因此,根据本发明的其它方式,本发明的方法为检测在哺乳动物中需要术后的化学治疗法的 I 期肺腺癌的方法,或者判断 I 期肺腺癌的患者是否需要术后的化学治疗法的方法。

[0042] 在本发明中,作为预测(诊断)的标的物、成为治疗的标的的「 α -辅肌动蛋白-4」或者「ACTN4」可以是来自成为诊断或者治疗被检物的哺乳动物的 α -辅肌动蛋白-4(ACTN4 基因产物)。ACTN4 基因的序列以及由其编码的氨基酸序列为在本领域公知的,可以举出例如,序列号 1 以及序列号 2(Ensembl ID:ENSG00000130402 以及 ENST00000252699)所示的来自人体的 ACTN4 序列。另外,来自人体的 ACTN4 序列也登录在 NCBI 中(National Center for Biotechnology Information)登录号:NM_004924 和 NP_004915。另外,ACTN4 基因的基因座也为本领域公知的,例如,人体的 ACTN4 基因是位于第 19 染色体的第 43,830,167 ~ 43,913,010 碱基。对于人体以外的哺乳动物,可以利用与来自人体的 ACTN4 对应的同样的基因以及蛋白质。

[0043] 在本说明书中, ACTN4 基因的扩增(基因组上的复制数增加)以及作为其转录产物的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达增强被证实为 I 期肺腺癌的预后不良因素。进一步,在癌细胞内的 ACTN4 基因的扩增与蛋白质的表达增强的组合,与各自单独的预后预测 I 期肺腺癌的预后相比被证实为能更严密地预测预后的预后不良因素。因此,通过调查由成为被检物的哺乳动物(人体或者除了人体以外的哺乳动物)而得到的 I 期肺腺癌组织的细胞中的 ACTN4 基因的复制数,能够预测(诊断)该 I 期肺腺癌是否为预后不良。另外,通过调查由所述哺乳动物而得到的 I 期肺腺癌的组织或者细胞中的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达增强,能够预测(诊断)该 I 期肺腺癌是否为预后不良。

[0044] 成为诊断对象的 I 期肺腺癌的组织或者细胞可以是来自患者的由外科手术而被摘出的手术样品,也可以是由内视镜等而得到的生检样品。

[0045] 在根据本发明的第一方式的方法中,通过调查 I 期肺腺癌组织的细胞中的 ACTN4 基因的复制数,来判断该 I 期肺腺癌是否为预后不良,由此来检测预后不良的 I 期肺腺癌。该方法包括测定 I 期肺腺癌组织的细胞中的 ACTN4 基因复制数的步骤,在该复制数超过 4 时,判断(诊断)作为被检物的哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良。

[0046] 在测定 ACTN4 基因复制数时,可以使用在本领域公知的标准的方法。关于 ACTN4 基因的序列以及由其编码氨基酸序列如上述所述,只要是本领域的技术人员就可以通过参照这些序列,使用标准的方法来测定 ACTN4 基因的复制数。作为基因复制数的测定方法,特别是可以举出基于杂交和扩增的试验。

[0047] 作为基于杂交的试验有印迹杂交法。在该方法中,使基因组 DNA 片断化,用电泳进行分离,转录到膜上,使其杂交在 ACTN4 的特异性探针上。通过比较来自该特异性探针的杂交信号的强度和没有复制数增加的相同的基因组区域进行杂交的来自对照探针的信号强度,得到相对的 ACTN4 基因的复制数。

[0048] 根据本发明优选的实施方式,ACTN4 基因复制数的测定是通过对基因组上的该基因使用特异性探针的荧光原位杂交(FISH)法(参照 Angerer, Meth. Enzymol. 152, 649, 1987)来进行的。一般,原味杂交主要是通过以下来进行的,即:使被分析的组织或者细胞固定化,将该组织或者细胞进行预杂交处理,使相对于该组织或者细胞中的核酸的特异性探针进行杂交,进行清洗以除去没有结合的特异性探针,检测杂交的特异性探针。在这样的用途中使用的特异性探针由荧光指示器进行标识。通过计算在 1 个细胞核内的荧光数,能够得到在该细胞中的 ACTN4 基因的复制数。

[0049] 根据本发明的特别优选的实施方式,在 FISH 法中使用的所述特异性探针由人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的核苷酸序列构成。在这里,由该区域的核苷酸序列构成的探针在测定基因组上的 ACTN4 基因的复制数上特别有效,是能够以高感度正确的测定的探针。因此,根据本发明的其它方式,提供一种用于测定人体细胞中的 α -辅肌动蛋白-4 基因复制数的试剂盒,该试剂盒含有可利用于 FISH 法的、在基因组上的所述基因中的特异性的探针,该特异性探针由人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的核苷酸序列构成。该特异性探针也可以由一条核苷酸分子构成,也可以为覆盖人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的 2 条以上(优选为 2 条)的核苷酸分子的组合。

[0050] 作为基于杂交的其它的试验也可以利用比较基因组杂交(CGH)法。就 CGH 法而言,

从被分析的被检验细胞和成为对照的正常细胞中提取各自的 DNA, 以不同颜色的荧光染料标识各自的 DNA, 调制由这些等量标识 DNA 构成的混合溶液, 将该混合溶液保存在 37°C、暗处 2 ~ 3 天。由此, 相对于染色体的全部部位, 在被检验 DNA 和对照 DNA 之间, 产生竞争性的结合。该结果为, 在被检验 DNA 中如果存在基因复制数的增加, 载玻片的与该基因相对应的位置上, 强烈地观察到标识了被检验 DNA 的颜色的荧光, 相反的, 在被检验 DNA 中如果存在基因复制数的减少, 载玻片上的与该基因相对应的位置上, 强烈地观察到标识了对照 DNA 的颜色的荧光。

[0051] 作为基于扩增的试验有定量的核酸扩增法。在该方法中, 由于基因组中的 ACTN4 基因成为扩增反应的模板, 因此能够得到与该复制数相应量的扩增产物。作为具体的核酸扩增法, 可以举出定量的 PCR 法, 例如, 实时定量 PCR 法等。

[0052] 在由本发明第二方式的方法中, 通过调查 I 期肺腺癌的组织或者细胞中的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达增强, 来判断该 I 期肺腺癌是否为预后不良, 由此, 检测预后不良的 I 期肺腺癌。该方法包括测定所述 I 期肺腺癌的组织或者细胞中的 ACTN4 基因的表达量的步骤, 其表达量比对应的正常的组织或者细胞的表达量多时, 即、 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达增强时, 判断 (诊断) 作为被检物的哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良。

[0053] 就 ACTN4 基因表达量的测定而言, 可以使用本领域公知的标准的方法。一般基因表达量典型的是将 mRNA 量或者蛋白质量作为标的物来测定。在本发明中也可以同样将 ACTN4 的 mRNA 量或者蛋白质量作为标的物来测定 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达量。对于 ACTN4 基因的序列以及由其编码的氨基酸序列如上所述, 只要是本领域的技术人员就可以通过参照这些序列, 使用标准的方法来测定 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达量。

[0054] 根据本发明的优选实施方式, 测定基因表达量的步骤包括测定所述组织或者细胞内的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质量。 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质量可以通过本领域公知的方法来进行测定。例如可以举出: 以序列号 2 所表示的序列作为 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的氨基酸序列, 只要是本领域的技术人员通过参照该序列, 就可以适宜地测定同蛋白质的量。

[0055] α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的量例如可以通过使用与同蛋白质相结合的抗体来适宜地进行测定。像这样的抗体优选为对 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质有特异性的抗体。抗体可以是多克隆抗体, 也可以是单克隆抗体。 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的定量优选通过使用这样的抗体的免疫组织化学染色而进行。或者也可以使用将从所述组织或者细胞而得到的蛋白质提取物进行电泳后使用抗体将其进行定量的免疫印迹法。

[0056] 根据本发明的其它的优选实施方式, 测定基因表达量的步骤包括将所述组织或者细胞内的 ACTN4 的 mRNA 进行定量而成。例如可以举出含有以序列号 1 表示的核苷酸序列 (只是, 序列中的 t 变换成 u) 作为 ACTN4 的 mRNA, 只要是本领域的技术人员通过参照该序列, 就可以适宜地定量 ACTN4 的 mRNA。作为用于定量的具体的方法, 例如可以举出, 在通过使用特异性的引物的 RT-PCR 而进行的扩增后进行电泳的方法等。

[0057] 成为比较对照的正常的组织或者细胞可以是来自成为被检物的同一个体的正常的组织或者细胞, 也可以是来自不同的个体的正常的组织或者细胞。另外, 就来自不同的多个个体的正常的组织或者细胞而言, 可以测定 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达量, 将其平均值作为比较对照。进一步, 由预先测定的多个正常的组织或者细胞中的表达量的数据出发, 预先设定平均值 + 标准偏差等合理值, 当被检验组织或者细胞的表达量比该合理值高

时,可以判断为有 ACTN4 基因的表达增强。作为“对应的正常的组织或者细胞”可以举出正常的肺组织或者细胞。

[0058] 在本说明书中,与 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达增强一起确认出该被检验哺乳动物的血清 CEA 浓度上升时,证实具有更显著的有意义差从而可以判断该 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。因此,根据本发明的优选实施方式,由本发明的第二方式的诊断法进一步包括以下步骤而成:步骤(c)在由所述哺乳动物而得到的血清中,测定癌胚抗原(CEA)的浓度;以及步骤(D)将在步骤(c)中得到的浓度与正常的血清中的癌胚抗原(CEA)的浓度进行比较步骤。在该诊断法中,相对于所述正常的组织或者细胞,所述 I 期肺腺癌的组织或者细胞中的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达增强,且相对于所述正常的血清,从所述哺乳动物得到的血清中的癌胚抗原(CEA)浓度为有意义地高时,表示来自所述哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。

[0059] 就测定 CEA 的血清浓度的方法而言,可以使用本领域公知的标准的方法。CEA 为众所周知的肿瘤标记,作为该血清浓度的测定方法,已知有 ELISA 法或 CLEIA 法等各种各样的方法,而用于实施这样的各自方法的试剂盒在市场上也有售。成为比较对照的正常的血清可以是来自成为被检物的同一个体的正常的血清,也可以是来自不同个体的正常的血清。另外,对于来自不同的多个个体的正常的血清,可以测定 CEA 的浓度,将其平均值作为比较对照。进一步,由预先测定的多个正常的血清中的 CEA 浓度的数据出发,预先设定平均值+标准偏差等合理值,当被检验血清的 CEA 浓度比该合理值高时,可以判断为有 CEA 血清浓度的上升。例如,就人体血清而言,CEA 浓度超过 5.0ng/mL 时,可以判断相对于正常的血清为有意义地高。

[0060] 根据本发明的优选实施方式,根据本发明的第二方式的方法是组合本发明的第一方式的方法来进行的。即、在该实施方式中,本发明的由第二方式的方法进一步包括以下的步骤而成:(e)测定从所述哺乳动物而得到的 I 期肺腺癌组织的细胞中的 ACTN4 基因的基因组上的复制数的步骤。在该方法中,相对于所述正常的组织或者细胞,所述 I 期肺腺癌的组织或者细胞中的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达增强、且 ACTN4 基因的复制数超过 4 时,表示来自所述哺乳动物的 I 期肺腺癌为预后不良的 I 期肺腺癌。

[0061] 为了实施以上这样的根据本发明的检测/诊断法,可以将必要的试剂汇集在一起来制成试剂盒。由此,根据本发明提供一种用于在哺乳动物中检测预后不良的 I 期肺腺癌的试剂盒,该试剂盒含有可以测定细胞中的 ACTN4 的基因组上的复制数的试剂。根据要实施的具体的方法来选择这样的试剂,优选为在 FISH 法中可使用的、对于基因组上的该基因为特异性的探针。所述特异性探针优选由人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb~第 44.02Mb 的区域的核苷酸序列构成。

[0062] 根据本发明的其它方式的试剂盒为用于检测哺乳动物中预后不良的 I 期肺腺癌的试剂盒,含有能测定组织或者细胞内的 ACTN4 基因或 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达量的试剂。作为像这样的试剂可以适宜地使用用于定量所述组织或者细胞内的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的试剂,例如,特异性结合 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的抗体。或者像这样的试剂也可以为用于定量所述组织或者细胞内的 ACTN4 的 mRNA 的试剂,例如可以是,将 ACTN4 的 mRNA 作为模板的在 RT-PCR 中使用的特异性引物以及 RT-PCR 用的其它试剂。根据本发明的优选实施方式,该试剂盒为进一步含有能测定血清中的癌胚抗原(CEA)浓度的试剂的试

剂盒。根据本发明的其它优选实施方式,该试剂盒为进一步含有能测定细胞中的 ACTN4 基因的复制数的试剂的试剂盒,像这样的试剂优选为能在 FISH 法使用的、对基因组上的该基因为特异性的探针的试剂。所述特异性探针优选由人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的核苷酸序列构成。

[0063] 根据本发明的试剂盒,根据要实施的具体方法,还可以进一步含有其它试剂类、反应容器、说明书等。

[0064] 根据本发明提供一种含有向被检验者投入有效的治疗量的 ACTN4 抑制剂而成的、治疗或者预防 I 期肺腺癌的方法。进一步根据本发明提供一种在制造用于治疗 I 期肺腺癌的药物中 ACTN4 抑制剂的使用。

[0065] 成为治疗或者预防对象的被检验者优选是哺乳动物,例如为人体或者非人体哺乳动物。

[0066] 根据本发明的优选实施方式,ACTN4 抑制剂为药物等小分子。像这样的小分子可以通过将 ACTN4 的阻害活性作为标的物,根据本领域公知的方法进行筛选而得到。

[0067] 根据本发明的优选实施方式,ACTN4 抑制剂为特异性地结合在 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质上的抗体。抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,优选是单克隆抗体。

[0068] 根据本发明的优选实施方式,ACTN4 抑制剂为特异性地抑制 ACTN4 基因表达的反义核酸分子。反义法是用于抑制特定的基因表达的公知技术。在一个具体例中,所述反义核酸分子为基于 ACTN4 基因的 5' 编码区域的序列而设计成的大约 10 ~ 40 碱基长的反义 RNA。在其它的具体例中,所述反义核酸分子设计与参与 ACTN4 基因的转录区域的序列为互补的 DNA 寡核苷酸。像这样的反义核酸分子可以基于序列号 1 所示的 ACTN4 基因的序列而容易地进行设计。

[0069] 根据本发明的优选实施方式,ACTN4 抑制剂为特异性地抑制 ACTN4 基因表达的 siRNA 核酸分子。在本说明书中,“siRNA 核酸分子”并不仅仅是 siRNA 其本身,也意味着能在标的细胞中导入 siRNA 的更长的两条链 RNA 分子。siRNA 核酸分子为通过 RNA 干扰 (RNAi) 能抑制特定基因表达的公知的工具(参照 Elbashir, S. M. et al., Nature 411, 494-498, 2001)。siRNA 典型的为,含有与标的基因的 mRNA 上特异性序列相同的 19 ~ 21 碱基对的核苷酸序列。上述两条链 RNA 分子典型的为含有与标的基因 mRNA 上特异性序列相同的更长的核苷酸序列。像这样的 siRNA 核酸分子可以基于序列号 1 所示的 ACTN4 基因的序列而容易地进行设计。进一步,所述 siRNA 核酸分子可以通过传达到细胞中的适宜的专用载体来使其表达。因此,ACTN4 抑制剂可以是特异性抑制 ACTN4 基因表达的使 siRNA 核酸分子进行表达的载体。像这样的载体可以通过本领域公知的标准程序而容易地构建(参照 Bass, B. L., Cell 101, 235-238, 2000; Tavernarakis, N. et al., Nat. Genet. 24, 180-183, 2000; Malagon, F. et al., Mol. Gen. Genet. 259, 639-644, 1998; Parrish, S. et al., Mol. Cell 6, 1077-1087, 2000)。

[0070] ACTN4 抑制剂可以通过局部、静脉内、皮下、筋肉内、经口、直肠、粘膜等适宜的途径来给药。另外,其治疗上的有效量依照症状的病势危急程度、被检验者的年龄、使用的具体药物的有效性、给药途径、给药频度等,由医生或者兽医来适宜决定。一般,所述治疗上有效量每一天为约 0.001 ~ 约 1000mg/ 体重 kg, 优选大约 0.01 ~ 大约 10mg/ 体重 kg, 更优选为大约 0.01 ~ 大约 1mg/ 体重 kg。

[0071] ACTN4 抑制剂可以与医药上允许的载体一起给药。因此,根据本发明,提供一种含有 ACTN4 抑制剂和医药上允许的载体的、用于治疗 I 期肺腺癌治疗的医药组合物。

[0072] 医药上允许的载体,例如,媒介物、赋形剂、稀释剂等由本领域的技术人员按照给药途径、所使用的具体药物的性质等来适宜选择。

[0073] 进一步,根据本发明提供一种治疗 I 期肺腺癌的方法,包括以下步骤而成,即:通过根据本发明的第一方式的方法或者根据第二方式的方法或者这些方法的组合,对判断为预后不良的 I 期肺腺癌的患者给药有效治疗量的化学治疗法制剂。作为该化学治疗法制剂可以使用上述 ACTN4 抑制剂,也可以使用替加氟、5-氟尿嘧啶混合剂或顺铂等其它的抗癌剂。

[0074] 实施例

[0075] 以下、通过实施例更具体地说明本发明,但本发明并不限于这些。

[0076] 实施例 1 :I 期肺腺癌和 α -辅肌动蛋白-4 基因的表达亢进的关联

[0077] 作为样品使用被甲醛固定石蜡包埋的来自 1997 年 12 月到 2001 年 3 月在国立癌中心中央医院(日本)实施了 I 期肺腺癌切除手术的 372 名患者的切除样体(以下称为“队列 1”)。在这些样品中,通过免疫组织化学分析来讨论 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达。在免疫组织化学分析中所使用的一次抗体是在国立癌中心研究所(日本)所制造的抗人体 α -辅肌动蛋白-4 兔多克隆抗体。免疫染色通过使用生物素·亲和素复合体(Avidin-Biotin Complex)的 ABC 法来进行。

[0078] 作为 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的评价,与同一切片上的血管内皮相比,将癌部的表达为亢进,且其亢进部分的面积占肿瘤整体面积的 30% 以上的样品定义为阳性例,其以外的样品定义为阴性例。

[0079] 接下来,通过 Cox 比例风险模型的单变量解析和多变量解析来分析关于 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的上述分类、以及各种临床病理学上的因素相对于 I 期肺腺癌患者生存期间的危险率。作为变量除了 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达(阳性/阴性)之外,使用性别(男性/女性)、年龄(65 以上/不到 65)、吸烟(无/有)、阶段(IA/IB)、血清 CEA(超过 5ng/mL/5ng/mL 以下)、淋巴管侵袭(阳性/阴性)以及静脉侵袭(阳性/阴性)。以下表 1 显示该结果。

[0080] 表 1 :使用 Cox 比例风险模型的 I 期肺腺癌的临床病理学上的预后因素解析(队列 1 : α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达解析)

[0081]

变数	N	单变量解析			多变量解析		
		风险比	95%可靠区间	P	风险比	95%可靠区间	P
性别(男性/女性)	182/190	2.1011	1.2388-3.5634	0.00588	1.581	0.8484-2.9462	0.149198
年龄(65 以上/不到 65)	200/172	2.5009	1.4286-4.3783	0.00134	2.3074	1.3012-4.0916	0.00422
吸烟(无/有)	165/207	2.3957	1.4203-4.0410	0.00106	1.7603	0.9562-3.2403	0.069338
阶段(IA/IB)	295/77	2.6628	1.5773-4.4953	0.00025	1.9322	1.1150-3.3483	0.01887
血清 CEA(> 5ng/mL/ 5ng/mL ≤)	62/310	3.0656	1.8055-5.2049	3.4E-05	2.1566	1.2491-3.7237	0.00581
淋巴管侵袭(阳性/阴性)	199/173	2.8852	1.7313-4.8082	4.8E-05	2.5643	1.5066-4.3646	0.00052
静脉侵袭(阳性/阴性)	106/263	2.5171	1.5221-4.1624	0.00032	1.4718	0.8629-2.5105	0.156032
α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达(阳性/阴性)	199/173	2.1146	1.2196-3.6664	0.00765	2.1153	1.1955-3.7425	0.01007

[0082] 根据表 1 左侧显示的单变量解析结果表明,上述所有的项目显示都能成为预后不良的危险因素。

[0083] 进一步,表 1 的右侧示出了通过多变量解析而分析的结果。根据该结果表示,年龄、阶段、血清 CEA、淋巴管侵袭以及 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达为统计学上的有意义差,表示这些为预后不良的危险因素。即表示在 I 期肺腺癌细胞中的 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达强度与本次调查的其它临床病理学上的因素为独立的预后因素。

[0084] 接下来,对于如上述这样进行分类的 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例和阴性病例的 2 群,通过 Kaplan-Meier 法制成生存曲线,通过 Log-rank 鉴定进行讨论。图 1 示出得到的生存曲线。图 1 的显示栏 A 示出 I 期全体的生存曲线。对于 I 期全体的阴性病例的 5 年生存率为 92.7%,而阳性病例的 5 年生存率为 82.1%。图 1 的显示栏 B 显示仅 IA 期的生存曲线。对于 IA 期的阴性病例的 5 年生存率为 94.4%,而阳性病例的 5 年生存率为 86.5%。另外,可知在显示栏 A 和 B 的双方中,阴性病例和阳性病例的生存率差在术后 5 年以后变得更大。因此,根据图 1,可知与 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阴性病例相比,阳性病例具有统计学上的有意义差,预后为不良。

[0085] 进一步,作为样品使用被甲醛固定石蜡包埋的来自 2001 年 3 月到 2003 年 1 月在国立癌中心中央医院(日本)实施了 I 期肺腺癌切除手术的 214 名患者的切除标本,进行与上述同样的讨论(以下称为“队列 2”)。结果示于表 2 和图 2。

[0086] 表 2:使用 Cox 比例风险模型的 I 期肺腺癌的临床病理学上的预后因素解析(队列 2:α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达解析)

[0087]

变量	N	单变量解析			多变量解析		
		风险比	95%可靠区间	P	风险比	95%可靠区间	P
性别(男性/女性)	100/114	0.8792	0.3990-1.9376	0.749496			
年龄(65 以上/不到 65)	115/99	1.8251	0.8177-4.0736	0.14192			
吸烟(无/有)	120/94	0.7797	0.3437-1.7690	0.55164			
阶段(IA/IB)	162/52	2.1994	0.9871-4.9004	0.053825			
血清 CEA(>5ng/mL/ ≤5ng/mL)	36/178	4.2755	1.9095-9.5731	0.00041	3.4228	1.4977-7.8222	0.00325
淋巴管侵袭(阳性/阴性)	57/157	3.8748	1.7566-8.5475	0.00079	1.9355	0.7042-5.3194	0.200464
静脉侵袭(阳性/阴性)	63/151	3.2821	1.4871-7.2441	0.00326	1.7957	0.6536-4.9336	0.256259
α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达(阳性/阴性)	87/127	4.4238	1.7654-11.0849	0.00151	3.5239	1.3904-8.9321	0.00794

[0088] 根据表 2 左侧显示的单变量解析的结果表示,血清 CEA、淋巴管侵袭、静脉侵袭以及 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达能成为预后不良的危险因素。

[0089] 进一步,在表 2 的右侧示出了仅对通过单变量解析而显示能成为预后不良因素的血清 CEA、淋巴管侵袭、静脉侵袭以及 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达,通过多变量解析来进行分析的结果。根据该结果表示,血清 CEA 和 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达为统计学上的有意义差,表示这些为预后不良的危险因素。即、I 期肺腺癌细胞中的 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达强度显示为与本次调查的其它临床病理学的因素为独立的预后因素。

[0090] 图 2 的显示栏 A 显示 I 期全体的生存曲线。对于 I 期全体的 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质阴性病例的 5 年生存率为 95.9%,而 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质阳性病例的 5 年生存率为 87.9%。图 2 的显示栏 B 显示仅 IA 期的生存曲线。对于 IA 期的 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质阴性病例的 5 年生存率为 95.9%,而 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质阳性病例的 5 年生存率为 89.7%。另外,可知在显示栏 A 和 B 的双方中,α-辅肌动蛋白-4 蛋白质阴性病例和 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质阳性病例的生存率差在术后 5 年以后变得更大。因此,根据图 2,与 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阴性病例相比,可知 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质阳性病例具有统计学上的有意义差,预后为不良。

[0091] 实施例 2:根据 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达亢进和血清 CEA 浓度组合的 I 期肺腺癌的预后预测)

[0092] 分别对于实施例 1 记载的队列 1 以及队列 2,调查 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质的表

达亢进和血清 CEA 浓度组合与 I 期肺腺癌的预后的关联。具体为,分别将队列 1 和队列 2 分为接下来的 3 群:血清 CEA5ng/mL 以下且 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质阴性的群、血清 CEA 超过 5ng/mL 或者 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质阳性的群、以及血清超过 CEA5ng/mL 且 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质阳性的群,对各自的群通过 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,通过 Log-rank 鉴定进行讨论。

[0093] 图 3 显示所得到的生存曲线。根据图 3, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达亢进和血清 CEA 浓度的组合为更严密的预后不良的危险因素,即、可知在 I 期肺腺癌的细胞中确认出 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达亢进,且血清 CEA 浓度超过 5ng/mL 的患者,术后的预后为显著不良。

[0094] 实施例 3:I 期肺腺癌中 ACTN4 基因的基因组复制数的增加

[0095] 为了调查 ACTN4 基因的基因组上的复制数,制造相对于存在于 19 号染色体长臂上的 ACTN4 基因的特异性探针,通过 FISH(Fluorescence in Situ Hybridization) 法对 I 期肺腺癌切除标本的石蜡切片进行分析。

[0096] 对实施例 1 记载的队列 1 的石蜡切片,使用 FISH 法测定 ACTN4 基因的复制数。FISH 法使用 PathVysion DNA 探针试剂盒 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) 来进行。在杂交中使用的特异性探针为包括 ACTN4 (RP11-118P21) 基因座的含有人体第 19 号染色体上的第 43.81Mb ~ 第 44.02Mb 区域的变性的细菌人工染色体 (BAC) 探针 (红)。另外,也使用 19 号染色体旁着丝粒控制克隆 (绿)。这些探针使用 SpectrimOrange (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) 来进行标识化。杂交在 37°C 进行 14 ~ 18 小时。按照赫赛汀测试的方法,测量 20 细胞核中的红和绿的荧光信号,将红信号数除以绿信号数而得的数值超过 2 的样品定义为 ACTN4 扩增 (+) (FISH 阳性),将该数值为 2 以下的定义为 ACTN4 扩增 (-) (FISH 阴性)。

[0097] 接下来,通过 Cox 比例风险模型的单变量解析和多变量解析来分析关于 ACTN4 基因扩增的上述分类、以及各种临床病理学上的因素相对于 I 期肺腺癌患者生存期间的危险率。作为变量除了 ACTN4 基因 (阳性 / 阴性) 之外,使用性别 (男性 / 女性)、年龄 (65 以上 / 不到 65)、吸烟 (无 / 有)、阶段 (IA/IB)、血清 CEA (超过 5ng/mL/5ng/mL 以下)、淋巴管侵袭 (阳性 / 阴性) 以及静脉侵袭 (阳性 / 阴性)。结果示于以下表 3。

[0098] 表 3:使用 Cox 比例风险模型的 I 期肺腺癌的临床病理学上的预后因素解析 (队列 1:ACTN4 基因复制数解析)

[0099]

变量	N	单变量解析			多变量解析		
		风险比	95%可靠区间	P	风险比	95%可靠区间	P
性别(男性/女性)	98/108	2.3951	1.1277-5.0868	0.02304	2.4325	1.1437-5.1738	0.02097
年龄(65 以上/不到 65)	86/120	2.2737	1.0167-5.0848	0.04548	2.7567	1.2133-6.2635	0.01545
吸烟(无/有)	123/83	1.8802	0.9266-3.8152	0.080346			
阶段(IA/IB)	154/52	2.3146	1.1227-4.7718	0.023	2.5259	1.1998-5.3179	0.01471
血清 CEA (> 5ng/mL/ ≤ 5ng/mL)	34/172	1.8416	0.8234-4.1189	0.137092			
淋巴管侵袭(阳性/阴性)	36/170	2.5771	1.2117-5.4808	0.01394	2.8193	1.2814-6.2026	0.00998
静脉侵袭(阳性/阴性)	64/142	2.024	0.9973-4.1079	0.050897			
α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达(阳性/阴性)	20/186	4.2287	1.9445-9.1960	0.00028	3.9933	1.7878-8.9195	0.00073

[0100] 根据表 3 左侧显示的单变量解析的结果显示,性别、年龄、阶段、淋巴管侵袭以及 ACTN4 扩增能成为预后不良的危险因素。

[0101] 进一步,在表 3 的右侧显示仅对通过单变量解析而显示能成为预后不良因素的性别、年龄、阶段、淋巴管侵袭以及 ACTN4 扩增,通过多变量解析来进行分析的结果。根据该结果,显示性别、年龄、阶段、淋巴管侵袭以及 ACTN4 扩增为统计学上的有意义差,显示这些为预后不良的危险因素。即表示、I 期肺腺癌细胞中的 ACTN4 扩增为与本次调查的其它临床病理学的因素为独立的预后因素。

[0102] 实施例 4:根据 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达亢进和 ACTN4 基因扩增的组合的 I 期肺腺癌的预后预测

[0103] 对实施例 1 记载的队列 1,调查 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达亢进和 ACTN4 基因扩增的组合与 I 期肺腺癌的预后的关联。具体为,将样品分为接下来的 3 群:ACTN4 基因扩增(-)且 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达阴性的群、ACTN4 扩增(-)且辅肌动蛋白-4 表达阳性的群、以及 ACTN4 基因扩增(+)且 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达阳性的群,对各自的群通过 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,通过 Log-rank 鉴定进行讨论。

[0104] 图 4 显示所得到的生存曲线。根据图 4, α-辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达亢进和 ACTN4 基因扩增的组合比各自的单独地因素为更严密的预后不良的危险因素,即、可知在 I 期肺腺癌的细胞中确认出 α-辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达亢进,且确认出 ACTN4 基因扩增的患者,术后的预后为显著不良。

[0105] 实施例 5:肺腺癌与 α-辅肌动蛋白-4 基因的表达亢进的关联

[0106] 与实施例 1 同样地通过免疫组织化学分析来讨论 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达。作为样品除了实施例 1 中的队列 1 以外,还使用被甲醛固定石蜡包埋的在 1997 年到 2001 年国立癌中心中央医院(日本)实施了 II 和 III 期肺腺癌切除手术的 168 名患者的切除标本(计 540 = 372+168)(以下称为“队列 1”)。除了实施例 1 的队列 2,还使用被甲醛固定石蜡包埋的在 1993 年到 2005 年国立癌中心东院(日本)实施了 I 期肺腺癌切除手术的 447 名患者的切除标本(计 661 = 214+447)(以下称为“队列 2”)。在免疫组织化学分析中所使用的一次抗体、免疫染色法、阳性(IHC-positive)和阴性(IHC-negative)的定义与实施例 1 相同。

[0107] 对于 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达,与实施例 1 同样地通过 Cox 比例风险模型的单变量解析和多变量解析来分析性别或年龄等分类、以及各种临床病理学上的因素相对于 I 期肺腺癌患者生存期间的危险率。结果示于以下表 4。

[0108] 表 4:根据预后因素,队列 1(所有时期)的 540 例的风险比

[0109]

变量		单变量解析			多变量解析		
		风险比	[95% CI*]	P 值**	风险比	[95% CI*]	P 值**
性别	男性 VS 女性	1.37	1.00-1.86	0.05	1.06	0.74-1.51	0.76
年龄	<65 VS \geq 65	1.14	0.84-1.55	0.38			
吸烟历史	从未 VS 现行 或曾经	1.49	1.09-20.2	0.01	1.06	0.74-1.52	0.76
血清 CEA*水平	<5ng/mL VS >5ng/mL	2.40	1.75-3.30	<0.001	1.50	1.08-2.08	0.02
病理阶段 [§]	I VS II 或 III	5.68	4.13-7.81	<0.001	4.01	2.78-5.77	<0.001
组织分化	良好分化* VS 中等或不 良分化	3.19	2.32-4.41	<0.001	1.57	1.09-2.26	0.02
α -辅肌动蛋白 -4 蛋白质表 达	阴性 VS 阳性	1.86	1.33-2.58	<0.001	1.64	1.17-2.29	0.004

[0110] *缩写:CEA,癌胚抗原(carcionembryonic antigen);CI,可靠区间(confidence interval)

[0111] **Cox 回归分析,P 值 < 0.05 的用粗体显示

[0112] [§]根据国际抗癌联盟(UICC)恶性肿瘤的 TNM 分类,第 6 版(2002)

[0113] *包括支气管肺泡癌【世界健康组织肺及胸膜肿瘤的组织学分类,第 3 版(1995)】

[0114] 根据表 4 左侧显示的单变量解析结果,表示上述所有的项目都能成为预后不良的

危险因素。

[0115] 进一步,表 4 的右侧显示通过多变量解析而分析的结果。根据该结果显示,阶段、血清 CEA 和 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达为统计学上的有意义差,显示这些为预后不良的危险因素。即表示,I ~ III 期肺腺癌细胞中的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质的表达强度与本次调查的其它临床病理学上的因素为独立的预后因素。

[0116] 接下来,对于如上述这样进行分类的 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例和阴性病例的 2 群,图 5 显示肺腺癌组织的显微镜照片。图 5 的左侧和中央显示阳性病例 (IHC-positive),图 5 的右侧显示阴性病例 (IHC-negative) 的结果。图 5 下部的显微镜照片为扩大上部的显微镜照片的框内的照片。如同图所示的、辅肌动蛋白-4 蛋白质(图中的“V”)沿肺泡隔壁而扩展,使浸润在纤维间质的癌细胞在细胞膜和细胞质进行局部化。

[0117] 接下来,对于 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例和阴性病例的 2 群,通过 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,通过 Log-rank 鉴定进行讨论。图 6 示出得到的生存曲线。图 6 的显示栏 A 示出 I ~ III 期的生存曲线。对于 I ~ III 期的阴性病例的 5 年生存率为 82%,而阳性病例的 5 年生存率为 69%。图 6 的显示栏 B 示出 I 期的生存曲线。对于 I 期的阴性病例的 5 年生存率为 92%,而阳性病例的 5 年生存率为 84%。另外,可知在显示栏 A 和 B 的双方中,阴性病例和阳性病例的生存率差在术后 5 年以后变得更大。因此,根据图 5,可知与 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阴性病例相比,阳性病例具有统计学上的有意义差,预后为不良。

[0118] 实施例 6 :I 期肺腺癌中 ACTN4 基因的基因组复制数的增加

[0119] 与实施例 3 同样地为了调查 ACTN4 基因的基因组上的复制数,制造相对于存在于 19 号染色体长臂上的 ACTN4 基因的特异性探针,通过 FISH(Fluorescence in Situ Hybridization) 法对 I 期肺腺癌切除标本的石蜡切片进行分析。作为样品使用被甲醛固定石蜡包埋的在 1997 年到 2009 年国立癌中心中央医院(日本)实施了 I ~ IV 期肺腺癌切除手术的 543 名患者的切除标本。在 543 的切除标本中,288 标本有表皮生长因子受体 (EGFR) 基因的突变,255 标本没有突变。并且,这些 543 标本不重复实施例 5 的队列 1 和 2。所使用的特异性探针、阳性 (FISH-positive) 和阴性 (FISH-negative) 的定义与实施例 3 相同。

[0120] 由荧光原位杂交 (FISH) 法标识的肺腺癌细胞的显微镜照片示于图 7。图 7 的左侧示出阳性病例 (FISH-positive)、图 7 的右侧示出阴性病例 (FISH-negative) 的结果。如同图所示,可以对肺腺癌细胞赋予红(图 7 中的○部)和绿(图 7 中的□部)的荧光标识。然后,基于 FISH 阳性、阴性的定义,从 I ~ IV 期的 543 切除标本中检测出 FISH 阳性的 79 切除标本 (15%)。

[0121] 接下来,对于通过 FISH 法分类的阳性病例和阴性病例的 2 群,通过 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,通过 Log-rank 鉴定进行讨论。图 8 显示得到的生存曲线。图 8 的显示栏 A 显示 I 期的生存曲线。对于 I 期的阴性病例的 5 年生存率为 95%,而阳性病例的 5 年生存率为 57%。图 8 的显示栏 B 显示 I 期的生存曲线。对于 I 期的阴性病例的 5 年生存率为 86%,而阳性病例的 5 年生存率为 37%。另外,可知在显示栏 A 和 B 的双方中,阴性病例和阳性病例的生存率差在术后 5 年以后变得更大。因此,根据图 8,与 FISH 法的阴性病例相比,可知阳性病例具有统计学上的有意义差,预后为不良。

[0122] 实施例 7:免疫组织化学分析和 FISH 法分析的组合

[0123] 作为样品使用在实施例 5 中使用的队列 1 中、I 期肺腺癌的 206 切除样本以及在实施例 5 中使用的队列 2 中 I 期肺腺癌的 645 切除样本。在这些样品中,将 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例和阴性病例与 FISH 法分析的阳性病例和阴性病例进行组合,通过 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,通过 Log-rank 鉴定进行讨论。图 9 显示得到的生存曲线。图 9 的显示栏 A 显示队列 1 的 I 期生存曲线。 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阴性病例的 5 年生存率为 95%, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例、且 FISH 法分析的阴性病例的 5 年生存率为 87%。而相对于此, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例、且 FISH 法分析的阳性病例的 5 年生存率为 58%。另外,图 9 的显示栏 B 显示队列 1 的 IA 期的生存曲线。 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阴性病例的 5 年生存率为 96%, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例、且 FISH 法分析的阴性病例的 5 年生存率为 92%。而相对于此, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例、且 FISH 法分析的阳性病例的 5 年生存率为 57%。由此,根据图 9 的显示栏 A 和 B 可知,与 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性、阴性病例相比,FISH 法分析的阳性、阴性病例具有统计学上的有意义差,预后为不良。

[0124] 另外,图 9 的显示栏 C 显示队列 2 的 I 期的生存曲线。 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阴性病例的 5 年生存率为 92%, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例、且 FISH 法分析的阴性病例的 5 年生存率为 89%。而相对于此, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例、且 FISH 法分析的阳性病例的 5 年生存率为 59%。图 9 的显示栏 D 显示队列 2 的 IA 期的生存曲线。 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阴性病例的 5 年生存率为 95%, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例、且 FISH 法分析的阴性病例的 5 年生存率为 91%。而相对于此, α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性病例、且 FISH 法分析的阳性病例的 5 年生存率为 74%。由此,根据图 9 的显示栏 C 和 D 可知,与 α -辅肌动蛋白-4 蛋白质表达的阳性、阴性病例相比,FISH 法分析的阳性、阴性病例具有统计学上的有意义差,预后为不良。

[0125] 本发明不受上述发明的实施方式以及实施例的任何限定。在不脱离专利申请的保护范围下,本领域的技术人员在能容易想到的范围下进行的种种变形也包含在本发明中。

[0126] 本申请基于 2010 年 3 月 30 日申请的日本专利申请 2010-78772 号,包括该说明书、权利要求的保护范围、图和摘要。上述日本专利申请中的公开的整体作为参考包括在本说明书中。

[0127] 产业上的可利用性

[0128] 本发明的肺腺癌的预后预测方法以及肺腺癌的检测试剂盒对于预测 I 期肺腺癌的预后,选择适宜的治疗方法是有用的。另外,本发明的用于腺癌治疗的医药组合物对于治疗预后不良的 I 期肺腺癌是有用的。

[0001]

序列表

<110> 日本健康科学财团

<120> 肺腺癌的预后预测方法、肺腺癌的检测试剂盒以及用于治疗肺腺癌的医药组合物

<130> 11F012-PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3893

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (60).. (2792)

<400> 1

agaggggagg gagctgaggc gggagcggac aggctggtgg gcgagcgaga ggcggcgga 59

atg gtg gac tac cac gcg gcg aac cag tcg tac cag tac ggc ccc agc 107
 Met Val Asp Tyr His Ala Ala Asn Gln Ser Tyr Gln Tyr Gly Pro Ser
 1 5 10 15

agc gcg ggc aat ggc gct ggc ggc ggg ggc agc atg ggc gac tac atg 155
 Ser Ala Gly Asn Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Met Gly Asp Tyr Met
 20 25 30

gcc cag gag gac gac tgg gac cgg gac ctg ctg ctg gac ccg gcc tgg 203
 Ala Gln Glu Asp Asp Trp Asp Arg Asp Leu Leu Leu Asp Pro Ala Trp
 35 40 45

gag aag cag cag cgc aag acc ttc acg gca tgg tgc aac tcc cac ctg 251
 Glu Lys Gln Gln Arg Lys Thr Phe Thr Ala Trp Cys Asn Ser His Leu
 50 55 60

cgg aag gca ggc aca cag atc gag aac att gat gag gac ttc cga gac 299
 Arg Lys Ala Gly Thr Gln Ile Glu Asn Ile Asp Glu Asp Phe Arg Asp
 65 70 75 80

ggg ctc aag ctc atg ctg ctc ctg gag gtc ata tca ggg gag cgg tta 347
 Gly Leu Lys Leu Met Leu Leu Leu Glu Val Ile Ser Gly Glu Arg Leu
 85 90 95

cct aag ccg gag cgg ggg aag atg aga gtg cac aaa atc aac aat gtg 395
 Pro Lys Pro Glu Arg Gly Lys Met Arg Val His Lys Ile Asn Asn Val
 100 105 110

aac aaa gcg ctg gac ttt att gcc agc aaa ggc gtc aag ctg gtc tcc 443
 Asn Lys Ala Leu Asp Phe Ile Ala Ser Lys Gly Val Lys Leu Val Ser
 115 120 125

[0002]

atc ggg gca gaa gag att gtg gac ggc aac gca aag atg acc ctg gga 491
 Ile Gly Ala Glu Glu Ile Val Asp Gly Asn Ala Lys Met Thr Leu Gly
 130 135 140

atg atc tgg acc atc atc ett agg ttc gcc atc cag gac atc tcc gtg 539
 Met Ile Trp Thr Ile Ile Leu Arg Phe Ala Ile Gln Asp Ile Ser Val
 145 150 155 160

gaa gag acc tgg gcc aag gaa ggg ctc ett ctc tgg tgc cag aga aag 587
 Glu Glu Thr Ser Ala Lys Glu Gly Leu Leu Leu Trp Cys Gln Arg Lys
 165 170 175

aca gcc cgg tat aag aac gtc aat gtg cag aac ttc cac atc agc tgg 635
 Thr Ala Pro Tyr Lys Asn Val Asn Val Gln Asn Phe His Ile Ser Trp
 180 185 190

aag gat ggt ctt gcc ttc aat gcc ctg atc cac cgg cac aga cca gag 683
 Lys Asp Gly Leu Ala Phe Asn Ala Leu Ile His Arg His Arg Pro Glu
 195 200 205

ctg att gag tat gac aag ctg agg aag gac gac cct gtc acc aac ctg 731
 Leu Ile Glu Tyr Asp Lys Leu Arg Lys Asp Asp Pro Val Thr Asn Leu
 210 215 220

aac aat gcc ttc gaa gtg get gag aaa tac ctc gac atc ccc aag atg 779
 Asn Asn Ala Phe Glu Val Ala Glu Lys Tyr Leu Asp Ile Pro Lys Met
 225 230 235 240

ctg gat gca gag gac atc gtg aac acg gcc cgg ccc gac gag aag gcc 827
 Leu Asp Ala Glu Asp Ile Val Asn Thr Ala Arg Pro Asp Glu Lys Ala
 245 250 255

ata atg acc tat gtg tcc agc ttc tac cat gcc ttt tca gga gcg cag 875
 Ile Met Thr Tyr Val Ser Ser Phe Tyr His Ala Phe Ser Gly Ala Gln
 260 265 270

aag get gaa act gcc gcc aac cgg atc tgt aag gtg ctg get gtc aac 923
 Lys Ala Glu Thr Ala Ala Asn Arg Ile Cys Lys Val Leu Ala Val Asn
 275 280 285

caa gag aac gag cac ctg atg gag gac tac gag aag ctg gcc agc gac 971
 Gln Glu Asn Glu His Leu Met Glu Asp Tyr Glu Lys Leu Ala Ser Asp
 290 295 300

ctc ctg gag tgg atc cgg cgc acc atc ccc tgg ctg gag gac cgt gtg 1019
 Leu Leu Glu Trp Ile Arg Arg Thr Ile Pro Trp Leu Glu Asp Arg Val
 305 310 315 320

ccc caa aag act atc cag gag atg cag cag aag ctg gag gac ttc cgc 1067
 Pro Gln Lys Thr Ile Gln Glu Met Gln Gln Lys Leu Glu Asp Phe Arg
 325 330 335

gac tac cgg cgt gtg cac aag ccg ccc aag gtg cag gag aag tgc cag 1115
 Asp Tyr Arg Arg Val His Lys Pro Pro Lys Val Gln Glu Lys Cys Gln
 340 345 350

ctg gag atc aac ttc aac acg ctg cag acc aag ctg cgc ctc agc aac 1163

[0003]

Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Asn	Thr	Leu	Gln	Thr	Lys	Leu	Arg	Leu	Ser	Asn		
	355			360			365										
egg	ccc	gcc	ttc	atg	ccc	tcc	gag	ggc	aag	atg	gtc	tcg	gac	atc	aac	1211	
Arg	Pro	Ala	Phe	Met	Pro	Ser	Glu	Gly	Lys	Met	Val	Ser	Asp	Ile	Asn		
	370		375			380											
aat	ggc	tgg	cag	cac	ttg	gag	cag	gct	gag	aag	ggc	tac	gag	gag	tgg	1259	
Asn	Gly	Trp	Gln	His	Leu	Glu	Gln	Ala	Glu	Lys	Gly	Tyr	Glu	Glu	Trp		
385			390			395			400								
ctg	ctg	aat	gag	atc	cgc	agg	ctg	gag	cgg	ctc	gac	cac	ctg	gca	gag	1307	
Leu	Leu	Asn	Glu	Ile	Arg	Arg	Leu	Glu	Arg	Leu	Asp	His	Leu	Ala	Glu		
		405			410			415									
aag	ttc	cgg	cag	aag	gcc	tcc	atc	cac	gag	gcc	tgg	act	gac	ggg	aag	1355	
Lys	Phe	Arg	Gln	Lys	Ala	Ser	Ile	His	Glu	Ala	Trp	Thr	Asp	Gly	Lys		
	420			425			430										
gaa	gcc	atg	ctg	aag	cac	cgg	gac	tac	gag	acg	gcc	aca	cta	tcg	gac	1403	
Glu	Ala	Met	Leu	Lys	His	Arg	Asp	Tyr	Glu	Thr	Ala	Thr	Leu	Ser	Asp		
	435			440			445										
atc	aaa	gcc	ctc	att	cgc	aag	cac	gag	gcc	ttc	gag	agc	gac	ctg	gct	1451	
Ile	Lys	Ala	Leu	Ile	Arg	Lys	His	Glu	Ala	Phe	Glu	Ser	Asp	Leu	Ala		
	450			455			460										
gcg	cac	cag	gac	cgc	gtg	gag	cag	atc	gcc	gcc	att	gcc	cag	gag	ctc	1499	
Ala	His	Gln	Asp	Arg	Val	Glu	Gln	Ile	Ala	Ala	Ile	Ala	Gln	Glu	Leu		
465			470			475			480								
aac	gag	ctg	gat	tac	tac	gac	tcc	cac	aat	gtc	aac	acc	cgg	tgc	cag	1547	
Asn	Glu	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Asp	Ser	His	Asn	Val	Asn	Thr	Arg	Cys	Gln		
		485			490			495									
aag	atc	tgt	gac	cag	tgg	gac	gcc	ctc	ggc	tct	ctg	aca	cat	agt	cgc	1595	
Lys	Ile	Cys	Asp	Gln	Trp	Asp	Ala	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	His	Ser	Arg		
	500			505			510										
agg	gaa	gcc	ctg	gag	aaa	aca	gag	aag	cag	ctg	gag	gcc	atc	gac	cag	1643	
Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Lys	Thr	Glu	Lys	Gln	Leu	Glu	Ala	Ile	Asp	Gln		
	515			520			525										
ctg	cac	ctg	gaa	tac	gcc	aag	cgc	gcg	gcc	ccc	ttc	aac	aac	tgg	atg	1691	
Leu	His	Leu	Glu	Tyr	Ala	Lys	Arg	Ala	Ala	Pro	Phe	Asn	Asn	Trp	Met		
	530			535			540										
gag	agc	gcc	atg	gag	gac	ctc	cag	gac	atg	ttc	atc	gtc	cat	acc	atc	1739	
Glu	Ser	Ala	Met	Glu	Asp	Leu	Gln	Asp	Met	Phe	Ile	Val	His	Thr	Ile		
545			550			555			560								
gag	gag	att	gag	ggc	ctg	atc	tea	gcc	cat	gac	cag	ttc	aag	tcc	acc	1787	
Glu	Glu	Ile	Glu	Gly	Leu	Ile	Ser	Ala	His	Asp	Gln	Phe	Lys	Ser	Thr		
		565			570			575									
ctg	ccg	gac	gcc	gat	agg	gag	cgc	gag	gcc	atc	ctg	gcc	atc	cac	aag	1835	
Leu	Pro	Asp	Ala	Asp	Arg	Glu	Arg	Glu	Ala	Ile	Leu	Ala	Ile	His	Lys		

[0004]

580	585	590	
gag gcc cag	agg atc gct	gag agc aac cac	atc aag ctg tcg ggc agc 1883
Glu Ala Gln	Arg Ile Ala	Glu Ser Asn His	Ile Lys Leu Ser Gly Ser
595	600	605	
aac ccc tac	acc acc gtc	acc ccg caa atc	atc aac tcc aag tgg gag 1931
Asn Pro Tyr	Thr Thr Val	Thr Pro Gln Ile	Ile Ile Asn Ser Lys Trp Glu
610	615	620	
aag gtg cag	cag ctg gtg	cca aaa cgg gac	cat gcc ctc ctg gag gag 1979
Lys Val Gln	Gln Leu Val	Pro Lys Arg Asp	His Ala Leu Leu Glu Glu
625	630	635	640
cag agc aag	cag cag tcc	aac gag cac ctg	cgc cgc cag ttc gcc agc 2027
Gln Ser Lys	Gln Gln Ser	Asn Glu His Leu	Arg Arg Gln Phe Ala Ser
645	650	655	
cag gcc aat	gtt gtg ggg	ccc tgg atc cag	acc aag atg gag gag atc 2075
Gln Ala Asn	Val Val Gly	Pro Trp Ile Gln	Thr Lys Met Glu Glu Ile
660	665	670	
ggg cgc atc	tcc att gag	atg aac ggg acc	ctg gag gac cag ctg agc 2123
Gly Arg Ile	Ser Ile Glu	Met Asn Gly Thr	Leu Glu Asp Gln Leu Ser
675	680	685	
cac ctg aag	cag tat gaa	cgc agc atc gtg	gac tac aag ccc aac ctg 2171
His Leu Lys	Gln Tyr Glu	Arg Ser Ile Val	Asp Tyr Lys Pro Asn Leu
690	695	700	
gac ctg ctg	gag cag cag	cac cag etc	atc cag gag gcc etc atc ttc 2219
Asp Leu Leu	Glu Gln Gln	His Gln Leu Ile	Gln Glu Ala Leu Ile Phe
705	710	715	720
gac aac aag	cac acc aac	tat acc atg gag	cac atc cgc gtg ggc tgg 2267
Asp Asn Lys	His Thr Asn	Tyr Thr Met Glu	His Ile Arg Val Gly Trp
725	730	735	
gag cag ctg	ctc acc acc	att gcc cgc	acc atc aac gag gtg gag aac 2315
Glu Gln Leu	Leu Thr Thr	Ile Ala Arg Thr	Ile Asn Glu Val Glu Asn
740	745	750	
cag atc ctc	acc cgc gac	gcc aag ggc	atc agc cag gag cag atg cag 2363
Gln Ile Leu	Thr Arg Asp	Ala Lys Gly Ile	Ser Gln Glu Gln Met Gln
755	760	765	
gag ttc cgg	geg tcc ttc	aac cac ttc	gac aag gat cat ggc ggg geg 2411
Glu Phe Arg	Ala Ser Phe	Asn His Phe Asp	Lys Asp His Gly Gly Ala
770	775	780	
ctg ggg ccc	gag gag ttc	aag gcc tgc	ctc atc agc ctg ggc tac gac 2459
Leu Gly Pro	Glu Glu Phe	Lys Ala Cys Leu	Ile Ser Leu Gly Tyr Asp
785	790	795	800
gtg gag aac	gac cgg cag	ggt gag gcc	gag ttc aac cgc atc atg agc 2507
Val Glu Asn	Asp Arg Gln	Gly Glu Ala Glu	Phe Asn Arg Ile Met Ser
805	810	815	

[0005]

ctg gtc gac ccc aac cat agc ggc ctt gtg acc ttc caa gcc ttc atc 2555
 Leu Val Asp Pro Asn His Ser Gly Leu Val Thr Phe Gln Ala Phe Ile
 820 825 830

gac ttc atg tgc cgg gag acc acc gac acg gac acg get gac cag gtc 2603
 Asp Phe Met Ser Arg Glu Thr Thr Asp Thr Asp Thr Ala Asp Gln Val
 835 840 845

atc get tcc ttc aag gtc tta gca ggg gac aag aac ttc atc aca get 2651
 Ile Ala Ser Phe Lys Val Leu Ala Gly Asp Lys Asn Phe Ile Thr Ala
 850 855 860

gag gag ctg cgg aga gag ctg ccc ccc gac cag gcc gag tac tgc atc 2699
 Glu Glu Leu Arg Arg Glu Leu Pro Pro Asp Gln Ala Glu Tyr Cys Ile
 865 870 875 880

gcc cgc atg geg cca tac cag ggc cct gac gcc gtg ccc ggt gcc etc 2747
 Ala Arg Met Ala Pro Tyr Gln Gly Pro Asp Ala Val Pro Gly Ala Leu
 885 890 895

gac tac aag tcc ttc tcc acg gcc ttg tat ggc gag agc gac ctg 2792
 Asp Tyr Lys Ser Phe Ser Thr Ala Leu Tyr Gly Glu Ser Asp Leu
 900 905 910

ttaggcccga gagacctgac ccaacacccc cgacggcctc caggaggggc ctgggeagcc 2852

ccacagtecc attectccac tetgtatcta tgcaaagcac tctctgcagt ectccggggt 2912

ggggtgggtgg gcagggaggg gctggggcag gctctctcct ctctctcttt gtgggttggc 2972

caggaggttc ccccgaccag gttggggaga cttggggcca gcgcttctgg tcttgtaaaf 3032

atgtatgatg tgttgtgctt ttttaaccaa ggaggggcca gtggattccc acagcacaac 3092

cggteccette catgcccctgg gatgcctcac caeaccacag tctcttctctt tgetetgagg 3152

tcccttcaag gctcccccaa tccagggcaa agccccatgt gccttgtcca ggaactgcct 3212

gggccatgcg aggggcccagc agagggcgcc accaccacct gacggctggg gacceaccca 3272

gccctctctc cctctctgct ccagactcac ttgccattgc caggagatgg cccaacaag 3332

cacccegett ttgcagcaga ggagctgagt tggeagaccg ggccccctg aaccgcacce 3392

catcccacca gcccggcct tgctttgtct ggctcacgt gtctcagatt ttctaagaac 3452

caaaaaaaaa aaaggaaaaa aaacacaaaa caacaaaaac caaaaaaaaa aaaaatcaca 3512

aaaacaaaaa aactataaaa aagaaagaat taaaaacttt cagagaatta ctatttactt 3572

fattaactta cggatttatt atataaatat atattcacct agcaacatat ctctgcegtc 3632

tetctgtctc tcataatgaa gacatagccg attctctgcc eggccccctt gctgatgetc 3692

ctccgggtct gcgtcgggcg tgggtctctg gggaccctcc agaggtggag gtgggetgat 3752

[0006]

ggcctggctg cctggtggtt gatggttttg ctccccctac cttttttttt tgagtttatt 3812
 ctgattgatt ttttttcttg gtttctggat aaaccaccct ctggggacag gataataaaa 3872
 catgtaatat ttttaagaag g 3893

<210> 2

<211> 911

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Met Val Asp Tyr His Ala Ala Asn Gln Ser Tyr Gln Tyr Gly Pro Ser
 1 5 10 15

Ser Ala Gly Asn Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Met Gly Asp Tyr Met
 20 25 30

Ala Gln Glu Asp Asp Trp Asp Arg Asp Leu Leu Leu Asp Pro Ala Trp
 35 40 45

Glu Lys Gln Gln Arg Lys Thr Phe Thr Ala Trp Cys Asn Ser His Leu
 50 55 60

Arg Lys Ala Gly Thr Gln Ile Glu Asn Ile Asp Glu Asp Phe Arg Asp
 65 70 75 80

Gly Leu Lys Leu Met Leu Leu Leu Glu Val Ile Ser Gly Glu Arg Leu
 85 90 95

Pro Lys Pro Glu Arg Gly Lys Met Arg Val His Lys Ile Asn Asn Val
 100 105 110

Asn Lys Ala Leu Asp Phe Ile Ala Ser Lys Gly Val Lys Leu Val Ser
 115 120 125

Ile Gly Ala Glu Glu Ile Val Asp Gly Asn Ala Lys Met Thr Leu Gly
 130 135 140

Met Ile Trp Thr Ile Ile Leu Arg Phe Ala Ile Gln Asp Ile Ser Val
 145 150 155 160

Glu Glu Thr Ser Ala Lys Glu Gly Leu Leu Leu Trp Cys Gln Arg Lys
 165 170 175

[0007]

Thr Ala Pro Tyr Lys Asn Val Asn Val Gln Asn Phe His Ile Ser Trp
 180 185 190

Lys Asp Gly Leu Ala Phe Asn Ala Leu Ile His Arg His Arg Pro Glu
 195 200 205

Leu Ile Glu Tyr Asp Lys Leu Arg Lys Asp Asp Pro Val Thr Asn Leu
 210 215 220

Asn Asn Ala Phe Glu Val Ala Glu Lys Tyr Leu Asp Ile Pro Lys Met
 225 230 235 240

Leu Asp Ala Glu Asp Ile Val Asn Thr Ala Arg Pro Asp Glu Lys Ala
 245 250 255

Ile Met Thr Tyr Val Ser Ser Phe Tyr His Ala Phe Ser Gly Ala Gln
 260 265 270

Lys Ala Glu Thr Ala Ala Asn Arg Ile Cys Lys Val Leu Ala Val Asn
 275 280 285

Gln Glu Asn Glu His Leu Met Glu Asp Tyr Glu Lys Leu Ala Ser Asp
 290 295 300

Leu Leu Glu Trp Ile Arg Arg Thr Ile Pro Trp Leu Glu Asp Arg Val
 305 310 315 320

Pro Gln Lys Thr Ile Gln Glu Met Gln Gln Lys Leu Glu Asp Phe Arg
 325 330 335

Asp Tyr Arg Arg Val His Lys Pro Pro Lys Val Gln Glu Lys Cys Gln
 340 345 350

Leu Glu Ile Asn Phe Asn Thr Leu Gln Thr Lys Leu Arg Leu Ser Asn
 355 360 365

Arg Pro Ala Phe Met Pro Ser Glu Gly Lys Met Val Ser Asp Ile Asn
 370 375 380

Asn Gly Trp Gln His Leu Glu Gln Ala Glu Lys Gly Tyr Glu Glu Trp
 385 390 395 400

[0008]

Leu Leu Asn Glu Ile Arg Arg Leu Glu Arg Leu Asp His Leu Ala Glu
 405 410 415

Lys Phe Arg Gln Lys Ala Ser Ile His Glu Ala Trp Thr Asp Gly Lys
 420 425 430

Glu Ala Met Leu Lys His Arg Asp Tyr Glu Thr Ala Thr Leu Ser Asp
 435 440 445

Ile Lys Ala Leu Ile Arg Lys His Glu Ala Phe Glu Ser Asp Leu Ala
 450 455 460

Ala His Gln Asp Arg Val Glu Gln Ile Ala Ala Ile Ala Gln Glu Leu
 465 470 475 480

Asn Glu Leu Asp Tyr Tyr Asp Ser His Asn Val Asn Thr Arg Cys Gln
 485 490 495

Lys Ile Cys Asp Gln Trp Asp Ala Leu Gly Ser Leu Thr His Ser Arg
 500 505 510

Arg Glu Ala Leu Glu Lys Thr Glu Lys Gln Leu Glu Ala Ile Asp Gln
 515 520 525

Leu His Leu Glu Tyr Ala Lys Arg Ala Ala Pro Phe Asn Asn Trp Met
 530 535 540

Glu Ser Ala Met Glu Asp Leu Gln Asp Met Phe Ile Val His Thr Ile
 545 550 555 560

Glu Glu Ile Glu Gly Leu Ile Ser Ala His Asp Gln Phe Lys Ser Thr
 565 570 575

Leu Pro Asp Ala Asp Arg Glu Arg Glu Ala Ile Leu Ala Ile His Lys
 580 585 590

Glu Ala Gln Arg Ile Ala Glu Ser Asn His Ile Lys Leu Ser Gly Ser
 595 600 605

Asn Pro Tyr Thr Thr Val Thr Pro Gln Ile Ile Asn Ser Lys Trp Glu
 610 615 620

Lys Val Gln Gln Leu Val Pro Lys Arg Asp His Ala Leu Leu Glu Glu

[0009]

625 630 635 640

 Gln Ser Lys Gln Gln Ser Asn Glu His Leu Arg Arg Gln Phe Ala Ser
 645 650 655

 Gln Ala Asn Val Val Gly Pro Trp Ile Gln Thr Lys Met Glu Glu Ile
 660 665 670

 Gly Arg Ile Ser Ile Glu Met Asn Gly Thr Leu Glu Asp Gln Leu Ser
 675 680 685

 His Leu Lys Gln Tyr Glu Arg Ser Ile Val Asp Tyr Lys Pro Asn Leu
 690 695 700

 Asp Leu Leu Glu Gln Gln His Gln Leu Ile Gln Glu Ala Leu Ile Phe
 705 710 715 720

 Asp Asn Lys His Thr Asn Tyr Thr Met Glu His Ile Arg Val Gly Trp
 725 730 735

 Glu Gln Leu Leu Thr Thr Ile Ala Arg Thr Ile Asn Glu Val Glu Asn
 740 745 750

 Gln Ile Leu Thr Arg Asp Ala Lys Gly Ile Ser Gln Glu Gln Met Gln
 755 760 765

 Glu Phe Arg Ala Ser Phe Asn His Phe Asp Lys Asp His Gly Gly Ala
 770 775 780

 Leu Gly Pro Glu Glu Phe Lys Ala Cys Leu Ile Ser Leu Gly Tyr Asp
 785 790 795 800

 Val Glu Asn Asp Arg Gln Gly Glu Ala Glu Phe Asn Arg Ile Met Ser
 805 810 815

 Leu Val Asp Pro Asn His Ser Gly Leu Val Thr Phe Gln Ala Phe Ile
 820 825 830

 Asp Phe Met Ser Arg Glu Thr Thr Asp Thr Asp Thr Ala Asp Gln Val
 835 840 845

 Ile Ala Ser Phe Lys Val Leu Ala Gly Asp Lys Asn Phe Ile Thr Ala
 850 855 860

[0010]

Glu Glu Leu Arg Arg Glu Leu Pro Pro Asp Gln Ala Glu Tyr Cys Ile
865 870 875 880

Ala Arg Met Ala Pro Tyr Gln Gly Pro Asp Ala Val Pro Gly Ala Leu
885 890 895

Asp Tyr Lys Ser Phe Ser Thr Ala Leu Tyr Gly Glu Ser Asp Leu
900 905 910

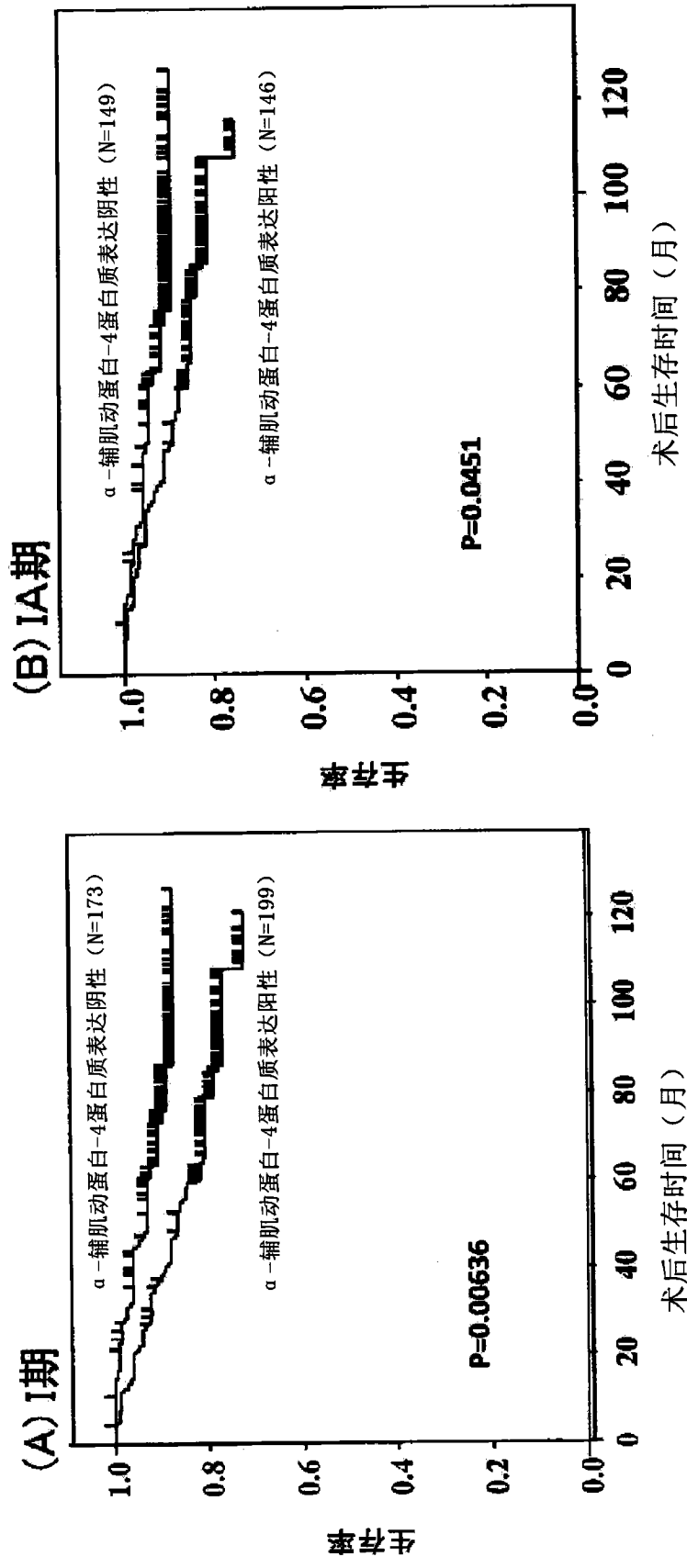


图 1

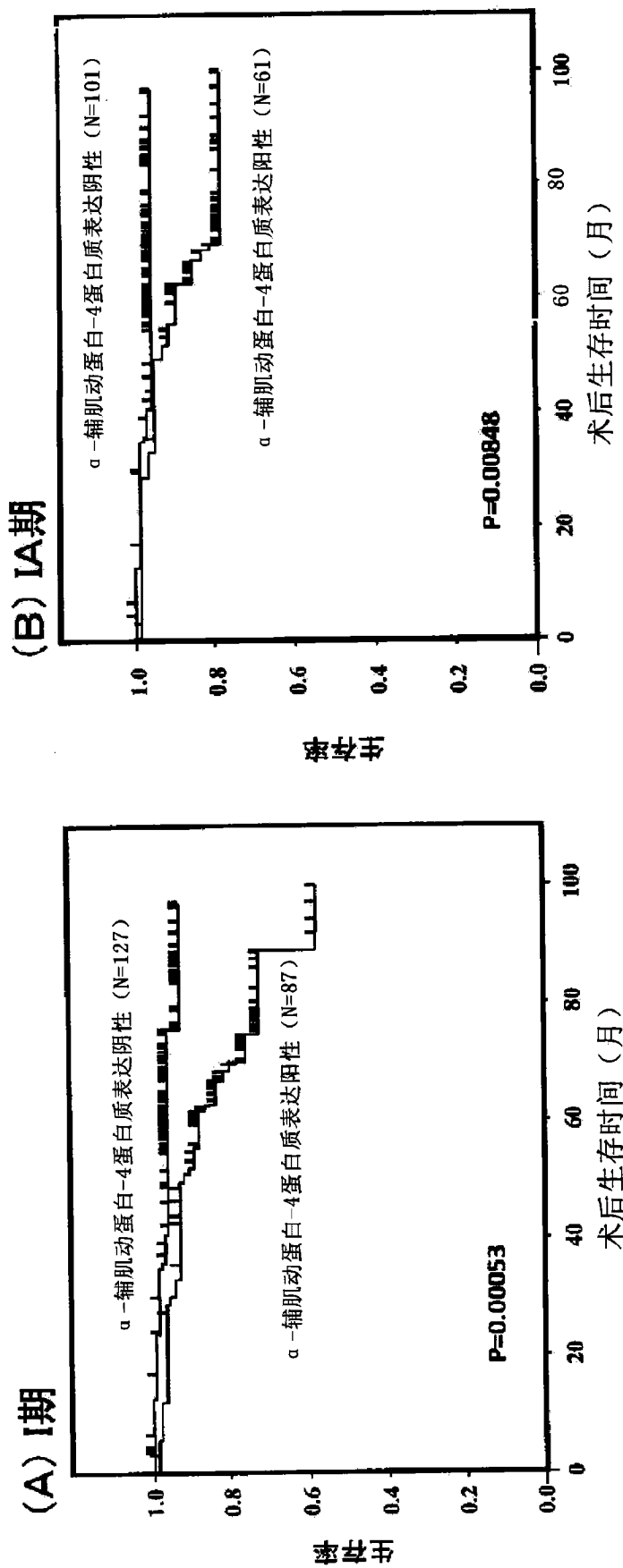


图 2

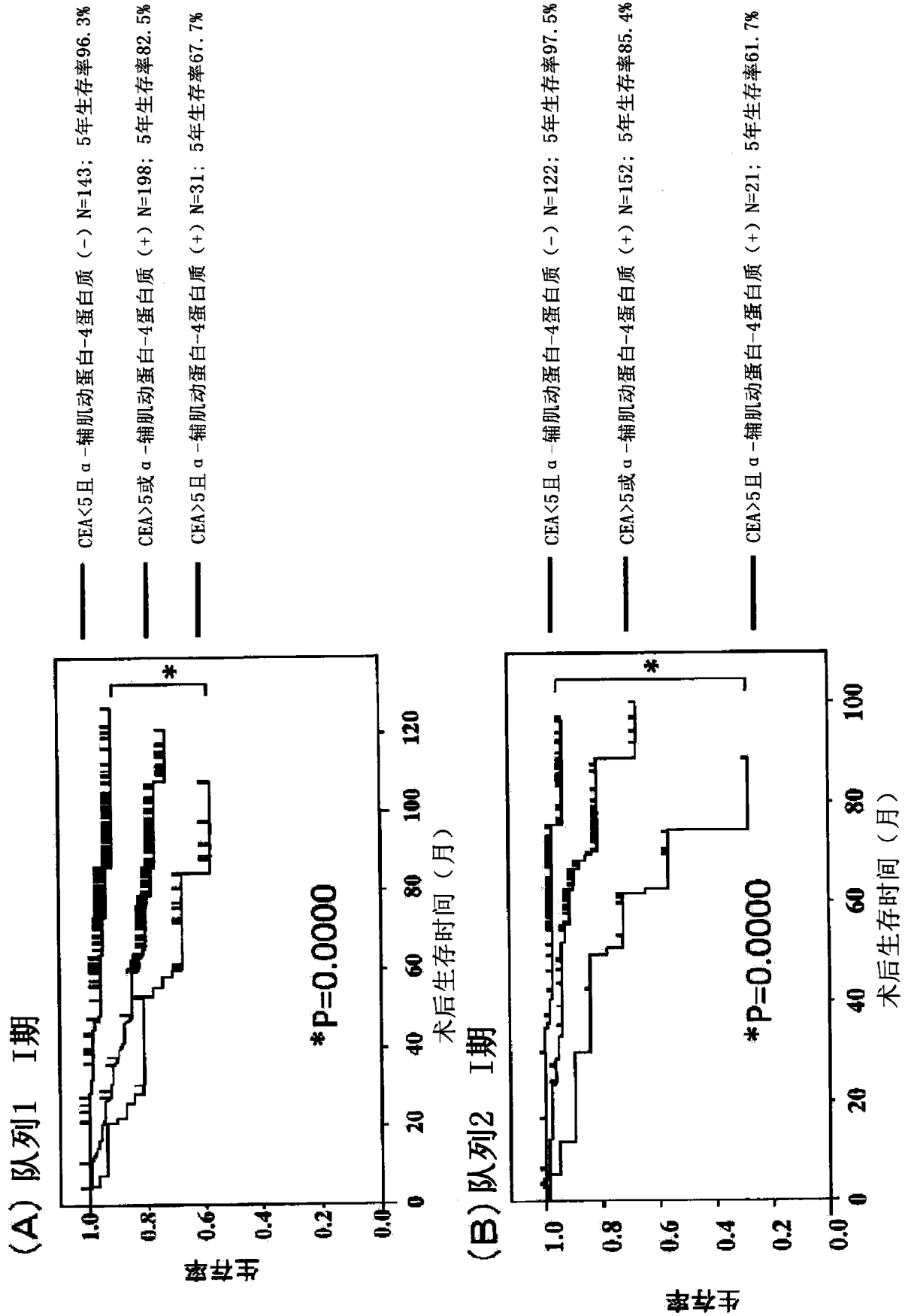


图 3

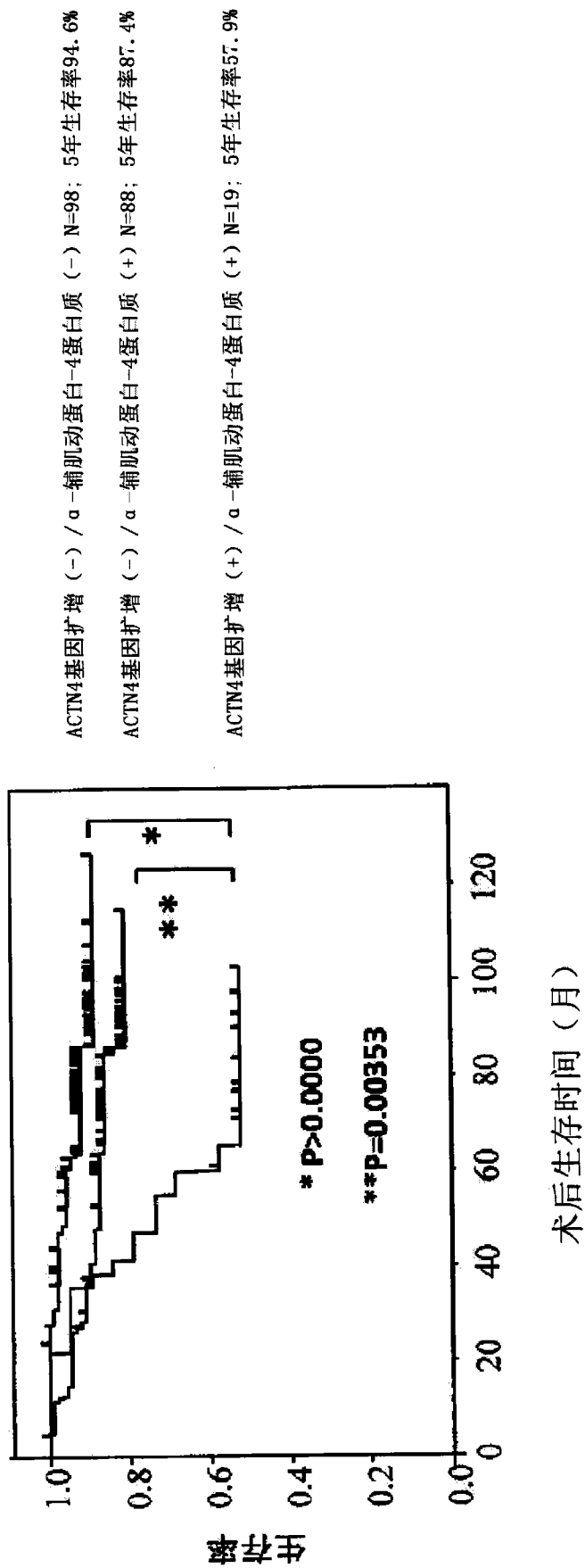


图 4

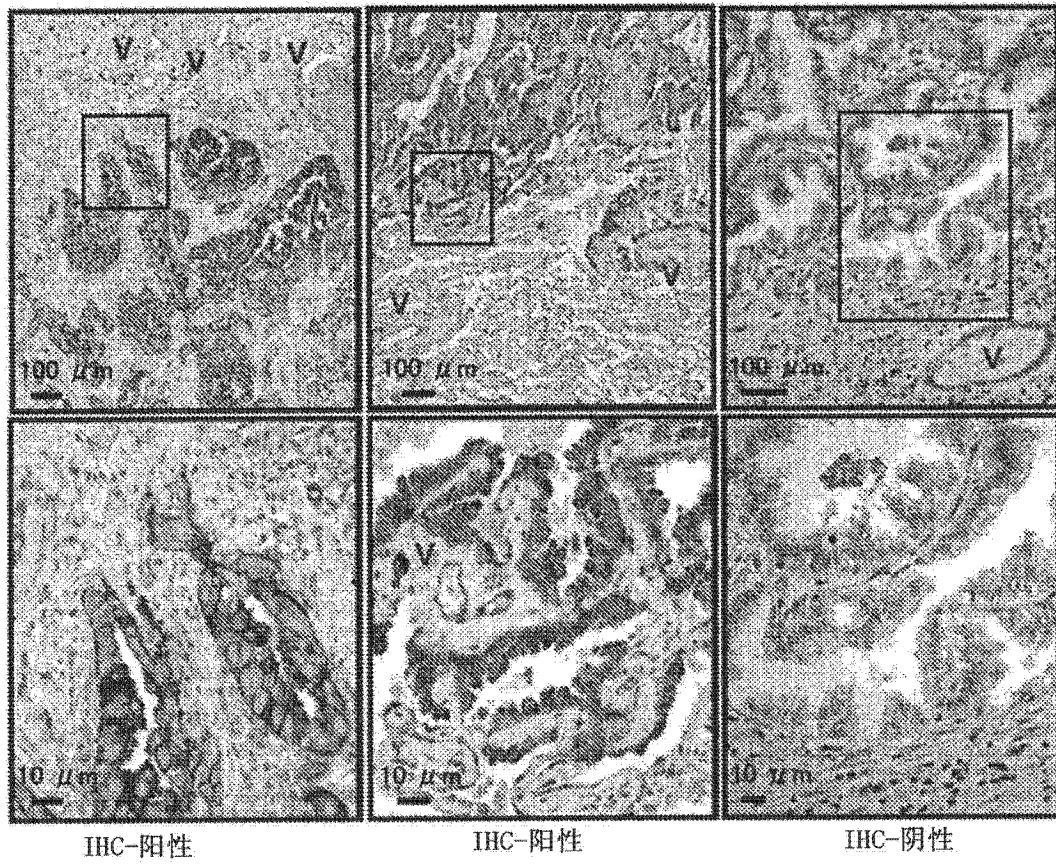


图 5

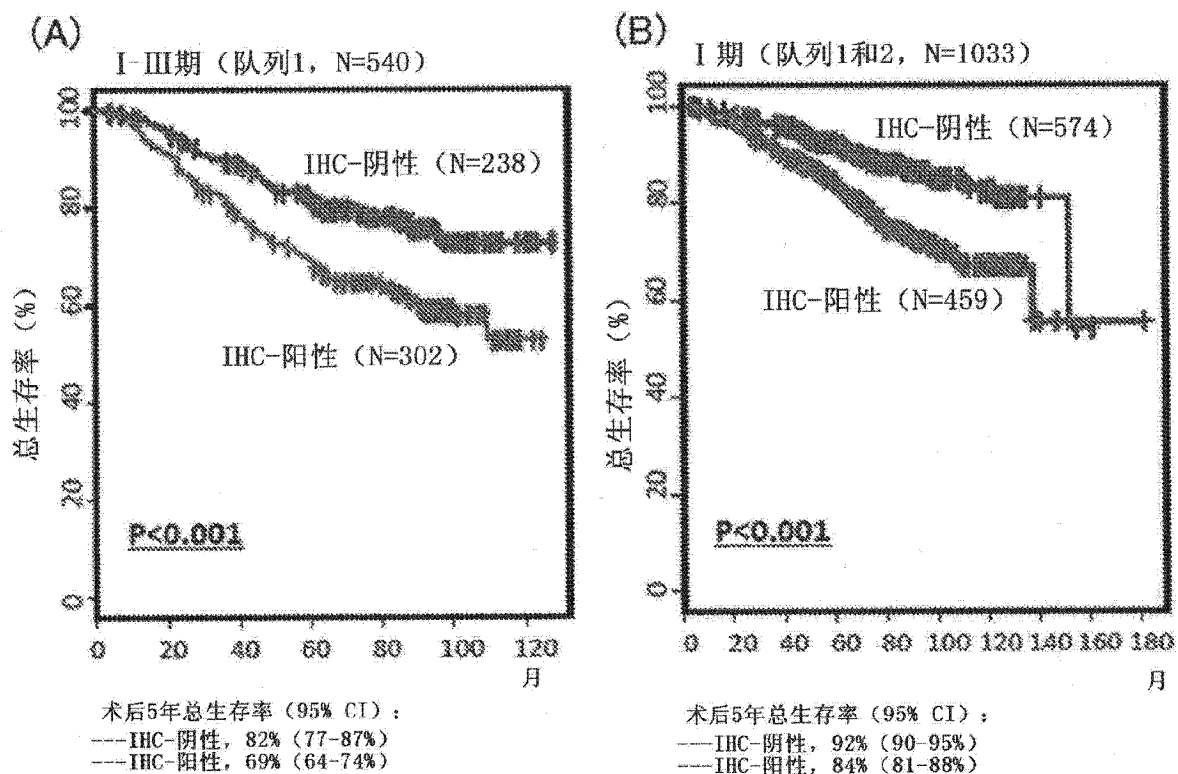


图 6

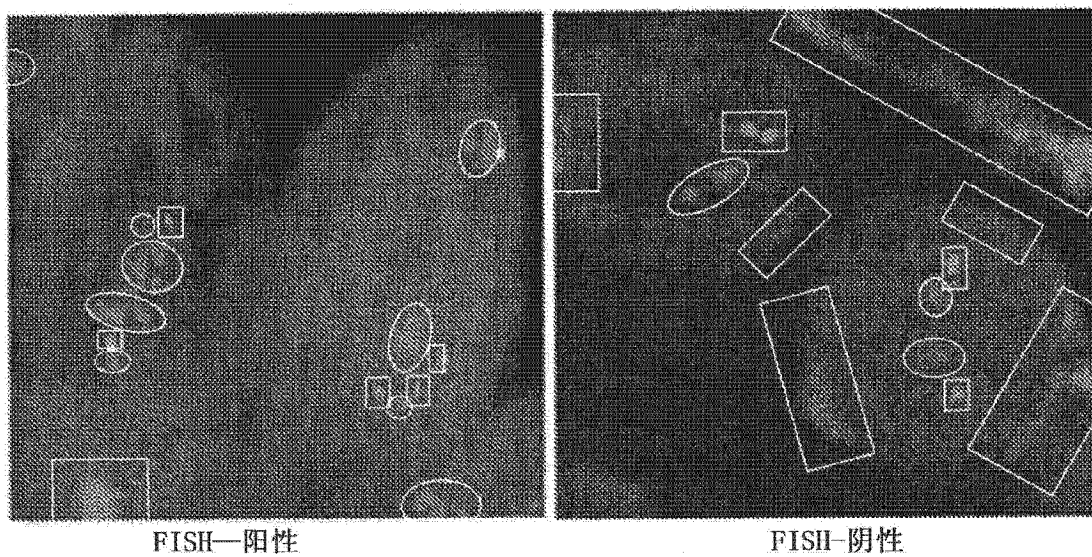


图 7

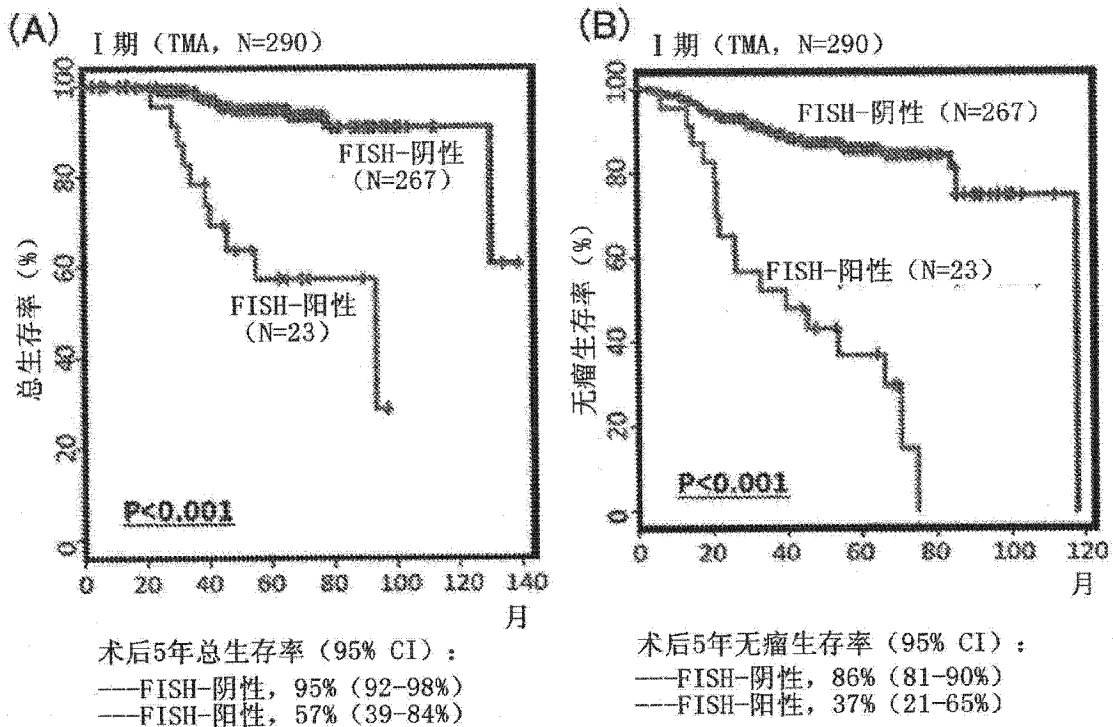


图 8

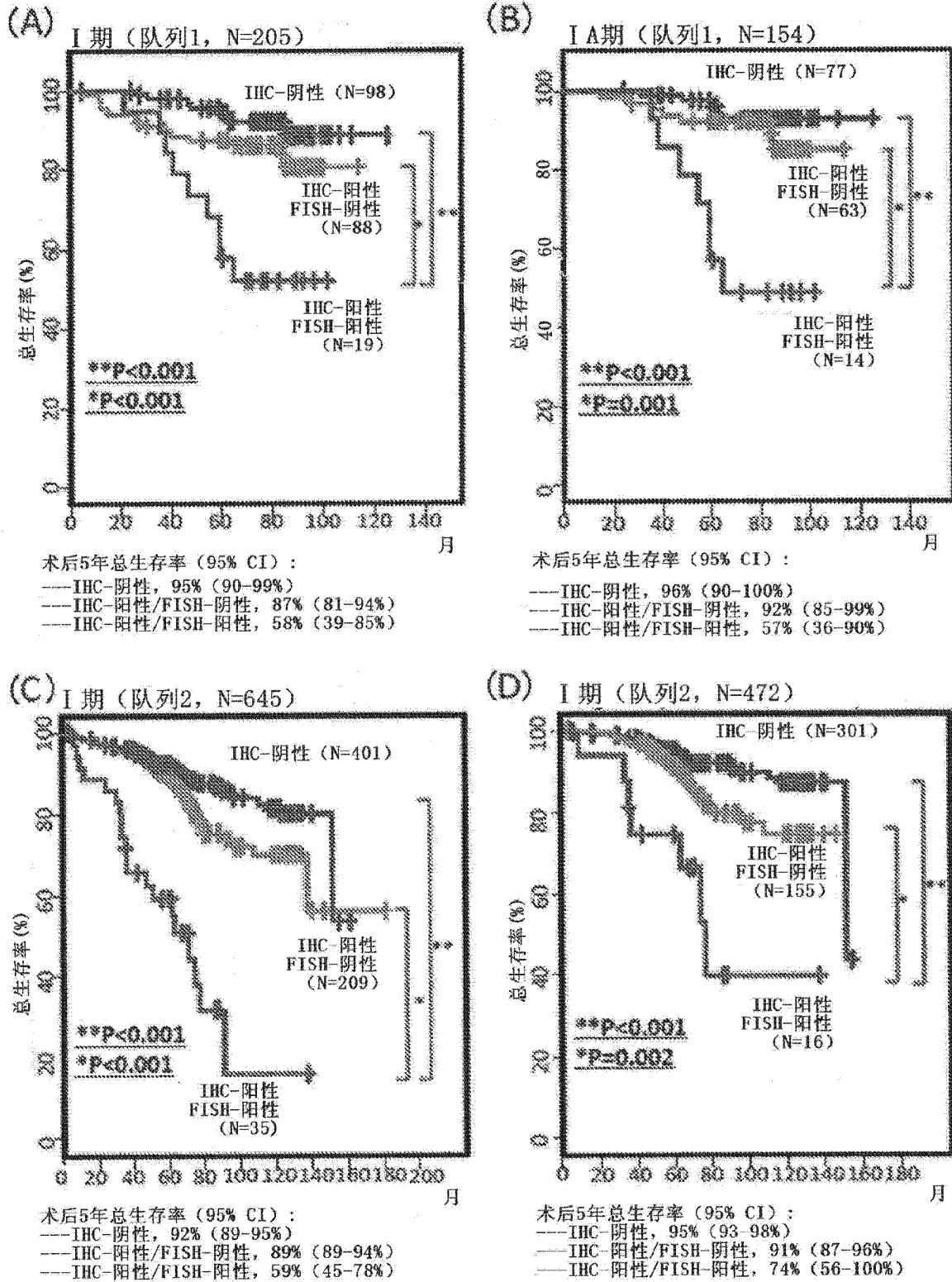


图 9

专利名称(译)	肺腺癌的预后预测方法、肺腺癌的检测试剂盒以及用于治疗肺腺癌的医药组合物		
公开(公告)号	CN102947446A	公开(公告)日	2013-02-27
申请号	CN201180015422.0	申请日	2011-03-29
[标]发明人	本田一文 山田哲司 野吕林太郎 广桥说雄		
发明人	本田一文 山田哲司 野吕林太郎 广桥说雄		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7105 A61K31/713 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61K31/7105 G01N33/57423 C12Q2600/156 G01N2800/56 C12Q1/6886 A61K31/713 C12Q2600/118 A61P35/00		
代理人(译)	贾玉 李志东		
优先权	2010078772 2010-03-30 JP		
其他公开文献	CN102947446B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种肺腺癌的预后预测方法、肺腺癌的检测试剂盒以及用于治疗肺腺癌的医药组合物，所述肺腺癌的预后预测方法为通过检测在哺乳动物中的预后不良的I期肺腺癌来预测预后的预后预测方法，测定由所述哺乳动物得到的I期肺腺癌组织的细胞中的ACTN4的复制数。当所述基因的复制数超过4时，预测为来自所述哺乳动物的I期肺腺癌为预后不良的I期肺腺癌。

变数	N	单变量解析			多变量解析		
		风险比	95%可靠区间	P	风险比	95%可靠区间	P
性别(男性/女性)	182/190	2.1011	1.2388-3.5634	0.00588	1.581	0.8484-2.9462	0.149198
年龄(65 以上/不到 65)	200/172	2.5009	1.4286-4.3783	0.00134	2.3074	1.3012-4.0916	0.00422
吸烟(无/有)	165/207	2.3957	1.4203-4.0410	0.00106	1.7603	0.9562-3.2403	0.069338
阶段(IA/IB)	295/77	2.6628	1.5773-4.4953	0.00025	1.9322	1.1150-3.3483	0.01887
血清 CEA(> 5ng/mL/ ≤5ng/mL)	62/310	3.0656	1.8055-5.2049	3.4E-05	2.1566	1.2491-3.7237	0.00581
淋巴管侵袭(阳性/阴性)	199/173	2.8852	1.7313-4.8082	4.8E-05	2.5643	1.5066-4.3646	0.00052
静脉侵袭(阳性/阴性)	106/263	2.5171	1.5221-4.1624	0.00032	1.4718	0.8629-2.5105	0.156032
α-辅肌动蛋白-4 蛋白质表达(阳性/阴性)	199/173	2.1146	1.2196-3.6664	0.00765	2.1153	1.1955-3.7425	0.01007