

國立台灣大學醫學院

臨床醫學研究所碩士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

Roundabout 4 在原發性急性骨髓性白血病的研究

Expression of Roundabout 4 in
bone marrow mononuclear cells from
de novo acute myeloid leukemia patients and
its clinical significance

研究生：陳尹愷

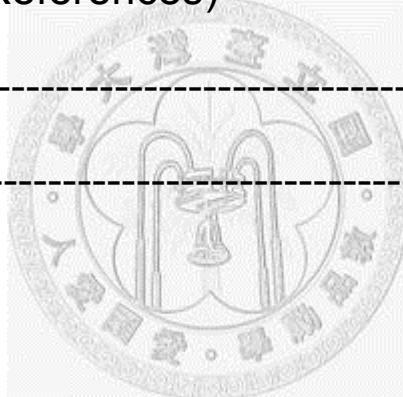
(Yin-Kai Chen)

指導教授：田蕙芬教授

(Prof. Hwei-Fang Tien)

中華民國一百零一年八月

一、中文摘要(Chinese Abstract)-----	I
二、英文簡述(English Summary)-----	IV
三、緒論(Introduction)-----	P1
四、研究方法與材料(Methods and Materials)-----	P6
五、結果(Results)-----	P10
六、討論(Discussion)-----	P12
七、展望(Perspective)-----	P14
八、參考文獻 (References)-----	P15
九、表(Tables)-----	P21
十、圖(Figure)-----	P26



一. 中文摘要

Roundabout 4 (Robo4) 是一種僅被發現存在於造血幹細胞及血管內皮細胞的膜蛋白。最近的研究發現造血幹細胞 Robo4 的表現與其在骨髓微環境中維持造血穩態有密切關係。

骨髓微環境(bone marrow microenvironment, niche)提供了造血幹細胞(hematopoietic stem cell, HSC)進行自我更新(self-renewal)、冬眠(quiescence)、歸巢(homing)與植入(engraftment)、分化(differentiation)及增生的特殊環境。愈來愈多的研究顯示骨髓微環境可能與急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)的致病機轉(leukemogenesis)有關。

至今尚無針對 Robo4 是否表現於急性骨髓性白血病細胞的研究。因此為了解急性骨髓性白血病細胞 Robo4 表現的高低與急性骨髓性白血病患者臨床表現及預後、分子生物學特徵如細胞表面標記、染色體及非染色體基因異常等的關聯性，我們利用即時定量聚合酶連鎖反應合成法(real-time quantitative polymerase chain reaction, RQ-PCR)分析急性骨髓性白血病患者初診斷時骨髓(bone marrow, BM)檢體中 Robo4 mRNA 的表現。

骨髓檢體來自 1995 年至 2006 年間於台大醫院血液科診斷為急性骨髓性白血病且接受標準化學治療的病患共計 148 位，藉由即時定量聚合酶連鎖反應合成(RQ-PCR)的方法分析初診斷時骨髓單核細胞 Robo4 mRNA 的表現。臨床表現分析包含性別、年齡、FAB 分類、初診斷時的周邊白血球及芽細胞(blast)數目、血色素、血小板數目、LDH 數值、染色體變化及預後影響的評估。分析 Robo4 mRNA 表現的高低與總體存活期(overall survival)、無病存活期(disease-free survival)、緩解率(remission rate)的相關性來評估其對預後的影響。

148 位病患中有 78 位是男性、70 位是女性，中位數年齡為 46 歲。研究結果發現急性骨髓性白血病患者初診斷時骨髓單核細胞 Robo4 mRNA 的表現都顯著高於正常對照組($P=0.0016$)。以 0.010 (*Robo4/RPLP0*) 作為閥值(cut-off

value)，患者分成 Robo4 高表現 (n=61) 與低表現 (n=87) 兩組。臨床表現方面，兩組的性別、年齡、初診斷時周邊白血球及芽細胞數目、血色素、血小板數目、LDH 數值無顯著差。表面標記特徵方面，Robo4 高表現病患的急性骨髓性白血病呈 HLA-DR 陽性(85.0% vs. 62.4%, P=0.003) 及 CD56 陽性(30.0% vs. 8.4%, P=0.001) 的比例顯著較高。

142 位 (96 %) 病患具初診段時有效的傳統染色體分析結果，其中 67 位 (47.2 %) 檢出同源性染色體異常。Robo4 高表現的病患發生 t(8;21) 的頻率(20% vs. 2.3%, P=0.0009) 顯著較高，t(15;17) 的頻率則顯著較低(1.6% vs. 14.9%, P=0.0081)。在染色體檢查無法驗出異常的基因變異方面，Robo4 高表現的病患發生 DNMT3A 突變的頻率 (P=0.0543) 顯著較高，CEBPA^{double mutation} 的頻率 (P=0.024) 則顯著較低。

148 位病患中有 107 位 (72.3%) 在接受標準治療後達到完全緩解 (complete remission, CR)。在病患的預後方面，Robo4 高表現的病患有治療效果較差的傾向 (CR rate, 63.9% vs. 78.2%, P=0.0643)。在中位數為 31 個月的追蹤期內 (範圍介於 1.0 至 160 個月)，Robo4 高表現病患的總體存活期 (中位數, 17.0 個月 vs. 95.0 個月, P =0.023) 及無病存活期 (中位數, 5.0 個月 vs. 15.0 個月, P=0.024) 均顯著較差；分析其中 99 位中度風險染色體核型 (intermediate-risk cytogenetics) 的病患，Robo4 高表現病患的總體存活期 (中位數, 13.5 個月 vs. 95.0 個月, P=0.007) 及無病存活期 (中位數, 4.0 個月 vs. 10.0 個月, P=0.025) 也顯著較差。

Cox proportional hazards 多變項分析可以發現，年齡大於 50 歲、初診斷時周邊白血球數目大於 50,000/ μ L、預後不佳之染色體核型 (unfavorable cytogenetics) 及 Robo4 的高表現 (Hazard ratio 1.779, 95% CI 1.005-3.149, P=0.048) 為總體存活期較差的獨立預後預測因子，CEBPA^{double mutation} 與 NPM1^{mutation+}/FLT3-ITD^{mutation-} 則為總體存活期較佳的獨立預後預測因子；年齡大於 50 歲、初診斷周邊白血球數目大於 50,000/ μ L、預後不佳之染色體核型 (unfavorable cytogenetics) 及 Robo4 的高表現 (Hazard ratio 1.779, 95% CI

$1.005-3.149$, $P=0.048$) 也是無病存活期較差的獨立預後預測因子， $CEBPA^{\text{double mutation}}$ 與 $NPM1^{\text{mutation}+}/FLT3\text{-ITD}^{\text{mutation}-}$ 則也是無病存活期較佳的獨立預後預測因子。

本次研究的結果顯示急性骨髓性白血病患者初診斷時骨髓單核細胞 Robo4 mRNA 的高表現為預後不佳的象徵；總體存活期的預後預測在中度風險染色體核型的病患顯得更有意義。在白血病致病機轉 (leukemogenesis) 中，Robo4 本身的作用機轉及其與 $t(8;21)$ 、 $DNMT3A$ 突變的交互作用值得進一步研究。



二. 英文摘要 (English Abstract)

Background and Purpose

Roundabout 4 (Robo4) is a transmembrane protein expressed specifically in endothelial cells and hematopoietic stem cells (HSCs). Recently, *Robo4* expression was shown to be tightly associated with bone marrow (BM) microenvironment and involved in HSC homeostasis. BM microenvironment provides support for self-renewal, quiescence, homing, engraftment and proliferative potential for HSCs. Emerging evidence suggested that BM microenvironment may play a role in the leukemogenesis of acute myeloid leukemia (AML). Till now, there has been no study concerning the prognostic implication of Robo4 expression in *de novo* AML.

Methods and Materials

We investigated the RNA expression of genes encoding Robo4 by real-time quantitative polymerase chain reaction in the BM from a cohort of 148 newly diagnosed *de novo* AML patients who received standard conventional chemotherapy and 20 healthy BM donors at the National Taiwan University Hospital. The expression of the target gene was normalized to that of the housekeeping gene *RPLP0*. The result was correlated with clinical features, cytogenetics, other genetic alterations and treatment outcomes.

Results

Among the 148 AML patients recruited, 78 were males and 70 were females with a median age of 46 years. Median levels of Robo4 expression were significantly higher in AML patients than in normal BM donors ($P=0.0016$). The patients were then divided into two groups, one with low expression of Robo4 ($n=87$) and the other with high expression ($n=61$), by using a cut-off point of 0.010 ($Robo4/RPLP0$). There was no difference in age, gender, hemogram and LDH levels between the patients

with high and low Robo4 expression. Patients with high Robo4 expression had higher incidence of HLA-DR and CD56 expression on the leukemia cells (85.0% vs. 62.4%, P=0.003 and 30.0% vs. 8.4%, P=0.001, respectively). However, there was no difference in the expression of other antigens between the patients with high and low Robo4 expression.

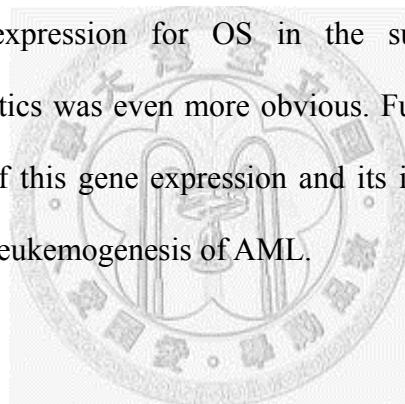
Chromosome data were available in 142(96%) patients at diagnosis and clonal chromosomal abnormalities were detected in 67 patients (47.2%). High Robo4 expression was closely association with chromosomal abnormalities t(8;21), but inversely correlated with t(15;17) (20% vs. 2.3%, P=0.0009 and 1.6% vs. 14.9%, P=0.0081, respectively). To investigate the interaction between *Robo4* expression and other genetic alterations in the pathogenesis of AML, a mutational screening of 16 other genes was also performed. We found that Robo4 expression was significantly higher in AML patients with *DNMT3A* mutation (P=0.0543), but lower in those with *CEBPA* mutation (P=0.0240).

Among the 148 AML patients, 107 (72.3%) patients achieved a complete remission (CR) after standard intensive chemotherapy. High Robo4 expression was associated with a trend of inferior response (CR rate, 63.9% vs. 78.2%, P=0.0643). With a median follow-up of 31 months (ranges, 1.0-160), patients with high Robo4 expression had significantly poorer overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) than those with low Robo4 expression (median, 17.0 months vs. 95.0 months, P =0.023, and medium, 5.0 months vs. 15.0 months, P=0.024, respectively). In the subgroup of 99 patients with intermediate-risk cytogenetics, the differences between patients with high and low Robo4 expression in OS (median, 13.5 months vs. 95.0 months, P= 0.007) and DFS (median, 4.0 months vs. 10.0 months, P=0.025) were still significant. In multivariate analysis, the independent poor risk factors for OS were older age > 50 years, high WBC count >50,000/ μ L, unfavorable karyotype, and high

Robo4 expression (Hazard ratio 1.779, 95% CI 1.005-3.149, P=0.048). On the other hand, *CEBPA*^{double mutation} and *NPM1*^{mutation+}/*FLT3-ITD*^{mutation-} were independent favorable prognostic factors. The independent poor risk factors for DFS included older age > 50 years, high WBC count >50,000/ μ L, unfavorable karyotype, and high Robo4 expression (Hazard ratio 1.600, 95% CI 1.026-2.495, P=0.038). *CEBPA*^{double mutation} and *NPM1*^{mutation+}/*FLT3-ITD*^{mutation-} were also independent favourable factors for DFS.

Conclusion

Our results demonstrated that high pre-treatment expression of Robo4 in the BM indicates an unfavorable prognosis in *de novo* AML patients and the prognostic significance of Robo4 expression for OS in the subgroup of patients with intermediate-risk cytogenetics was even more obvious. Further studies are needed to explore the mechanisms of this gene expression and its interaction with t(8;21) and *DNMT3A* mutation in the leukemogenesis of AML.



三. 緒論 (Introduction)

研究背景與文獻回顧

Roundabout (Robo) 家族是一群具高度保留性的(highly conserved) 跨膜蛋白，為免疫球蛋白超家族 (immunoglobulin superfamily) (1)。Robo1、Robo2 和 Robo3 的構造相似，細胞外的部分包含了 5 個免疫球蛋白區域(immunoglobulin domain) 與 3 個 fibronectins；相較之下，Robo4 細胞外的部分僅包含了 3 個免疫球蛋白區域與 2 個 fibronectins (2)。Slit 為此種跨膜蛋白的配體 (ligand)，有 Slit1、Slit2 和 Slit3 三種。Slit-Robo 訊息傳導路徑最初是在神經軸突生長錐 (axonal growth cones) 的研究中發現的 (3)。Robo4 另一個與其他 Robo 成員不同之處在於 Robo4 最初被認為是內皮細胞特有的 (4)。Bedell VM 等人的斑馬魚實驗發現 Robo4 在胚胎的血管增生 (angiogenesis) 作用中是不可缺少的 (5)。Jones CA 等人利用小鼠的視網膜疾病動物模型發現 Slit2-Robo4 透過抑制與血管增生有關的第 2 型血管內皮生長因子受體 (vascular endothelial growth factors receptor 2, VEGFR-2) 路徑維持血管網路的完整性 (4)。Marlow R 等人的小鼠乳腺實驗則發現 Slit2-Robo4 藉由下調 (down-regulate) 下游的 Src 及 FAK 家族 kinases 抵銷 (counteract) VEGF-VEGFR 作用 (6)。在腦、膀胱和結腸來源的肝轉移等惡性腫瘤內的血管中，可以明顯地發現 Robo4 的表現 (7)；晚期非小細胞肺癌病患治療前血漿中 Robo4 濃度的高低可能和預後有關 (8)。

Shackney 於 1975 年描述了骨髓內的細胞發展梯度 (gradient of cell development) (9)，他發現位於骨髓膜 (endosteum) 區域的未分化細胞往血管豐富的骨髓腔移動，與細胞的分化 (differentiation) 與成熟有關。Schofield 則於 1978 年提出骨髓微環境 (marrow microenvironment，又稱 niche) 的概念 (10)，他認為造血幹細胞存在於一個功能與空間上特異的微環境，避免幹細胞的分化並維持它們的增殖。陸續發表的研究也支持骨髓內具有調控造血幹細胞靜止狀態 (quiescence) 的骨髓膜微環境 (endosteal niche) (11, 12) 及可能與造血幹細胞分化有關的血管微環境 (vascular niche) (13, 14)。

CXCR4 是表現在 CD34 陽性骨髓單核細胞及白血病細胞的一種 chemokine 受體，stromal cell-derived factor-1 (SDF-1，也就是 CXCL12) 為其配體 (15)，CXCL12-CXCR4 以細胞自主性的方式 (cell autonomous manner) 參與造血幹細胞於微環境中靜止狀態及造血幹細胞庫 (HSC pool) 的維持 (16, 17)。Avecilla ST 等人發現阻斷 CXCR4 會抑制巨核細胞 (megakaryocyte) 往血管微環境移動並逐漸分化成血小板的過程 (14)。臨床研究則發現 CD34 陽性急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia，AML) 患者治療前 CXCR4 表現較高是一個總體存活期 (overall survival ，OS) 較差的獨立預後因子(18, 19)。

骨髓血管增生現象的增加可見於急性骨髓性白血病患者 (20, 21)。Padró T 等人也發現急性骨髓性白血病患者骨髓的 VEGF 及 VEGFR-2 有過度表現的現象 (22)。台大血液病田教授研究團隊藉由骨髓動態核磁共振 (dynamic MRI) 檢查 (23) 、骨髓 angiopoietin-2 mRNA 表現 (24) 進一步發現骨髓血管增生現象的增加為急性骨髓性白血病患者總體存活期較差的獨立預後因子。白血病細胞 (22) 與骨髓微環境 (25) 藉由不同的血管增生因子及調節因子對白血病骨髓的血管增生現象貢獻相同，其中有愈來愈多的證據顯示 CXCL12-CXCR4 與骨髓血管增生的調節有關 (26)。

Colmone A 等人證明了白血病幹細胞 (leukemic stem cell) 將正常的造血骨髓微環境改造成惡性的微環境，正常的造血幹細胞身處其中會有異常的行為 (27)。Lane SW 等人也認為白血病幹細胞藉由直接入侵及物質分泌破壞正常造血幹細胞的微環境、干擾與 CXCL12-CXCR4 有關的歸巢 (homing) 及植入 (engraftment) 作用，劫持並改變了整個微環境，以利維持靜止狀態並增加增殖及自我更新 (self-renewal) 的能力 (28)。Meads MB 等人進一步提出了與骨髓微環境有關的抗藥性機轉、癌症細胞歸巢與植入微環境後，藉由特定血清因子 (soluble factor) 及細胞黏附 (cell adhesion) 兩種機轉產生抗藥性 (29)。

1988 年第一個分離出小鼠造血幹細胞的 Irving Weissman 的團隊於 Stanford University 陸續成功地找出長期造血幹細胞 (long-term HSCs, LT-HSCs) 、 短期

造血幹細胞 (short-term HSC, ST-HSCs) 與 multi-potent progenitors (MPPs) 的表面標記。 Irving Weissman 團隊的研究發現這三種造血幹細胞的分化能力相似，但以長期造血幹細胞的自我更新與增殖能力最強，Robo4 的表現也最高 (30)。 Shibata F 等人的研究顯示造血幹細胞上的 Robo4 與維持造血幹細胞的穩態 (homeostasis) 有關 (31)。 Smith-Berdan S 等人進一步的研究發現 Robo4 的表現侷限在與微環境關係密切的造血幹細胞，沒有表現 Robo4 的造血幹細胞骨髓植入能力不佳但分化能力不受影響，CXCR4 會上調以彌補 Robo4 的丟失 (32)。 Irving Weissman 團隊的另一項造血幹細胞基因表現印記的研究則發現了 Robo4 在造血幹細胞與白血病幹細胞差異化的表現 (33)。

臨床應用上，針對準備接受自體造血幹細胞移植的多發性骨髓瘤 (multiple myeloma) (34) 及非何杰金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma) (35) 病患，已有第三期臨床試驗證實 plerixafor (CXCR4 拮抗劑) 與 G-CSF 合併使用較單獨使用 G-CSF 更為有效地收集到自體造血幹細胞移植，美國食品藥物管理局(FDA) 也已於 2008 年 11 月核准 plerixafor 與 G-CSF 合併使用於上述的病患及用途。針對復發或頑固性急性骨髓性白血病患者，利用 plerixafor 干擾 CXCL12-CXCR4 來增加化學治療敏感度的第一/二期臨床試驗之療效是可以期待的 (36)。

Robo4 最初被認為是血管內皮細胞特有的細胞膜受體，它藉由抑制不正常的血管增生來維持血管網路的穩定。陸續發表的研究發現 Robo4 也存在於造血幹細胞 (30-32)。其中 2011 年的研究也同時發現 Robo4 藉由與 CXCR4 交互作用來調節造血幹細胞在微環境中的位置與歸巢過程 (32)。 CXCR4 表現的高低與 CD34 陽性急性骨髓性白血病患者的預後有關 (19)，CXCR4 拮抗劑的臨床應用範圍也愈來愈廣(34-36)。文獻回顧後發現急性骨髓性白血病細胞是否有 Robo4 的表現從未被報告過。本研究的主要目的是研究 Robo4 在初診斷急性骨髓性白血病細胞的表現，並分析 Robo4 表現的高低對急性骨髓性白血病患者預後的影響。

研究的問題及重要性

本研究主題主要是探討 Robo4 這個與血管增生，特別是病態性血管增生調節有關的細胞膜受體是否表現在急性骨髓性白血病細胞。利用定量聚合酶連鎖反應合成 (real-time quantitative PCR,RQ-PCR)的方法，分析急性骨髓性白血病患者初診斷時骨髓單核細胞(marrow mononuclear cell) Robo4 mRNA 的表現高低，臨床的分析指標包含性別、年齡、初診斷時周邊白血球數目與芽細胞量、血色素、血小板數及 LDH，Robo4 表現的高低與 FAB 分類、染色體變化及 class I/II 基因突變是否有關也是分析的重點。治療效果的分析則包含 Robo4 表現的高低與完全緩解率 (complete remission rate)、總體存活期 (overall survival)、無病存活期 (disease-free survival) 的關聯性。

預後預測因子對急性骨髓性白血病患者達第一次完全緩解率後鞏固治療的選擇十分重要，特別是異體造血幹細胞移植的進行與否。染色體的變化是目前最有力的預測因子 (37)，然而近半數的病患被歸類為染色體正常 (38)。一些與細胞存活、增殖或分化有關的基因突變陸續被發現與急性骨髓性白血病患者的預後有關 (39) 外，骨髓微環境中的基質細胞 (stromal cell) 具有刺激急性骨髓性白血病細胞增殖與分化的能力也受到注意 (40)。骨髓基質細胞與造血幹細胞交互作用所依賴的 CXCR4 與 CD34 陽性急性骨髓性白血病患者的預後有關，在骨髓微環境中與 CXCR4 關係密切的 Robo4 是否可以作為新的急性骨髓性白血病預後的預測因子，甚至成為治療的標的，改變急性骨髓性白血病患的治療方式，是值得進一步探討的。

研究的假說與目的

目前 Robo4 這個細胞膜受體，在急性骨髓性白血病方面的研究甚少，臨床上的應用也不甚清楚。因此本次研究假說為：

白血病的發生被認為是造血幹細胞累積了多重癌化事件 (transforming events) 的結果 (41) ，我們認為造血幹細胞特有的 Robo4 可能存在於急性骨髓性白血病細胞中並影響患者的預後。

研究的目的：

- (一) 利用即時定量聚合酶連鎖反應合成法分析初診斷急性骨髓性白血病患者 Robo4 mRNA 的表現高低。
- (二) 分析病患的臨床表現及預後是否和 Robo4 的表現有關。
- (三) Robo4 表現的高低與已知的急性骨髓性白血病主要預後預測因子間的交互作用是否會影響病患的臨床預後。



四. 研究方法及材料

(一) 研究對象

連續性地收集了 148 位於 1995 年至 2006 年間在國立台灣大學醫學院附設醫院被診斷為原發性(*de novo* AML) 之大於 15 歲的病患。急性骨髓性白血病的分類是依照 FAB (French-American-British) classification, 並參考白血病細胞的細胞化學染色 (cytochemical stain) 、表面抗原分析 (surface marker or immunophenotype) 及骨髓病理切片報告。這些病患都是接受標準的緩解誘導 (remission induction) 化學治療，也就是三天的 anthracycline (idarubicin or daunorubicin) 加上七天的 cytarabine；達到緩解後再接受高劑量 cytarabine (with or without anthracycline) 為主的鞏固性 (consolidation) 化學治療。收案病患的中位數追蹤時間為 31 個月。這項研究已通過台大醫院倫理委員會 (IRB) 的核准，同時病患皆簽署同意書。

這些病患初診斷時骨髓單核細胞 Robo4 的 mRNA 表現高低為本次研究的主要標的。

(二) 檢體的收集及處理

所有急性骨髓性白血病病患及健康者(骨髓捐贈者)之骨髓檢體，皆以 Heparin 為抗凝血劑之方式收集，將所得的骨髓檢體以 3000 rpm 的方式離心 10 分鐘，取出上清液的血清保存於 -80 °C 中。在 5 ml 的 Ficoll solution 上緩慢加入 10 ml 的骨髓稀釋液，以 400 g 的轉速離心 30 分鐘，此時位於試管中層的白色環狀物，即是單核球-淋巴球層，再用吸管將此層細胞吸出後，用適量體積之 PBS 溶液進行清洗，然後進行離心且去除上清液，最後再用適量體積之 PBS 溶液將沉澱物形成懸浮液，計算細胞數量且分裝，大約 10^7 個細胞放置入一個 eppendorf tube 中，離心後加入 TRIzol 後保存於 -80 °C 中。

(三) RNA 萃取

(a) 在 1.5 mL 之微量離心管 (eppendorf tube) 中取 10^7 個培養細胞，溶於 1 ml TRIzol 分離試劑中，以吸管將溶液均質化。（此步驟會使細胞溶解，並

使細胞內 RNA 和蛋白質之結合物解離。)

- (b) 加入 0.2 ml chloroform，並均勻搖盪 15 秒，重新靜置於冰上 5 分鐘。
- (c) 然後於 4 °C 14,000 rpm 離心 15 分鐘。
- (d) 離心後，萃取液會分成上面的水層及下面的有機層(在酸性萃取條件下，RNA 會在水層，而 DNA 及蛋白質會在有機層或介面層)。
- (e) 小心吸取上層液至另一微量離心管，加入等體積 isopropanol，混和均勻後，置於 4 °C 15 分鐘。(此步驟會使 RNA 沉澱。)
- (f) 於 4 °C 14,000 g 離心 15 分鐘。(使 RNA 沉澱)
- (g) 小心倒掉上清液，留下底部少量 RNA 白色沈澱。
- (h) 以 200 ml 75 % 酒精清洗管壁，輕微搖晃，於 4 °C 14,000 g 離心 10 分鐘。
- (i) 倒掉上清液，將微量離心管倒置，使殘留的酒精揮發 (5-10 分鐘即可)，勿使 RNA 完全乾燥，否則不易回溶。
- (j) 以 DEPC (diethylpyrocarbonate) 處理過的水，將 RNA 白色沈澱完全回溶。
- (k) 取少量 RNA 溶液經適當稀釋後，以分光光度計測波長 260 nm 與 280 nm 之吸光值，以計算所抽出 RNA 之濃度與純度。



(四) 反轉錄聚合酶連鎖反應合成 cDNA

(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

- (a) 在一個 0.2 ml 的微量離心管內加入 3 µg 的 total RNA，再以 DEPC 處理過的水補到總體積為 10 µl。
- (b) 加入 1 µl 的 random hexamer 及 dNTP (10 mM) 1 µl 且混合均勻，將此微量離心管加熱至 65 °C 5 分鐘，然後快速置於冰上。
- (c) 再加入以下物質 (5 X reverse transcriptase buffer 4 µl + DTT 0.1 M 2 µl + RNaseOut (20 U) 1 µl 混合均勻，將此微量離心管培養於室溫下 2 分鐘。

(d)加入反轉錄酵素 (SSRT, 200 unit) 1 μ l，置於 25 °C 10 分鐘，放入 PCR 機器中，進行下列溫度反應：25°C 10 分鐘 → 42 °C 50 分鐘→70 °C 15 分鐘，保存於 -70 °C。

(五) 即時定量聚合酶連鎖反應合成法

(Real-time quantitative polymerase chain reaction, RQ-PCR)

- (a) 骨髓檢體來自這 148 位病患初診斷時的採檢及 20 位健康對照組。
- (b) 採用即時 Taqman® RQ-PCR (ABI, USA) on ABI Prism 7500 machine。
- (c) 每次操作採用 Taqman® fast universal master mix 均勻混合 1 μ L cDNA 樣本成 10 μ L 的反應液。
- (d) 每次操作的反應溫度與條件為 50 °C 2 分鐘，95 °C 10 分鐘，95 °C 15 秒進行 40 循環，60 °C 1 分鐘。
- (e) 利用 U937 cell line 製作質體 (cloning of amplification products into the pCRII Vector using the plasmid miniprep purification kit)，同時完成標準曲線 (housekeeping gene *RPLP0*)。
- (f) 每個檢體至少獨立操作二次，Robo4 的數值利用 housekeeping gene (*RPLP0*) 紣正。兩次數值的標準差大於 0.5 則重複獨立操作，取標準差不大於 0.5 的二次數值的平均使用。
- (g) Taqman® assays for Robo4 (Hs00219408_m1*)。

(六) 染色體分析方法 (Karyotypic analysis)

染色體的分析是採用骨髓細胞經非刺激操作之培養法，培養一天至三天 (42)，再採用 International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 命名法判讀。

(七) 基因突變分析方法 (Mutation analysis)

16 個基因突變分析方法為參考引用文獻所述，class I 如 *FLT3*-ITD 及 *FLT3*-TKD (43)、*N-RAS* 及 *K-RAS* (44)、*KIT*、*WT1* (45) 及 *PTPN11* (46)，class II 如 *MLL*-PTD (47)、*CEBPA* (48)、*NPM1* (49) 及 *AML1* (50)，class III 如

DNMT3A (51) 、*ASXL1* (52) 、*TET2* (53) 、*IDH1* (54) 及 *IDH2* (55) 。

(八) 統計分析與方法

- (a) 利用 Mann-Whitney *U* test 的方法來比較健康對照組骨髓與急性骨髓性白血病患者初診斷骨髓 Robo4 mRNA 的表現高低。
- (b) 利用 sequential cutting 選取 Robo4 mRNA 表現高低的閥值 (cut-off value)，再以 bootstrap resampling 驗證閥值。
- (c) 針對 Robo4 表現高低兩組間 categorized variables 的比較是採用 Fisher's exact test ；continuous variables 的比較是採用 Mann- Whitney *U* test 。
- (d) 總體存活期 (overall survival, OS) 是從初診斷時間到因任何原因死亡的時間；無病存活期 (disease-free survival, DFS) 是從第一次緩解到復發、死亡或研究時間終止的時間。利用 Kaplan-Meier estimation 繪製存活曲線，同時以 Log-Rank test 比較存活曲線是否有統計學上的顯著差異。
- (e) 針對總體存活期與無病存活期的多變項獨立因子分析是採用 hazard ratio and 95% confidence interval (CI) by Cox proportional hazards regression models 。
- (f) Two-sided P 值小於 0.05 被視為有統計學上的顯著差異。
- (g) 所有統計的分析是採用 SPSS 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 、 SAS 9 及 StatsDirect (United Kingdom) 。
- (h) 為了避免造血幹細胞移植治療本身的相關致死率干擾治療預後的評估，針對接受造血幹細胞移植的病患，存活期分析以病患接受幹細胞回輸當日為刪節 (censor) 。

五. 結果

(一) 研究者-急性骨髓性白血病病患的特性

所有 148 位的急性骨髓性白血病病患(詳見表一)皆是接受標準治療。78 位男性及 70 位女性，中位數年齡為 46 歲 (病患年紀從 15 歲到 82 歲)，其中有 107 位 (72.3 %) 接受標準化學治療後達到完全緩解 (complete remission, CR)。在平均追蹤 31 個月後，共有 56 位 (37.8 %) 維持在無疾病狀況中 (disease-free status)。追蹤期中仍存活的病患中，中位數總體存活期為 17.5 個月。此外，在引導治療過程中共造成 11 位病患死亡 (induction death)。

(二) Robo4 mRNA 的表現與健康對照組 (normal control) 及急性骨髓性白血病患者的差異

我們將 Robo4 mRNA 的表現與 housekeeping gene (*RPLP0*) 的比率作為基準值，儘管 Robo4 的數值在不同個體間有相當的差異，利用 Mann-Whitney U test 的分析發現：急性骨髓性白血病患者 Robo4 表現的 median level 大於健康對照組，達統計學上的顯著差異 ($P=0.0016$) (詳見圖一)。

(三) Robo4 mRNA 的表現與臨床及生物學表徵的關連性

將病患 Robo4 mRNA 的表現值以 0.010 (*Robo4/RPLP0*) 作為閥值，患者分成 Robo4 高表現 ($n=61$) 與低表現 ($n=87$) 兩組。

臨床表現方面，兩組的性別、年齡、初診斷時周邊白血球及芽細胞數目、血色素、血小板數目、LDH 數值無顯著差(詳見表一)。細胞表面標記特徵方面，Robo4 高表現病患的急性骨髓性白血病細胞呈 HLA-DR 陽性 (85.0% vs. 62.4%, $P=0.003$) 及 CD56 陽性 (30.0% vs. 8.4%, $P=0.001$) 的比例顯著較高(詳見表二)。

142 位 (96 %) 病患具初診斷時有效的傳統染色體分析結果，其中 67 位 (47.2 %) 檢出同源性染色體異常。Robo4 高表現的病患發生 t(8;21) 的頻率 (20% vs. 2.3%, $P=0.0009$) 顯著較高，t(15;17) 的頻率則 (1.6% vs. 14.9%, $P=0.0081$) 顯著較低(詳見表三)。在與細胞存活、增殖或分化有關的基因變異方面，Robo4 高表現的病患發生 *DNMT3A* 突變的頻率 (21.3% vs. 9.2%, $P=0.0543$) 顯著較高，呈正相關(詳見表四)。*CEBPA*^{double mutation} 的頻率 (5.0% vs. 17.2%, $P=0.024$) 則顯著

較低，呈負相關（詳見表四）。

（七）Robo4 mRNA 的表現與預後的相關分析

Robo4 高表現的病患接受標準化學治療後達到完全緩解的比率有較低的傾向 (63.9 % vs. 78.2%, P=0.0643)。

在中位數為 31 個月的追蹤期間（範圍介於 1.0 至 160 個月），Robo4 高表現病患的總體存活期（中位數，17.0 個月 vs. 95.0 個月，P=0.023）及無病存活期（中位數，5.0 個月 vs. 15.0 個月，P=0.024）均顯著較差（詳見圖二）；分析其中 99 位中度風險染色體核型 (intermediate-risk cytogenetics) 的病患，Robo4 高表現病患的總體存活期（中位數，13.5 個月 vs. 95.0 個月，P =0.007）及無病存活期（中位數，4.0 個月 vs. 10.0 個月，P=0.025）也顯著較差（詳見圖三）。

Cox proportional hazards 多變項分析（詳見表五）可以發現，年齡大於 50 歲、初診斷周邊白血球數目大於 50,000/ μ L、預後不佳的染色體核型 (unfavorable cytogenetics) 及 Robo4 的高表現 (Hazard ratio 1.779, 95% CI 1.005-3.149, P=0.048) 為總體存活期較差的獨立預後預測因子，*CEBPA*^{double mutation} 與 *NPM1*^{mutation+}/*FLT3-ITD*^{mutation-} 則為總體存活期較佳的獨立預後預測因子；年齡大於 50 歲、初診斷周邊白血球數目大於 50,000/ μ L、預後不佳的染色體核型 (unfavorable cytogenetics) 及 Robo4 的高表現 (Hazard ratio 1.779, 95% CI 1.005-3.149, P=0.048) 也是無病存活期較差的獨立預後預測因子，*CEBPA*^{double mutation} 與 *NPM1*^{mutation+}/*FLT3-ITD*^{mutation-} 則也是無病存活期較佳的獨立預後預測因子。

六. 討論

這是第一篇探討 Robo4 在急性骨髓性白血病細胞表現的研究。我們發現與健康對照組的骨髓相比，Robo4 在新診斷急性骨髓性白血病患者的骨髓單核細胞表現較高，病患間 Robo4 的表現高低也有差異，研究結果指出 Robo4 表現高的病患經標準化學治療後達完全緩解的比例有較低的趨勢 ($P=0.0643$)，意味著 Robo4 表現的高低可能與抗藥性有關。更重要的是，我們發現 Robo4 表現高的病患總體存活期與無病存活期均顯著較差。針對病患年齡大於 50 歲、初診斷時周邊白血球數目大於 $50,000/\mu\text{L}$ 、預後不佳的染色體核型， $CEBPA^{\text{double mutation}}, NPM1^{\text{mutation}+}/FLT3-\text{ITD}^{\text{mutation}}$ 及 Robo4 表現高低的多變項存活分析也指出 Robo4 的表現高低為總體存活期與無病存活期的獨立預後預測因子。我們首度證明了已知與造血幹細胞植入骨髓微環境有關的 Robo4 (32) 在急性骨髓性白血病細胞上的表現，我們的研究則暗示著骨髓微環境中的白血病細胞藉由 Robo4 的細胞黏附作用降低外來的壓力並維持穩態。Robo4 在白血病致病機轉中可能扮演著維持正在癌化成白血病細胞的造血幹細胞穩態並降低外來的壓力。

我們的研究也指出 Robo4 高表現的病患白血病細胞發生 $t(8;21)$ 的頻率 (20% vs. 2.3%, $P=0.0009$) 顯著較高。 $t(8;21)$ 的融合蛋白 (fusion protein) AML1-ETO 藉由抑制 SCL (or tal-1) 的表現改變造血幹細胞的命運(56)。SCL 屬轉錄因子 (transcription factor)，與造血幹細胞分化成紅血球與血小板的過程有關 (56)。與 Robo4 相同的是，SCL 也同時表現於造血及血管系統 (57)。Robo4、AML1-ETO 融合蛋白與 SCL 三者間可能存在的交互作用如何參與白血病致病機轉，值得進一步研究。

白血病細胞表面標記分析發現 Robo4 高表現的病患白血病細胞，其 CD56 呈陽性(30.0% vs. 8.4%, $P=0.001$) 的比例顯著較高；13 位 $t(8;21)$ 急性骨髓性白血病患者中，我們發現 10 位(76.9 %) 的 CD56 呈陽性；Robo4 高表現的 11 位病患中，9 位 (81.8 %) 的 CD56 呈陽性，Robo4 低表現的 2 位病患中，1 位 (50.0 %) 的 CD56 呈

陽性。Schaich M 等人發現 t(8;21) 的急性骨髓性白血病患帶有 MDR1 表現的頻率顯著較高(58)；Yang DH 等人分析了 37 位 t(8;21) 急性骨髓性白血病患者，其中的 25 位 CD56 呈陽性(67.6 %)，這 25 位患者的預後顯著較差 (59)。CD56 呈陽性的 t(8;21) 急性骨髓性白血病患者預後較差是否與 Robo4 的表現高低有關，需要更大規模的研究分析。Robo4 與 MDR1 兩者的表現是否有關，有待進一步研究。

我們的研究中 Robo4 高表現的病患發生 DNMT3A 突變的頻率 (21.3% vs. 9.2%, P=0.0543) 顯著較高。DNMT3A 為 DNA methyltransferases (DNMTs) 的一種，Challen GA 等人的研究顯示 DNMT3A 作用於不同的基因會有 hypo-methylation 或 hyper-methylation 兩種不同的效果 (60)；在缺少 DNMT3A 的造血幹細胞中，與 multi-potency 有關的基因會有上調 (up-regulate) 的現象，與分化有關的基因則有下調 (down-regulate) 的情形(51)。陸續發表的研究指出急性骨髓性白血病患 DNMT3A 突變的發生率為 20 % 上下(51, 61)，在台大血液病田教授研究團隊一項 500 位急性骨髓性白血病患者的研究中，DNMT3A 突變的發生率為 14.0 %，正常染色體核型 (normal karyotype) 病患的發生率則為 22.9 % (62)。DNMT3A 的突變是急性骨髓性白血病患者一個總體存活期較差的獨立預後因子，特別是中度風險染色體核型 (51) 及正常染色體核型的病患 (61, 62)。DNMT3A 突變是否會上調 Robo4 的表現，則須進一步研究。

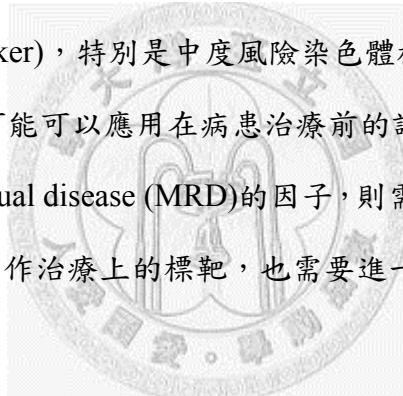
愈來愈多的證據也顯示急性骨髓性白血病的惡化(63)和抗藥性的產生(29)，與白血病細胞和其所身處的骨髓微環境複雜的交互作用有關。在複雜的白血病細胞與骨髓微環境的交互作用中，CXCR4 是目前唯一被發現具有急性骨髓性白血病預後預測價值(18, 19)且已被開發成治療惡性血液疾病的標靶；我們的研究找到了在骨髓微環境中與 CXCR4 關係密切的 Robo4(32)為急性骨髓性白血病患者具潛力的預後預測指標，也再次支持骨髓微環境在急性骨髓性白血病研究的重要性。另一個獨立的急性骨髓性白血病患族群驗證我們的發現是值得的。我們的研究也暗示著 Robo4 的表現調控可能與 AML1-ETO 融合蛋白及 DNMT3A 的突變有關，進一步的釐清三者間的交互作用，應有助於了解骨髓微環境在複雜的白血病致病機轉中扮演的角色。

七. 展望

這是第一篇有關急性骨髓性白血病病患初診斷時骨髓 Robo4 的表現與相關臨床意義的研究。我們的確發現急性骨髓性白血病病患 Robo4 的表現與健康對照組有顯著差異，暗示著 Robo4 在急性骨髓性白血病的致病機轉 (leukemogenesis) 中可能扮演重要的角色。

而針對急性骨髓性白血病患者的預後預測，在中度風險染色體核型的病患，可以運用的因子較少，多半是一些基因的突變 (genetic alterations or mutations)。我們的研究藉著多變項存活分析，更明確指出除了染色體變化外，Robo4 的表現也是一項獨立的預後預測因子。更重要的是，它的預後關聯性在中度風險染色體核型的病患更顯著。換句話說，Robo4 的表現，在急性骨髓性白血病的預後上可以說是一個潛在的生物標記 (biomarker)，特別是中度風險染色體核型的病患。

由於這樣的結果，可能可以應用在病患治療前的評估及治療後的追蹤，至於是否可以當作 minimal residual disease (MRD)的因子，則需進一步檢測治療後的檢體才能明瞭。而是不是可以當作治療上的標靶，也需要進一步的實驗與研究才能知悉。



八. 參考文獻 (References)

1. Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, et al. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell*. 1998;92(2):205-15. Epub 1998/02/11.
2. Wong K, Park HT, Wu JY, Rao Y. Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Current opinion in genetics & development*. 2002;12(5):583-91. Epub 2002/08/30.
3. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. 2005;436(7048):193-200. Epub 2005/07/15.
4. Jones CA, London NR, Chen H, Park KW, Sauvaget D, Stockton RA, et al. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nature medicine*. 2008;14(4):448-53. Epub 2008/03/18.
5. Bedell VM, Yeo SY, Park KW, Chung J, Seth P, Shivalingappa V, et al. roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(18):6373-8. Epub 2005/04/26.
6. Marlow R, Binnewies M, Sorensen LK, Monica SD, Strickland P, Forsberg EC, et al. Vascular Robo4 restricts proangiogenic VEGF signaling in breast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(23):10520-5. Epub 2010/05/26.
7. Huminiecki L, Gorn M, Suchting S, Poulsom R, Bicknell R. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics*. 2002;79(4):547-52.
8. Gorn M, Anige M, Burkholder I, Muller B, Scheffler A, Edler L, et al. Serum levels of Magic Roundabout protein in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*. 2005;49(1):71-6. Epub 2005/06/14.
9. Shackney SE, Ford SS, Wittig AB. Kinetic-microarchitectural correlations in the bone marrow of the mouse. *Cell and tissue kinetics*. 1975;8(6):505-16. Epub 1975/11/01.
10. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*. 1978;4(1-2):7-25. Epub 1978/01/01.
11. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-61. Epub 2004/07/21.
12. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nature medicine*. 2006;12(6):657-64. Epub

2006/05/23.

13. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-21. Epub 2005/07/02.
14. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine*. 2004;10(1):64-71. Epub 2004/01/02.
15. Mohle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 1998;91(12):4523-30. Epub 1998/06/17.
16. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-88. Epub 2006/12/19.
17. Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(4):777-83. Epub 2008/04/02.
18. Rombouts EJ, Pavic B, Lowenberg B, Ploemacher RE. Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;104(2):550-7. Epub 2004/04/01.
19. Spoo AC, Lubbert M, Wierda WG, Burger JA. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2007;109(2):786-91. Epub 2006/08/05.
20. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000;95(1):309-13. Epub 1999/12/23.
21. Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000;95(8):2637-44. Epub 2001/02/07.
22. Padro T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Burger H, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2002;16(7):1302-10. Epub 2002/07/03.
23. Shih TT, Hou HA, Liu CY, Chen BB, Tang JL, Chen HY, et al. Bone marrow angiogenesis magnetic resonance imaging in patients with acute myeloid leukemia: peak enhancement ratio is an independent predictor for overall survival. *Blood*. 2009;113(14):3161-7. Epub 2008/11/08.
24. Hou HA, Chou WC, Lin LI, Tang JL, Tseng MH, Huang CF, et al. Expression of

- angiopoietins and vascular endothelial growth factors and their clinical significance in acute myeloid leukemia. *Leukemia research*. 2008;32(6):904-12. Epub 2007/10/02.
25. Litwin C, Leong KG, Zapf R, Sutherland H, Naiman SC, Karsan A. Role of the microenvironment in promoting angiogenesis in acute myeloid leukemia. *American journal of hematology*. 2002;70(1):22-30. Epub 2002/05/08.
26. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends in immunology*. 2007;28(7):299-307. Epub 2007/06/15.
27. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008;322(5909):1861-5. Epub 2008/12/20.
28. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009;114(6):1150-7. Epub 2009/04/30.
29. Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(9):2519-26. Epub 2008/05/03.
30. Forsberg EC, Prohaska SS, Katzman S, Heffner GC, Stuart JM, Weissman IL. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS genetics*. 2005;1(3):e28. Epub 2005/09/10.
31. Shibata F, Goto-Koshino Y, Morikawa Y, Komori T, Ito M, Fukuchi Y, et al. Roundabout 4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype. *Stem Cells*. 2009;27(1):183-90. Epub 2008/10/18.
32. Smith-Berdan S, Nguyen A, Hassanein D, Zimmer M, Ugarte F, Ciriza J, et al. Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell stem cell*. 2011;8(1):72-83. Epub 2011/01/08.
33. Forsberg EC, Passegue E, Prohaska SS, Wagers AJ, Koeva M, Stuart JM, et al. Molecular signatures of quiescent, mobilized and leukemia-initiating hematopoietic stem cells. *PloS one*. 2010;5(1):e8785. Epub 2010/01/26.
34. DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, Micallef IN, Stiff PJ, Kaufman JL, et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2009;113(23):5720-6. Epub 2009/04/14.
35. DiPersio JF, Micallef IN, Stiff PJ, Bolwell BJ, Maziarz RT, Jacobsen E, et al. Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation

for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(28):4767-73. Epub 2009/09/02.

36. Uy GL, Rettig MP, Motabi IH, McFarland K, Trinkaus KM, Hladnik LM, et al. A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;119(17):3917-24. Epub 2012/02/07.
37. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-65. Epub 2010/04/14.
38. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96(13):4075-83. Epub 2000/12/09.
39. Damm F, Heuser M, Morgan M, Wagner K, Gorlich K, Grosshennig A, et al. Integrative prognostic risk score in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*. 2011;117(17):4561-8. Epub 2011/03/05.
40. Scholzel C, Lowenberg B. Stimulation of proliferation and differentiation of acute myeloid leukemia cells on a bone marrow stroma in culture. *Experimental hematology*. 1985;13(7):664-9. Epub 1985/08/01.
41. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100 Suppl 1:11842-9. Epub 2003/09/25.
42. Tien HF, Wang CH, Lin MT, Lee FY, Liu MC, Chuang SM, et al. Correlation of cytogenetic results with immunophenotype, genotype, clinical features, and ras mutation in acute myeloid leukemia. A study of 235 Chinese patients in Taiwan. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1995;84(1):60-8. Epub 1995/10/01.
43. Chou WC, Tang JL, Lin LI, Yao M, Tsay W, Chen CY, et al. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer research*. 2006;66(6):3310-6. Epub 2006/03/17.
44. Chen CY, Lin LI, Tang JL, Tsay W, Chang HH, Yeh YC, et al. Acquisition of JAK2, PTPN11, and RAS mutations during disease progression in primary myelodysplastic syndrome. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2006;20(6):1155-8. Epub 2006/04/07.

45. Hou HA, Huang TC, Lin LI, Liu CY, Chen CY, Chou WC, et al. WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood*. 2010;115(25):5222-31. Epub 2010/04/07.
46. Hou HA, Chou WC, Lin LI, Chen CY, Tang JL, Tseng MH, et al. Characterization of acute myeloid leukemia with PTPN11 mutation: the mutation is closely associated with NPM1 mutation but inversely related to FLT3/ITD. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2008;22(5):1075-8. Epub 2007/11/02.
47. Shiah HS, Kuo YY, Tang JL, Huang SY, Yao M, Tsay W, et al. Clinical and biological implications of partial tandem duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal abnormalities at 11q23. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2002;16(2):196-202. Epub 2002/02/13.
48. Lin LI, Chen CY, Lin DT, Tsay W, Tang JL, Yeh YC, et al. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(4):1372-9. Epub 2005/03/05.
49. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England journal of medicine*. 2005;352(3):254-66. Epub 2005/01/22.
50. Tang JL, Hou HA, Chen CY, Liu CY, Chou WC, Tseng MH, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009;114(26):5352-61. Epub 2009/10/08.
51. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2010;363(25):2424-33. Epub 2010/11/12.
52. Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood*. 2010;116(20):4086-94. Epub 2010/08/10.
53. Chou WC, Chou SC, Liu CY, Chen CY, Hou HA, Kuo YY, et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood*. 2011;118(14):3803-10. Epub 2011/08/11.
54. Chou WC, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, et al. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Blood*. 2010;115(14):2749-54. Epub 2010/01/26.

55. Chou WC, Lei WC, Ko BS, Hou HA, Chen CY, Tang JL, et al. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2011;25(2):246-53. Epub 2010/11/17.
56. Yeh JR, Munson KM, Chao YL, Peterson QP, Macrae CA, Peterson RT. AML1-ETO reprograms hematopoietic cell fate by downregulating scl expression. *Development*. 2008;135(2):401-10. Epub 2007/12/25.
57. Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ. The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood*. 1994;83(5):1200-8. Epub 1994/03/01.
58. Schaich M, Harbich-Brutscher E, Pascheberg U, Mohr B, Soucek S, Ehninger G, et al. Association of specific cytogenetic aberrations with mdr1 gene expression in adult myeloid leukemia and its implication in treatment outcome. *Haematologica*. 2002;87(5):455-64. Epub 2002/05/16.
59. Yang DH, Lee JJ, Mun YC, Shin HJ, Kim YK, Cho SH, et al. Predictable prognostic factor of CD56 expression in patients with acute myeloid leukemia with t(8;21) after high dose cytarabine or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *American journal of hematology*. 2007;82(1):1-5. Epub 2006/09/21.
60. Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nature genetics*. 2012;44(1):23-31. Epub 2011/12/06.
61. Thol F, Damm F, Ludeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(21):2889-96. Epub 2011/06/15.
62. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Chou WC, Lee MC, Chen CY, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*. 2012;119(2):559-68. Epub 2011/11/15.
63. Lane SW, Wang YJ, Lo Celso C, Ragu C, Bullinger L, Sykes SM, et al. Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia progression. *Blood*. 2011;118(10):2849-56. Epub 2011/07/19.

表一 Robo4 高表現與低表現的急性骨髓性白血病患者臨床表現的比較

Clinical manifestations of acute myeloid leukemia (AML) patients with high and low Robo4 expression

Variables	Total (n=148)	Robo4 high (n=61, 41.2%)	Robo4 low (n=87, 58.8%)	P value
Sex†				0.3189
Male	78	29 (37.2)	49 (62.8)	
Female	70	32 (45.7)	38 (54.3)	
Age (year)‡	46.0 (15-82)	46.0 (15-77)	46.0 (15-82)	0.7944
Lab data‡				
WBC (/μL)	23535(380-423000)	23260 (650-175900)	24520 (380-423000)	0.7568
Hb (g/dL)	7.9 (3.3-13.1)	7.5 (3.3-12.0)	8.2 (3.5-13.1)	0.3252
Platelet (×1,000 /μL)	45.0 (3-802)	46 (3-202)	42.0 (3-802)	0.4509
Blast (/μL)	12517.1 (0-338400)	11148(0-141878.5)	13439(0-338400)	0.7746
LDH (U/L)	843.5 (271-13130)	838 (298-5559)	849(271-13130)	0.5482
FAB†				0.069
M0	1	0 (0)	1 (100.0)	>0.9999
M1	34	11 (32.4)	23 (67.6)	0.321
M2	49	24 (49.0)	25 (51.0)	0.215
M3	14	1 (7.1)	13 (92.9)	0.0081
M4	39	18 (46.2)	21 (53.8)	0.57
M5	8	5 (62.5)	3 (37.5)	0.2748
M6	2	1 (50.0)	1 (50.0)	>0.9999
Undetermined	1	1 (100.0)	0 (0)	>0.9999
Induction response	148	61	87	
CR	107 (72.3)	39 (63.9)	68 (78.2)	0.0643
PR	4 (2.7)	2 (3.3)	2 (2.3)	0.3035
Refractory	26 (17.6)	13 (21.3)	13 (14.9)	
Induction death	11 (7.4)	7 (11.5)	4 (4.6)	0.2009
Relapse	50 (33.8)	20 (32.8)	30 (34.5)	0.5477

†number of patients (%)

‡median (range)

Abbreviations: FAB, French-American-British classification; CR, complete remission; PR, partial remission

表二 Robo4 高表現與低表現的急性骨髓性白血病患者免疫現型的比較
Comparison of immunophenotypes of leukemia cells between AML
patients with high and low Robo4 expression

Antigens	Total patients examined	Percentage of patients with the antigen expression			<i>P</i>
		Whole cohort	<i>Robo4</i> high patients	<i>Robo4</i> low patients	
HLA-DR	145	71.7	85.0	62.4	0.003
CD13	145	94.5	98.3	91.8	0.088
CD33	145	90.3	88.3	91.8	0.491
CD34	144	68.8	76.3	63.5	0.105
CD56	143	17.5	30.0	8.4	0.001
CD7	145	17.2	13.3	20.0	0.295



表三 Robo4 高表現與低表現的急性骨髓性白血病患者染色體變化的比較
Association of Robo4 expression level with cytogenetic abnormalities

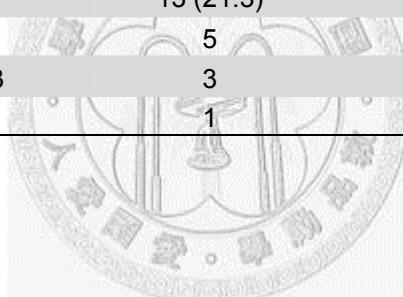
Variables	Total	Robo4 high	Robo4 low	P
Karyotype† (N=142)				
Favorable	35	17 (48.6)	18 (51.4)	0.3316
Intermediate	99	37 (37.4)	62 (62.6)	0.215
Unfavorable	8	5 (62.5)	3 (37.5)	0.2767
Cytogenetics				
Normal	75	28 (37.3)	47 (62.7)	0.404
abnormal	67	31 (46.3)	36 (53.7)	0.3093
Recurrent chromosomal abnormality				
t(8;21)	14	12(84.6)	2 (15.4)	0.0009
inv(16)	7	4 (50.0)	3(50.0)	0.4472
t(15;17)	14	1(14.3)	13(85.7)	0.0081

†Favorable, t(15;17), t(8;21), inv (16) ; unfavorable, -7, del(7q), -5, del(5q), 3q abnormality, complex abnormalities; Intermediate, normal karyotype and other abnormalities.



表四 Robo4 高表現與低表現的急性骨髓性白血病患者其他基因突變的比較
Association of Robo4 expression level with other genetic alterations

Variables	No. of patients with alteration (%)			P
	Whole cohort (n=148)	Robo4 high patients (n=61)	Robo4 low patients (n=87)	
<i>CEBPA</i> ^{double}	18 (10.1)	3 (5.0)	15 (17.2)	0.024
<i>NPM1+/FLT3-ITD-</i>	15 (10.1)	5 (8.2)	10 (11.5)	0.513
<i>NPM1</i>	33 (22.3)	15 (24.6)	18 (20.7)	0.575
<i>IDH2</i>	20 (13.5)	10 (16.4)	10 (11.5)	0.391
<i>IDH1</i>	11 (7.4)	3 (4.9)	8 (9.2)	0.329
<i>N-RAS</i>	18 (12.1)	9 (14.8)	9 (10.3)	0.419
<i>K-RAS</i>	4 (2.7)	3 (4.9)	1 (1.1)	0.164
<i>TET2</i>	17 (11.5)	10 (16.4)	7 (8.0)	0.1262
<i>AML1</i>	13 (8.8)	7 (11.5)	6 (6.9)	0.333
<i>WT1</i>	11 (7.4)	5 (8.2)	6 (6.9)	0.767
<i>MLL</i>	9 (6.1)	4 (6.6)	5 (5.7)	0.839
<i>ASXL1</i>	9	6	3	0.162
<i>DNMT3A</i>	21	13 (21.3)	8 (9.2)	0.0543
<i>KIT</i>	7	5	2	0.1249
<i>FLT3-TKD</i>	13	3	10	0.2397
<i>PTPN11</i>	6	1	5	0.4012



表五 Robo4 高表現與低表現的急性骨髓性白血病患者其他基因突變的比較
Association of Robo4 expression level with other genetic alterations

Variables	Disease-free Survival				Overall Survival			
	95% CI				95% CI			
	RR	Lower	Upper	P value	RR	Lower	Upper	P value
Age [†]	1.98	1.286	3.048	0.002	3.497	1.982	6.17	0.001
WBC [§]	1.581	1.011	2.47	0.044	1.862	1.069	3.242	0.028
Karyotype [¶]	4.175	2.634	6.62	0	3.078	1.726	5.489	0.001
NPM1/FLT3-ITD [¤]	0.246	0.11	0.554	0.001	0.398	0.166	0.955	0.039
CEBPA ^{double mutation}	0.401	0.187	0.858	0.019	0.166	0.039	0.699	0.014
Robo4*	1.6	1.026	2.495	0.038	1.779	1.005	3.149	0.048

Abbreviation: RR, relative risk; CI, confidence interval

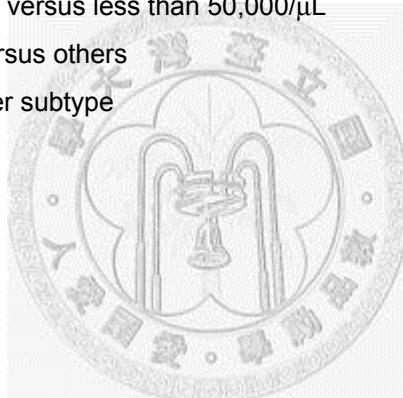
[†] Age > 50 relative to Age ≤50 (the reference)

[§] WBC greater than 50,000/μL versus less than 50,000/μL

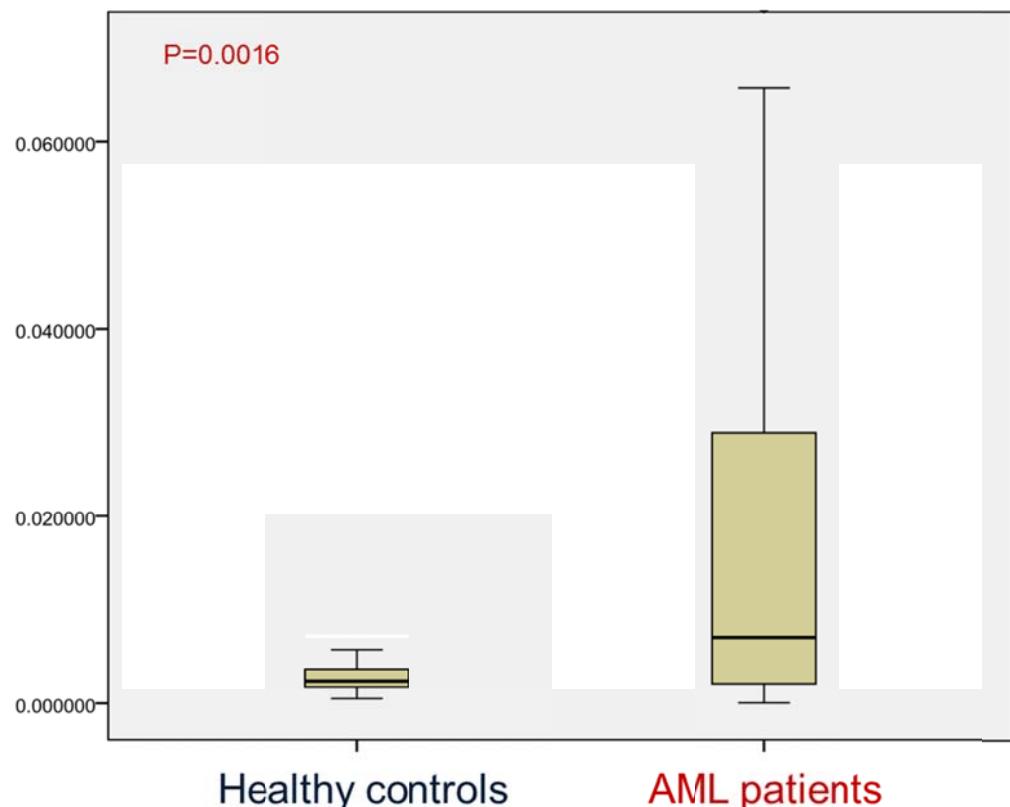
[¶] unfavorable cytogenetics versus others

[¤] NPM1^{mut+}/FLT3-ITD⁻ versus other subtype

*Robo4 expression level



圖一 Robo4 在健康對照組與急性骨髓性白血病患者表現的比較
Robo4 expression level between healthy controls and AML patients



註解：

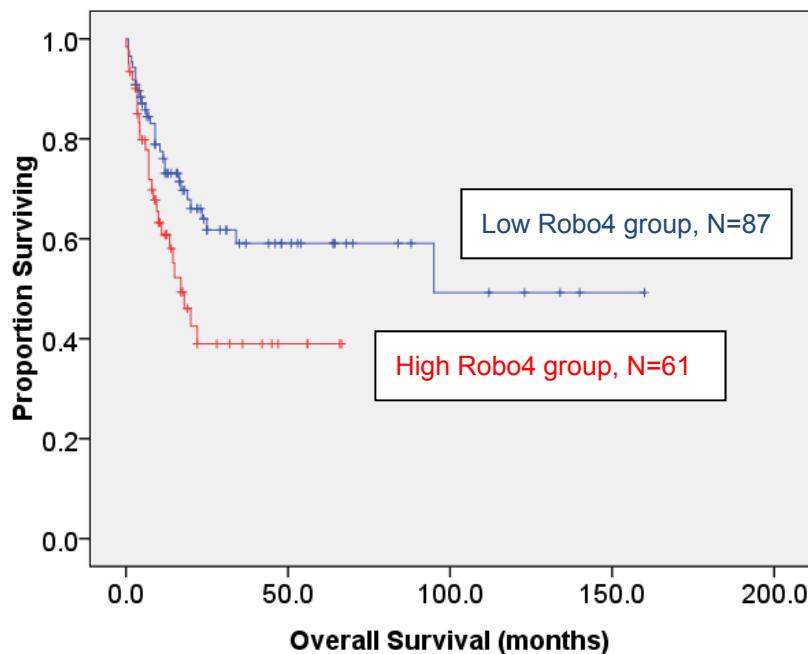
Healthy controls-健康對照組(20位)；AML patients-急性骨髓性病患(148位)

P value：利用 Mann-Whitney U test 統計分析

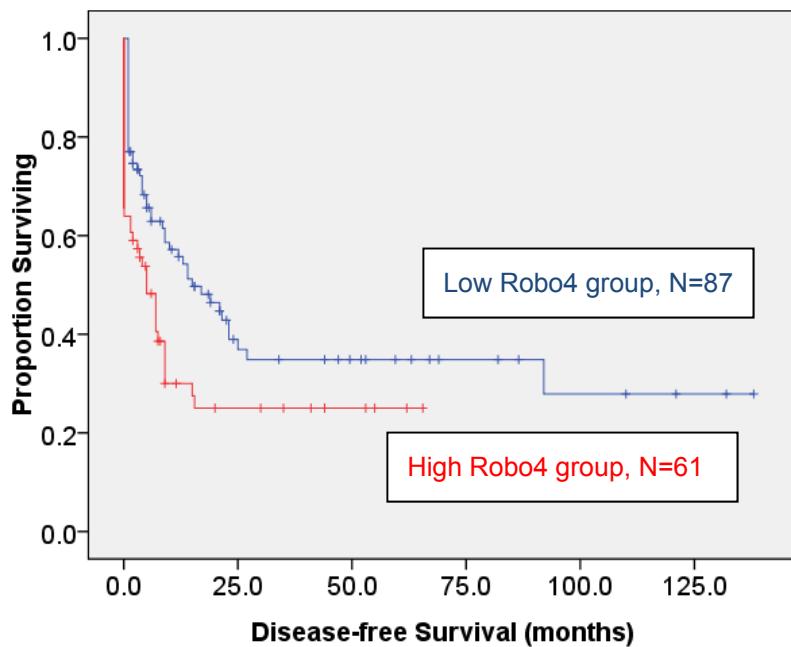
Y 軸：Robo4/RPLP0

圖二 Robo4 表現的高低與病患存總體存活期及無病存活期的存活分析

Kaplan-Meier curves of overall survival and disease-free survival of patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia stratified by the level of Robo4 expression



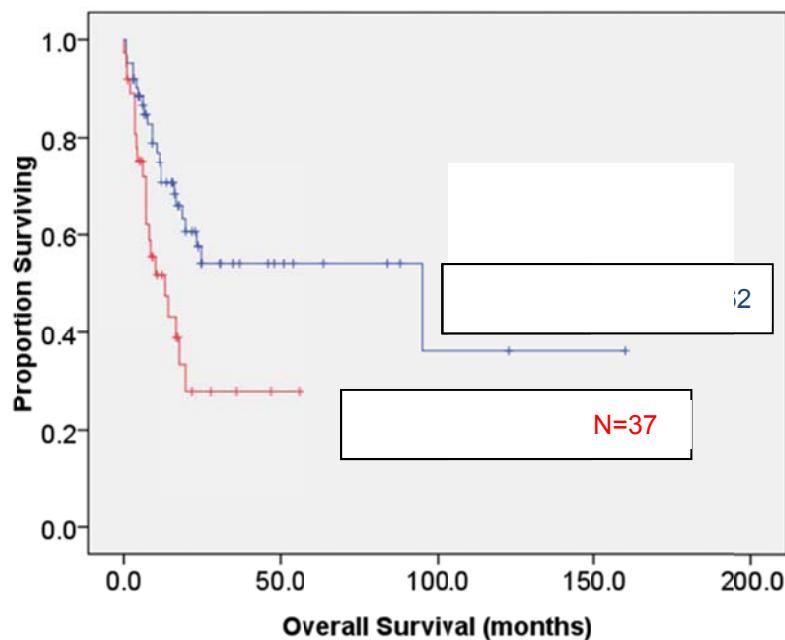
median, 17.0 months vs. 95.0 months, P=0.023



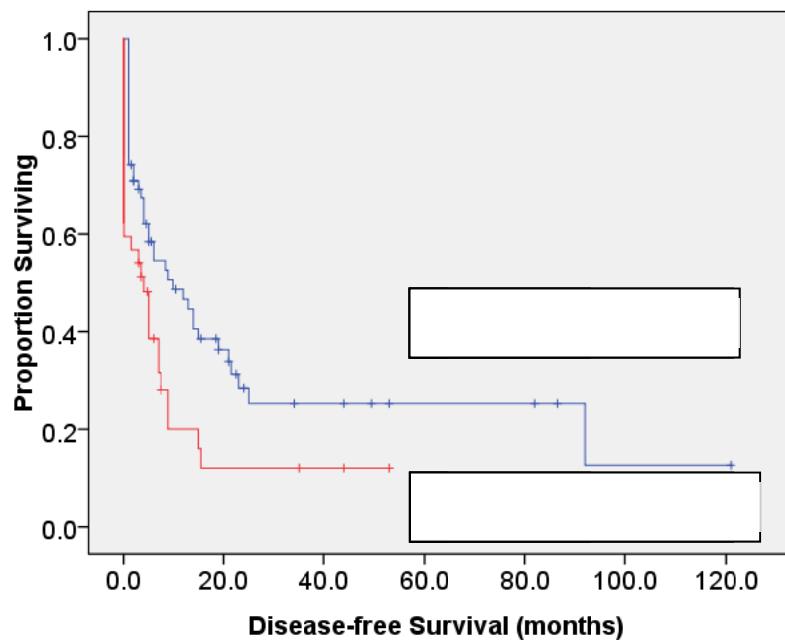
medium, 5.0 months vs. 15.0 months, P=0.024

圖三 Robo4 表現的高低與中度風險染色體核型病患總體存活期及無病存活期的存活分析

Kaplan-Meier curves of overall survival and disease-free survival of patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia of intermediate-risk cytogenetics stratified by the level of Robo4 expression



median, 13.5 months vs. 95.0 months, P=0.007



median, 4.0 months vs. 10.0 months, P=0.025