



國立台灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

Cabozantinib 抗藥性血癌細胞株 Molm13-XR 的建立、
特性分析以及治療策略

Establishment, characterization and treatment strategy of
cabozantinib-resistant Molm13-XR leukemic cells

藍珮綺

Pei-Qi Lan

指導教授:林亮音 博士

Advisor: Liang-In Lin, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

國立台灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

Cabozantinib 抗藥性血癌細胞株 Molm13-XR 的建立、
特性分析以及治療策略

Establishment, characterization and treatment strategy of
cabozantinib-resistant Molm13-XR leukemic cells

本論文係藍珮綺君(學號 R04424009)在國立台灣大學醫學檢驗暨生物
技術學系研究所所完成之碩士學位論文，於民國 106 年 07 月 18 日承
下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：林彥音

(指導教授)

何訓奇

陳建源

胡忠怡

歐大偉

系主任、所長：林彥音 (簽名)



致謝

碩士生涯兩年時間轉眼即過，能夠完成這本論文，要感謝許多人的指導、幫忙以及鼓勵。

首先要感謝我的指導教授林亮音老師，謝謝老師不厭其煩耐心地指導，並給予許多資源以及經驗分享，讓我在短短兩年獲得寶貴的知識與成長，也謝謝胡忠怡老師、歐大諒老師、郭遠燁老師、顧雅真老師、何元順老師、陳建源老師給予許多實驗以及論文的寶貴意見，每個星期的標靶課程都從老師們身上學習到許多文獻討論的精要，真的受益許多。

另外也要感謝實驗室的夥伴，正偉學長、羿鈴學姊、玟君學姊、政豪學長、子筠、潔雯、文惠、黃焱，宇暄，感謝你們在實驗討論、生活分享上給予我許多的能量，很開心與你們相遇。

最後我要感謝我的爸爸、媽媽、哥哥，謝謝你們總是包容我並給予我許多支持，讓我能全力完成碩士學位，謝謝你們。

藍珮綺 謹誌於

臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系

中華民國 106 年 7 月

目錄



目錄.....	I
圖目錄.....	III
表目錄.....	IV
縮寫表.....	V
摘要.....	VI
Abstract.....	VIII
第一章 前言.....	1
1.1 急性骨髓性白血病簡介.....	1
1.1.1 急性骨髓性白血病(Acute Myeloid Leukemia, AML).....	1
1.1.2 AML 之分類.....	1
1.1.3 AML 之治療.....	1
1.2 Cabozantinib (XL184)之簡介.....	2
1.3 FLT3 之簡介.....	2
1.4 Tyrosine kinase(TK)以及 tyrosine kinase inhibitor(TKI)之簡介.....	3
1.5 Mcl-1 蛋白之簡介.....	3
1.6 Wnt/ β -catenin signaling pathway.....	4
1.7 Pyrvinium pamote(PP)之簡介.....	4
第二章 研究目的.....	5
第三章 材料與方法.....	6
3.1. 材料.....	6
3.1.1. 細胞株: Molm-13(ATCC :ACC554).....	6
3.1.2. 儀器設備:.....	6
3.1.3. 藥品:.....	7
3.1.4. 抗體:.....	8
3.1.5. 試劑組:.....	9
3.1.6. 藥品與試劑配製:.....	10
3.2. 方法.....	11
3.2.1. 細胞培養.....	11
3.2.2. 細胞抑殺試驗 (MTS assay).....	11
3.2.3. 細胞生長曲線.....	11
3.2.4. 白血球表面抗體螢光染色.....	12
3.2.5. 細胞萃取物製備.....	12
3.2.6. 蛋白質濃度定量.....	12
3.2.7. 西方墨點法.....	12
3.2.8. RNA 萃取.....	13
3.2.9. 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR).....	13

3.2.10.	PCR 聚合酶連鎖反應.....	14
3.2.11.	1 % 洋菜膠製備與電泳.....	14
3.2.12.	聚合酶連鎖反應產物之純化.....	14
3.2.13.	序列分析.....	15
3.2.14.	即時監控聚合酶連鎖反應(q-RT-PCR).....	15
3.2.15.	Pyrosequencing.....	15
3.2.16.	GeneScan.....	16
3.2.17.	建立對 cabozantinib 具抗藥性之 Molm13-XR.....	16
3.2.18.	Human phospho-kinase array.....	16
3.2.19.	核質蛋白分離實驗.....	17
3.2.20.	RNA-seq.....	17
3.2.21.	統計方法.....	17
第四章	實驗結果.....	18
4.1.	Cabozantinib 對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制效果.....	18
4.2.	Molm13-P 以及 Molm13-XR 之 FLT3 情形.....	18
4.3.	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的生長曲線以及細胞週期情形.....	19
4.4.	第一型及第二型 FLT3 抑制劑對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制效果.....	19
4.5.	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的激酶磷酸化程度之差異.....	20
4.6.	細胞凋亡(apoptosis)相關蛋白在 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的差異..	20
4.7.	<i>PIK3CA</i> 、 <i>PTEN</i> 、 <i>AKT</i> 之突變熱點於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的情形...	20
4.8.	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 <i>K-ras</i> 、 <i>N-ras</i> 突變情形.....	21
4.9.	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 β -catenin、 <i>MYC</i> 、 <i>CCND1</i> 的差異...	22
4.10.	Molm13-P 與 Molm13-XR 具差異性表現之 1057 個基因於 KEGG database 中具顯著意義之訊息傳遞路徑.....	22
4.11.	ICG-001 對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制性.....	23
4.12.	各種抑制劑對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的抑制效果.....	23
4.13.	Pyrvinium pamote 的作用機制.....	23
4.14.	Molm13-P 與 Molm13-XR 的表面抗原差異.....	24
4.15.	Molm13-P 與 Molm13-XR 的 ABC 傳輸蛋白的 mRNA 表現量.....	25
第五章	討論.....	26
第六章	參考文獻.....	33
圖	39
附圖	59
附表	65
表	68

圖目錄

圖 1	Cabozantinib 對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制效果.....	39
圖 2	Molm13-P 以及 Molm13-XR 之 FLT3 情形.....	40
圖 3	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 FLT3 mRNA 以及蛋白表現量.....	42
圖 4	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的生長曲線以及細胞週期情形.....	43
圖 5	Molm13-P 以及 Molm13-XR 針對 type I、II 的 FLT3 TKI 之感受性.....	44
圖 6	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的激酶磷酸化程度之差異.....	45
圖 7	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 AKT、STAT5、ERK、GSK3 β 、CREB 的磷酸化情形.....	46
圖 8	細胞凋亡(apoptosis)相關蛋白在 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之差異.....	47
圖 9	Molm13-P 以及 Molm13-XR 於 PIK3CA、PTEN、AKT 突變熱點情形...	48
圖 10	Molm13-P 以及 Molm13-XR 之 K-ras 突變熱點情形.....	49
圖 11	Molm13-P 以及 Molm13-XR 之 N-ras 突變熱點情形.....	50
圖 12	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 β -catenin、下游 MYC、CCND1 的差異.....	51
圖 13	Molm13-P 與 Molm13-XR 具差異性表現之 1057 個基因於 KEGG database 中具顯著意義之訊息傳遞路徑.....	52
圖 14	ICG-001 對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制程度.....	53
圖 15	各種抑制劑對 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制效果.....	54
圖 16	Pyrvinium pamote 對於 Molm13-XR 的 ATP、AKT、STAT5、GSK3 β -Ser9 之抑制作用.....	55
圖 17	Pyrvinium pamote 會使 Molm13-XR 發生細胞凋亡.....	56
圖 18	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的細胞表面抗原差異.....	57
圖 19	Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 ABCC1 及 ABCC2 的 mRNA 表現.....	58
附圖 1	Cabozantinib 能有效抑制帶有 FLT3-ITD 血癌細胞株之生長.....	59
附圖 2	FLT3 的蛋白結構.....	60
附圖 3	FLT3 WT 與 FLT3-ITD 的訊息傳遞路徑.....	61
附圖 4	Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑.....	62
附圖 5	Cabozantinib 對 Molm13 腫瘤之抑制效果.....	63
附圖 6	Molm13-XR single clone(C1-C6)之 FLT3 D835 位點之情形.....	64

表目錄

附表 1 法美英分類系統(FAB classification).....	65
附表 2 世界衛生組於 2016 年發佈對 AML 之分類.....	66
附表 3 Molm13-P 以及 Molm13-XR 於 proteoglycans in cancer(hsa 05205)訊息路 徑中具差異性表現之基因.....	67
表 1 PCR 所使用的引子序列.....	68
表 2 Real-time PCR 所使用的引子序列.....	68
表 3 Pyrosequence 所使用的引子序列.....	68
表 4 GeneScan 所使用的引子序列.....	69

縮寫表



項目	縮寫	全名
疾病與藥物	AML	Acute myeloid leukemia
	XL184	Cabozantinib
基因與蛋白	FLT3-ITD	FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication
	TKD	Tyrosine kinase domain
	TKI	Tyrosine kinase inhibitor
	MEK	Ras-mitogen activated protein kinase
	AKT	Protein kinase B
	PI3K	Phosphoinositide 3 kinase

摘要

FLT3 內部串聯重複(*FLT3-ITD*)是急性骨髓性白血病常見的突變類型，約有 30~40%的 AML 病人具有此突變，這類的病患在臨床上的預後不佳;因此，*FLT3* 被認為是有潛力的治療標的，目前也已經發展出許多能夠作用於 *FLT3* 的標靶藥物，其中包括 cabozantinib(XL184)。

實驗室先前在 *in vitro* 的研究中發現 cabozantinib 於低劑量即能夠抑制 *FLT3-ITD* 突變的 AML 細胞株 Molm13，在 *in vivo* 實驗亦看到 cabozantinib 能夠顯著地抑制 Molm13 腫瘤的生長。由於使用 *FLT3* 標靶藥物常會有復發的情形，因此有必要著手進行 Molm13 對於 cabozantinib 的抗藥性探討。

本篇研究利用持續給予藥物的方式，為期 5 個月後建立出對 cabozantinib 具抗藥性的細胞株 Molm13-XR，其對於 cabozantinib 的 IC_{50} 為 473.36 ± 154.73 nM，母細胞株 Molm13-P 為 1.06 ± 0.93 nM。以 RNA-seq 篩選後發現 Molm13-XR 具有 *FLT3* D835Y 突變，此結果也進一步以 pyrosequencing 確認。

另外以 phospho-kinase array 篩選並用西方墨點法確認 *FLT3* 以及其下游訊息傳遞路徑表現情形，觀察到 p-*FLT3*、p-AKT、p-STAT5 以及 p-ERK 皆增加。此外，phospho-kinase array 的篩選中發現 Molm13-XR 的 p-GSK3 β -Ser9 在眾多激酶當中有最大程度的增加且以西方墨點法確認，並觀察到下游的抗凋亡蛋白 Mcl-1 增加。

其他藥物的細胞抑制實驗結果顯示 Molm13-XR 對於第一型的 *FLT3* 抑制劑 midostaurin 以及 crenolanib 仍具有感受性，能夠在低濃度下有抑制效果;然而對於第二型的 *FLT3* 抑制劑 sorafenib、quizartinib 則依然具有抗藥性。除了 *FLT3* 抑制劑之外，還另外使用了 MEK 抑制劑 CI-1040、AKT 抑制劑 MK-2206，但皆無法在臨床上可達到的藥物濃度下達到抑制效果。

Pyrrvinium pamote(PP)是一種 FDA 已核准使用的蟻蟲治療用藥。我們發現其於低濃度下即可以抑制不論是 Molm13-P 或是 Molm13-XR 的生長，進一步分析

其能夠引發細胞凋亡、減少細胞的 ATP。另外以西方墨點法偵測到 AKT、STAT5 的活性受到抑制，以及抗凋亡蛋白 Mcl-1 的減少、切割態的 caspase 3 增加。

總體而言，從我們的實驗結果顯示 FLT3 D835Y 以及抗凋亡蛋白 Mcl-1 增加，可能是造成 Molm13-XR 對 cabozantinib 產生抗藥性的原因。

關鍵字：急性骨髓性白血病、cabozantinib 抗藥性、FLT3 D835Y、Mcl-1、pyrvinium
pamote

Abstract

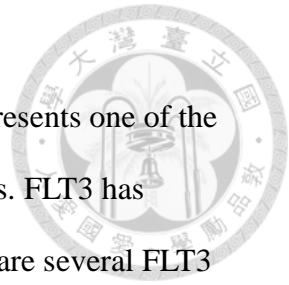
Internal tandem duplication mutation in *FLT3* (*FLT3*-ITD) represents one of the most common gene alterations in AML and confers a poor prognosis. *FLT3* has emerged as a promising molecular target in therapy of AML. There are several *FLT3* inhibitors have been used in clinical trials including cabozantinib (XL184).

Our previous work demonstrated that cabozantinib potently inhibited the viability of a *FLT3*-ITD+ Molm13 cell line also known as Molm13-P *in vitro*. Also, cabozantinib significantly delayed the outgrowth of Molm13-P tumor compared with vehicle treated mice *in vivo*. However, drug resistance in patients after target therapy has become a clinical problem. Therefore, it is necessary to understand the underlying mechanisms conferring drug resistance.

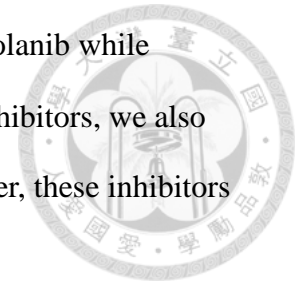
We generated cabozantinib resistant Molm13 cells also known as Molm13-XR by treating Molm13-P with progressively increasing concentrations of cabozantinib from 1nM to 1 μ M for approximately 5 months. Cabozantinib potently decreased the viability of Molm13-P with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 1.06 ± 0.93 nM, whereas the resistant strain Molm13-XR was 473.36 ± 154.73 nM. There was a new *FLT3* D835Y mutation in Molm13-XR screened by RNA-seq and confirmed by pyrosequencing.

In addition, phosphorylated level of *FLT3* and its downstream molecules were screened by phospho-kinase array and confirmed by western blot. We demonstrated that there were increased phosphorelated level of *FLT3*、*AKT*、*STAT5* and *ERK*. Moreover, p-GSK3 β -Ser9 had the most increased level among all kinases in Molm13-XR compared with Molm13-P screened by phospho-kinase array and confirmed by western blot. Furthermore, there was higher level of Mcl-1, an anti-apoptotic protein, in Molm13-XR compared with Molm13-P.

By performing cytotoxicity assay in Molm13-XR, our results suggested



Molm13-XR exhibited good susceptibility to midostaurin and crenolanib while remaining resistant to sorafenib and quizartinib. Other than FLT3 inhibitors, we also tested MEK inhibitor, CI-1040、AKT inhibitor, MK-2206. However, these inhibitors couldn't inhibit Molm13-XR at clinically relevant doses.



We found that pyrvinium pamote(PP), an anthelmintic drug approved by FDA, had a potent cytotoxicity toward Molm13-P and Molm13-XR at a low nanomolar concentration of 14.81 ± 10.77 and 13.45 ± 6.59 nM. PP would inhibit AKT and STAT5 activities and decrease ATP level in Molm13-XR. Also, PP would downregulate anti-apoptotic protein Mcl-1 and upregulate cleaved caspase 3 in Molm13-XR.

PP would induce apoptosis and decrease ATP level in Molm13-XR. The AKT and STAT5 signaling were downregulated and anti-apoptotic protein Mcl-1 is decreased by pyrvinium pamote treatment.

Overall, we established a cabozantinib resistant AML cell line Molm13-XR. Our results show that FLT3 D835Y mutation and upregulation of Mcl-1 might contribute to cabozantinib resistance.

Keywords:

AML、cabozantinib-resistance、FLT3 D835Y、Mcl-1、pyrvinium pamote

第一章 前言



1.1 急性骨髓性白血病簡介

1.1.1 急性骨髓性白血病(Acute Myeloid Leukemia, AML)

急性骨髓性白血病(AML)的特徵為骨髓中的髓芽細胞(myeloid blast)不斷地增生且不進行分化,進而造成造血功能不全而引發的疾病,台灣每年發生率約為每十萬人約有 3-5 人罹患 AML,且發病機率隨著年紀增長而增加¹。AML 的臨床症狀具多樣性,由於血液當中的白血病細胞浸潤而影響正常造血系統進而使紅血球、白血球以及血小板的功能異常,因此病人常出現典型的症狀例如貧血、出血不止、易受感染等,另外也有因細胞浸潤組織所導致的肝、脾、淋巴腫大等²。

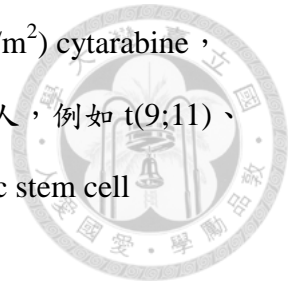
1.1.2 AML 之分類

目前 AML 有兩大分類系統,分別是法美英分類系統(French-American British classification, FAB classification),依照白血病細胞的型態、分化程度、來源種系,分成 M0 到 M7 共 9 類(附表一)³;以及世界衛生組織分類系統(World Health Organization classification, WHO classification) (附表二)⁴。

1.1.3 AML 之治療

AML 的治療方式以化學療法以及幹細胞移植為主,化學治療分為兩個階段,分別為前導性治療(induction therapy)以及依照緩解程度而進行的鞏固性治療(consolidation therapy)。前導性治療的部分會給予病患連續靜脈注射 7 日的 cytarabine(Ara-C)合併 3 日的 anthracycline 類藥物(例如 idarubicin、daunorubicin 以及 mitoxantrone),通常僅達部分緩解的病人會再給予第二次的 7+3 化學療程。通常較年輕的患者在接受前導性治療後能達到 60~85% 的完全緩解率,而超過 60 歲的患者則是介於 40~60%。鞏固性治療的部份若病患屬於預後較佳的基因型,例如 t(8;21)、inv(16)

則給予靜脈注射 2~4 個循環的中度劑量(1000-1500mg/m²) cytarabine，治癒率約可達到 6~7 成；若屬於中度或不良預後的病人，例如 t(9;11)、inv(3)，則建議考慮進行造血幹細胞移植(hematopoietic stem cell transplantation)，以降低復發的可能性²。



1.2 Cabozantinib (XL184)之簡介

Cabozantinib 是一種口服的多激酶小分子抑制劑，能夠作用在 MET、VEGFR2、RET、KIT、TIE-2 以及 FLT3 等分子⁵。美國食品藥物管理局(FDA)在 2012 年核准 cabozantinib 用於治療轉移性甲狀腺髓質癌(metastatic medullary thyroid cancer)⁶，也在 2016 年核准使用於晚期腎細胞癌(advanced renal cell carcinoma, RCC)⁷。實驗室先前的研究結果發現 cabozantinib 在細胞實驗上能夠針對具有 FLT3-ITD 的 MV4-11 以及 Molm13 血癌細胞之生長有很好的抑制作用，IC₅₀ 小於 5nM(附圖 1)，能夠引起細胞週期停滯於 G0/G1 期以及促使細胞凋亡的發生⁸。目前 cabozantinib 針對復發型 AML 病患正在進行第一期臨床試驗的評估⁸⁰。

1.3 FLT3 之簡介

FLT3的全名為FMS-like tyrosine kinase 3，基因坐落在chromosome 13q12，蛋白結構為一個穿膜的酪氨酸激酶接受器(tyrosine kinase receptor)，其組成包含了四個區域，包括extracellular ligand-binding domain、transmembrane domain、juxtamembrane domain、intracellular kinase domain(附圖2)⁹。當FLT3在非活化態時會以單體(monomeric)、未磷酸化的型式存在；而當FLT3 ligand結合上FLT3時，會使FLT3成為雙體(dimer)構造，接著位於細胞膜內的酪氨酸激酶會發生磷酸化，形成活化態，並吸引細胞膜內的轉接蛋白(adaptor protein)前來，例如SHC(Src homology 2 containing protein)、GRB2(growth factor receptor bound protein 2)，進而啟動下游的訊息路徑傳遞，活化MAPK、PI3K/AKT等

訊息路徑，調控細胞的存活(survival)、增生(proliferation)、凋亡(apoptosis)，以及分化(differentiation)等功能(附圖二)¹⁰。

*FLT3*最常見的突變為在exon 14發生內部串聯重複(internal tandem duplication)，簡稱為*FLT3-ITD*，約有30%的AML病人有此突變，其重複的序列長度介於3至超過400個base pair¹¹，此結果會使*FLT3*持續地活化下游的MAPK、PI3K/AKT、JAK/STAT等訊息傳遞路徑(附圖2)^{10,12}。另一種常見的*FLT3*活化突變是位於tyrosine kinase domain(TKD)上的胺基酸發生位點突變，約有5~10%的AML病人具有此突變¹³。

1.4 Tyrosine kinase(TK)以及 tyrosine kinase inhibitor(TKI)之簡介

蛋白激酶(protein kinase)的功能為催化磷酸根的轉移，kinase在組成結構上具有一保留的activation loop結構，其N端與C端分別由DFG motif與APE motif所組成。當kinase處於失活狀態時，DFG會朝向外(DFG-out)，進而阻擋受質結合位(substrate binding site)，因此能夠阻止磷酸根的轉移；而當kinase處於活化態時，DFG會朝向內(DFG-in)，並形成ATP binding site，ATP結合後能夠做為提供下游磷酸化反應的原料¹⁴。當今研究人員將tyrosine kinase inhibitor(TKI)分成第一型(type I)以及第二型(type II)¹⁵。第一型TKI為ATP競爭型，會抑制活化態的kinase，如同論文當中所使用的crenolanib以及midostaurin；第二型TKI會辨識非活化態的DFG-out結構，阻擋其移動進而抑制kinase成為活化態，例如quizartinib以及sorafenib。

1.5 Mcl-1 蛋白之簡介

Mcl-1，全名為myeloid cell leukemia-1，在細胞內的功能扮演著抵抗細胞凋亡發生的角色，為Bcl-2家族中的一員，其能夠與促凋亡蛋白Bax、Bak等結合，防止發生粒線體膜穿孔而能抑制cytochrome c的釋出，因此能夠抑制細胞凋亡¹⁶。Mcl-1的轉錄可經由*FLT3-ITD*活化

STAT5 訊息路徑¹⁷ 以及 PI3K/AKT 活化 CREB 轉錄因子進入細胞核¹⁸ 而表現，另外，PI3K/AKT 路徑活化會抑制 GSK3 β 活性，因此會使 Mcl-1 蛋白無法走向泛素化降解(ubiquitin-proteasome degradation)因而累積在細胞¹⁹。研究指出癌細胞會透過 Mcl-1 蛋白的堆積使藥物治療失去效果²⁰。

1.6 Wnt/ β -catenin signaling pathway

當 Wnt/ β -catenin 訊息路徑關閉時，細胞質內的 Axin、GSK3、APC、CK1 α 蛋白會形成降解 β -catenin 的蛋白複合物(degradation complex)，藉由泛素-蛋白酶體剪切(ubiquitin/proteasome processing)而將 β -catenin 降解；而當 Wnt/ β -catenin 訊息路徑開啟時，Wnt ligand 與細胞膜表面的 Frizzled receptor 結合後會與輔助受體(co-receptor) LRP5/6 形成複合物，並瓦解上述的蛋白複合物，使細胞質內的 β -catenin 能夠穩定存在，並進入細胞核與 TCF/LEF 轉錄因子(T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcription factors)共同調控下游基因的表達，例如 *CCND1*、*MYC* (附圖 4)²¹。

1.7 Pyrvinium pamote(PP)之簡介

Pyrvinium pamote(PP)是一種喹啉衍生的橘黃色螢光染料，作為 FDA 核准使用的蟻蟲感染用藥。口服食用 PP 劑量 35 mg/kg 而不會有毒性副作用²²。近 10 年來證實 PP 有抗腫瘤特性的潛力，包括在轉錄層次上抑制自噬作用(autophagy)基因 Vps34 表達而抑制腫瘤細胞的自噬作用²³、增加 CK1 α 活性使 Wnt/ β -catenin 訊息路徑去活化²⁴、抑制 AKT/P70S6K 訊息路徑的活化²⁵、促使 GSK3 蛋白活化²⁶。抑制粒線體呼吸傳遞鏈複合物 I (mitochondria respiratory complex I)活性使 ATP 產量減少、活性氧化物(Reactive oxygen species, ROS)產量增加、使 active caspase 3 蛋白量增加、Bcl-2 與 Mcl-1 蛋白量減少而使細胞凋亡發生²⁷。

第二章 研究目的



實驗室先前的研究結果顯示 cabozantinib(XL184)能夠在 *in vitro* 及 *in vivo* 抑制 *FLT3-ITD* 突變的血癌胞株 Molm13-P。本研究藉由建立對於 cabozantinib 具有抗藥特性的細胞株 Molm13-XR，並且分析其抗藥機制以及尋找治療策略，從而提前準備未來 cabozantinib 於應用時可能會面臨的抗藥問題。

第三章 材料與方法



3.1. 材料

3.1.1. 細胞株: Molm-13(ATCC :ACC554)

在 1995 年由 MDS(myelodysplastic syndrome)復發為 AML M5a 的男性病人之周邊血建立而來的細胞株，帶有 *FLT3*-ITD、+8、+13、t(9;11)。

3.1.2. 儀器設備:

即時定量聚合酶連鎖反應器:Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

聚合酶連鎖反應器: Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler

序列分析: ABI 3730 Genetic Analyzer

直立式電泳槽: BIO-RAD

轉漬器: BIO-RAD Mini Protein II TM

電源供應器: BIO-RAD Model 200/2.0 Power Supply

烘箱: Cherg Huei CON 560

平面震盪器:Digisystem Laboratory Instrument inc. DSR-2100P

生物安全操作台: Esco Lab culture Class II Type A2 Biological Safety Cabinet (LA2-4A2)

冷光系統分析儀: Fuji LAS 4000

超音波震盪器: Hielsher Ultrasonics

往復式震盪恆溫水槽: Hotech 905D

酸鹼指示儀: JENCO microcomputer pH-VISION 6173

冰箱: King Cool KC-4579B(4°C)、Whirlpool Model EVI150F(-20°C)、Thermo ULT2586-4-D42(-80°C)

高速冷凍離心機: Kubota 1920

落地型大容量冷凍離心機: Kubota 8800



電子天秤: Mettler PJ300

DNA 式電泳槽: Mupid-ex

超純水機: Milli-ORG

焦磷酸定序: PyroMark Q24(Qiagen)

血球計數器: Reichert Bright-Line Metalized Haemocytometer

高壓滅菌器: Sakula Asv-3023

二氧化碳培養箱: Sanyo Mco-18Aic

製冰機: Scotsman AF200; Freser V150

微量盤分光光譜儀: SpectraMax M5(Molecular Devices)

電磁攪拌器: Therlyne Nuiva II stir plate

3.1.3. 藥品:

30% Acrylamide Mix (BIO-RAD)

Agarose Powder (AMRESCO)

Absoluted Ethanol (J.T.Baker)

Ammonium Persulfate (BIO-RAD)

Antibiotic/Antimycotic solution 100X (HYCLONE)

Albumin standard (THERMO SCIENTIFIC)

Cabozantinib-malate (EXELIXIS)

β -Mercaptomethanol (SIGMA)

Bromophenol Blue (BIO-RAD)

Diethylpyrocarbonate (SIGMA)


Dimethylsulfoxide (SIGMA)

EDTA (AMRESCO)

Fetal Bovine Serum (HYCLONE)

Histopaque-1077(SIGMA)

Hydrogen Chloride (MERCK)



Isopropanol (MERCK)
MEM Non Essential Amino Acids Solution 100X (HYCLONE)
Methanol (MACRON)
NaCl (Merck)
NP-40(SIGMA)
Pierce Protein Free Blocking Buffer (THERMO SCIENTIFIC)
Phosphate Buffered Aaline (AMRESCO)
Phosphatase Inhibitor (ROCHE)
Propidium Iodide (SIGMA)
Protease Inhibitor (ROCHE)
PVDF Membrane (MILLIPORE)
RNase A (MACHEREY-NAGEL)
RPMI 1640(GIBCO)
RIPA Buffer (HYCELL)
SDS (BIO-RAD)
Sodium Bicarbonate (SIGMA)
Stripping Buffer (THERMO SCIENTIFIC)
SYBR Green PCR Master Mix (ABI)
TBE Buffer 5X (BIOMAN SCIENTIFIC)
TEMED (BIO-RAD)
Tris-Base (OmniPure)
Trypan Blue (MERCK)
Tween-20(MERCK)

3.1.4. 抗體:

一級抗體:



p-FLT3(Tyr589/Tyr591) (Cell Signaling # 3464)

FLT3(Santa Cruz # 479)

p-STAT5(Tyr694)(Cell Signaling # 4322)

STAT5(Genetex # 61098)

p-AKT(Ser473) (Cell Signaling # 4058)

AKT(Cell Signaling # 9272)

p-ERK(Thr202/Tyr204)(Cell Signaling # 4370)

ERK(Cell Signaling # 4695)

GAPDH(Genetex # 627408)

Tubulin(Genetex # 628802)

Mcl-1(Santa Cruz # 12756)

Bcl-2(Merck Millipore OP60)

Bak(Merck Millipore AM03)

β -catenin(Genetex # 101254)

p-GSK3 β (Ser9) (Cell Signaling # 9336)

GSK3 β (Cell Signaling # 9315)

Cleaved caspase 3(Cell signaling # 9664)

Caspase 3 (Santa Cruz # 7148)

二級抗體:

Mouse IgG antibody (Cell signaling # 7076)

Rabbit IgG antibody (Cell signaling # 7074)

3.1.5. 試劑組:

Bradford Protein Assay(BIO-RAD # 500-0006)

CellTiter96® Cell Proliferation Assay(Promega # 3581)

DNA-Free(Ambion # 1906)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI # 4368814)

Human Phospho-Kinase array(R & D System # ARY003B)

Nuclear and cytoplasmic extraction reagent(Thermo # 78833)

PageRuler Prestained Protein Ladder(Thermo # 26616)

Spectra Multicolor High Range Protein Ladder (Thermo # 26625)

TRIzol® reagent(Invitrogen # 15596018)

Western Lightening® Plus-ECL(Perkin Elmer # WBKLS0500)



3.1.6. 藥品與試劑配製:

I. 細胞培養液

於 4000 ml 的 RPMI-1640 溶液中加入 8 g 的 sodium bicarbonate，接著以 1M HCl 調整 pH 至 7.25~7.35，再加入 40 ml 的非必需胺基酸以及抗生素，再以 0.45 μ m 過濾器過濾，並分裝至含有 50 ml 胎牛血清的血清瓶，配置成含有 10% FBS RPMI-1640 細胞培養液。

II. 1X Phosphate Buffer Saline

將 9.88 g phosphate buffer saline 加入 1000 ml ddH₂O 回溶後以高溫高壓滅菌，降溫後使用。

III. 1X Phosphate Buffer Saline- 0.1% Tween 20

將 4 ml 的 Tween 20 加入 1X 1000ml PBS 溶液後混合均勻。

IV. 10X Running buffer

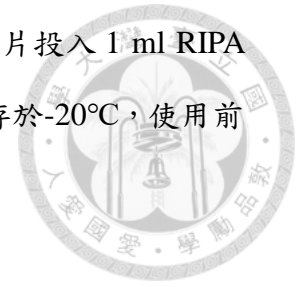
將 30.2 g Tris-base、144 g Glycine、10 g SDS，以 800 ml ddH₂O 回溶後調整 pH 值至 8.3，最後以 ddH₂O 補到 1L。

V. 10X Transfer buffer

將 30 g Tris-base、150 g Glycine 加入 800 ml ddH₂O 回溶後以 ddH₂O 補到 1L。

VI. Cell lysis buffer

將 protease inhibitor 及 phosphatase inhibitor 藥錠各一片投入 1 ml RIPA buffer 配成 10X lysis buffer 後，分裝每管 100 μ l 並保存於-20 $^{\circ}$ C，使用前再加入 900 μ l RIPA buffer。



VII. SDS-PAGE(2 片)

下層膠(8% Resolving gel)

以 9.3ml ddH₂O、5.3ml 30% acrylamide mix、5.0ml 1.5M Tris(pH8.8)、0.2ml 10% SDS 混合後，最後加入 0.2ml 10% ammonium persulphate、0.012ml TEMED，混和均勻後注入製膠模型中，以 isopropanol 壓膠，約 30 分鐘凝固後以棉紙吸掉 isopropanol。

上層膠(5 % stacking gel)

以 5.5ml ddH₂O、1.3ml 30% acrylamide mix、1.0ml 1M Tris(pH6.8)、0.08ml 10% SDS 混合後，最後加入 0.08ml 10% ammonium persulphate、0.008ml TEMED，混和均勻後注入製膠模型中，並插入齒梳。

3.2. 方法

3.2.1. 細胞培養

以含有 10% FBS 的 RPMI-1640 繼代培養，並置於 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培養箱培養，每三天繼代一次。

3.2.2. 細胞抑殺試驗 (MTS assay)

將細胞懸浮液配成 10⁵/ml，將 50 μ l 細胞懸浮液投入 96 孔盤中，24 小時後再加入等體積雙倍濃度的藥物，共五重複，經過 72 小時後，於每孔加入 20 μ l CellTiter 96[®] Aqueous One Solution 再培養 2 小時，測定 490nm 吸光值。

3.2.3. 細胞生長曲線

將細胞懸浮液配成 4 x 10⁴/ml，將 100 μ l 細胞懸浮液投入 96 孔盤中，每個時間點共作五重複。之後，在第 24、48、72 小時於每孔加入 20 μ l

CellTiter 96® AQueous One Solution，再培養 2 小時後測定 490nm 吸光值。最後套入 OD490 換算細胞數目的標準曲線公式。

3.2.4. 白血球表面抗體螢光染色

每管需要 10^6 個細胞，加入所要分析的螢光單株抗體，於室溫避光反應 20 分鐘，以流式細胞儀分析，且每株抗體需有各自的 isotype control。

3.2.5. 細胞萃取物製備

將 2×10^6 個細胞以 1500 rpm， 4°C ，離心 5 分鐘後移除培養液，以冰的 PBS 清洗過後去除殘留的廢液，加入 35 μl cell lysis buffer，每 10 分鐘充分震盪 10 秒，共 3 次，之後使用超音波震盪器以每 10 秒震盪，停 10 秒的循環，共 3 次。接者以 14000 rpm， 4°C ，離心 10 分鐘，將上清液轉移到新的離心管中，測定濃度後分裝並保存於 -80°C 。

3.2.6. 蛋白質濃度定量

首先製備蛋白濃度標準曲線，將 bovine serum albumin stock 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以 ddH₂O 稀釋，各別取 0、1、2、4、8、10、12 μl 以 ddH₂O 補至總體積為 800 μl ；細胞萃取液則取 2 μl 加上 798 μl ddH₂O。加入回溫後的 200 μl Bradford Protein assay 試劑混和均勻，取 200 μl 至 96 孔盤中，每一樣品各做三重複，之後測定 595nm 吸光值，再套入蛋白濃度標準曲線，定量出樣本中的蛋白濃度，最後分裝樣本並保存於 -80°C 。

3.2.7. 西方墨點法

取等量蛋白以及 3.5 μl protein marker 注進 SDS-PAGE 凹槽，以 80V 進行電泳 1 小時，再以 100V 進行 1.5 小時。電泳完成後以濕式轉漬法將蛋白轉漬至 PVDF 膜上，以固定伏特 100V、隨機電流 380mA，轉漬 2 小時。轉漬完成後以油性原子筆標示 marker 分子量位置，再依蛋白位置裁切 PVDF 膜後以 blocking buffer 於室溫搖晃 1 小時，再以 PBS-T 於室溫清洗，每 10 分鐘一循環，共 3 次。之後將 PVDF 膜與以 PBS-T 稀

釋後的一級抗體溶液於 4°C 搖晃過夜。將 PVDF 膜以 PBS-T 於室溫清洗，每 10 分鐘一循環，共 3 次。再放置於以 PBS-T 稀釋後的二級抗體溶液室溫反應 40 分鐘，最後以 PBS-T 於室溫清洗，每 10 分鐘一循環，共 3 次。最後再以 Western Lightening® Plus-ECL 的 oxidizing reagent 和 luminol reagent 等量混和，將 PVDF 膜浸淋過後再以 LAS-4000 冷光分析儀收集冷光訊號。

3.2.8. RNA 萃取

將 5×10^6 個細胞以 1500 rpm，4°C，離心 5 分鐘後移除培養液，以冰的 PBS 清洗過後去除殘留的廢液，加入 1 ml TRIzol® reagent 反覆吸排直至沒有白色細胞團塊，置於 -80°C 過夜。加入 200µl Chloroform 並反覆搖晃 15 秒，樣品置於 -20°C 反應 40 分鐘，以 12000 g，4°C 離心 15 分鐘，吸取 400µl 上清液到含有 400µl Isopropanol 離心管混和均勻後置於冰上 15 分鐘，以 12000 g，4°C 離心 15 分鐘。倒掉上清液後加入 DEPC 水稀釋的 75% 酒精沖洗沉澱物，以 12000 g，4°C 離心 15 分鐘，倒掉上清液，接著將離心管倒扣風乾直到 RNA 沉澱物呈現半透明，加入 20µl DEPC 水回溶置於 60°C 乾熱氣 15 分鐘，直至 RNA 完全溶解。接著進行去 DNA 動作：加入 3µl 10X DNase buffer 與 1µl DNaseI，以 parafilm 包覆後置於 37°C 水浴槽反應 30 分鐘，之後加入 4µl DNase inactivation reagent，以 12000 g，4°C 離心 2 分鐘，取出上清液即為 RNA 樣本，以超微量分光光度計測定濃度後置於 -80°C 保存。

3.2.9. 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

利用試劑組將轉為 cDNA。每一反應試管包含 3.7µl DEPC 水、2µl 10X RT buffer、0.8µl 25X dNTP mix(100mM)、2µl 10X random primer、1µl MultiScribe™ reverse transcriptase、0.5µl RNase inhibitor(40 units/µl) 以及 10µl RNA(100ng/µl)。總體積為 20µl，於 25°C 作用 10 分鐘、37°C 作用 2

小時、85°C作用 5 分鐘，最終溫度為 4°C，產物將長期儲存於-20°C。

3.2.10. PCR 聚合酶連鎖反應

引子設計為根據 NCBI 資料庫，以 Primer 3 設計引子，序列如表一所示。每一反應試管包含 1 μ l cDNA、1 μ l forward primer(10 μ M)、1 reverse primer(10 μ M)、0.3 μ l Tag polymerase、2 μ l dNTP(2.5mM)、3 μ l 10X PCR buffer、1.8 μ l MgCl₂、19.9 μ l ddH₂O。總體積為 30 μ l。聚合酶連鎖反應由 95°C作用 10 分鐘、之後以 95°C作用 1 分鐘、58°C作用 1 分鐘、72°C作用 1.5 分鐘為一循環，共進行 35 個循環，最後延伸溫度以 72°C作用 10 分鐘，最終產物以 2% 洋菜膠進行電泳確認。

3.2.11. 1 % 洋菜膠製備與電泳

取 0.25 克的洋菜膠粉末加入 25ml 1X TBE 溶液中，丟入攪拌磁加熱至透明為止。將溶液倒進製膠盤中，以 tip 將氣泡刺除後室溫放涼，凝固後的洋菜膠拔除齒梳後即可進行電泳。

在電泳槽內放置洋菜膠片，倒入可蓋過膠片水位的 1X TBE 溶液，將 3.5 μ l 的 DNA marker 注入齒槽內，樣本則是先以 1 μ l 與 5 μ l 的 6X loading dye 混和均勻後依序注入齒槽，以 50V 通電 15 分鐘，確定樣本皆入膠後再以 100V 通電約 20 分鐘。結束後將膠片放入含有 EtBr 溶液的染缸搖晃染 15 分鐘，之後以自來水搖晃退染 15 分鐘，最後放進照膠台以 UV 光分析結果。

3.2.12. 聚合酶連鎖反應產物之純化

將聚合酶連鎖反應之產物與等體積的 binding solution 混合，之後全部轉移入 spin column 中，以 13000 rpm，室溫離心 1 分鐘，將上清液倒除後加入 500 μ l wash buffer，以 13000rpm，室溫離心 3 分鐘，再重複一次清洗的步驟後，將 spin column 置於新的 1.5ml 離心管上，加入 25 μ l 的 elution buffer 室溫靜置 5 分鐘，之後以 13000 rpm 室溫離心 2 分鐘，所

收集於離心管中的即為純化過後的 PCR 產物。

3.2.13. 序列分析

純化過的 PCR 產物測定濃度完後以 1~2 ng/100bp 取適當量加入 1 μ l 定序 primer(5 μ M)，以 ddH₂O 補至總體積為 6 μ l。送至台大醫院第二共研研究室進行序列分析(Big Dye terminator v3.1 Cycles sequencing kit，ABI 3730 Genetic Analyzer)。

3.2.14. 即時監控聚合酶連鎖反應(q-RT-PCR)

引子設計為根據 NCBI 資料庫，以 Primer 3 設計引子，序列如表一所示。將 170 μ l 的 ddH₂O 加入反轉錄後的 cDNA 管內，每一反應試管包含 12.5 μ l 2X SYBR Green PCR Master Mix、1.5 forward primer(5 μ M)、1.5 μ l reverse primer(5 μ M)、9.5 μ l cDNA，總體積為 25 μ l，於 50 $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘、95 $^{\circ}$ C 變性 10 分鐘、之後以 95 $^{\circ}$ C 作用 15 秒、60 $^{\circ}$ C 作用 1 分鐘，進行 40 個循環。反應結束後溫度將由 95 $^{\circ}$ C 緩慢降至 60 $^{\circ}$ C，偵測產物的 T_m(melting temperature)，確認產物為單一目標物後，以 7500 Software v2.0.4 分析，藉由 $2^{-\Delta Ct}$ 計算出目標基因的相對表現量，其中，
 $-\Delta Ct = Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{HPRT})$ 。

3.2.15. Pyrosequencing

待測樣本之 cDNA 以聚合酶連鎖反應(3.2.10)放大待測基因，所使用之引子如表二所示，之後以 1% 洋菜膠確認(3.2.11)，於 0.2ml 八連排中加入 18 μ l ddH₂O、40 μ l binding buffer、2 μ l beads 以及 20 μ l PCR 產物，總體積為 80 μ l。上蓋後震盪 10 分鐘，在置於 PyroMark Q24 Vacuum workstation PCR plate，利用 vacuum 吸取樣品後依序以 70% 酒精、denaturing buffer、wash buffer、ddH₂O 溶液清洗。之後將 vacuum 上的樣品加至含有 25 μ l sequencing primer 的 Q24 plate 相對位置上，於 80 $^{\circ}$ C Q24 plate holder 加熱 2 分鐘，降溫後置於 PyroMark Q24 儀器內反應，

最後以 Pyromark Q24 software 分析目標基因位點的 ATCG 比例，判斷目標為點的突變程度。



3.2.16. GeneScan

將待測細胞的 cDNA 以 AmpliTag Gold® DNA polymerase 進行 PCR，於 95°C 變性 10 分鐘，之後以 95°C 作用 30 秒、58°C 作用 30 秒、72°C 作用 30 秒，進行 35 個循環，跑膠確認有產物後以 ddH₂O 稀釋 2x、4x、8x，上機分析前可避光儲存於 -20°C。取 0.5µl 樣品與 9.5µl formaldehyde 以及標準品加入 96 孔盤並混合，於 95°C 加熱 2 分鐘之後以毛細管電泳上機分析。

3.2.17. 建立對 cabozantinib 具抗藥性之 Molm13-XR

首先以細胞抑殺試驗分析 Molm13 對於 cabozantinib 的 IC₅₀ 為 1.06±0.93 nM，於繼代培養時將細胞培養在 1nM cabozantinib 的培養液內，待細胞生長穩定後以 2 倍提升藥物濃度的方式，提升至 1µM，逐漸剔除掉敏感性細胞，經 5 個月後建立出具抗藥特性之 Molm13-XR，其 IC₅₀ 為 473.36 ±154.73 nM。

3.2.18. Human phospho-kinase array

將 10⁷ 個細胞以 1500 rpm，4°C，離心 5 分鐘後移除培養液，以冰的 PBS 清洗過後去除殘留的廢液，加入 1ml Lysis buffer 17(含有 10µg/µl 的 aprotinin、leupeptin、pepstatin)震盪均勻，測定蛋白濃度後將樣本配置成等濃度，取 1µg 蛋白配置於 array buffer 1，成待測樣本。將蛋白膜片以 array buffer 1 在室溫搖晃 1 小時，之後將待測樣本加入，在 4°C 搖晃過夜。隔夜後倒掉樣本液，以 1X wash buffer 室溫搖晃 10 分鐘，共 3 循環，之後在以 1:2000 的稀釋比例將 anti-HRP detection antibody 溶於 1X array buffer 2，將蛋白膜片置於其中室溫搖晃 2 小時。之後倒掉溶液，以 1X wash buffer 室溫搖晃 10 分鐘，共 3 循環，最後再將 chemi reagent

mix 1&2 以等量混和，將蛋白膜片浸淋過後以 LAS-4000 冷光分析儀收集冷光訊號。



3.2.19. 核質蛋白分離實驗

以 Nuclear and cytoplasmic extraction reagent(Thermo # 78833)進行實驗，將 10^6 個細胞以 1500 rpm, 4°C ，離心 5 分鐘後移除培養液，以冰的 PBS 清洗過後去除殘留的廢液，加入 100 μl CER I 並震盪 15 秒，之後置於冰上靜置 10 分鐘，加入 5.5 μl CER II 並震盪 5 秒，之後置於冰上靜置 1 分鐘，以 16000 g, 4°C 離心 5 分鐘，不碰觸到沉澱物地將上清液吸取到新的離心管，此即為細胞質蛋白萃取物(cytoplasmic extract)。在原沉澱物管中加入 1 ml 冰的 PBS，以 16000 g, 4°C 離心 5 分鐘，移除掉上清液，此清洗步驟重複 2 次。加入 50 μl NER 並震盪 15 秒後置於冰上靜置 10 分鐘，共重複 4 次。最後以 16000 g, 4°C 離心 10 分鐘，將上清液吸取到新的離心管，此即為細胞核蛋白萃取物(nuclear extract)，之後將核與質萃取物定量蛋白濃度及分裝並保存於 -80°C 。

3.2.20. RNA-seq

將抽取好的 RNA 送 10 μg 於基龍米克斯分析，剩餘的 RNA 全轉為 cDNA，之後凍於 -20°C 保存。突變分析是以 IGV 軟體進行，從 NCBI 查詢所欲分析基因之 NM accession number，輸入於 IGV 後再對應於人類標準序列進行分析。另外，以 DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)分析軟體分析差異性表現基因在 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database) 所參與的細胞生物訊息傳遞路徑，以 $p < 0.05$ 做為 threshold。

3.2.21. 統計方法

利用 Microsoft Excel 計算，以雙尾 t 檢定檢驗控制組以及實驗組的統計差異值，當 p 值小於 0.05 具有統計上的顯著差異。

第四章 實驗結果



4.1. Cabozantinib 對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制效果

首先，先以細胞抑制試驗(MTS assay)測試 Molm13-P 對於 cabozantinib 的感受性，得到半抑制濃度 IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) 為 1.06 ± 0.93 nM(圖 1)。藉由持續給予藥物(continual drug selection)的方式，起初先將 Molm13-P 培養在濃度為 1 nM 的 cabozantinib 培養液內，待細胞恢復成正常繼代頻率時，便提高藥物濃度，濃度以兩倍增加之提升規律培養約 5 個月，建立對於 cabozantinib 具抗藥性的細胞株，給予其名稱為 Molm13-XR。Molm13-XR 對於 cabozantinib 的 IC_{50} 為 473.36 ± 154.73 nM (圖 1)。後續母細胞珠與抗藥細胞株的培養皆是處在不含有藥物的 RPMI+10% FBS。

4.2. Molm13-P 以及 Molm13-XR 之 FLT3 情形

Molm13 是屬於 FLT3-ITD 異合子(heterozygous)突變的細胞株，且 FLT3 所在的第 13 號染色體具有 3 條(+13)²⁸。我們以 GeneScan 檢測 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 FLT3-ITD 突變情況，結果顯示 Molm13-P 之 FLT3-ITD 與 FLT3 wild-type 的訊號面積為 40346 : 23295 ; Molm13-XR 為 175363:104253，兩者皆大約為 2:1，顯示第 13 號染色體有兩條為 FLT3-ITD 突變，有一條為 FLT3-wild type (圖 2A)。藉由 RNA-seq 分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 mRNA，在 FLT3 mRNA 的序列上看見第 2524 個核苷酸位點，Molm13-P 偵測到 100% 的 G，而同樣的位點，則在 Molm13-XR 偵測到 69% 的 G 以及 31% 的 T(圖 2B)，即第 835 個密碼子由 GAT(Aspartic acid)突變形成 TAT(Tyrosine)，簡稱為 D835Y。我們也以 Sanger sequencing(反股)確認，Molm13-P 在第 835 個密碼子組成 ATC，Molm13-XR 除了有 ATC 以外還有 ATA 的訊號(圖 2C)，從 Molm13-XR 挑出的 6 株 single clone(C1-C6)也有相同的結果(附圖 6)。

我們也利用 Sanger sequencing 定序(正股) genomic DNA，Molm13-XR 具有 GAT 以及 TAT 之訊號(圖 2D)。另外也以 Pyrosequencing 檢測突變百分比，Molm13-XR 的正常密碼子 GAT 占了 65%，突變密碼子 TAT 佔了 35%(圖 2E)，比例大約為 2:1。

綜合以上，Molm13-XR 應有 2 條染色體屬於 FLT3 D835 wild-type，而 1 條染色體具有 FLT3-D835Y 突變。

利用即時監控聚合酶連鎖反應分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 FLT3 mRNA 表達量，結果顯示兩株細胞並沒有顯著的差異性($p=0.38$)(圖 3A)，另外 RNA-seq 分析的結果同上，兩者並無顯著差異($p=0.99$)(圖 3B)。以西方墨點法分析 FLT3 磷酸化的程度，FLT3 蛋白分成兩種形式，糖基化(glycosylation)(160kDa)以及非糖基化(130kDa)，結果顯示 Molm13-XR 的磷酸化程度增加(圖 3C)。

4.3. Molm13-P 以及 Molm13-XR 的生長曲線以及細胞週期情形

以細胞增生試驗評估兩株細胞的增生速度是否具有差異，結果顯示 Molm13-XR 有較快的生長速度(圖 4A)，在實驗進行到第 48 小時即具有顯著差異($p=0.0008$)。分析細胞倍增的時間(doubling time)，Molm13-P 為 17.77 小時，Molm13-XR 為 15.81 小時。以 RNA-seq 分析 *PIMI* 基因表現量，Molm13-XR 具有顯著性地增加(圖 4B)。

在細胞週期部分，Molm13-P 以及 Molm13-XR 的細胞週期分布，並無顯著差異(sub-G1 phase: 5.52 ± 2.18 v.s. 4.44 ± 1.0 、G1 phase: $48.47 \pm 6.36\%$ v.s. $49.63 \pm 2.4\%$ 、S phase: $18.26 \pm 13.04\%$ v.s. $25.73 \pm 1.62\%$ 、G2/M phase: $26.2 \pm 5.62\%$ v.s. $17.9 \pm 1.01\%$)(圖 4C)。

4.4. 第一型及第二型 FLT3 抑制劑對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制效果

MTS assay 的結果顯示 Molm13-XR 對於第一型的 FLT3 抑制劑 midostaurin 以及 crenolanib 仍具有感受性；而對於第二型的 FLT3 抑制劑 sorafenib 以及 quizartinib 則依然存有抗藥性，特別是對 sorafenib 的抗藥程度最大(圖 5)。

4.5. Molm13-P 以及 Molm13-XR 的激酶磷酸化程度之差異

利用 phospho-kinase array 分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的激酶磷酸化的差異，以分析兩株細胞的訊息路徑活化情形。結果顯示，Molm13-XR 在下列激酶的磷酸化程度較 Molm13-P 多，包括 STAT5a/b 之 Tyr694/Tyr699 (normalized to control:1.06 vs. 1.35)、AKT 之 Ser473(0.83 vs. 1.05)、ERK1/2 之 Thr185/Tyr187, Thr202/Tyr204(0.7 vs. 1.0)、CREB 之 Ser133(1.44 vs. 2.16)，以及 GSK3 α/β 之 Ser21/S9(1.67 vs. 2.67) (圖 6)。接著利用西方墨點法確認上述的結果，證實在 Molm13-XR 中 STAT5a 之 Tyr694、AKT 之 Ser473、ERK1/2 之 Thr202/Tyr204、CREB 之 Ser133，以及 GSK3 β 之 S9 的磷酸化增加(圖 7)。

4.6. 細胞凋亡(apoptosis)相關蛋白在 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的差異

以西方墨點法分析兩株細胞的細胞凋亡蛋白表現量，顯示 Mcl-1 蛋白在 Molm13-XR 有明顯增加，而 Bcl-2、Bak 則不具有明顯差異(圖 8A)。

接著以即時監控聚合酶連鎖反應分析，結果顯示兩株細胞的 Mcl-1 mRNA 表現量並無顯著差異($p=0.28$)(圖 8B)，RNA-seq 的結果同上 ($p=0.94$)(圖 8C)。

4.7. PIK3CA、PTEN、AKT 之突變熱點於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的情形

由於觀察到 Molm13-XR 的 AKT 之 Ser473 磷酸化增加，因此往上游尋找調控 AKT 活化的分子。AKT 是許多生長因子接受器(growth factor receptor)

所活化的 PI3K 之下游分子，文獻指出 *PIK3CA*，其會轉譯出 PI3K 的催化功能區域，當發生活化突變(activating mutation)時，包括位於 exon9 的 E542K、E545K，以及位於 exon20 的 H1047R，皆可能使 AKT 異常活化²⁹。

另外，PI3K 活化 AKT 的過程會受到抑癌蛋白 PTEN 所負調控。*PTEN* 是具有磷酸酶活性的抑癌基因，其所編碼的蛋白能夠將 PIP3 轉換成 PIP2，而抑制 AKT 的活化，因此，*PTEN* 的喪失功能突變(loss of function mutation) 已知有 R130、R173，以及 R233，會使 PI3K/AKT 訊息路徑不受抑制³⁰。另外，也有文獻指出 *AKT1* 基因本身的 E17K 位點突變會使得 AKT 異常活化³¹。藉由 RNA-seq 分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的上述 *PIK3CA*(圖 9A)、*PTEN*(圖 9B)、*AKT1*(圖 9C)之熱點突變位，結果顯示兩株細胞的上述位點皆為正常序列。

4.8. Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 *K-ras*、*N-ras* 突變情形

由於觀察到 Molm13-XR 的 ERK1/2 之 Thr202/Tyr204 磷酸化增加，因此往上游尋找活化 ERK 的訊息路徑分子。文獻指出 *RAS* 基因的突變會造成 Raf/MEK/ERK 以及 PI3K/PTEN/Akt/mTOR 訊息路徑的異常活化³²。

藉由 pyrosequence 分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 *K-ras* 以及 *N-ras* 的突變熱點，包含 codon12、13、59、61、117、146³³。結果顯示在 *K-ras* 的 codon 117 部分，Molm13-P 以及 Molm13-XR 皆有 TTT(Lys)→ATT(Asn)(反股)的突變，但突變比例反而由 Molm13-P 的 36%減少成 Molm13-XR 的 19%(圖 10)，加上在母細胞即存在此突變，因此推估 *RAS* 的 codon 117 突變並非 Molm13-XR 的 ERK、AKT 磷酸化增加的原因。另外，在 *N-ras* 的 codon 146 部分，同樣的，兩株細胞皆有 GCC(Ala)→ACC(Thr)(正股)的突變，且兩者的突變比例接近(19% vs 20%)(圖 11)，因此同樣推測 *N-ras* 的 codon 146 突變並非為 ERK、AKT 活化有差異的原因。

4.9. Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 β -catenin、下游基因 *MYC*、*CCND1* 的差異。

由於 GSK3 β 之 Ser9 磷酸化後會失去活性，GSK3 β 亦是調控 Wnt/ β -catenin 訊息路徑的分子之一，當其具有活性時會與 APC、CK1、Axin 蛋白分子組成 destruction complex，使 β -catenin 磷酸化後降解，因此 Wnt/ β -catenin 訊息調控路徑會關閉；反之若路徑開啟時， β -catenin 會進入細胞核做為 TCF/LEF(T cell factor/ lymphoid enhancer factor-1)轉錄因子的輔助活化因子(co-activator)，促使下游基因例如 *MYC*、*CCND1* 的表達²¹。

藉由細胞核質蛋白分離的實驗，分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 β -catenin 分別在細胞質以及細胞核的蛋白量，結果顯示兩株細胞的 β -catenin 於細胞質中的量沒有明顯差異，在細胞核中則是 Molm13-P 存有 β -catenin，而 Molm13-XR 存在更多。此結果顯示 Molm13-P 本身即為 β -catenin 會活化的細胞株(圖 12A)。

接著欲分析是否 Molm13-XR 有較多的 β -catenin 進入細胞核會增加下游基因的表達。由 RNA-seq 分析結果得到，兩株細胞的在 *MYC* 的表達量並無差異(p=0.99)，而 *CCND1* 則具有顯著差異(p=0.02)(圖 12B)，但以即時定量聚合酶連鎖反應分析，兩者的 *CCND1* 並無統計上的顯著差異(p=0.07)(圖 12C)。

4.10. Molm13-P 與 Molm13-XR 具差異性表現之 1057 個基因於 KEGG database 中具顯著意義之訊息傳遞路徑。

經 RNA-seq 分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之差異性表現基因，以 p<0.05 挑選出 1057 個基因，經由 DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)分析軟體分析 1057 個基因於 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database)訊息路徑網絡中具有顯著意義之路徑，並以 p<0.05 做為挑選之 threshold，結果顯示 proteoglycan in

cancer(hsa05205)最具有顯著性意義(圖 13)，並列出 Molm13-P 與 Molm13-XR 參與其中具有表現差異性之基因(附表 3)。



4.11. ICG-001 對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制性

以 MTS assay 測試 ICG-001(β -catenin 抑制劑)對於兩株細胞之抑制程度，實驗結果顯示 ICG-001 對於 Molm13-P 之 IC_{50} 為 $2.09 \pm 0.32 \mu M$ ，對 Molm13-XR 之 IC_{50} 為 $3.35 \pm 1 \mu M$ (圖 14A)。以核質蛋白分離試驗分析 ICG-001 於 2、 $4 \mu M$ 處理兩株細胞經 24 小時後之 β -catenin 蛋白量，結果顯示 ICG-001 能夠劑量依存性地減少 Molm13-P 與 Molm13-XR 細胞質與細胞核中的 β -catenin (圖 14B)。

4.12. 各種抑制劑對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的抑制效果

接者以 MTS assay 分析了 MK-2206(AKT 抑制劑)、CI-1040(MEK 抑制劑)、LY294002(PI3K 抑制劑)，以及 pyrvinium pamote(Wnt 抑制劑)對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的抑制效果。實驗結果顯示，Molm13-P 以及 Molm13-XR 對於藥物的 IC_{50} 分別為: MK-2206: $0.95 \pm 0.36 \mu M$ 、 $1.41 \pm 0.40 \mu M$; CI-1040: $1.88 \pm 0.25 \mu M$ 、 $3.16 \pm 0.28 \mu M$; LY294002: $7.05 \pm 2.49 \mu M$ 、 $7.66 \pm 2.75 \mu M$; pyrvinium pamote: $14.81 \pm 10.77 nM$ 、 $13.45 \pm 6.59 nM$ (圖 15)。

Molm13-P 與 Molm13-XR 對於上述四種藥物的感受性並沒有明顯的差異，而 pyrvinium pamote 對於兩株細胞的抑制效果最佳，可以在 nanomolar 的程度下抑制細胞的活性，因此接著分析 pyrvinium pamote 的作用機制。

4.13. Pyrvinium pamote 的作用機制

文獻指出 pyrvinium pamote(簡稱 PP)會抑制 JAK/STAT5 以及 AKT 訊息傳遞路徑^{25 27}、活化 GSK3 β ²⁶、減少抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 而使細胞走

向細胞凋亡²⁷、抑制粒線體的電子傳遞鏈複合物 I (electron-transport chain complex I)使無法製造 ATP³⁴。

我們以 0.5、1 μ M 的 PP 作用於 Molm13-XR 經過 4 小時，由 ATP assay 得到有劑量依存性 (dose-dependent) 地減少細胞的 ATP(圖 16A)。進一步以西方墨點法在相同的條件下分析 STAT5、AKT、GSK3 β 分子的情形，觀察到經 PP 作用後，p-STAT5、p-AKT、p-GSK3 β -Ser9 皆有減少，也就是會使 AKT、STAT5 激酶失去活性，而 p-GSK3 β -Ser9 減少也就代表著 GSK3 β 活性增加的現象(圖 16B)。

而在細胞凋亡情形的分析上，以 5、25nM 作用於 Molm13-XR 經過 24、48、72 小時，以 Annexin V - Propidium Iodide 染色後以流式細胞儀分析。由於 pyrvinium pamote 本身是一種橘黃色的螢光染料，其最大激發光譜為 477nm，最大釋放光譜為 579nm，進行 AV-PI 染色時會影響到紅、綠螢光的訊號，因此隨著藥物的濃度增加，存活的細胞也會朝著強螢光訊號的方向偏移(圖 17A)。不過，仍然觀察到細胞凋亡的比例(Annexin V + %)有時間依存性(time-dependent)的現象(圖 17B、C)。於是近一步以西方墨點法分析在 PP 處理後的抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2，以及細胞凋亡發生的標誌 cleaved caspase 3 的表現情形，實驗結果顯示 PP 會促使 cleaved caspase 3 增加、Mcl-1 減少，證實細胞凋亡發生(圖 17D)。

綜合以上實驗結果，pyrvinium pamote 會抑制 Molm13-XR 的 STAT5、AKT 的活性、增加 GSK3 β 的活性，使細胞的 ATP 減少，以及促使抗凋亡蛋白 Mcl-1 減少、cleaved caspase 3 增加，使細胞凋亡發生。

4.14. Molm13-P 與 Molm13-XR 的表面抗原差異

利用流式細胞儀分析兩株細胞的表面抗原，結果顯示 Molm13-P 有 93.8% 為 CD56⁺、6.2% 為 CD56⁻，而 Molm13-XR 則有 99.9% 為 CD56⁺、0.1% 為

CD56⁺ (圖 18)。



4.15. Molm13-P 與 Molm13-XR 的 ABC 傳輸蛋白的 mRNA 表現量

ABC 傳輸蛋白為在細胞膜上的一種穿膜蛋白，能夠藉由 ATP 將藥物運輸於細胞內外。文獻指出癌細胞產生多重抗藥性(Multidrug Resistance, MDR)與 ABC 蛋白過度表現有關³⁵。與抗藥性相關的 ABC 傳輸蛋白包括 ABCB1³⁶、ABCC1³⁷、ABCC2³⁸、ABCG2³⁹。實驗結果顯示 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 ABCC1(p=0.27)、ABCC2(p=0.11)之 mRNA 表現量並無顯著差異(圖 19)。

第五章 討論

FLT3 突變是急性骨髓性白血病在臨床上最常見的突變，大約佔有 30~40%，目前已經發展出許多能夠針對 FLT3 的抑制劑，例如 cabozantinib、tandutinib、lestaurtinib、midostaurin、sorafenib、quizartinib、crenolanib 等⁴⁰。

本篇論文所使用的 cabozantinib 是一種口服的多激酶抑制劑(multikinase inhibitor)，其抑制的標的有 VEGFR2、RET、KIT、MET、FLT3、TIE2 等⁵。在細胞實驗上已經知道 cabozantinib 能夠在低於 5 nM 的濃度下選擇性地抑制 FLT3-ITD 突變的 MV4-11 以及 Molm13⁸。在第一期的臨床試驗給予受試者最高劑量 175 mg，在人體血漿中能夠達到的最高濃度為 $1.08 \pm 0.51 \mu\text{M}$ ，細胞實驗有效的濃度遠低於此。過去實驗室有將 FLT-ITD 血癌細胞株 Molm13-P 異種移植入裸鼠皮下，待腫瘤生長至 200mm^3 ，開始口服給予 vehicle 及 cabozantinib，從腫瘤生長圖可見，兩組的腫瘤大小成長有顯著差異(附圖五， $p=0.0031$)。從上述 *in vitro* 及 *in vivo* 實驗顯示 cabozantinib 有潛力能成為急性骨髓性白血病的一種治療用藥，但由於標靶藥物的復發性是常見的，因此有必要進行 cabozantinib 的抗藥性探討。

我們將人類急性血癌細胞株 Molm13-P 培養在含有 cabozantinib 的培養液內，由低濃度開始以兩倍濃度增加的頻率長時間培養在藥物內，得到 IC_{50} 為 $473.36 \pm 154.73 \text{ nM}$ ，建立出抗藥細胞株 Molm13-XR。過去文獻指出病人的 FLT3-ITD 重複序列的長度越長，病人的整體存活期(overall survival)以及無病存活期(relapse-free survival)越短⁴¹，由 GeneScan 分析結果顯示 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 ITD 重複序列長度不具差異(圖 1)。另外，實驗結果顯示 Molm13-XR 的 FLT3 TKD 發生 heterozygous D835Y 突變(圖 2)。過去有研究團隊亦是將 Molm13 長時間培養在 FLT3 抑制劑 MLN518，所建立的抗藥細胞株同樣也發現帶有 heterozygous D835Y 突變⁴²，與我們的實驗結果一致。

D835Y 突變也在其他 FLT3 抑制劑的抗藥性細胞被發現過，例如 Sorafenib⁴³、Tandutinib⁴²。另外在臨床檢體的研究顯示出 FLT3-ITD+ 的 AML 病人經 sorafenib 治療後出現抗藥性而再復發，從骨髓血球細胞檢測出在治療前不具有的 FLT3 D835Y 突變^{43,44}。有文獻探討藥物無效的原因是由於蛋白結構的改變，FLT3 的 TKD 發生點突變會使 kinase 結構改變，因而影響藥物的結合，使藥物的效果減弱¹⁴。另外有文獻在不具有 FLT3 的 Ba/F3 老鼠細胞上分析抗藥性，利用轉殖技術將 FLT3-ITD 以及各種 FLT3-ITD-TKD 突變送入 Ba/F3 細胞，結果顯示 FLT3-ITD-D835Y 相較於只有 FLT3-ITD 的細胞具有 quizartinib 抗藥性⁴⁵，而 Nguyen 等人的研究亦使用同樣的方式建立 Ba/F3 模式系統，另外分析了其他 FLT3 抑制劑的感受性，結果顯示 FLT3-ITD-D835Y 會對部分 FLT3 抑制劑也具抗藥性，例如 AG1295、Sorafenib、KW2449、Quizartinib⁴⁶。我們的實驗結果顯示 Molm13-XR 針對 sorafenib、quizartinib 仍然具有抗藥性(圖 5)，符合上述文獻的結果，而第一型抑制劑 (midostaurin、crenolanib) 能夠在低濃度下達到抑制效果，因此第一型抑制劑對於 Molm13-XR 仍然是有效的。

過去文獻將會持續活化的 mutant STAT5 轉殖入 IL3 依賴型生長 (IL3-dependently growth) 的 Ba/F3 細胞後成為 IL3-independent 的細胞，並且高度表現 *PIM1* 以及 *BCL-XL*，顯示 STAT5 訊息路徑之活化對於細胞生長具有重要意義⁴⁷。在我們的實驗結果 Molm13-XR 的 p-STAT5 以及 *PIM1* 表現量顯著增加(圖 4B、圖 7)，這可能是 Molm13-XR 生長速度較快的可能原因(圖 4A)。

有文獻指出 *PI3K* 的活化突變(activating mutation)以及 *PTEN* 的功能缺失突變(loss of function mutation)會透過活化 PI3K/AKT 訊息路徑進而促進癌細胞的生長和轉移^{29,30}，另外也有因 *PIK3CA* 以及 *PTEN* 突變而使癌細胞對標靶藥物產生抗藥性的相關報導^{48,49}。我們的實驗結果顯示 Molm13-P 以及

Molm13-XR 的 *PI3K* 活化突變(activating mutation) 位點皆為正常序列(圖 9)。有文獻指出 LY294002(*PI3K* 抑制劑)對 mutant *PIK3CA* 細胞的生長有較大的抑制程度(相比於 wild type 細胞)⁵⁰，從我們實驗結果顯示 LY294002 對於兩株細胞的抑制程度並不具有顯著差異(圖 15)。從上述結果推測 Molm13-XR 產生抗藥性的原因並非由於 *PIK3CA* 以及 *PTEN* 突變造成。

過去有研究將 Molm14 細胞株同樣以長時間培養在 FLT3 抑制劑 CEP701 建立出抗藥細胞株 M14(R)701，觀察到抗藥株帶有母細胞株所沒有的 *N-RAS* G12V、Q61K 突變，並在母細胞轉殖入上述的突變後也會對 CEP701 具抗藥性⁵¹。Molm14 與 Molm13 細胞株是由同一位 FAB M5a 的病人周邊血所分離出的細胞株，差異在於細胞表面抗原並不完全一致²⁸。除了血液惡性疾病外，也有在大腸癌以及黑色素瘤的研究報導指出 *K-ras* 和 *N-ras* 突變與標靶用藥治療無效具相關性^{52,53}。*N-ras* 以及 *K-ras* 的活化突變會使 *PI3K/AKT* 以及 *RAS/RAF/MEK/ERK* 訊息路徑活化³³。我們的實驗結果顯示不論是 *K-ras* 或 *N-ras* 皆沒有觀察到 Molm13-XR 具有新出現的突變位(圖 10、11)。從上述結果推測 Molm13-XR 的抗藥性原因與 *N-ras*、*K-ras* 突變並不相關。

Mcl-1 蛋白具差異性的部分，過去研究指出 FLT3-ITD 能夠活化 *STAT5* 訊息路徑，增加 Mcl-1 的轉錄及轉譯¹⁷。另外 *PI3K/AKT* 訊息路徑活化下，能夠藉由轉錄因子 CREB 調控 Mcl-1 的轉錄¹⁸。在我們的實驗結果，雖然 Molm13-XR 的 p-*STAT5*、p-*AKT*、p-*CREB* 明顯增加，但並沒有觀察到 Mcl-1 的 mRNA 與母細胞具顯著差異(圖 8B)，但是蛋白量卻在 Molm13-XR 明顯增加(圖 8A)，推測可能為轉譯後修飾的差異造成此結果。根據文獻指出，當 *GSK3β* 失去活性時便無法磷酸化 Mcl-1，導致 Mcl-1 無法走向泛素化降解，而使得 Mcl-1 蛋白能夠穩定存在¹⁹。另外，曾有研究使用 ABT-737(*BCL2/BCL-XL* 抑制劑)進行抗藥性的探討，當細胞中的 Mcl-1 蛋白過度表現會因為結合住 Bax/Bak 蛋白複合物，導致 ABT-737 所誘導的細胞

凋亡無法發生，使細胞出現抗藥性⁵⁴，而有其他研究報告是以 flavopiridol 用來抑制 Molm13 的 Mcl-1 表現量，合併 ABT-737 使用後觀察到細胞凋亡比例增加²⁰。綜合上述推測 Molm13-XR 的 Mcl-1 蛋白相較 Molm13-P 增加可能與其抗藥性有關，未來可以進一步於 Molm13-P 過度表達 Mcl-1 觀察是否亦出現 cabozantinib 抗藥性以證明之。

p-GSK3 β -Ser9 具差異的部分，當 GSK3 β 之 Ser9 發生磷酸化會失去活性⁵⁵。已經知道會將 GSK3 β 之 Ser9 磷酸化的分子有 AKT、p90^{rsk}、p70 S6K⁵⁶⁻⁵⁸。p90^{rsk} 是 MEK/ERK 的下游分子⁵⁹，p70 S6K 是 PI3K/AKT/mTOR 的下游分子⁶⁰。我們的實驗結果觀察到 p-AKT 以及 p-ERK 增加(圖 7)，從上述推測有可能是因為增加了 AKT 以及 ERK 訊息路徑的活化，使 Molm13-XR 的 p-GSK3 β -Ser9 增加。

GSK3 β 是 Wnt/ β -catenin 訊息路徑當中的分子之一，當失去活性會使 β -catenin 能穩定存在於細胞中^{61,62}。 β -catenin 活化後會進入細胞核與 Tcf/Lef 轉錄因子調控 *CCND1*、*MYC* 的轉錄，對於癌症的演進具重要性^{63,64}。核質蛋白分離實驗顯示 Molm13-XR 的 β -catenin 在細胞核的量與 Molm13-P 相比有明顯增加(圖 12A)，以 ICG-001(β -catenin 抑制劑)作用後能夠使 Molm13-XR 的 β -catenin 回復至與 Molm13-P 接近的量(圖 14)，過去有文獻指出抑制 Wnt/ β -catenin 訊息路徑能夠增加 sorafenib 對於癌症的作用效果⁶⁵，未來可以進一步探討合併使用 ICG-001 與 cabozantinib 對於 Molm13-XR 的抑制。

接著以 MTS assay 分析了 MK-2206(Akt 抑制劑)、CI-1040(MEK 抑制劑)、LY294002(PI3K 抑制劑)、pyrvinium pamote(Wnt 抑制劑)對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的感受性。實驗結果顯示 Molm13-P 與 Molm13-XR 對於上述四種用藥的感受性並沒有明顯的差異(圖 15)。在 MK-2206 的第一期臨床試驗，給予人體受試者 60mg 的藥量，在血漿中能達到的最高濃度為 $163 \pm 73.6 \text{ nM}$ ⁶⁶，另外 CI-1040 的第一期臨床試驗給予受試者 800mg 藥量後所達的最高濃度

約為 447nM⁶⁷。LY294002 則是由於毒性大以及溶解度差因此未進入臨床試驗階段⁶⁸。從實驗結果看到 pyrvinium pamote 對於兩株細胞的抑制效果最佳，可以在 nanomolar 的程度下抑制細胞的活性，因此接著分析 pyrvinium pamote 的作用機制。

Pyrvinium pamote 對於 Molm13-XR 的作用機制上，觀察到 PP 能夠使細胞減少 ATP 量、使 AKT、STAT5 激酶失去活性，增加 GSK3 β 活性(圖 16)、使抗凋亡蛋白 Mcl-1 減少、cleaved caspase 3 增加而引發細胞凋亡(圖 17)。在相同條件下觀察到 ATP 量的減少以及 AKT、STAT5 訊息路徑的抑制，間接連結了粒線體的呼吸作用以及 AKT、STAT5 訊息路徑的相關性。有文獻指出 PP 可能是增加了會使 AKT 去磷酸化的 phosphatase 之活性，或是抑制 AKT 蛋白移動至細胞膜而使其無法活化²⁶，因此間接觀察到 p-AKT 減少的現象。另外，有報導指出當 AKT 具活性時會移動至粒線體膜上的 ATP 合成酶 (ATP synthase protein) 並將其磷酸化，增加粒線體的氧氣消耗率(oxygen consumption rate, OCR)^{69,70}，因此 PP 有可能因為抑制了 AKT 的活性，而影響了粒線體的呼吸作用，因此觀察到 ATP 量的減少。上述的兩種假說傾向於 PP 藉由抑制了 AKT 訊息路徑而影響細胞的呼吸作用。

但是，由於 PP 是一種喹啉衍生的橘黃色螢光染料，能藉由螢光顯微鏡觀察螢光進而偵測 PP 位於細胞內的所在處。有文獻即透過建立缺乏粒線體 DNA 以致於無法製作出呼吸傳遞鏈蛋白的 p0 細胞，在顯微鏡下觀察到粒線體上的螢光減少，證明 PP 會坐落於粒線體，特別是呼吸傳遞鏈複合蛋白 I (respiratory chain complex I)^{71,72}。而 p0 細胞經 PP 處理後即觀察不到呼吸作用減少的現象。上述文獻的結果則較傾向於 PP 會直接作用在粒線體膜蛋白上，進而抑制細胞的呼吸作用。

綜合上述，目前對於 PP 的作用機制在 AKT 訊息路徑以及粒線體呼吸傳遞鏈之抑制的先後順序，並沒有一個明確的答案，還需要進一步探討其機

制。

在 1974 年的文獻指出給予受試者每日 5mg/kg pyrvinium pamote 的口服藥錠或是藥液，當中某些病人出現嘔吐的副作用，偵測病人的血液以及尿液檢體，並無偵測出藥物的存在，顯示 pyrvinium pamote 可能在人體內吸收並不好⁸¹。在 1976 年的文獻給予受試者 250mg 的 pyrvinium pamote 衍伸物-pyrvinium chloride，測試血液中的含量最高僅約 17.7nM⁸²。在動物模式系統中，有文獻將結直腸腺癌細胞株 HCT116 打入裸鼠的肝臟，每日給予老鼠可耐受之 pyrvinium pamote 劑量 1mg/kg，能夠有效抑制癌細胞的轉移⁷³。未來若需要測試 pyrvinium pamote 或是 pyrvinium chloride 的動物實驗在評估對於老鼠的毒性影響後亦可以考慮以靜脈注射(intravenous)的方式模擬血液疾病的動物模式系統。

最後，在分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的表面抗原差異時，我們發現 Molm13-P 有 93.8% 為 CD56⁺、6.2% 為 CD56⁻，而 Molm13-XR 有 99.9% 的細胞為 CD56⁺、0.1% 為 CD56⁻ (圖 16)。在 cabozantinib 長時間培養下，似乎淘汰掉了 CD56⁻ 的細胞。CD56 是一種神經細胞黏附因子(neural cell adhesion molecule, NCAM)，功能展現於細胞之間的貼附⁷⁴，除了對於神經與肌肉組織之間的交互作用扮演重要角色外，亦會表現於血液系統中的自然殺手細胞(NK cell)以及 T 淋巴細胞(T cell)⁷⁵，NK cell 當中表現最多 CD56 的一群細胞(CD56^{bright} NK cell)能夠製造出最多的細胞激素(cytokine)，包括有 IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-10 以及 IL-13⁷⁶。

有研究顯示骨髓細胞為 CD56⁺ 的急性骨髓性白血病病人，相較於 CD56⁻ 的病人，其多重抗藥性基因 *PGP* (p-glycoprotein, *ABCBI*) 表達量亦較高、化學治療後達到完全緩解(complete remission)的機率較低，且有較低的存活率，因此 CD56 被認為是一個預後不良的指標⁷⁷。在我們所研究的 Molm13-XR 雖然擁有較高比例的細胞為 CD56 陽性，但其母細胞 Molm13-P 即屬於 CD56

陽性的細胞株，因此推測 CD56 並非為出現抗藥性的原因。雖然有研究顯示 CD56⁺ 病人有較高的多重抗藥性基因 *PGP* 的表達量，但我們以 q-PCR 以及 RNA-seq 分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 *PGP* 皆是無法偵測到 (undetectable) 的結果；另有研究指出 CD56 的表現量與 *PGP* 表達量並不相關，與我們的實驗結果比較相符合。⁷⁸

綜合以上實驗結果及討論，Molm13-XR 新出現的 FLT3 D835Y 突變，以及抗凋亡蛋白 Mcl-1 增加，可能是造成 Molm13-XR 具有抗藥性的原因。另外，pyrvinium pamote 雖然目前的作用機制以及在應用上適合的給藥方式尚需釐清，不過也能提供給急性骨髓性白血病在治療研究上的一個新的選擇。

第六章 參考文獻

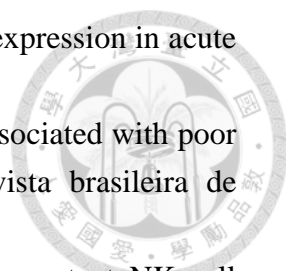
- 1 Huang, S. Y. et al. Epidemiology of multiple myeloma in Taiwan - Increasing incidence for the past 25 years and higher prevalence of extramedullary myeloma in patients younger than 55 years. *Cancer* 110, 896-905, 2007.
- 2 Dohner, H. et al. Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine* 373, 1136-1152, 2015.
- 3 Tenen, D. G. et al. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Reviews Cancer* 3, 89-101, 2003.
- 4 Arber, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391-2405, 2016.
- 5 Yakes, F. M. et al. Cabozantinib (XL184), a Novel MET and VEGFR2 Inhibitor, Simultaneously Suppresses Metastasis, Angiogenesis, and Tumor Growth. *Molecular cancer therapeutics* 10, 2298-2308, 2011.
- 6 Viola, D. et al. Cabozantinib (XL184) for the treatment of locally advanced or metastatic progressive medullary thyroid cancer. *Future Oncol* 9, 1083-1092, 2013.
- 7 Singh, H. et al. US Food and Drug Administration Approval: Cabozantinib for the Treatment of Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 23, 330-335, 2017.
- 8 Lu, J. W. et al. Cabozantinib is selectively cytotoxic in acute myeloid leukemia cells with FLT3-internal tandem duplication (FLT3-ITD). *Cancer letters* 376, 218-225, 2016.
- 9 Small, D. et al. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 178-184, 2006.
- 10 Grafone, T. et al. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev* 6, e8, 2012.
- 11 Swords, R. et al. Targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 26, 2176-2185, 2012.
- 12 Griffith, J. et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 13, 169-178, 2004.
- 13 Thiede, C. et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99, 4326-4335, 2002.
- 14 Treiber, D. K. et al. Ins and outs of kinase DFG motifs. *Chem Biol* 20, 745-746, 2013.
- 15 Zhang, J. et al. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat*

- Rev Cancer 9, 28-39, 2009.
- 16 Thomas, L. W. et al. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. FEBS letters 584, 2981-2989, 2010.
- 17 Yoshimoto, G. et al. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. Blood 114, 5034-5043, 2009.
- 18 Wang, J. M. et al. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. Mol Cell Biol 19, 6195-6206, 1999.
- 19 Ding, Q. Q. et al. Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. Mol Cell Biol 27, 4006-4017, 2007.
- 20 Kasper, S. et al. Targeting MCL-1 sensitizes FLT3-ITD-positive leukemias to cytotoxic therapies. Blood Cancer J 2, 2012.
- 21 MacDonald, B. T. et al. Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. Dev Cell 17, 9-26, 2009.
- 22 Momtazi-Borojeni, A. A. et al. The novel role of pyrvinium in cancer therapy. J Cell Physiol, 2017.
- 23 Deng, L. et al. Pyrvinium targets autophagy addiction to promote cancer cell death. Cell Death Dis 4, e614, 2013.
- 24 Thorne, C. A. et al. Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1alpha. Nature chemical biology 6, 829-836, 2010.
- 25 Carrella, D. et al. Computational drugs repositioning identifies inhibitors of oncogenic PI3K/AKT/P70S6K-dependent pathways among FDA-approved compounds. Oncotarget 7, 58743-58758, 2016.
- 26 Venerando, A. et al. Pyrvinium pamoate does not activate protein kinase CK1, but promotes Akt/PKB down-regulation and GSK3 activation. The Biochemical journal 452, 131-137, 2013.
- 27 Xiao, M. F. et al. Pyrvinium selectively induces apoptosis of lymphoma cells through impairing mitochondrial functions and JAK2/STAT5. Biochem Bioph Res Co 469, 716-722, 2016.
- 28 Matsuo, Y. et al. Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23). Leukemia 11, 1469-1477, 1997.
- 29 Vorkas, P. A. et al. PIK3CA Hotspot Mutation Scanning by a Novel and Highly Sensitive High-Resolution Small Amplicon Melting Analysis Method. J Mol Diagn 12, 697-704, 2010.

- 30 Dillon, L. M. et al. Therapeutic Targeting of Cancers with Loss of PTEN Function. *Curr Drug Targets* 15, 65-79, 2014.
- 31 Kim, M. S. et al. Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Brit J Cancer* 98, 1533-1535, 2008.
- 32 McCubrey, J. A. et al. Mutations and Deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Cascades Which Alter Therapy Response. *Oncotarget* 3, 954-987, 2012.
- 33 Prior, I. A. et al. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research* 72, 2457-2467, 2012.
- 34 Ishii, I. et al. Reprofile a classical anthelmintic, pyrvinium pamoate, as an anti-cancer drug targeting mitochondrial respiration. *Frontiers in oncology* 2, 137, 2012.
- 35 Borst, P. et al. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71, 537-592, 2002.
- 36 Gottesman, M. M. et al. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research. *FEBS letters* 580, 998-1009, 2006.
- 37 Deeley, R. G. et al. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 86, 849-899, 2006.
- 38 Shibayama, Y. et al. Multidrug Resistance Protein 2 Implicates Anticancer Drug-Resistance to Sorafenib. *Biol Pharm Bull* 34, 433-435, 2011.
- 39 Sarkadi, B. et al. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: Participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86, 1179-1236, 2006.
- 40 Kiyoi, H. et al. Flt3 Inhibitors: Recent Advances and Problems for Clinical Application. *Nagoya J Med Sci* 77, 7-17, 2015.
- 41 Meshinchi, S. et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood* 111, 4930-4933, 2008.
- 42 Moore, A. S. et al. Selective FLT3 inhibition of FLT3-ITD+ acute myeloid leukaemia resulting in secondary D835Y mutation: a model for emerging clinical resistance patterns. *Leukemia* 26, 1462-1470, 2012.
- 43 Baker, S. D. et al. Emergence of polyclonal FLT3 tyrosine kinase domain mutations during sequential therapy with sorafenib and sunitinib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 5758-5768, 2013.
- 44 Man, C. H. et al. Sorafenib treatment of FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia:

- favorable initial outcome and mechanisms of subsequent nonresponsiveness associated with the emergence of a D835 mutation. *Blood* 119, 5133-5143, 2012.
- 45 Smith, C. C. et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature* 485, 260-U153, 2012.
- 46 Nguyen, B. et al. FLT3 activating mutations display differential sensitivity to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Oncotarget* 8, 10931-10944, 2017.
- 47 Nosaka, T. et al. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *Embo J* 18, 4754-4765, 1999.
- 48 Berns, K. et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of Trastuzumab resistance in breast cancer. *Ejc Suppl* 7, 17-17, 2009.
- 49 Paraiso, K. H. et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer research* 71, 2011.
- 50 Samuels, Y. et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7, 561-573, 2005.
- 51 Piloto, O. et al. Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. *Blood* 109, 1643-1652, 2007.
- 52 Knickelbein, K. et al. Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer. *Genes & diseases* 2, 4-12, 2015.
- 53 Johnson, D. B. et al. Treatment of NRAS-Mutant Melanoma. *Curr Treat Option On* 16, 2015.
- 54 Konopleva, M. et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 375-388, 2006.
- 55 Wu, D. Q. et al. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 35, 161-168, 2010.
- 56 Fang, X. J. et al. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *P Natl Acad Sci USA* 97, 11960-11965, 2000.
- 57 Sutherland, C. et al. Inactivation of Glycogen-Synthase Kinase-3-Beta by Phosphorylation - New Kinase Connections in Insulin and Growth-Factor Signaling. *Biochemical Journal* 296, 15-19, 1993.
- 58 Sutherland, C. et al. The Alpha-Isoform of Glycogen-Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal-Muscle Is Inactivated by P70 S6 Kinase or Map Kinase-Activated Protein Kinase-1 in-Vitro. *FEBS letters* 338, 37-42, 1994.
- 59 Lara, R. et al. The p90 RSK family members: common functions and isoform

- specificity. *Cancer research* 73, 5301-5308, 2013.
- 60 Faivre, S. et al. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5, 671-688, 2006.
- 61 Thamilselvan, V. et al. Anticancer efficacy of deguelin in human prostate cancer cells targeting glycogen synthase kinase-3 beta/beta-catenin pathway. *Int J Cancer* 129, 2916-2927, 2011.
- 62 Takahashi-Yanaga, F. et al. Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta)-mediated signal transduction pathway: inhibitors of the Wnt/beta-catenin signaling pathway as novel anticancer drugs. *Journal of pharmacological sciences* 109, 179-183, 2009.
- 63 Lin, S. Y. et al. beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *P Natl Acad Sci USA* 97, 4262-4266, 2000.
- 64 Tetsu, O. et al. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426, 1999.
- 65 Lin, H. H. et al. Inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling pathway improves the anti-tumor effects of sorafenib against hepatocellular carcinoma. *Cancer letters* 381, 58-66, 2016.
- 66 Yap, T. A. et al. First-in-Man Clinical Trial of the Oral Pan-AKT Inhibitor MK-2206 in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* 29, 4688-4695, 2011.
- 67 LoRusso, P. M. et al. Phase I and pharmacodynamic study of the oral MEK inhibitor CI-1040 in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 23, 5281-5293, 2005.
- 68 Zhao, W. N. et al. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin B* 7, 27-37, 2017.
- 69 Bijur, G. N. et al. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 87, 1427-1435, 2003.
- 70 Li, C. et al. PI3K/AKT signaling regulates bioenergetics in immortalized hepatocytes. *Free Radical Bio Med* 60, 29-40, 2013.
- 71 Xiang, W. et al. Pyrvinium selectively targets blast phase-chronic myeloid leukemia through inhibition of mitochondrial respiration. *Oncotarget* 6, 33769-33780, 2015.
- 72 Harada, Y. et al. Pyrvinium pamoate inhibits proliferation of myeloma/erythroleukemia cells by suppressing mitochondrial respiratory complex I and STAT3. *Cancer letters* 319, 83-88, 2012.
- 73 Wiegering, A. et al. The impact of pyrvinium pamoate on colon cancer cell viability. *Int J Colorectal Dis* 29, 1189-1198, 2014.

- 
- 74 Di Bona, E. et al. Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 87, 250-256, 2002.
- 75 Rego, E. M. et al. The expression of the CD56 antigen is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* 33, 176-177, 2011.
- 76 Poli, A. et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126, 458-465, 2009.
- 77 Raspadori, D. et al. CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia* 15, 1161-1164, 2001.
- 78 Baer, M. R. et al. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). *Blood* 90, 1643-1648 (1997).
80. Phase I Trial of Cabozantinib in Patients With Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML).(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01961765).
- 81 Robert A. et al. Pyrvinium pamote. Department of Clinical Investigation,16, 716-719, 1974.
- 82 Smith T. C. et al. Absorption of pyrvinium pamoate. Department of Clinical Investigation,19, 802-806, 1976.

圖

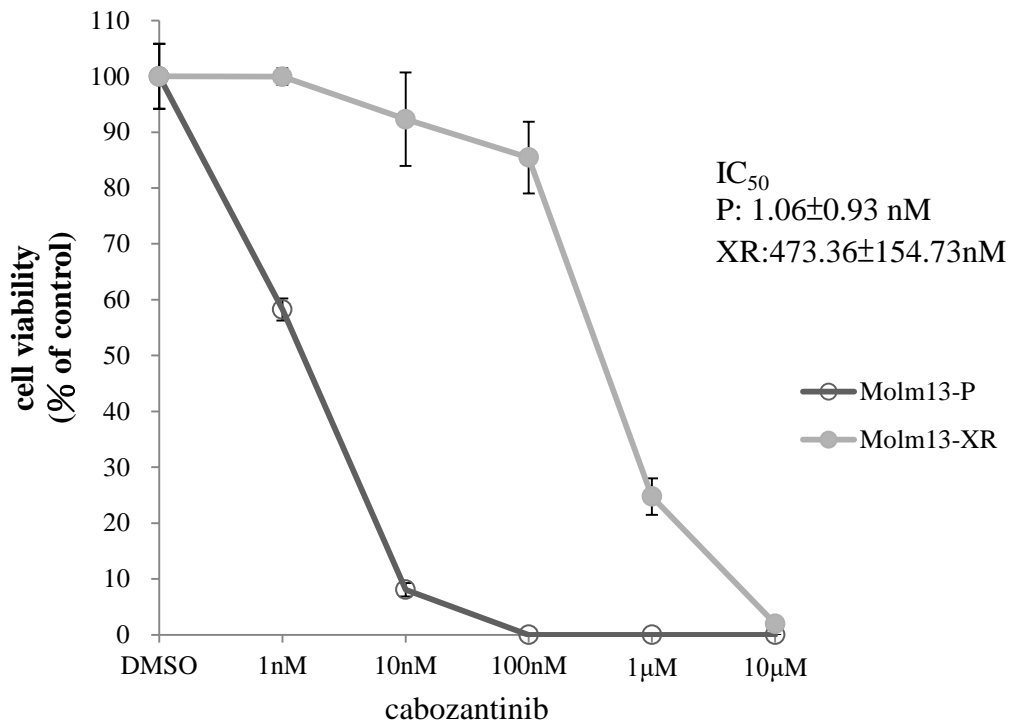


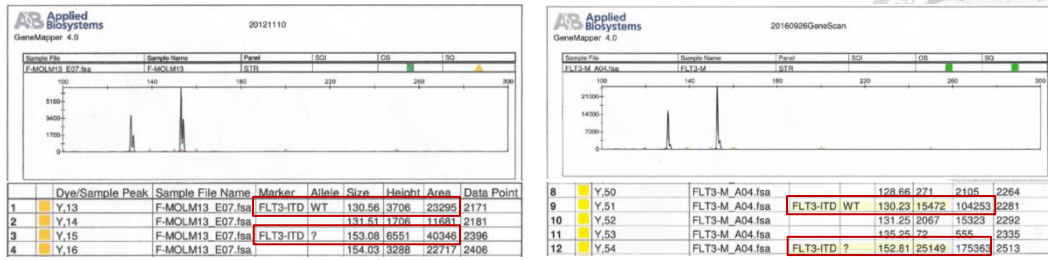
圖 1 Cabozantinib 對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制效果

使用由低到高濃度的 cabozantinib 作用於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 經 72 小時，以細胞抑制試驗(MTS assay)所得之細胞相對存活率(% of cell viability)。控制組為含有 0.1% DMSO 之細胞培養液。

(A)

Molm13-P

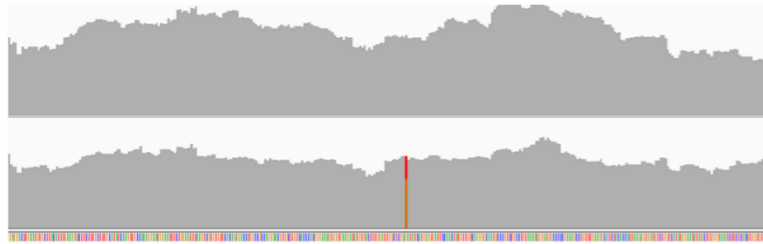
Molm13-XR



(B)

Molm13-P

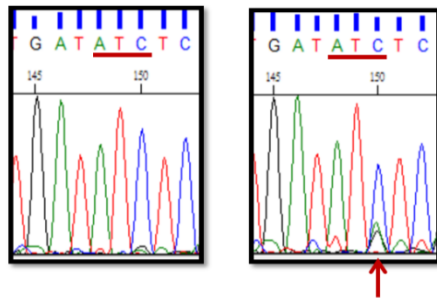
Molm13-XR



(C)

Molm13-P-FLT3

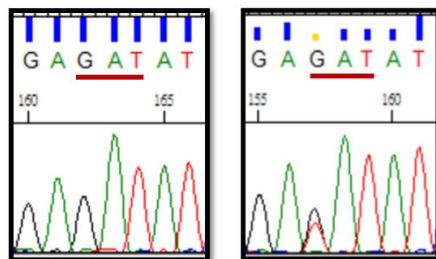
Molm13-XR-FLT3



(D)

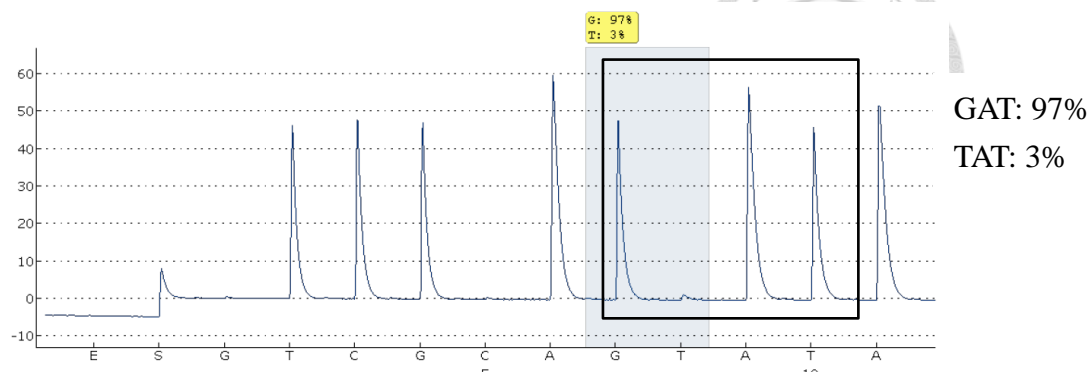
Molm13-P

Molm13-XR



(E)

Molm13-P



Molm13-XR:

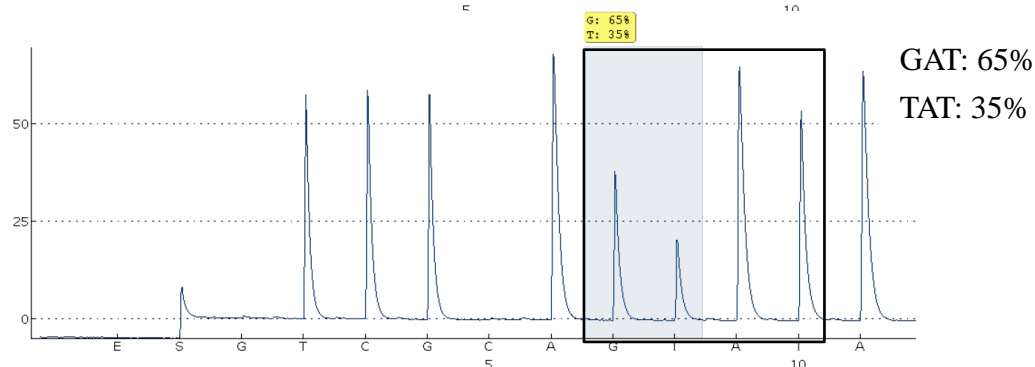


圖 2 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之 FLT3 情形

(A)利用 GeneScan 分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之 FLT3 片段。

(B)以 RNA-sequencing 分析兩株細胞的轉錄組(transcriptome)之 FLT3 片段，

Molm13-XR 在第 835 個密碼子，有 69%(棕)是由 GAT(aspartic acid, D)組成，
有 31%(紅)是由 TAT(Tyrosine, Y)組成。

(C)以 Sanger sequencing 定序(反股)兩株細胞的 FLT3 片段，將 cDNA 以 PCR 放大 FLT3，Molm13-XR 的第 835 個密碼子有 ATA 之訊號。

(D)以 Sanger sequencing 定序兩株細胞的 FLT3 片段，將 genomic DNA 以 PCR 放大 FLT3 片段，以前置引子分析，Molm13-XR 的第 835 個密碼子有 TAT 之訊號。

(E)以 Pyrosequence 分析兩株細胞的 FLT3 D835Y 突變百分比。將 genomic DNA 以 PCR 放大後，以前置引子定序，Molm13-P 有 97%為 GAT ; Molm13-XR 有 65%為 GAT、35%為 TAT，比例約為 2:1。

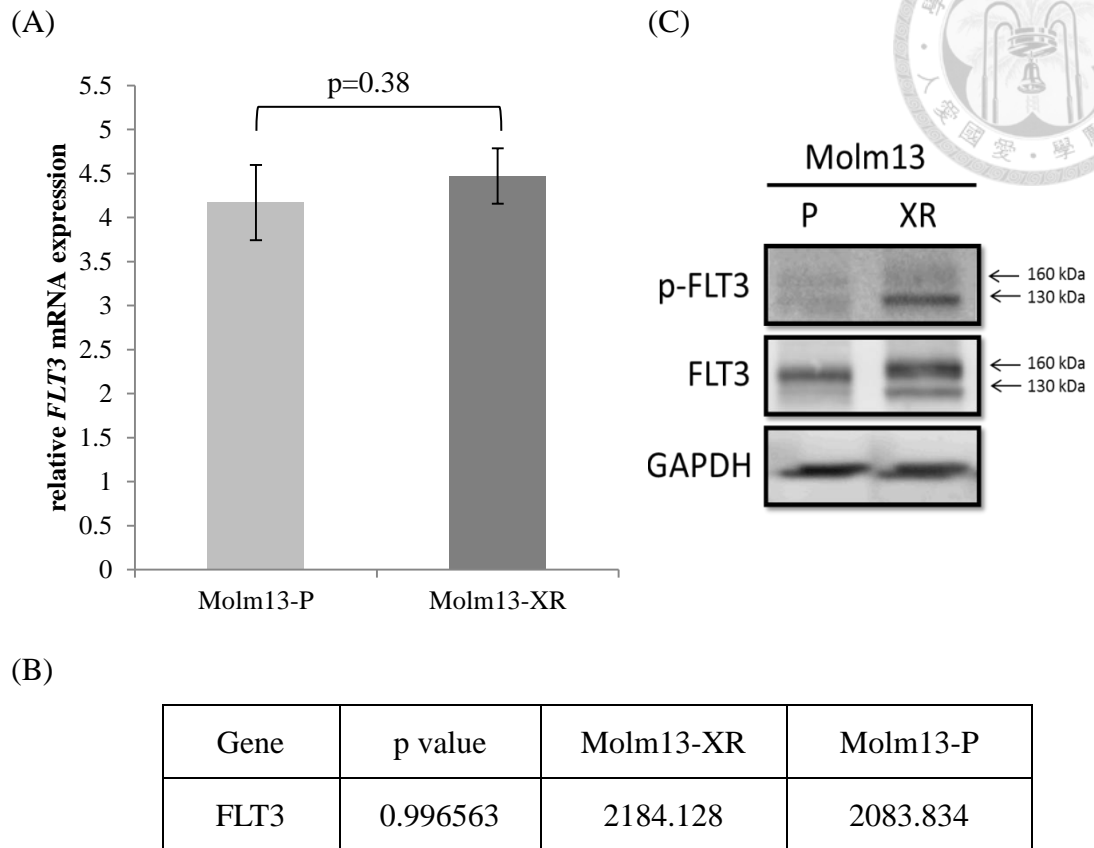


圖 3 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 *FLT3* mRNA 以及蛋白表現情形

- (A) 利用 qRT-PCR 偵測 *FLT3* mRNA 表現量，內源控制基因為 *HPRT*，以 $2^{-\Delta Ct}$ 計算出相對於 *HPRT* 的表現量。
- (B) 以 RNA-seq 分析後之兩株細胞的 *FLT3* mRNA 表現量。
- (C) 利用西方墨點法分析 *FLT3* 蛋白的磷酸化以及表現量，*GAPDH* 作為內部控制組。醣基化(glycosylation)的 *FLT3* 分子量位於 160 kDa，非醣基化的分子量為 130 kDa。

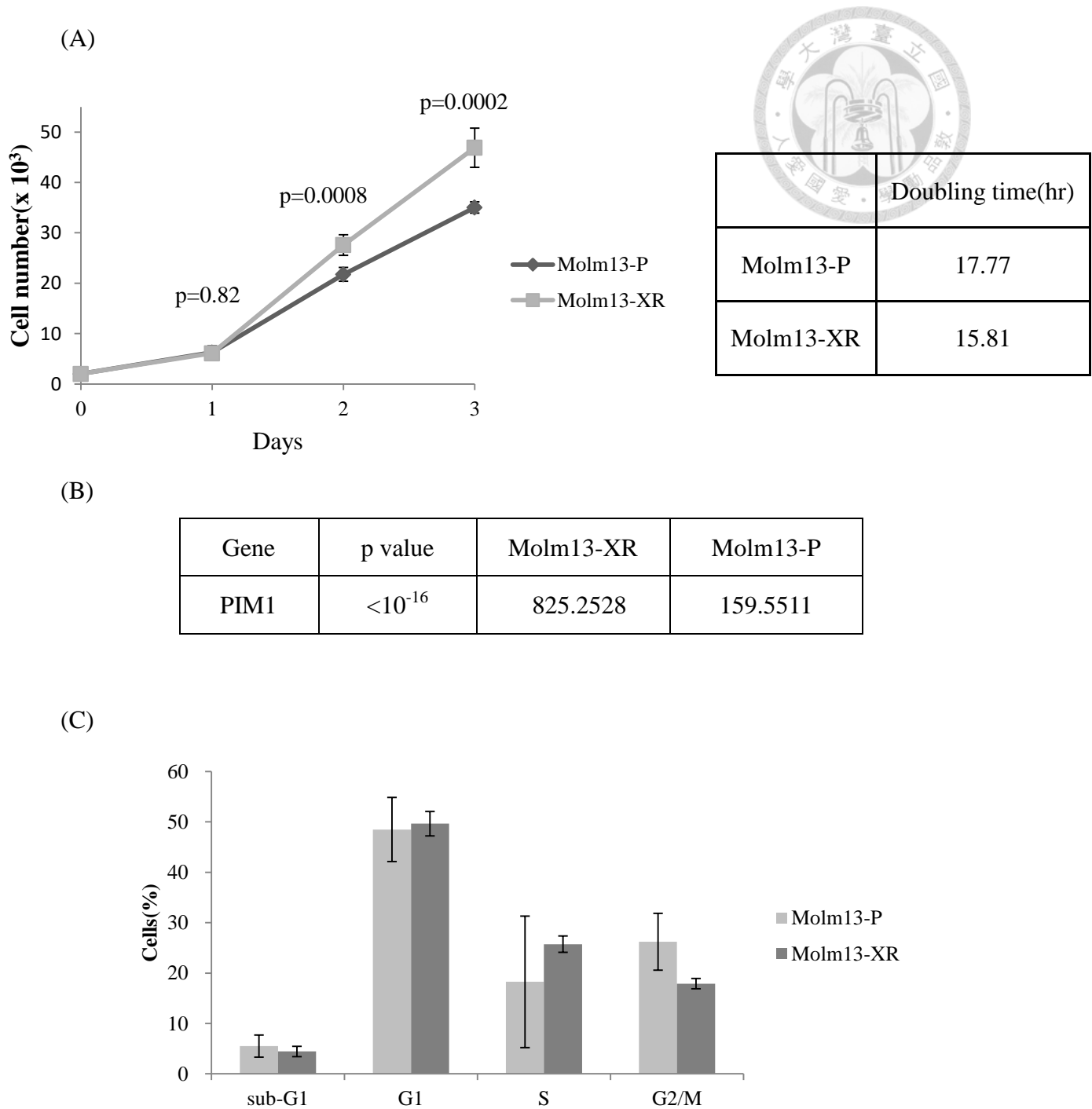


圖 4 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的生長曲線以及細胞週期情形

- (A) 接種 2×10^3 顆細胞於 96 孔盤中，於 37°C、5% CO₂ 培養，分別在培養經 24、48、72 小時，利用 CellTiter 96® AQueous One Solution 試劑所反映的活細胞數目，觀察兩株細胞的生長速度。以 *Doubling Time* 軟體分析細胞倍增時間。
- (B) 以 RNA-seq 分析後之兩株細胞的 *PIM1* mRNA 表現量。
- (C) 利用流式細胞儀搭配 FlowJo 軟體分析，計算出不同細胞週期占的比例(%)。

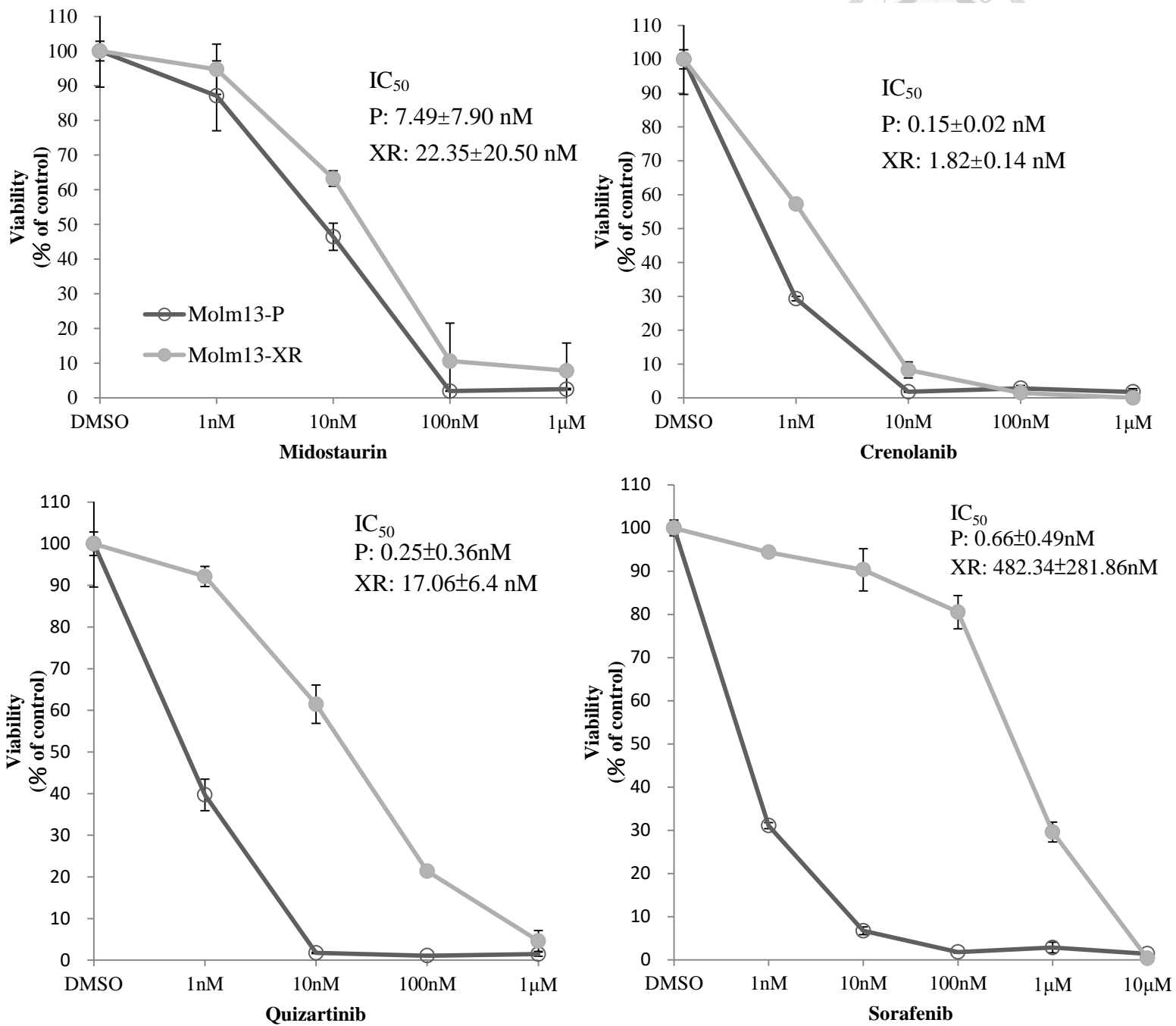


圖 5 Molm13-P 以及 Molm13-XR 針對 typeI 以及 typeII 的 FLT3 TKI 之感受性。以 MTS assay 所得之細胞相對存活率(% of cell viability)。控制組為含有 0.1% DMSO。Midostaurin 以及 crenolanib 為 type I 抑制劑，quizartinib 以及 sorafenib 為 type II 抑制劑。

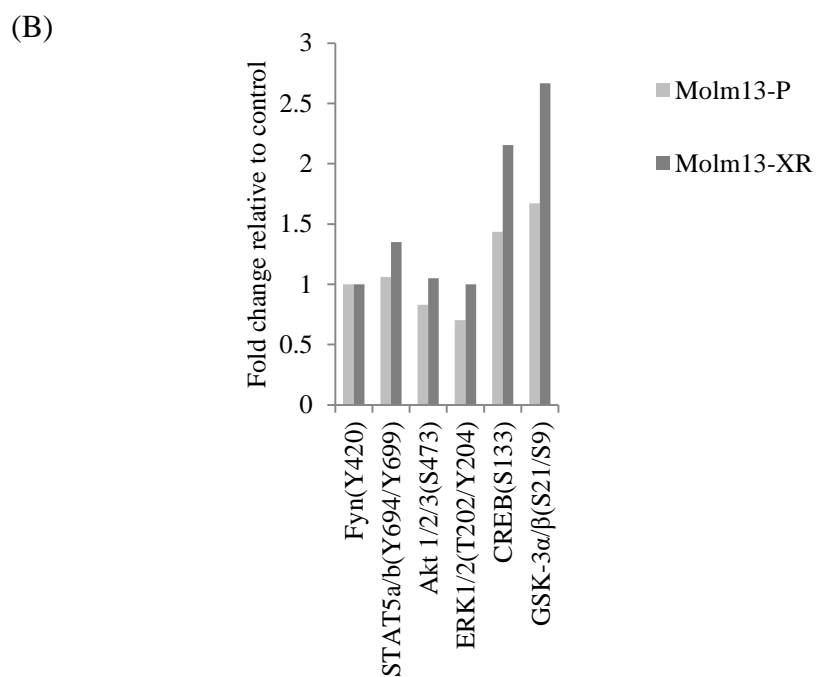
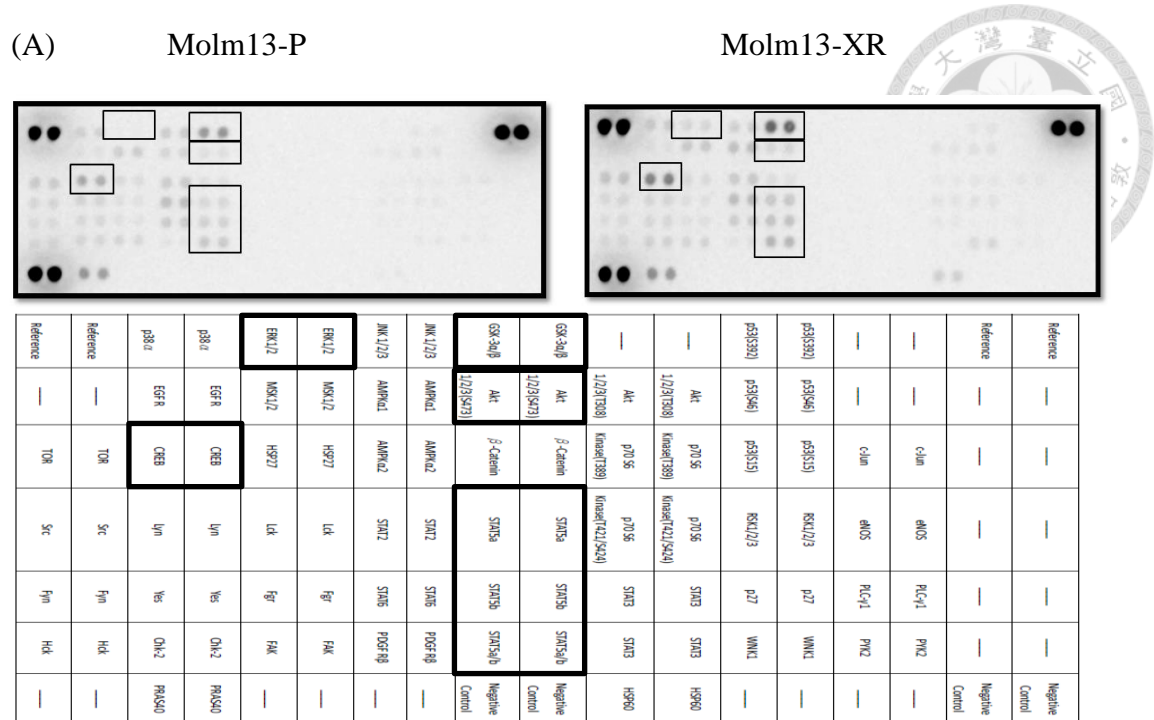


圖 6 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的激酶磷酸化程度之差異

(A) phospho-kinase array 之原始圖。

(B) 以 ImageJ 軟體定量後以各自的內部控制組 Fyn 位點的訊號做規化。

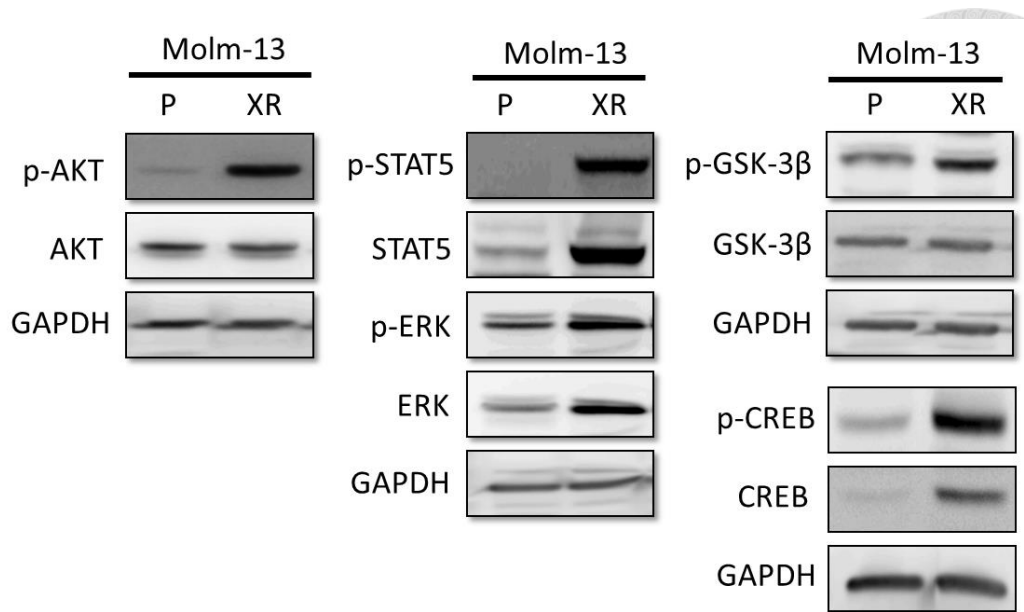


圖 7 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 AKT、STAT5、ERK、GSK3 β 、CREB 的磷酸化情形。利用西方墨點法分析蛋白的磷酸化以及 total 表現量，GAPDH 作為內部控制組。

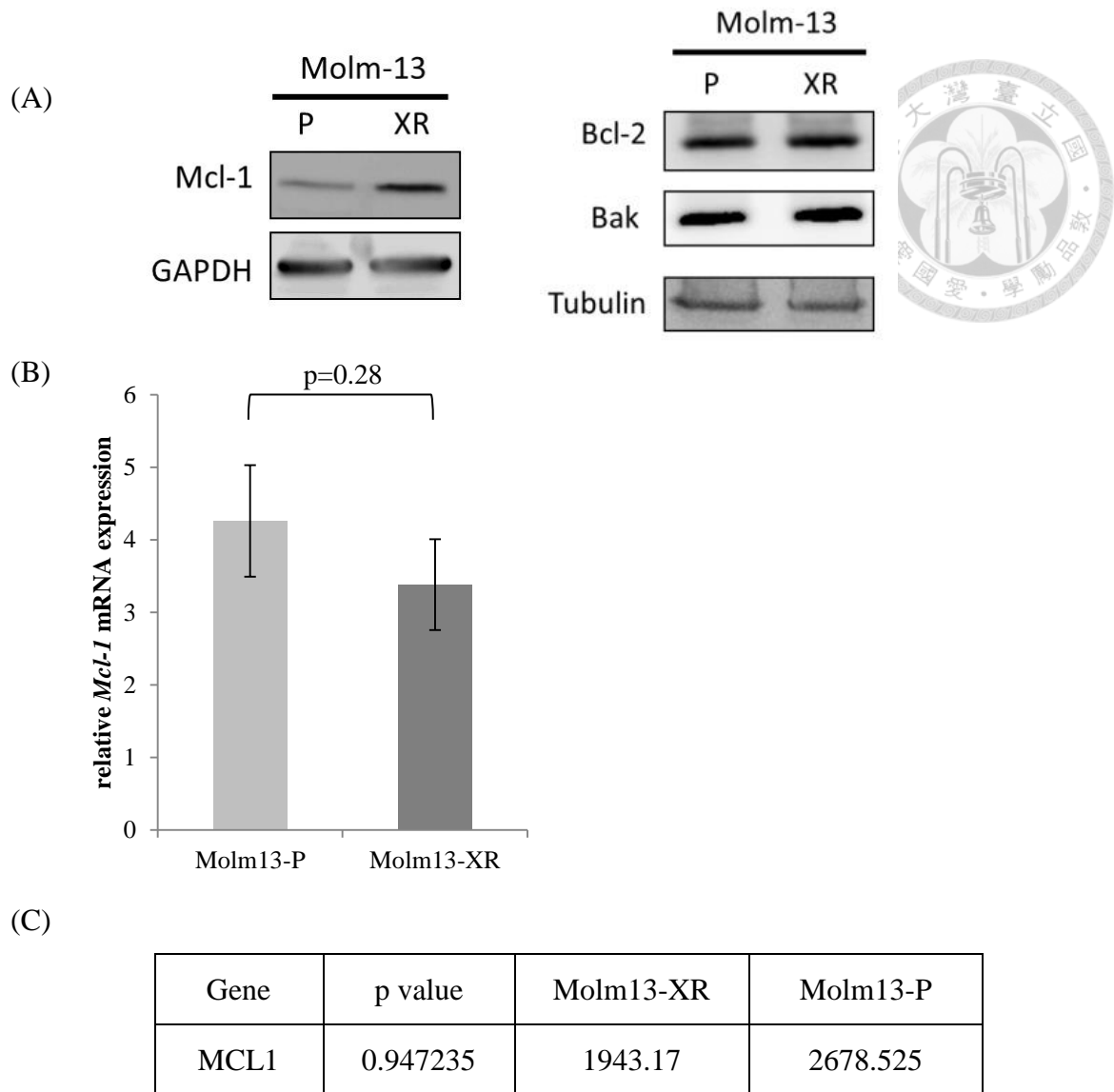
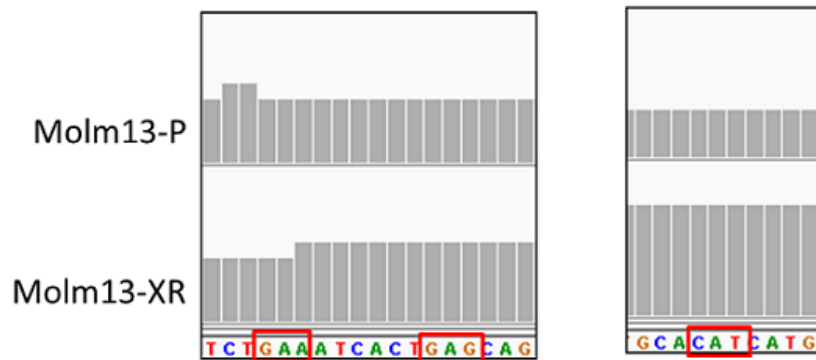


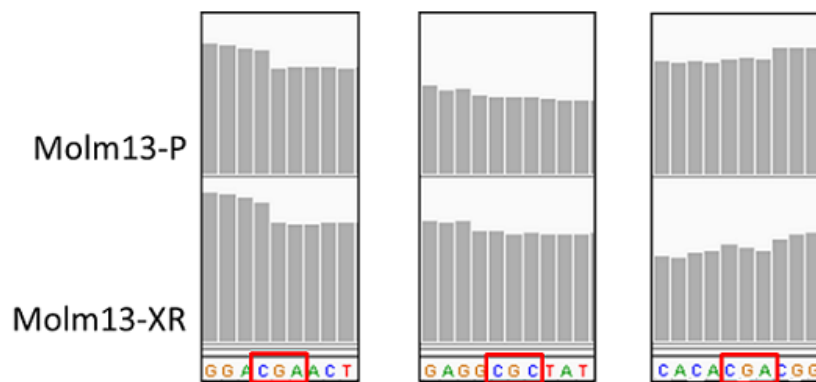
圖 8 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的細胞凋亡相關蛋白表現量

- (A) 利用西方墨點法分析 Mcl-1、Bcl-2、Bak 蛋白量，GAPDH、Tubulin 作為內部控制組。
- (B) 利用 qRT-PCR 偵測 *Mcl-1* 的 mRNA 表現量，內源性控制基因為 *HPRT*，以 $2^{-\Delta Ct}$ 計算出相對於 *HPRT* 的表現量。
- (C) 以 RNA-seq 分析之兩株細胞的 *Mcl-1* mRNA 表現量。

(A) *PIK3CA*:



(B) *PTEN*:



(C) *AKT1*:

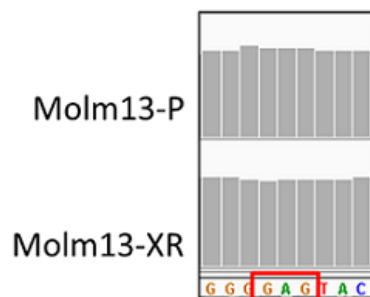


圖 9 *PIK3CA*、*PTEN*、*AKT* 之突變熱點於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的情形
RNA-seq 分析後以 IGV 分析軟體尋找(A) *PIK3CA* 之胺基酸位點 *E542*、*E545*、
H1047 之密碼子 (B) *PTEN* 之胺基酸位點 *R130*、*R173*、*R233* 之密碼子，以及(C)
AKT 之之胺基酸位點 *E17* 之密碼子。

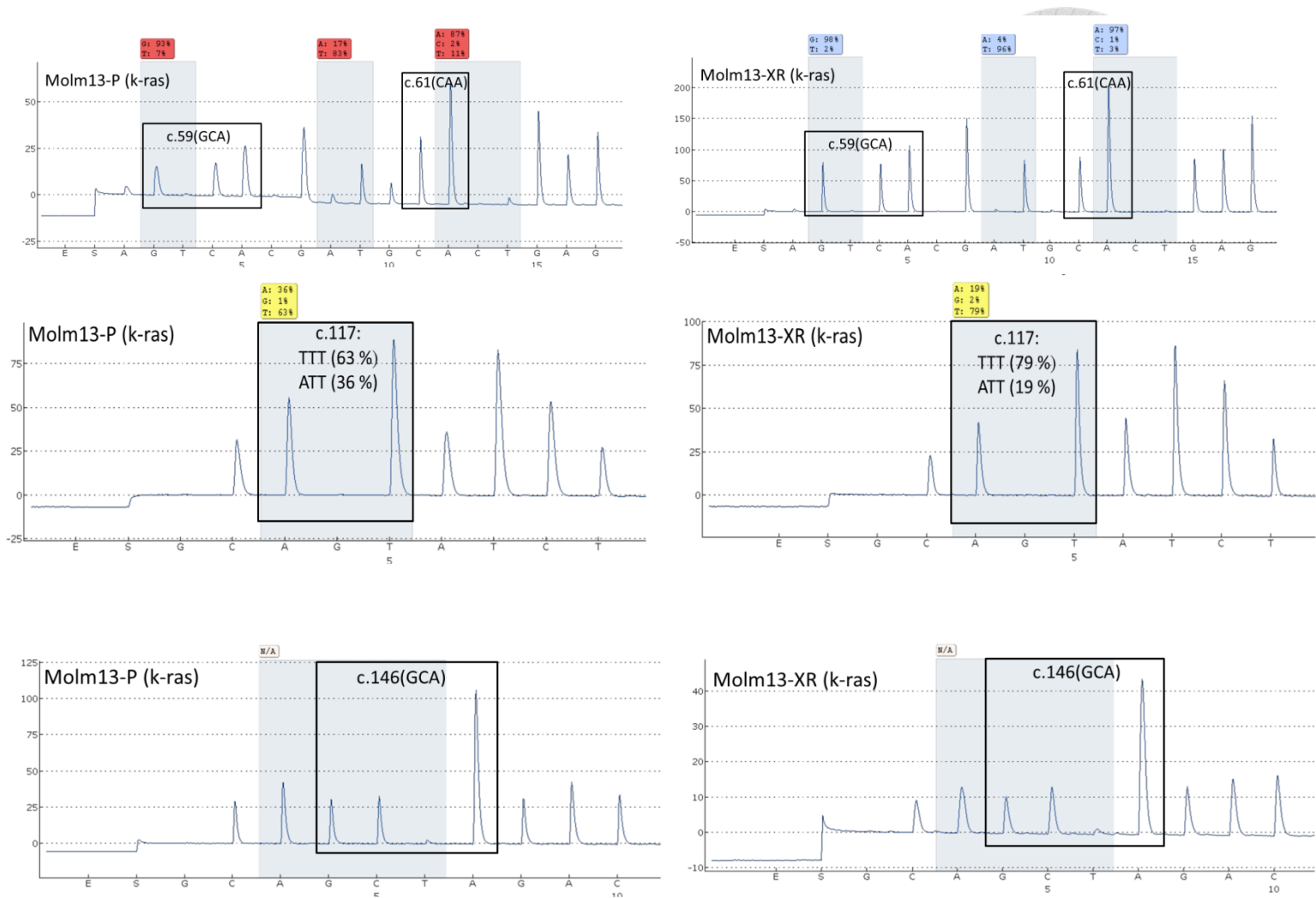


圖 10 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之 *K-ras* 突變熱點情形

以 pyrosequencing 分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 *K-ras* 突變熱點，於 codon 59、61、117、146 的情形，僅在 codon 117 發現兩株細胞皆有 TTT(Lys) → ATT(Asn)(反股)的突變，Molm13-P 有 63% 為 lysine，有 36% 為 asparagine; Molm13-XR 有 79% 為 lysine，19% 為 asparagine。

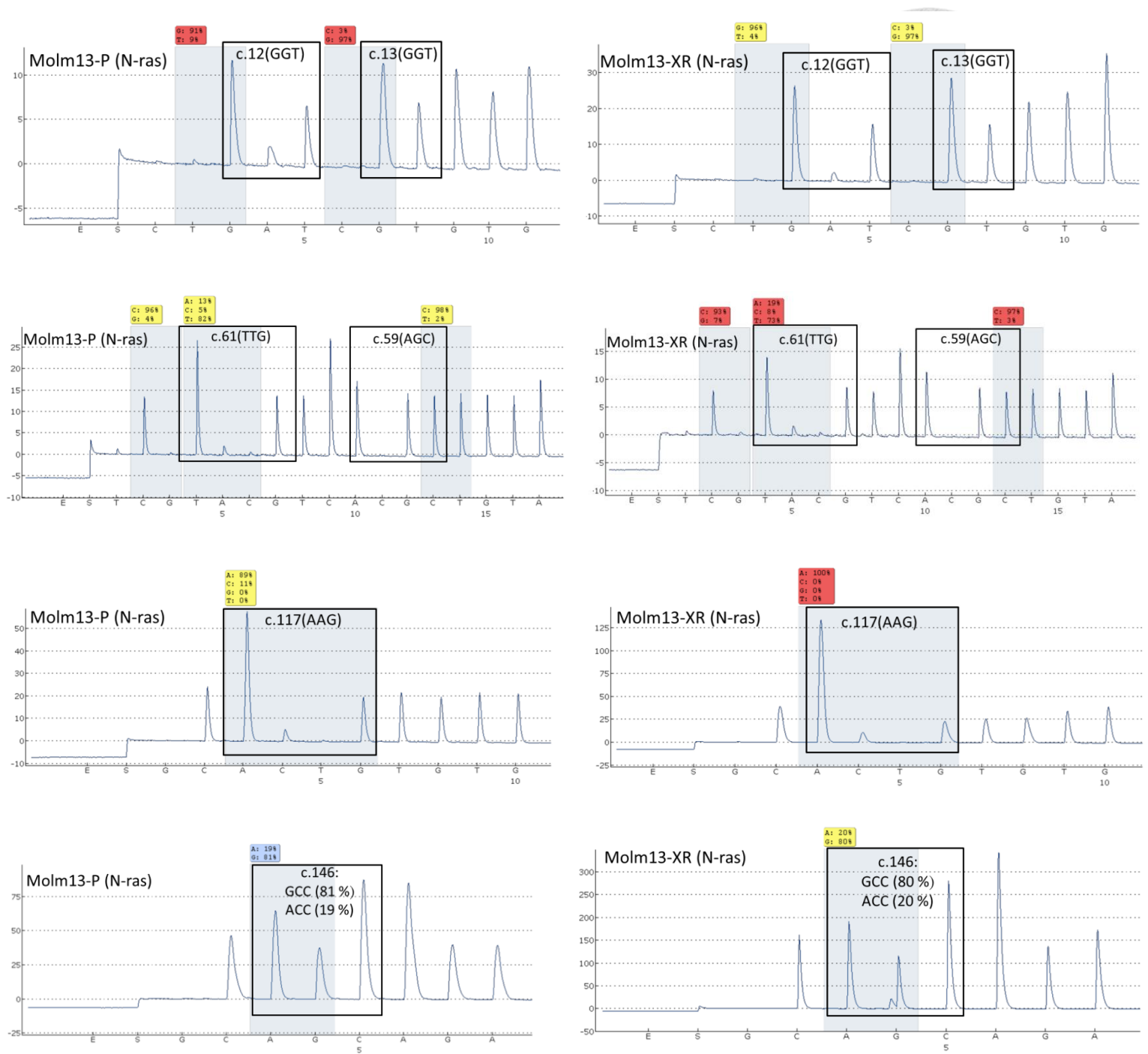


圖 11 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之 *N-ras* 突變熱點情形

以 Pyrosequencing 分析 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 *N-ras* 突變熱點，於 codon 12、13、59、61、117、146 的情形，僅在 codon 146 發現兩株細胞皆有 GCC(Ala)>ACC(Thr)(正股)的突變。Molm13-P 有 81% 為 alanine，有 19% 為 threonine； Molm13-XR 有 80% 為 alanine，20% 為 threonine。

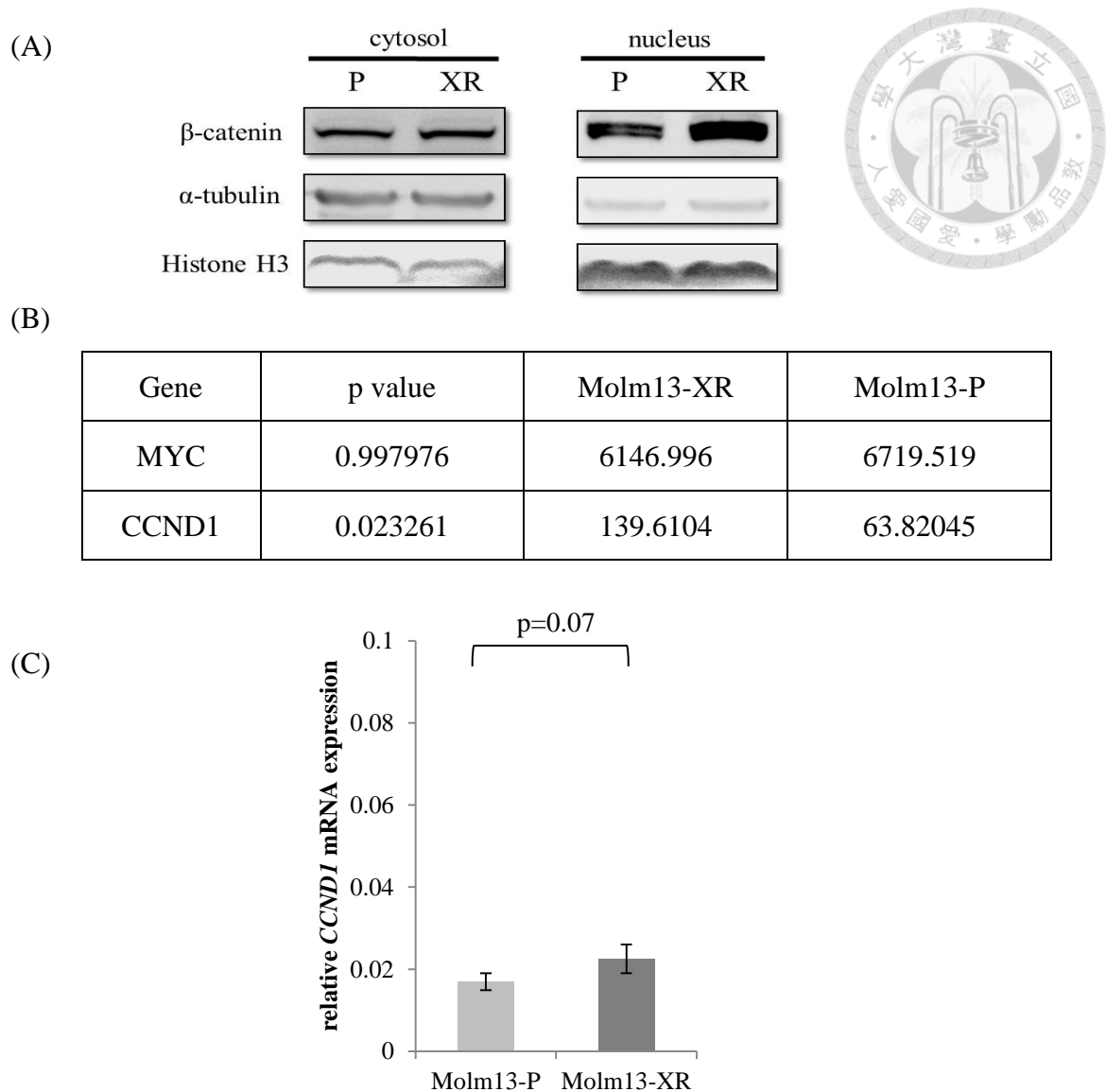


圖 12 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 β -catenin、下游基因 *MYC*、*CCND1* 的差異

- (A) 以細胞核質蛋白分離法分離出兩株細胞的細胞質以及細胞核的蛋白萃取物，定量後以西方墨點法分析 β -catenin 於細胞質以及細胞核的蛋白量。細胞質與細胞核的內部控制組分別為 Tubulin 以及 Histone H3。
- (B) 以 RNA-seq 分析後之兩株細胞的 *MYC*、*CCND1* mRNA 表現量。
- (C) 利用 qRT-PCR 偵測 *CCND1* 的 mRNA 表現量，內源性控制基因為 *HPRT*，以 $2^{-\Delta Ct}$ 計算出相對於 *HPRT* 的表現量。

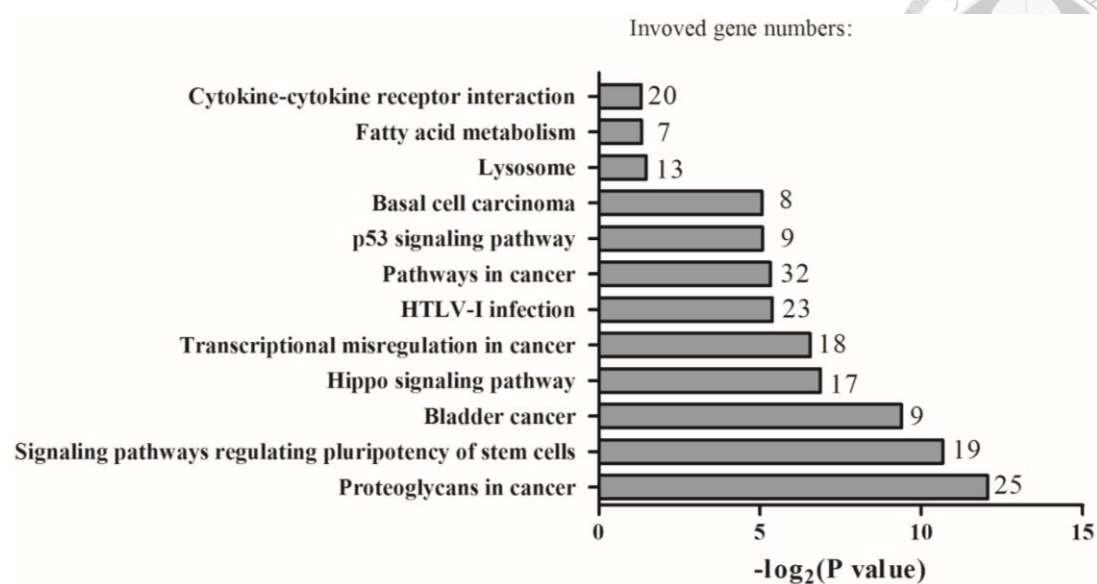


圖 13 Molm13-P 與 Molm13-XR 具差異性表現之 1057 個基因於 KEGG database 中具顯著意義之訊息傳遞路徑。以 DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)分析軟體分析差異性表現基因在 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database) 所參與的細胞生物訊息傳遞路徑，以 $p < 0.05$ 做為挑選之 threshold。

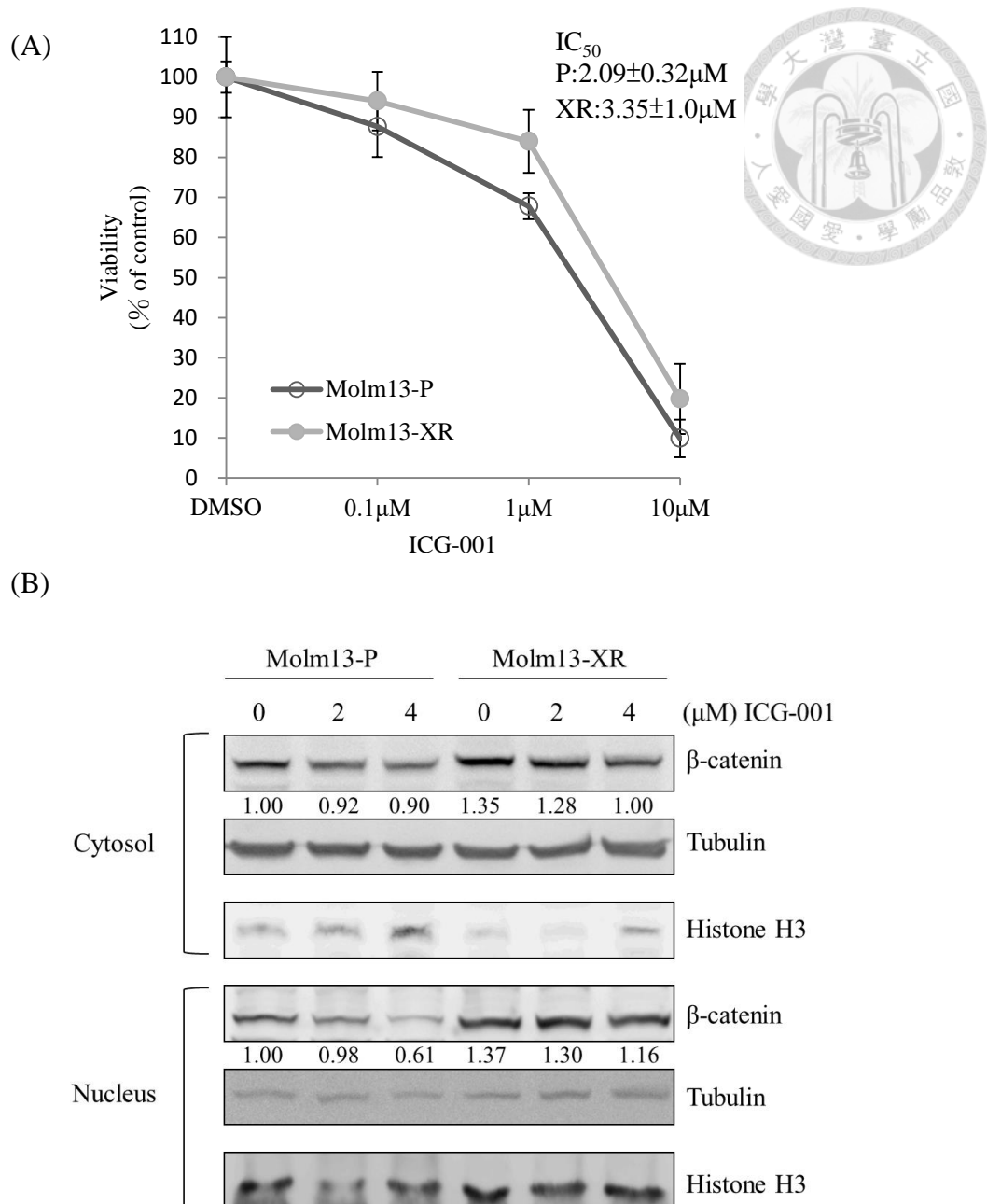


圖 14 ICG-001 對於 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制程度

- (A) 將細胞以不同濃度之 ICG-001 處理經 72 小時，加入 MTS 試劑於 OD490 nM 偵測吸光值，控制組為含有 0.1% DMSO 之細胞培養液。
- (B) 以 2、4 μM 之 ICG-001 處理經 24 小時後分離核質蛋白萃取物，定量後以西方墨點法分析 β-catenin 於細胞質以及細胞核的蛋白量。細胞質與細胞核的內部控制組分別為 Tubulin 以及 Histone H3。

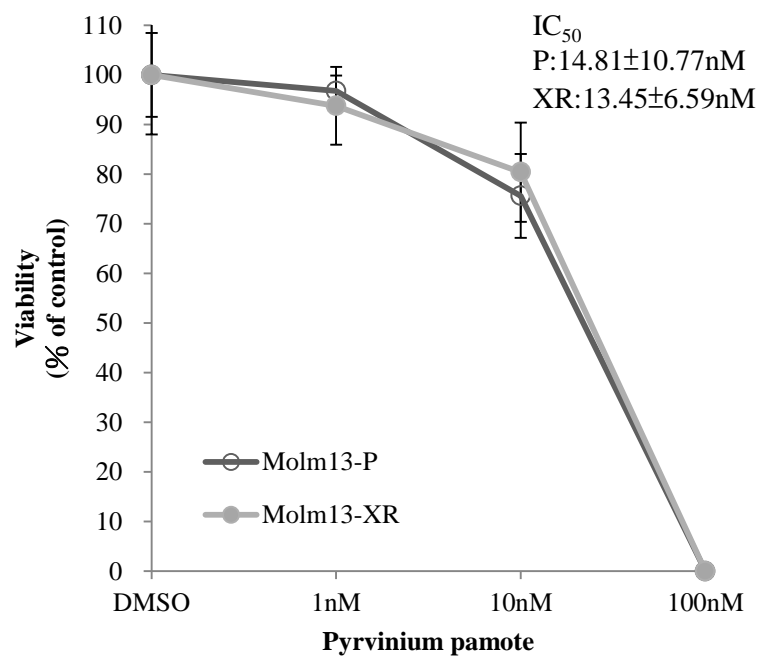
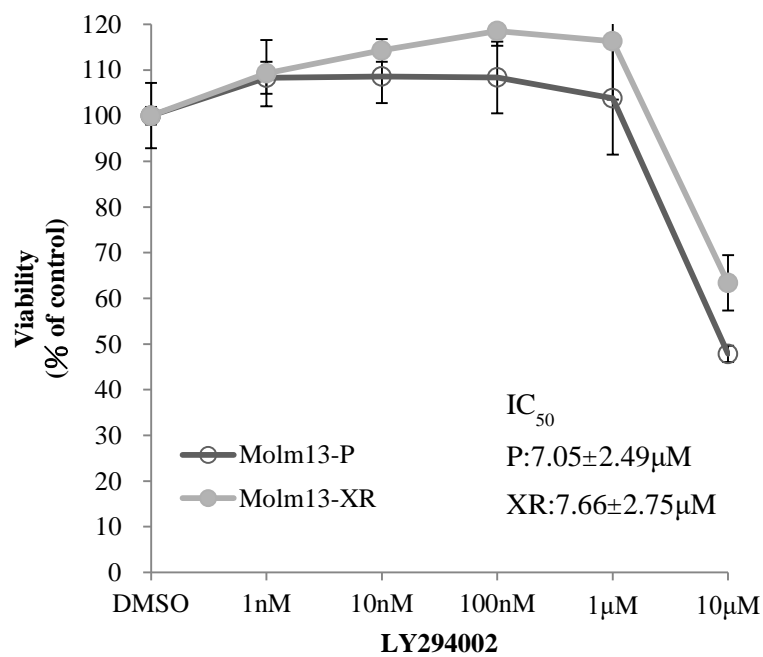
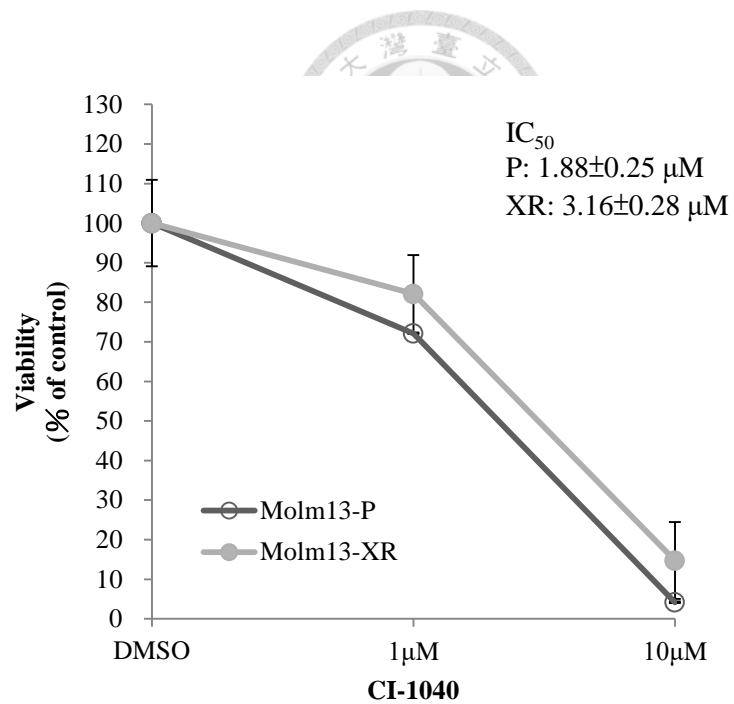
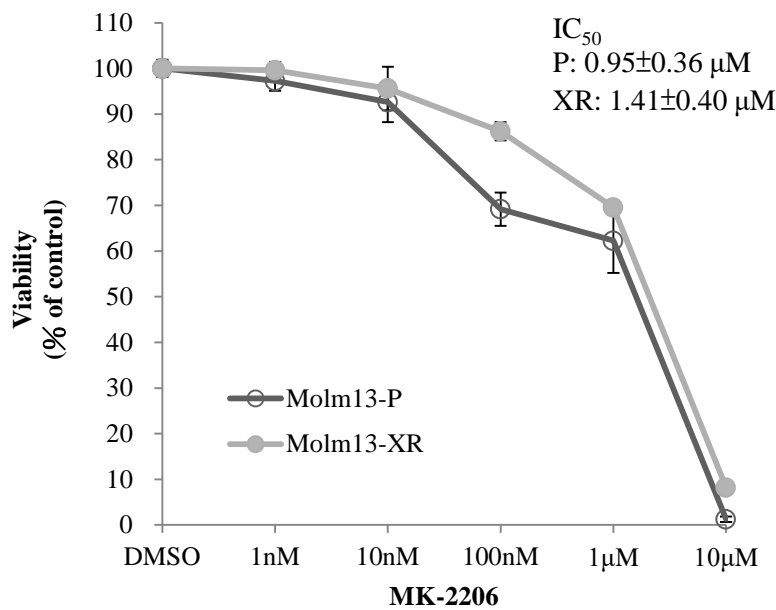


圖 15 各種抑制劑對 Molm13-P 以及 Molm13-XR 之抑制效果

將細胞以不同濃度藥物處理經 72 小時，加入 MTS 試劑於 OD490 nm 偵測吸光值，控制組為含有 0.1% DMSO 之細胞培養液。

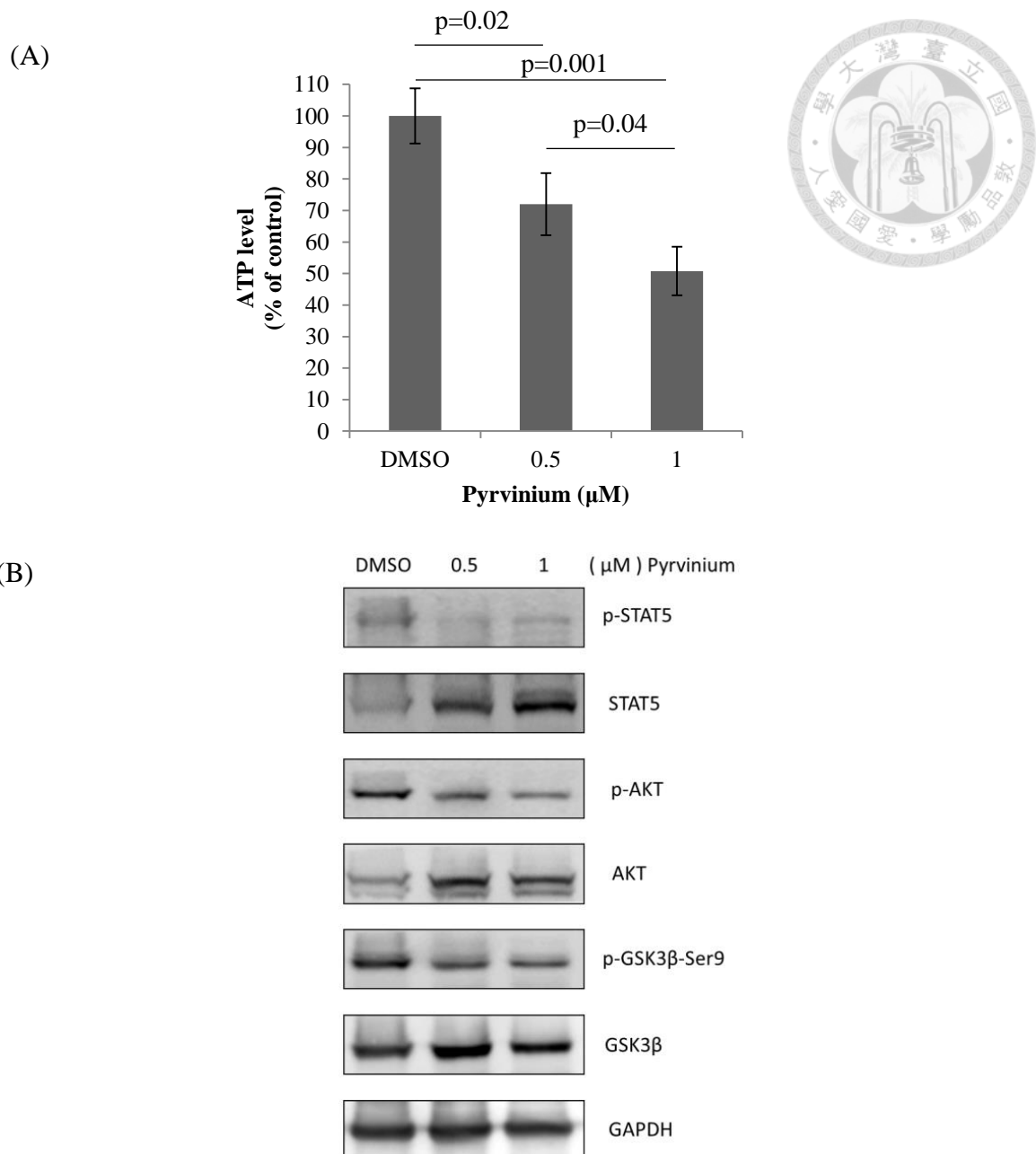


圖 16 Pyrvinium pamote 對於 Molm13-XR 的 ATP、p-AKT、p-STAT5、p-GSK3β-Ser9 之抑制作用。

(A) Molm13-XR 以 0.5、1μM 的 pyrvinium pamote 處理經 4 小時，以 ATP assay 收集冷光訊號分析細胞的 ATP 量。

(B) Molm13-XR 以 0.5、1μM 的 pyrvinium pamote 處理經 4 小時，收集蛋白萃取物後進行西方墨點實驗，偵測 p-AKT、p-STAT5、p-GSK3β-Ser9 以及 total protein 之結果，內部控制組為 GAPDH。

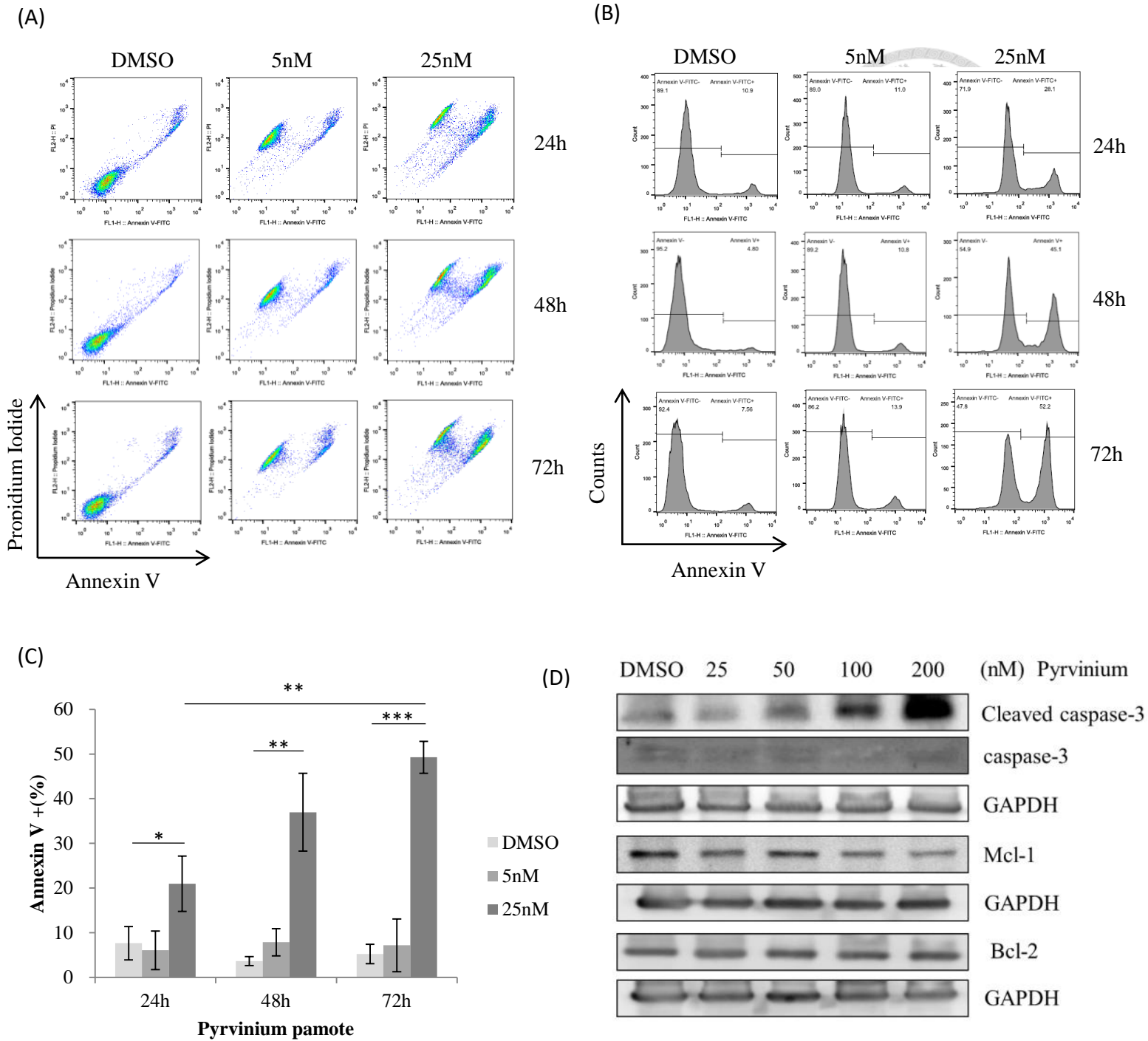
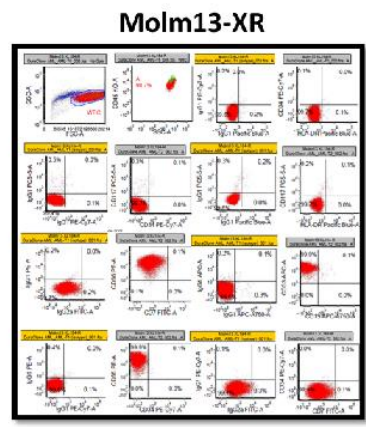
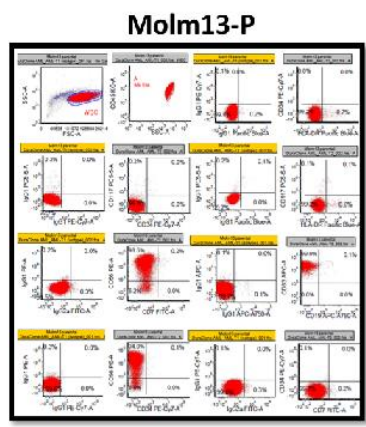
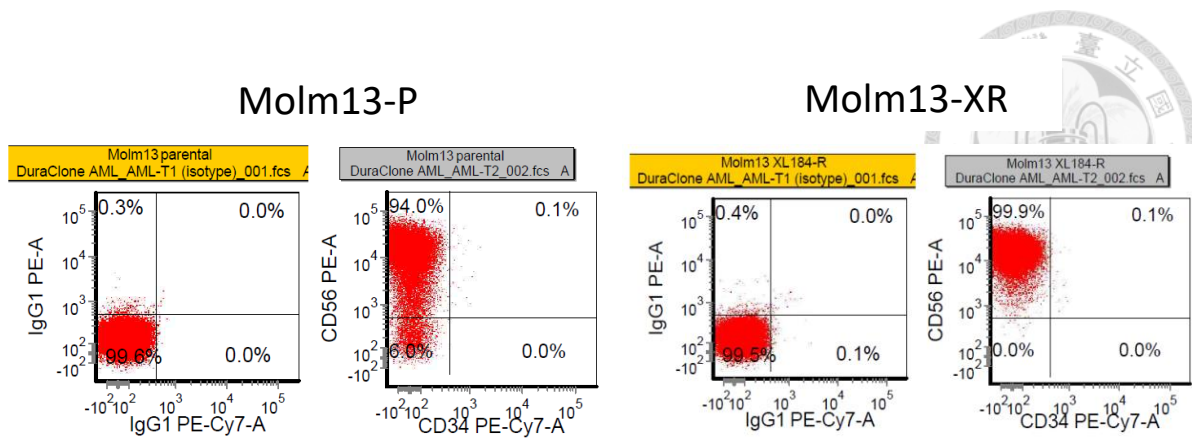


圖 17 Pyrvinium pamote 會使 Molm13-XR 發生細胞凋亡。

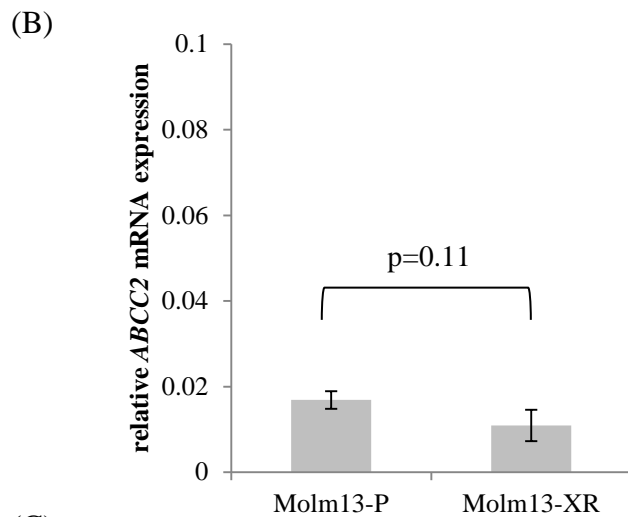
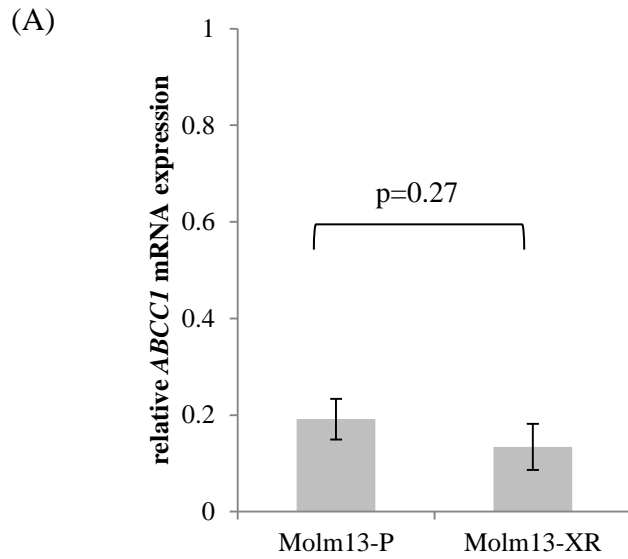
(A)、(B)、(C) 以 5、25nM 的 pyrvinium pamote 作用於 Molm13-XR 經 24、48、72 小時經 annexin v-propidium iodide 染色後以流式細胞儀分析 apoptosis+ (%)。

(D) 以 25、50、100、200nM 的 pyrvinium pamote 作用於 Molm13-XR 經 24 小時候收取蛋白萃取物，分析 cleaved caspase-3、Mcl-1、Bcl-2 蛋白表現情形，內部控制組為 GAPDH。



Marker(%)	Molm13-P	Molm13-XR
CD33	100.0	100.0
CD15	100.0	100.0
CD56	93.8	99.9
CD38	88.1	99.0
CD123	58.7	46.2
CD34	0-8.8	0-23.8
CD13	25.1	12.1
CD11b	20.2	10.0
CD41	0.4	1.5
CD14	0.2	0.5
GPA	0.2	0.5
CD117	0.2	0.3
CD16	0.2	0.3
CD2	0.2	0.2
HLA-DR	0.7	0.2
CD7	0.3	0.1
CD19	0.1	0.1

圖 18 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的細胞表面抗原差異
 利用流式細胞儀偵測在 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的細胞表面抗原比例(%), 每個抗體有各自的 isotype control。

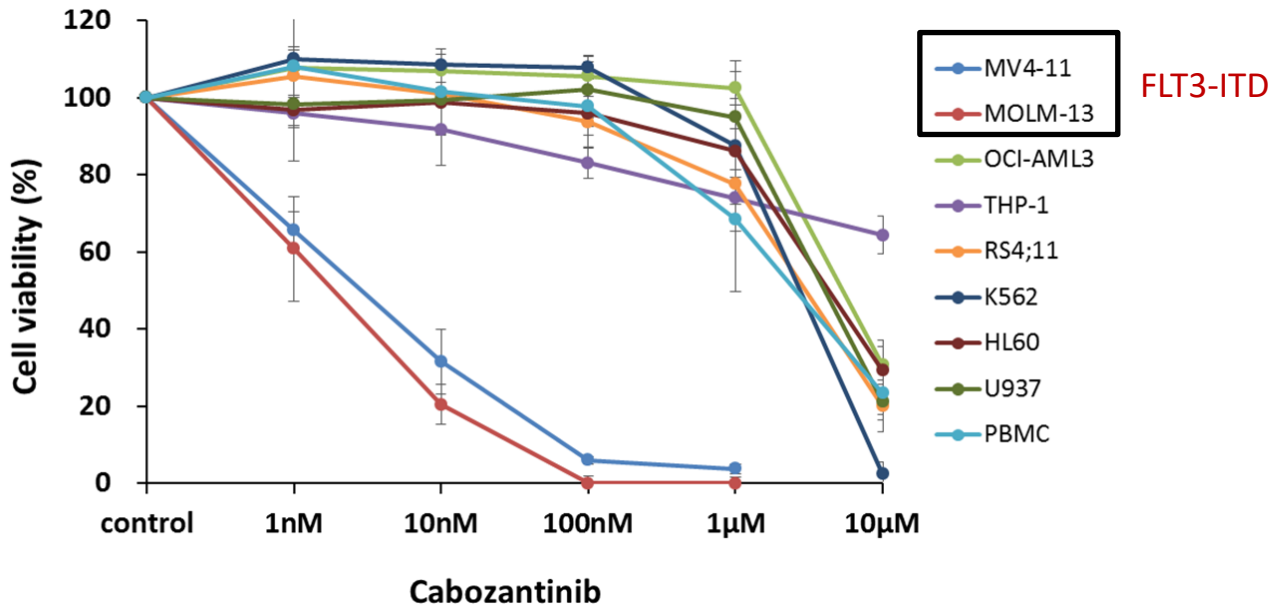


(C)

Gene	p value	Molm13-XR	Molm13-P
ABCC1	0.984236	380.5677	323.9371
ABCC2	0.689049	26.88793	10.63674

圖 19 Molm13-P 以及 Molm13-XR 的 ABCC1 及 ABCC2 之 mRNA 表現量
 利用即時監控聚合酶連鎖反應分別偵測(A)ABCC1 以及(B)ABCC2 的 mRNA 表現量。內源性控制基因為 *HPRT*，以 $2^{-\Delta Ct}$ 計算出 ABCC1 以及 ABCC2 相對於 *HPRT* 的 mRNA 表現量。(C) 以 RNA-seq 分析後之兩株細胞的 ABCC1、ABCC2 的 mRNA 表現量。

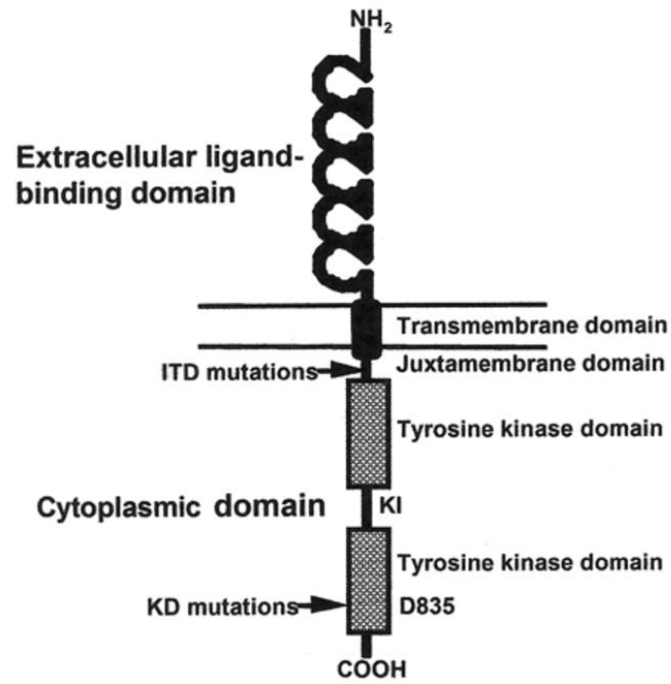
附圖



附圖 1 Cabozantinib 能有效抑制帶有 FLT3-ITD 血癌細胞株之生長

Reference:Wang A N, Cabozantinib is selectively cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells with internal tandem duplication of FLT3(FLT3-ITD)

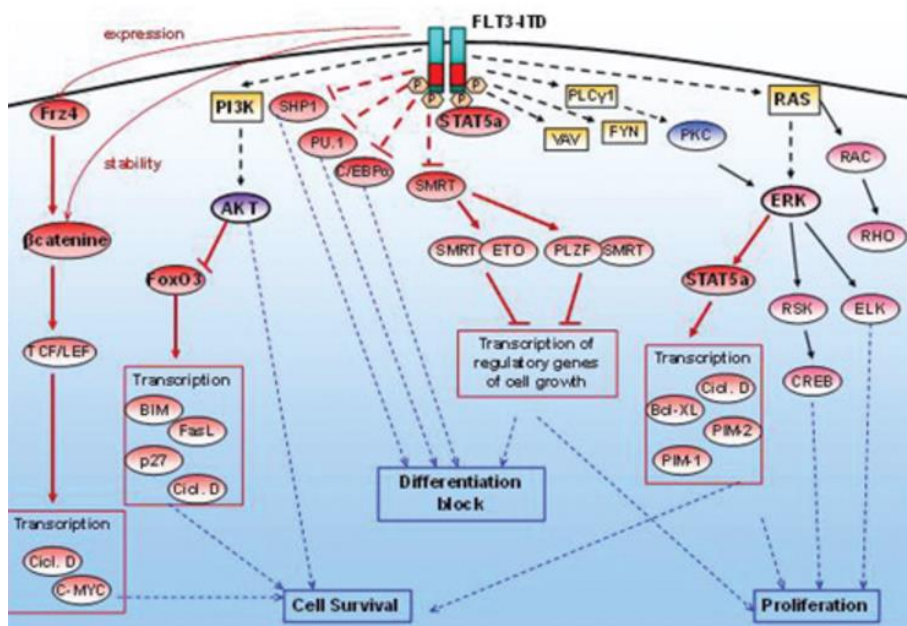
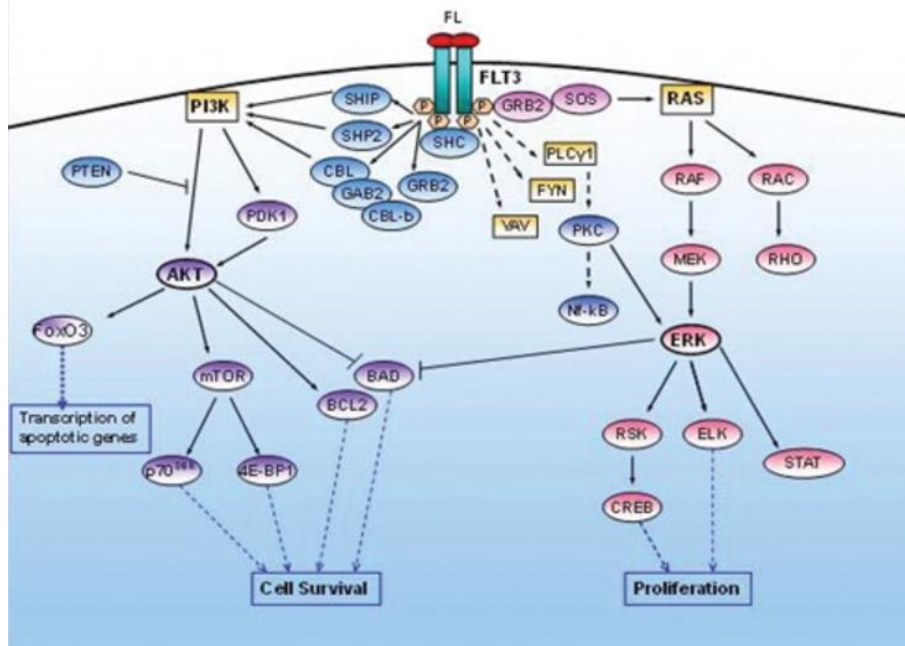
Master thesis, National Taiwan university, 2014.



附圖 2 FLT3 的蛋白結構

Reference:

FLT3 mutations: biology and treatment. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006, 178-184

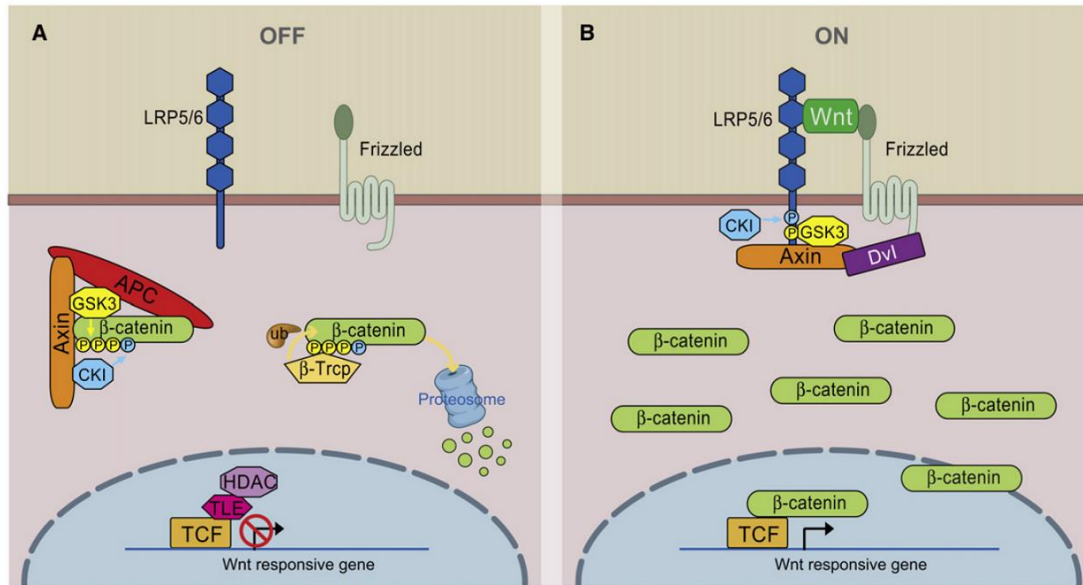


附圖 3 FLT3 wild type 以及 FLT3-ITD 的訊息傳遞路徑

Reference:

An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia:

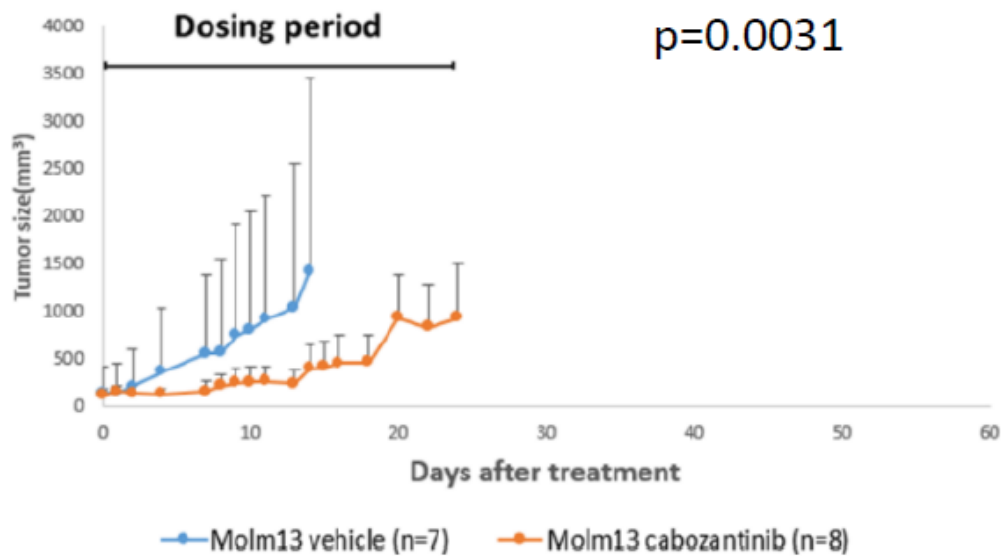
Biology and treatment. *Oncol Rev*, 2012; 6(1): e8



附圖 4 Wnt/β-catenin 訊息傳遞路徑

Reference:

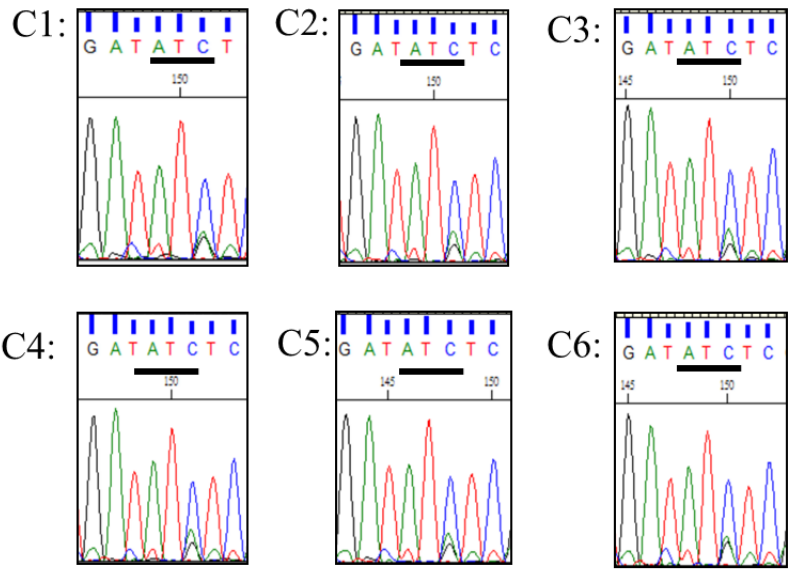
MacDonald, B. T., et al. (2009). "Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases." *Developmental Cell* 17(1): 9-26.



附圖 5 Cabozantinib 對 Molm13 腫瘤之抑制效果

將 6-8 周齡大之裸鼠(BALB/cAnN.Cg-Foxn1)以皮下注射的方式注入 Molm13 和 matrigel 1:1 的混和液 100ul。當腫瘤生長至 200mm³ 左右時，將裸鼠進行分組採取口服管餵 cabozantinib-malate，餵 5 天休 1 天，共四個周期，每二到三天利用測徑尺零腫瘤大小並且量體重。腫瘤測量公式為 0.5 x 長 x 寬 x 寬，將腫瘤的長邊定義為長，短邊定義為寬。

Reference: Zheng-Hau Liu, *In vitro* and *in vivo* study of the Efficacy of Cabozantinib on various *FLT3* mutations, Master thesis, National Taiwan university, 2016.



附圖 6 Molm13-XR single clone(C1-C6)之 FLT3 D835 位點之情形
 以 Sanger sequencing(反股)分析 FLT3 第 835 個密碼子，皆由 aspartic acid 以及 tyrosine 組成。

附表



Table 2 | French–American–British (FAB) classification of AML

FAB subtype	Description	Comments
M0	Undifferentiated	Myeloperoxidase negative; myeloid markers positive
M1	Myeloblastic without maturation	Some evidence of granulocytic differentiation
M2	Myeloblastic with maturation	Maturation at or beyond the promyelocytic stage of differentiation; can be divided into those with t(8;21) AML1–ETO fusion and those without
M3	Promyelocytic	APL; most cases have t(15;17) PML–RAR α or another translocation involving RAR α
M4	Myelomonocytic	
M4 _{Eo}	Myelomonocytic with bone-marrow eosinophilia	Characterized by inversion of chromosome 16 involving CBF β , which normally forms a heterodimer with AML1
M5	Monocytic	
M6	Erythroleukaemia	
M7	Megakaryoblastic	GATA1 mutations in those associated with Down's syndrome

AML1, acute myeloid leukaemia 1; APL, acute promyelocytic leukaemia; PML, promyelocytic leukaemia; RAR α , retinoic-acid receptor- α . Modified from REF. 65.

附表 1 法美英分類系統(FAB classification)

Reference: Tenen, D. G. (2003). "Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way." *Nature Reviews Cancer* **3**(2): 89-101.



Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms

AML with recurrent genetic abnormalities

AML with t(8;21)(q22;q22.1);*RUNX1-RUNX1T1*

AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);*CBFB-MYH11*

APL with *PML-RARA*

AML with t(9;11)(p21.3;q23.3);*MLLT3-KMT2A*

AML with t(6;9)(p23;q34.1);*DEK-NUP214*

AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*

AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3);*RBM15-MKL1*

Provisional entity: AML with BCR-ABL1

AML with mutated *NPM1*

AML with biallelic mutations of *CEBPA*

Provisional entity: AML with mutated RUNX1

AML with myelodysplasia-related changes

Therapy-related myeloid neoplasms

AML, NOS

AML with minimal differentiation

AML without maturation

AML with maturation

Acute myelomonocytic leukemia

Acute monoblastic/monocytic leukemia

Pure erythroid leukemia

Acute megakaryoblastic leukemia

Acute basophilic leukemia

Acute panmyelosis with myelofibrosis

Myeloid sarcoma

Myeloid proliferations related to Down syndrome

Transient abnormal myelopoiesis (TAM)

Myeloid leukemia associated with Down syndrome

附表 2 世界衛生組於 2016 年發佈對 AML 之分類

Reference:

Arber, D. A., et al. (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia." *Blood* 127(20): 2391-2405.4



Category	Gene name	Discription	Category	Gene name	Discription
hsa: 857	CAV1	caveolin 1	hsa:3480	IGF1R	insulin like growth factor 1 receptor
hsa: 595	CCND1	cyclin D1	hsa: 3693	ITGB5	integrin subunit beta 5
hsa:1026	CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A	hsa:4313	MMP2	matrix metalloproteinase 2
hsa:1514	CTSL	cathepsin L	hsa:22808	MRAS	muscle RAS oncogene homolog
hsa:2002	ELK1	ETS transcription factor	hsa:5328	PLAU	plasminogen activator, urokinase
hsa:7430	EZR	ezrin	hsa:6383	SDC2	syndecan 2
hsa:2260	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	hsa:6469	SHH	sonic hedgehog
hsa:2318	FLNC	filamin C	hsa:7099	TLR4	toll like receptor 4
hsa:7976	FZD3	frizzled class receptor 3	hsa:7124	TNF	tumor necrosis factor
hsa:8323	FZD6	frizzled class receptor 6	hsa:7291	TWIST1	twist family bHLH transcription factor 1
hsa:8324	FZD7	frizzled class receptor 7	hsa:7481	WNT11	Wnt family member 11
hsa:2719	GPC3	glypican 3	hsa:7475	WNT6	Wnt family member 6
hsa:1839	HBEGF	heparin binding EGF like growth factor	hsa:7477	WNT7B	Wnt family member 7B

附表 3 Molm13-P 以及 Molm13-XR 於 proteoglycans in cancer(hsa 05205) 訊息路徑

中具差異性表現之基因。

表

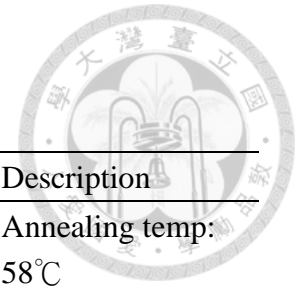


表 1 聚合酶連鎖反應(PCR)之引子序列

Gene	Primer sequence(5'→3')	Description
FLT3	F-TCCCTTGGCACATCTTGTGA	Annealing temp: 58°C
	R-GGAATGCCAGGGTAAGGAT	

表 2 即時監控聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)之引子序列

Gene	Primer sequence(5'→3')	Description
CCND1	F-GCATGTTTCGTGGCCTCTAAG	Annealing temp: 60°C
	R-CGTGTTTGC GGATGATCTGT	
HPRT	F-TGACACTGGCAAACAATGCA	Annealing temp: 60°C
	R-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	
ABCC1	F-AGGTCAAGCTTTTCCGTGTACTG	Annealing temp: 60°C
	R-GGACTTTCGTGTGCTCCTGA	
ABCC2	F-CTGCGTGGATCTAGAGACAGA	Annealing temp: 60°C
	R-TGCCGCACTCTATAATCTTCCC	
FLT3-ITD	F-GTGACCGGCTCCTCAGATAA	Annealing temp: 60°C
	R-TGGAAAAGTGATGAACGCAA	
MCL1	F-AAGAGGCTGGGATGGGTTTGTG	Annealing temp: 60°C
	R-TTGGTGGTGGTGGTGGTTGG	

表 3 Pyrosequencing 之引子序列

Gene	Primer sequence(5'→3')	Description
FLT3	F-CCTTCCATCACCGGTACCTC	Annealing temp: 58°C
	R-Biotin-GCAGACTGCTGTGAGGGTTTT	
FLT3 D835Y	F-GATATGTGACTTTGGATTGGC	Sequence primer
K-ras	F-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGT	Annealing temp: 58°C
	R-Biotin -ACAGGGTGTGATGATGCCT	
K-ras c.59、61	F-TTGGATATTCTCGACACA	Sequence primer
K-ras c.117	R-GTTCTAGAAGGCAAATCA	Sequence primer
K-ras c.146	FAATTCCTTTTATTGAAACAT	Sequence primer
N-ras	F-GGTGGGTTTTCTTTTATGTAGGG	Annealing temp: 58°C
	R-Biotin-CGCAAATGACTTGCTATTATTGAT	
N-ras c.12、13	F-GTGGTGGTTGGAGCA	Sequence primer
N-ras c.59、61	F-TCATGGCACTGTACTCTT	Sequence primer
N-ras c.117	F-TGGTGCTAGTGGGAAA	Sequence primer
N-ras c.146	F-TCCATTCATTGAAACCT	Sequence primer

表 4 GeneScan 之引子序列

Gene	Primer sequence(5'→3')	Description
FLT3	F-CAAATCTCAGGGCTTCATGG R-FAM-GGAATGCCAGGGTAAGGAT	Annealing temp: 58°C

