



國立臺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's Thesis

利用病人腫瘤異體移植小鼠模型探討 *KMT2A-r* 亞型 B 細胞急性
性淋巴性白血病中樞神經侵犯相關基因

Investigating genes related to central nervous system invasion of
KMT2A-r B cell acute lymphoblastic leukemia utilizing patient-
derived xenograft mouse model

廖育濬

Yu-Chun Liao

指導教授：林淑華 博士

Advisor: Shu-Wha Lin, PhD

中華民國 113 年 7 月

July 2024

致謝



碩班兩年匆匆，在這期間受到了許多人的幫助，讓我得以完成我的研究。首先我想感謝我的指導教授林淑華老師，自大學成為老師的導生開始，與老師相處足有六年的時間，即使在碩班之前便已受到老師許多的教導，在碩班兩年時間老師或許對我嚴格，但是也逐步養成我作為一位科學研究者需要具有的素養，並扎實地訓練我的邏輯思考能力，縱使我的研究結果不能算作非常成功，所有的知識與經驗都會化為我未來在醫學相關領域最穩固的基礎支撐著我。再來我想感謝我的父母，在許多方面不斷地支持我，或許在經歷這兩年後學術研究不再是我最想追求的職涯，但若是沒有他們的幫助，我不會有這個機會知道我未來真正想走的方向，儘管可能有些許後悔，我依然認為值得。接著我想感謝臺大兒童醫院血液腫瘤科的楊永立醫師及團隊，我的研究中最為基礎的實驗材料絕大多數都來自楊醫師的提供，以及許多關鍵的實驗技術也是向楊醫師的團隊學習而得，沒有這些協助，我的研究不可能完成。我也想要感謝臺大醫學院第一共研的李慧瑛博士，在研究最後最關鍵的許多數據分析沒有李博士的協助不可能有機會完成。我還要感謝我的同學陳立夫與陳尹婕，兩位同學在學術研究方面的天分都勝過於我，與兩位互相切磋砥礪是我實驗技術進步最大的來源。另外我也要感謝我的學長洪嘉倫繁忙中不斷指導我整個研究的方向以及精進我的實驗技術。同時也要感謝我的學弟潘致宇，在我的研究各方面都給予我相當大的協助，在自己的研究同時與我一同分擔了許多實驗以及動物照護的工作，辛苦程度肯定是不相上下的。最後我要感謝我的碩士論文口試委員們對我的研究的認可，儘管我的成果並不完美，但仍為我的論文提出許多建議，令其得以臻至完善。未來我的目標或許已不再是學術研究，但我仍會精益求精，努力不懈。

中文摘要



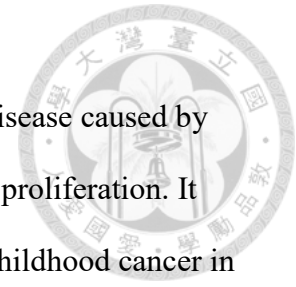
急性淋巴性白血病(Acute lymphoblastic leukemia, ALL)為淋巴系前驅白血球發生基因突變，進而不良性增生所造成的惡性血液疾病。其好發於年輕族群，在台灣為兒童癌症發生率之首。根據免疫分型，急性淋巴性白血病可分為 T 細胞型(T-ALL)及 B 細胞型(B-ALL)，並再根據基因突變分為不同亞型。在 B-ALL 中，常見突變有 hyperdiploid、hypodiploid、*KMT2A* rearrangement、*BCR::ABL1*、*ETV6::RUNX1*、*TCF3::PBX1* 等，其中 *KMT2A* rearrangement 屬於中樞神經侵犯高風險亞型，同時該亞型預後較差，且在一歲以下嬰幼兒新診斷病例占約 70%以上。在現行治療下，對於中樞神經侵犯已有良好的成效，然而對於其本身的機制尚未明瞭。過往文獻提出過多種不同假說，指出某些基因與中樞神經侵犯有關，如 2018 年有文獻提出 B-ALL 細胞藉由表現 integrin $\alpha 6$ ，利用血管外壁之 laminin 由顱骨骨髓腔爬行至蜘蛛網膜下腔；2020 年一文獻則觀察到 *ITGA5* 及 *ITGA9* 的表現量上升與 B-ALL 細胞於中樞神經系統定殖(colonization)成正相關性；2021 年又有另一文獻則提出 B-ALL 細胞利用蝕骨作用以及 CXCR4 介導的趨化訊號得以從顱骨進入蜘蛛網膜下腔。然而目前尚未有一定論提出某一機制主導中樞神經侵犯發生，不同亞型是否由同一機制主導也並未確定。綜上所述，本研究旨在探討與 B-ALL 中樞神經侵犯相關之基因，並集中於 *KMT2A* rearrangement 亞型；鑒於中樞神經侵犯檢體不易大量取得，本研究亦使用病人腫瘤異體移植模型(Patient-derived xenograft model, PDX model)克服此一困難。本研究先對十五位 *KMT2A* rearrangement B-ALL 病人原有檢體進行 RNA 定序分析，未發現有基因集於有中樞神經侵犯病人之血癌細胞顯著調升，推論其原因為病人原有檢體非中樞神經侵犯檢體，故未能觀察到與中樞神經侵犯能力及發生等相關的基因表現變化。本研究接著使用重度免疫缺陷 NSGTM小鼠進行 PDX 模型之建立，並先採用人類血癌細胞株 RS4;11 進行異體移植前驅實驗。RS4;11 移植於小鼠後，可自小鼠頭部切片觀察到其分布於



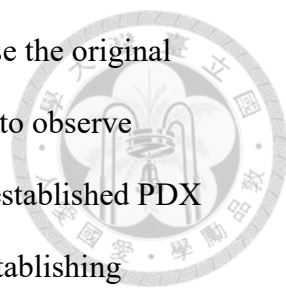
蜘蛛網膜下腔區域，表明該移植模型可呈現中樞神經侵犯表型。鑒於 RS4;11 移植模型的成功，我們自前述病人中挑選六位病人個別建立 PDX 模型，其中三位病人診斷時有中樞神經侵犯，三位則無。對自 PDX 小鼠分離之中樞神經侵犯細胞進行 RNA 定序分析，發現整合素基因如 *ITGA6*、*ITGA7*、*ITGA9*、*ITGB5* 有顯著調升，同時數個整合素基因如 *ITGA2B*、*ITGB2*、*ITGB3* 等有顯著調降。以過表徵分析(ORA)則自 KEGG 資料庫辨別出如「ECM receptor interaction」、「PI3K-Akt signaling pathway」等基因集有所調升，前者包含整合素基因 *ITGA7*、*ITGA9*、*ITGB5*，後者包含 *ITGA6*。綜上所述，本研究成功建立 PDX 模型以供辨識主導 *KMT2A* rearrangement B-ALL 中樞神經侵犯的基因路徑。

關鍵字：小兒癌症、急性淋巴性白血病、中樞神經侵犯、*KMT2A*-r 亞型、整合素

Abstract



Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant hematologic disease caused by genetic mutations in lymphoid precursor cells, leading to abnormal proliferation. It predominantly affects young individuals and is the most common childhood cancer in Taiwan. ALL can be classified into T-cell type (T-ALL) and B-cell type (B-ALL) by immunophenotyping, and further classified into different subtypes according to the genetic mutation of the cancer cells. In B-ALL, common mutations include hyperdiploid, hypodiploid, *KMT2A* rearrangement (*KMT2A-r*), *BCR::ABL1*, *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, etc.. The *KMT2A-r* subtype is associated with a high risk of central nervous system (CNS) involvement and has a poorer prognosis, with over 70% of new diagnoses in infants under one year old. Current treatments have shown good efficacy against CNS involvement, but the underlying mechanisms remain unclear. Previous studies have proposed various hypotheses linking certain genes to CNS involvement. For instance, a 2018 study suggested that B-ALL cells express integrin $\alpha 6$, using laminin on the vascular wall to migrate from the cranial bone marrow cavity to the subarachnoid space. A 2020 study observed increased expression of *ITGA5* and *ITGA9*, correlating with B-ALL cell colonization in the CNS. Another study in 2021 proposed that B-ALL cells utilize osteolysis and CXCR4-mediated chemotaxis to enter the subarachnoid space from the cranial bone. However, no definitive mechanism has been suggested, and it is unclear whether different subtypes are governed by the same mechanism. Our study aims to investigate genes related to CNS involvement in B-ALL, especially focusing on the *KMT2A-r* subtype. Due to the difficulty in obtaining large quantities of CNS involvement samples, we also utilize patient-derived xenograft (PDX) model to overcome this challenge. Initial RNA sequencing analysis of original samples from 15 *KMT2A-r* B-ALL patients did not reveal significant gene set upregulation in leukemia



cells from patients with CNS involvement. We proposed that because the original samples were not from CNS involvement samples, we weren't able to observe expression changes of genes related to CNS involvement. We then established PDX models using severely immunodeficient NSGTM mice, while first establishing xenograft model with human *KMT2A-r* B-ALL cell line RS4;11 as a pilot study. After transplantation, we observed RS4;11 in the subarachnoid space in mice head sections. Thus we confirm that the RS4;11 xenograft model can represent CNS involvement phenotypes. Based on the successful results of RS4;11, we select six patients, three with CNS involvement and three without, and we establish PDX models for individual patients. RNA sequencing analysis of CNS involvement cells isolated from PDX mice revealed significant upregulation of integrin genes such as *ITGA6*, *ITGA7*, *ITGA9*, and *ITGB5* and downregulation of several integrin genes such as *ITGA2B*, *ITGB2*, and *ITGB3*. Furthermore, Over-Representation Analysis (ORA) identified several gene sets that are enriched in CNS involvement cells, such as “ECM receptor interaction”, in which *ITGA7*, *ITGA9*, and *ITGB5* are included, and “PI3K-Akt signaling pathway”, in which *ITGA6* is included. Taken together, we have established PDX models that allow us to identify novel pathways that govern CNS involvement in *KMT2A-r* B-ALL.

Keyword: pediatric cancer, acute lymphoblastic leukemia, CNS involvement, *KMT2A* rearrangement, integrin

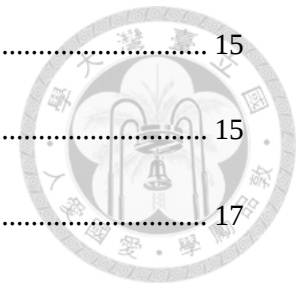
目次



致謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iv
表次.....	ix
圖次.....	x
中英對照表.....	xi
縮寫表.....	xii
第一章 緒論.....	1
1.1 急性淋巴性白血病.....	1
1.2 急性淋巴性白血病之亞型.....	2
1.3 急性淋巴性白血病之中樞神經侵犯.....	2
1.4 中樞神經侵犯發生與白血病亞型相關性與 <i>KMT2A-r</i> 亞型.....	3
1.5 中樞神經侵犯機制尚未明瞭.....	4
1.6 研究動機.....	4
第二章 實驗方法與材料.....	6
2.1 細胞株及病人血癌細胞.....	6
2.1.1 細胞株.....	6
2.1.2 病人血癌細胞.....	6
2.2 實驗動物.....	6
2.3 人類白血病細胞異體移植小鼠模型.....	6

2.3.1 尾靜脈注射	6
2.3.2 血癌細胞生長監測及小鼠檢體採集	7
2.3.3 小鼠檢體血癌細胞萃取	7
2.3.4 流式細胞儀分析	8
2.4 血癌細胞 RNA 萃取及定序分析	9
2.5 小鼠頭部石蠟包埋製作	9
2.6 組織免疫化學染色	10
2.7 數據分析	10
第三章 實驗結果	11
3.1 KMT2A-r B-ALL 病人基因表現差異分析	11
3.1.1 病人資訊	11
3.1.2 有中樞神經侵犯之病人未有基因路徑顯著調升	11
3.2 人類血癌細胞株前驅實驗	11
3.2.1 人類血癌細胞株異體移植模型之建立	11
3.2.2 中樞神經侵犯可見於細胞株異體移植模型	12
3.3 病人腫瘤異體移植(PDX)模型	12
3.3.1 PDX 模型之建立	12
3.3.2 病人之中樞神經侵犯表型可重現於 PDX 模型	13
3.4 PDX 模型檢體 RNA 定序分析	14
3.4.1 Pt#2 PDX 檢體 RNA 定序分析	14
3.4.2 Pt#3 PDX 檢體 RNA 定序分析	14
3.4.3 Pt#11 PDX 檢體 RNA 定序分析	15

3.4.4 Pt#1 PDX 檢體 RNA 定序分析	15
3.4.5 過表徵分析(Over-Representation Analysis , ORA).....	15
第四章 討論	17
4.1 病人原有檢體之 RNA 定序分析.....	17
4.2 RS4;11 異體移植模型與 PDX 模型之建立	17
4.3 無中樞神經侵犯病人之 PDX 模型呈現中樞神經侵犯表型	18
4.4 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞之 RNA 定序分析.....	19
第五章 結論與展望	21
參考文獻	22
表	27
圖	37
附錄	64



表次

表一、病人基本資訊	27
表二、PDX 模型實驗病人資訊	28
表三、病人 PDX 模型資訊整理	29
表四、整合素基因於 Pt#2-6 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量.....	30
表五、整合素基因於 Pt#2-9 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量.....	31
表六、整合素基因於 Pt#3-5 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量.....	32
表七、整合素基因於 Pt#11-8 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量.....	33
表八、整合素基因於 Pt#1-11 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量.....	34
表九、整合素基因於各 PDX 小鼠調升及調降統計	35
表十、RANKL(基因名 <i>TNFSF11</i>)於 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量	36

圖次

圖一、人類癌細胞株 RS4;11 前驅實驗	37
圖二、RS4;11 異體移植小鼠之頭部切片	39
圖三、病人腫瘤異體移植(PDX)模型	40
圖四、PDX 小鼠頭部切片	44
圖五、Pt#2 PDX 小鼠中樞神經侵犯檢體相對基因表現量散布圖	47
圖六、Pt#3 PDX 小鼠中樞神經侵犯檢體相對基因表現量散布圖	50
圖七、Pt#11 PDX 小鼠中樞神經侵犯檢體相對基因表現量散布圖	52
圖八、Pt#1 PDX 小鼠中樞神經侵犯檢體相對基因表現量散布圖	54
圖九、Pt#2-6 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析	56
圖十、Pt#2-9 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析	57
圖十一、Pt#3-5 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析	58
圖十二、Pt#11-8 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析	59
圖十三、Pt#1-11 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析	60
圖十四、RANKL(基因名 <i>TNFSF11</i>)於 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量散布圖	61

中英對照表



B 細胞急性淋巴性白血病

B cell acute lymphoblastic leukemia ,

B-ALL

T 細胞急性淋巴性白血病

T cell acute lymphoblastic leukemia ,

T-ALL

中樞神經

Central nervous system , CNS

尾靜脈注射

Intravenous injection , IV

臉頰採血

Submandibular blood collection

胎牛血清

Fetal Bovine Serum , FBS

錐蟲藍

Trypan Blue

病人腫瘤異體移植

Patient-derived xenograft , PDX

定殖

Colonization

縮寫表



B-ALL	B cell acute lymphoblastic leukemia
T-ALL	T cell acute lymphoblastic leukemia
CNS	Central nervous system
<i>KMT2A</i> -r	<i>KMT2A</i> rearrangement
PDX	Patient-derived xenograft
1% PBSA	PBS buffer containing 1% bovine serum albumin

第一章 緒論



1.1 急性淋巴性白血病

白血病(Leukemia)為白血球前驅細胞因發生基因突變，導致非良性增生所引發的血液惡性疾病，根據發生癌化細胞之細胞系，可分為淋巴性白血病(lymphoblastic leukemia)以及骨髓性白血病(myeloid leukemia)，並根據癌化細胞的分化成熟程度，分為急性以及慢性。其中，急性淋巴性白血病(ALL)好發於年輕族群，在美國為最常見的兒童癌症，同時亦為 20 歲前最常見之癌症死因[1]；而根據中華民國兒童癌症基金會統計，於臺灣自 1995 年至 2022 年為兒童癌症好發率之首[2]。ALL 的臨床表現通常包含發燒、牙齦出血、頻繁性鼻血、淋巴結腫大、臉色蒼白、四肢無力、虛弱極容易疲倦等，風險因子包含年齡、性別、種族、診斷時白血球數、中樞神經侵犯(CNS involvement)與否、唐氏症、睪丸侵犯(testicular involvement)以及癌細胞本身的免疫分型及突變亞型等。在兒童病患族群中，以年齡在 1 歲以下以及 10 歲以上、性別為男性、白血球數在 $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ 以上、有中樞神經侵犯、唐氏症、睪丸侵犯等為預後較差之因子，種族則以非裔美國人及拉丁裔預後較差、亞洲人及白人預後較好，免疫分型上以 T 細胞型 ALL 預後較差[3]。現行對於 ALL 之治療主要以化學藥物治療為主，常見用藥如 L-asparaginase、vincristine、dexamethasone 等[4]，另外根據 ALL 亞型不同，亦有合併標靶藥物以提升治療成效，例如對 *BCR::ABL1* 亞型使用酪胺酸激酶抑制劑(TKI)藥物[5-7]。化學治療的流程分為三個主要時期，分別為引導期(Induction)、鞏固期(Consolidation)及維持期(Maintenance)；在引導期目標為達到癌細胞的緩解(remission)，期間大約為四至六週，以糖皮質固醇類(glucocorticoid)(prednisone 或 dexamethasone)、vincristine、asparaginase 三種類藥物進行治療，目前临床上已可達到 90%以上的小兒病患在引導期達到疾病的完全緩解；在引導期後接著進入鞏固期治療，相對於引導期用藥劑量上升，常見用藥有 cyclophosphamide、cytarabine、mercaptopurine、methotrexate 等，並且在鞏固期結束後，屬於一般風

險(standard-risk)或高風險(high-risk)病患會進入再引導期(reinduction)以確保疾病的清除；過往文獻已表明在引導期及鞏固期時微量殘留疾病(MRD)為陰性的病人其5年無事件存活率相對於MRD陽性的病人較佳[8]；最後病人會進入維持期，該期間通常為一年以上，以持續低劑量的化療藥物如 mercaptopurine 及 methotrexate 進行治療，並且後續追蹤是否有疾病的復發[3]。

1.2 急性淋巴性白血病之亞型

早期根據 French-American-British 分類，ALL 可依照細胞型態分類為三種亞型：L1、L2 以及 L3[9]。近年以來，世界衛生組織則根據細胞的型態、免疫分型以及基因突變進行分類[10]。依照細胞免疫分型可將其分為 B 細胞型(B-ALL)以及 T 細胞型(T-ALL)兩類，並再根據常見的基因突變細分為多種亞型。在 B-ALL 中，常見突變有 hyperdiploid、hypodiploid、*BCR::ABL1*、*ETV6::RUNX1*、*KMT2A* rearrangement (*KMT2A-r*)、*TCF3::PBX1* 等，近年來亦持續新增新的突變亞型如 *IKZF1*^{N159Y}[6, 11]。Hyperdiploid 及 hypodiploid 為染色體數異常之突變，正常人體染色體數為 46 條(23 對)，前者為染色體數介於 47 至 58 條之間，後者則為染色體數介於 35 至 45 條之間[12, 13]；*BCR::ABL1*、*ETV6::RUNX1*、*KMT2A-r*、*TCF3::PBX1* 等則為染色體轉位之突變，比如 *BCR::ABL1* 為人類第二十二號染色體長臂(*BCR* 所在)與第九號染色體長臂(*ABL1* 所在)發生轉位而產生基因融合[10]。個別亞型具有不同程度的預後，具有較良好預後的亞型有 hyperdiploid、*ETV6::RUNX1*、*TCF3::PBX1*，預後較差的亞型則有 *BCR::ABL1*、*KMT2A-r*、hypodiploid 等[6]。

1.3 急性淋巴性白血病之中樞神經侵犯

在 ALL 的疾病進程中，癌化細胞會於骨髓中增殖，並轉移到身體內其他器官，常見轉移如脾臟、肝臟，亦會轉移至中樞神經系統。據過往文獻統計，於初診斷



時有 5%至 10%病人發現有中樞神經侵犯，並且有 7%至 15%的病人會發生中樞神經系統復發[14]。大多數有中樞神經侵犯之病人為無症狀表現，少數病人會表現症狀包含頭痛、平衡感喪失、情緒不穩定(mood swings)、癲癇、噁心嘔吐等。現行對於中樞神經侵犯之診斷方式為使用腰椎穿刺(lumbar puncture)採集病人的腦脊髓液，製作細胞抹片以細胞學檢驗進行分類，可分為 CNS1 至 CNS3 三個類群。CNS1 為抹片中無觀察到芽細胞(blast)或白血球，CNS2 及 CNS3 則是有觀察到芽細胞或白血球存在，其中以少於 5 顆/ μL 為 CNS2，5 顆/ μL (含)以上為 CNS3[15, 16]。於診斷時發生中樞神經侵犯之病人預後較為不好[17, 18]，而中樞神經侵犯風險因子包含高白血球數($\geq 100 \times 10^3$ 細胞/ μL)以及特定 ALL 亞型等[19]。針對中樞神經侵犯的發生，現行治療以脊髓鞘內注射(intrathecal injection)的方式進行投藥，並且以 methotrexate (MTX)、cytarabine (Ara-C)及 dexamethasone (DEX)三種藥物為主[20]，此外亦有採用顱部放射線治療(cranial irradiation)，然而過往文獻皆顯示該治療於小兒病患容易產生神經毒性，影響神經系統發展，此外亦有在放射線治療區域發生次發性中樞神經腫瘤的風險[19]。

1.4 中樞神經侵犯發生與白血病亞型相關性與 *KMT2A-r* 亞型

過往文獻表明，中樞神經侵犯發生之風險於不同 ALL 亞型不一，具有高發生風險的亞型如 T-ALL[21]、*BCR::ABL1*[22]、*TCF::PBX1*[23-25]以及 *KMT2A-r*[26]等。其中，*KMT2A-r* 在所有 ALL 病例雖占比不高[1]，但於 1 歲以下嬰幼兒新診斷病例中佔比達 70%以上[6, 27]，並以 B-ALL 病例居多[28]，其年齡分布上於 1 歲以下達到高峰，隨年齡增長比例銳減，並於 40 歲左右有些微比例上升[27]。該亞型突變為位於人類第十一號染色體長臂之 *KMT2A*(舊稱 *MLL*，mix lineage leukemia)基因與其他染色體之基因發生轉位，產生融合基因。該亞型之融合夥伴基因經文獻報導已有九十種以上被辨認，其中常見的基因有 *AFF1*(舊稱 *AF4*)、*MLLT1*(舊稱 *ENL*)、*MLLT3*(舊稱 *AF9*)、*MLLT10*(舊稱 *AF10*)等，以 *AFF1* 最為常

見[28]。在現行治療指引中，診斷為 *KMT2A-r* 亞型之病人屬於高風險族群，其臨床表徵通常伴隨著高白血球數($> 30 \times 10^3/\mu\text{L}$)[11]。



1.5 中樞神經侵犯機制尚未明瞭

對於 ALL 的中樞神經症狀，現行的治療指引已有良好的成效[16, 29]，然而其發生的機制目前尚未有完整的定論。過往文獻曾提出多種假說，認為 ALL 的中樞神經侵犯能力與某些基因表現有相關性；2018 年，Yao Hisayuki 團隊提出 B-ALL 細胞藉由表現 integrin $\alpha 6$ ，利用與血管外壁之 laminin 結合，自顱骨骨髓腔沿導血管(emissary vessels)爬行至蜘蛛網膜下腔內[30]；2020 年，Shah Scharff BFS 團隊則觀察到 *ITGA5* 及 *ITGA9* 的表現量上升與 B-ALL 細胞於中樞神經系統定殖(colonization)成正相關性[31]；2021 年，Sujeetha A. Rajakumar 團隊則提出 B-ALL 細胞利用蝕骨作用的 RANK-RANKL 路徑以及 CXCR4 介導的趨化訊號使其得以從顱骨進入蜘蛛網膜下腔[32]；近期 Philip Gebing 團隊亦提出 AP-1 signaling pathway 於發生中樞神經侵犯的 *TCF::PBX1* 亞型 B-ALL 病人中有顯著地調升，且該路徑中的 *JUN* 基因亦有顯著調升[33]。然而，目前尚無任何統一之結論確定主導 B-ALL 中樞神經侵犯能力的基因或路徑為何，不同亞型之 B-ALL 中樞神經侵犯是否由同一路徑主導也尚未明瞭。

1.6 研究動機

綜上所述，本研究旨在探討與 B-ALL 中樞神經侵犯能力相關之可能基因，並選擇專注於 *KMT2A-r* 亞型 B-ALL。本研究選擇 *KMT2A-r* 亞型之原因在於該亞型屬於中樞神經侵犯高風險因子，同時其本身屬於預後較差之亞型[1]，並且在小兒族群所佔比例高。由於可從病人取得之檢體多為骨髓以及周邊血之血癌細胞，中樞神經侵犯檢體則難以大量取得，因此本研究利用病人腫瘤異體移植模型(Patient-derived xenograft model, PDX model)，將病人之血癌細胞移植於帶有重度免疫缺

陷的 NSG™小鼠，使血癌細胞於小鼠的中樞神經系統進行擴增，藉以取得足量之中樞神經侵犯檢體進行分析。



第二章 實驗方法與材料



2.1 細胞株及病人血癌細胞

2.1.1 細胞株

帶有 t(4;11) 染色體轉位突變之人類白血病細胞株 RS4;11[34] 由臺大醫學院檢驗醫學科楊永立副教授慷慨提供，並委託國立成功大學基因體醫學中心進行細胞株基因型鑑定，鑑定方法為 STR 基因型鑑定(附圖二、附表一)。RS4;11 培養於含 10% FBS、1% sodium pyruvate、10 mM HEPES 之 RPMI1640 培養基(SH30027.02, Cytiva)，並於 37°C、5% CO₂ 的環境下培養，培養期間定期以核酸偵測法(聚合酶連鎖反應)進行黴漿菌偵測以確保沒有汙染。

2.1.2 病人血癌細胞

本研究與臺大兒童醫院血液腫瘤科合作，取得 *KMT2A-r* 亞型 B-ALL 病人保存之血癌細胞及其 RNA 定序數據。

2.2 實驗動物

本研究使用之實驗動物皆於台灣大學醫學院實驗動物中心飼養與繁殖，動物照護及實驗流程均遵守臺灣大學醫學院動物管理委員會之規範。人類血癌細胞株異體移植模型及 PDX 模型皆使用 NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ 小鼠(簡稱 NSG™ 小鼠)，NSG™ 小鼠自 The Jackson Laboratory。

2.3 人類白血病細胞異體移植小鼠模型

2.3.1 尾靜脈注射

本研究使用尾靜脈注射技術將人類血癌細胞株或病人血癌細胞移植於 NSG 小鼠體內，建立異體移植小鼠模型。欲移植之細胞事前以不含 FBS 之 DMEM-F12 (10-090-CV, Corning®) 進行回溶成細胞懸浮液；將 8-12 週 NSG 小鼠放入保定器

內，以非慣用手固定小鼠尾巴後，對注射位置以 75%酒精進行消毒，接著以 30.5 gauge 0.3 mL 胰島素針取 200 μ L 的細胞懸浮液，並注射進小鼠的尾部靜脈，注射完畢後停留約 5 至 10 秒再拔除注射針，以紗布按壓注射處止血，再將小鼠放回飼養籠內。以細胞株建立之異體移植模型，每隻小鼠注射 5×10^6 顆細胞；以病人細胞建立之異體移植模型，每隻小鼠注射 4 至 10×10^6 顆細胞，每位病人於同一批次實驗的小鼠皆注射相同的細胞量。

2.3.2 血癌細胞生長監測及小鼠檢體採集

為定期監測血癌細胞於小鼠體內生長情形，移植細胞的小鼠定期以臉頰採血取得周邊血液，並以流式細胞儀藉由特異性細胞表面標記偵測血癌細胞。為偵測血癌細胞於小鼠 CNS、骨髓、脾臟等器官生長的情形，小鼠以 2.5% Avertin 麻醉後，先以心臟採血取得周邊血液，接著以 1x PBS 對小鼠進行心臟灌流，灌流時間約為 10 分鐘，灌流完成後以頸部脫臼法犧牲小鼠。取小鼠的左右股骨，將兩端以大剪截斷後，使用 26.5 gauge 1mL syringe 以不含 FBS 之 DMEM-F12 培養基(10-090-CV, Corning®)沖洗骨髓腔，製成組織懸浮液；取小鼠的脾臟，以滅菌之 5mL syringe plunger 於不含 FBS 之 DMEMF-F12 培養基中將其磨碎製成組織懸浮液；以大剪將小鼠進行斷頭，去除頭部表皮後，以小剪剪開頭骨，使用鑷子取出腦組織並放入 10 mL 不含 FBS 之 DMEMF-F12 培養基中暫時保存，經過後續處理取得血癌細胞；用於頭部切片之檢體，以大剪將小鼠斷頭，去除頭部表皮去、下顎及外部軟組織，放入 10 mL 4% PFA 固定一週。

2.3.3 小鼠檢體血癌細胞萃取

小鼠周邊血以 150 μ L/1 mL RBC lysis buffer (402301, BioLegend®)的比例混和均勻，靜置 20 分鐘反應以去除紅血球，反應完成後以 2800 xg、2 分鐘的條件離心，去除上清液後，再加入 500 μ L RBC lysis buffer 反應 5 分鐘以去除殘存紅血



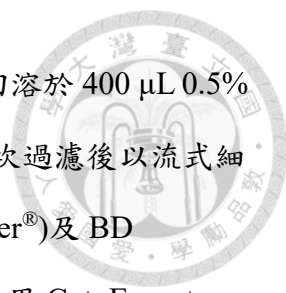
球，反應完成後以 2800 xg、2 分鐘的條件離心，去除上清液，以 1 mL 含 1% BSA 之 1x PBS 清洗細胞沉澱，並回溶於等同原血液體積量含 1% PBSA。

小鼠骨髓及脾臟組織懸浮液以 100 μ m cell strainer (CSS013100, Jet BIOFIL[®])過濾後取得單細胞懸浮液，以 360 xg、3 分鐘的條件離心，去除上清液，再分別加入 1 mL 及 3 mL RBC Lysis Buffer 混和均勻並靜置 2 分鐘反應以去除紅血球，反應完成後加入 10 倍體積量 1% PBSA，以 360 xg、3 分鐘的條件離心，去除上清液後分別重新回溶於 1 mL 及 3 mL 1% PBSA，使用血球計數盤以 Trypan blue 染色進行活細胞計數。

小鼠腦組織置於 100 μ m cell strainer，於 10 cm petri dish 上以滅菌之 5mL syringe plunger 磨碎，並加入不含 FBS 之 DMEMF-F12 培養基(10-090-CV, Corning[®])過濾製成單細胞懸浮液，將懸浮液取至 50 mL 離心管內，以 300 xg、10 分鐘的條件離心，去除上清液，重新回溶於 37% Percoll[®] (P4937, Sigma-Aldrich[®])，並以 70%/37%/30%的 percoll gradient 進行密度梯度離心，離心條件為 400 xg、30 分鐘，離心完後吸取 70%及 37%介面層之細胞，約吸取 2 至 3 mL 至 15 mL 離心管，每 1 mL 之細胞懸浮液加入 2 mL 的 1x PBS，以 300 xg、7 分鐘的條件離心，去除上清液，以 1x PBS 清洗沉澱物兩次，回溶於 1 mL 1% PBSA，使用血球計數盤以 Trypan blue 染色進行活細胞計數。

2.3.4 流式細胞儀分析

自小鼠檢體萃取出來的血癌細胞，以含 1% BSA 之 1x PBS 調整至約 1×10^7 顆細胞/mL 的濃度，取 100 μ L 細胞懸浮液以 anti-human CD45-APC (clone HI30, 555485, BD Pharmingen[™])、anti-human CD19-FITC (clone 4G7, 340846, BD[™])、anti-mouse CD45-PerCP (clone 30-F11, 557235, BD Pharmingen[™])避光染色 20 分鐘，加入 1



mL 1%PBSA 並以 2800 xg、2 分鐘的條件離心，去除上清液，回溶於 400 μ L 0.5% PFA，並以 100 μ m cell strainer (CSS013100, Jet BIOFIL[®])進行一次過濾後以流式細胞儀進行分析。本實驗使用之機型為 CytoFLEX (Beckman Coutler[®])及 BD Acurri[™] C6 Plus (BD Biosciences[®])，流式細胞儀結果分析軟體使用 CytoExpert (Beckman Coutler[®])、C6 Plus Analysis software (BD Biosciences[®])以及 FlowJo[™] v10.8.1 (BD Biosciences[®])。

2.4 血癌細胞 RNA 萃取及定序分析

自小鼠骨髓及腦組織萃取之血癌細胞，以 5×10^6 顆細胞/1 mL TRIzol[®] (15596018, Invitrogen[™])的比例混和，靜置 3 分鐘，加入 200 μ L 氯仿，充分混和後靜置 3 分鐘，以 13200 rpm、4°C、15 分鐘的條件離心，離心後取上清液，加入 500 μ L 異丙醇，混和後靜置 10 分鐘，以 13200 rpm、4°C、10 分鐘的條件離心，離心後去除上清液，加入 1 mL 75%酒精，以 13200 rpm、4°C、5 分鐘的條件離心，離心後去除上清液，風乾 5 至 10 分鐘後以 20 μ L nuclease free water 回溶沉澱物，並以 NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific)測量 RNA 濃度及純度。

本研究之 RNA 定序以及定序結果初步分析委託國立臺灣大學醫學院第一共同研究室醫學微生物體核心實驗室進行，建庫使用之試劑組為 Illumina Stranded mRNA prep (Illumina)，定序使用之機型為 Novaseq X plus (Illumina)。

2.5 小鼠頭部石蠟包埋製作

經 4% PFA 固定一週之小鼠頭顱(包含完整腦組織)，以 1x PBS 清洗 15 至 20 分鐘後，浸泡於 20% EDTA (pH 7.4)溶液中一週進行脫鈣，並每兩天更換一次 EDTA 溶液，脫鈣完畢後以滅菌刀片自頭顱中線縱向切開成左、右等分，並將其進行石蠟包埋。



2.6 組織免疫化學染色

包埋後之頭顱組織以 8 至 10 μm 的厚度製作連續切片，切片以 anti-human CD19 (IR253-901, iREAL) 進行組織免疫化學染色，簡述步驟如下：將切片放置於玻片架，以 65°C 加熱 15 分鐘後進行復水；浸於二甲苯中 15 分鐘，每 5 分鐘更換一次二甲苯，接著依照 100% 酒精、95% 酒精、70% 酒精、ddH₂O 的順序分別浸泡 5 分鐘；復水後的切片浸於煮沸之 0.01M citrate buffer (pH6.0，含 0.05% tween 20) 10 分鐘，接著靜置於室溫自然冷卻；冷卻後之切片以圈畫筆圈畫組織，加入 3% 過氧化氫溶液室溫反應 10 分鐘，反應完後去除 3% 過氧化氫溶液，加入 blocking buffer (含 10% normal goat serum 之 1x TBST buffer)，室溫反應 2 小時；反應完後去除 blocking buffer，加入一級抗體 anti-human CD19 (以 blocking buffer 稀釋 300 倍製成) 染色過夜；以 1x TBST 清洗 3 次，加入二級抗體 goat anti-rabbit IgG-HRP 反應 30 分鐘，反應後以 1x TBST 清洗 3 次，以 Vector[®] NovaRed[®] Substrate Kit () 反應 5 分鐘呈色，反應後立即以 ddH₂O 清洗，並以蘇木紫進行背景染色；染色完成之切片進行脫水，依照 70% 酒精、95% 酒精、100% 酒精、二甲苯 (2 次) 的順序，分別浸泡 2 分鐘，最後以封片膠進行封片。

2.7 數據分析

PDX 檢體 RNA 定序之實驗數據以 VolcanoseR 軟體[35]繪製相對基因表現量散佈圖，fold change 閾值設定為 $\log_2(\text{fold change}) \geq 1.5$ or ≤ -1.5 ，以 FDR $p\text{-value} \leq 0.01$ 為統計顯著；以 ShinyGO 軟體[36]進行過表徵分析(Over-Representation Analysis, ORA)並繪製基因集富集點圖，以 FDR $p\text{-value} \leq 0.05$ 為統計顯著。

第三章 實驗結果



3.1 *KMT2A*-r B-ALL 病人基因表現差異分析

3.1.1 病人資訊

本研究自臺大兒童醫院血液腫瘤科收集得共十八位 *KMT2A*-r 亞型之 B-ALL 病人之資料，病人基本資訊見於表一及附表一。該十八位病人皆有進行 RNA 定序之結果，惟其中三位病人與其他十五位病人之 RNA 定序並非同一批次實驗，故排除之。剩餘十五位病人中，七位病人於診斷時有中樞神經侵犯，八位病人則無，且該八位病人中有兩位病人無任何保存檢體，於後續病人腫瘤異體移植模型實驗亦被排除。統計後，男性病人共九位，其中六位於診斷時有中樞神經侵犯，女性病人則有四位，其中一位於診斷時有中樞神經侵犯；融合夥伴基因包含常見之 *AFF1*、*MLLT1*、*MLLT3* 以及 *MLLT10*，其中以 *AFF1* 最多(共六位，診斷時有中樞神經侵犯共三位)。

3.1.2 有中樞神經侵犯之病人未有基因路徑顯著調升

本研究首先對病人原有腫瘤細胞之 RNA 定序結果中進行分析，比較有中樞神經侵犯之病人相對於無中樞神經侵犯之病人的基因表現差異以及基因路徑富集。以 GSEA 進行分析後，有中樞神經侵犯之病人並未得出有基因路徑具顯著性的調升。本研究推論該結果源自於定序之檢體來源為骨髓及周邊血，而非中樞神經侵犯檢體，故未能呈現出中樞神經侵犯能力相關基因之顯著表現差異。為取得中樞神經侵犯檢體進行分析，本研究決定利用帶有重度免疫缺陷的 NSG 小鼠建立異體移植模型，令病人腫瘤細胞於小鼠中樞神經系統擴增以達到目的。

3.2 人類血癌細胞株前驅實驗

3.2.1 人類血癌細胞株異體移植模型之建立

本研究首先利用人類血癌細胞株 RS4;11 進行異體移植小鼠模型的建立(圖一 A)。

該細胞株帶有 t(4;11)(q21;q23) 染色體轉位，產生 *KMT2A::AFF1* 基因融合突變。本實驗將 5×10^6 的 RS4;11 經尾靜脈注射移植於週齡八至十二週的 NSG 小鼠，自移植後第三或四週開始每兩週進行臉頰採血，以流式細胞儀監測 RS4;11 在小鼠周邊血內生長的狀況。結果顯示 RS4;11 成功移植於 NSG 小鼠，經計算約於移植後四至六週間周邊血內 RS4;11 的占比可達 1% 以上，並且最快於移植後第六至八週可達占比 90% 以上(圖一 B、C)。

3.2.2 中樞神經侵犯可見於細胞株異體移植模型

為確認建立之模型可表現中樞神經侵犯，本研究將前述實驗移植 RS4;11 的小鼠於抵達人道實驗終點時犧牲，將小鼠含完整腦組織之頭部進行石蠟包埋，製作切片並進行組織免疫化學染色，以人類 CD19 作為特異性標的偵測移植之 RS4;11 於小鼠頭部分布。結果可見人類 CD19 陽性之細胞分布於顱骨骨髓腔以及蜘蛛網膜下腔，且分布於蜘蛛網膜下腔之細胞聚集於顱骨內側以及腦膜區(圖二)，顯示 RS4;11 具有中樞神經侵犯能力，並且可表現於異體移植模型。

3.3 病人腫瘤異體移植(PDX)模型

3.3.1 PDX 模型之建立

依據前述成功建立之異體移植模型，本研究採用相同的策略進行 PDX 模型的建立(圖三 A)。本實驗採用六位病人的腫瘤細胞(表二)，以尾靜脈注射移植於週齡八至十二週的 NSG 小鼠體內，並自移植後第二週開始每兩週進行臉頰採血，以人類 CD45 及人類 CD19 為特異性標的，使用流式細胞儀監測病人腫瘤細胞於小鼠周邊血內生長情形。該六位病人分別為三位診斷為有中樞神經侵犯(Pt#1、Pt#2、Pt#3)以及 3 位診斷為無中樞神經侵犯(Pt#11、Pt#12、Pt#13)。結果顯示多數病患腫瘤細胞成功移植於 NSG 小鼠；其中 Pt#1、Pt#2、Pt#11、Pt#12 等四位病患的 PDX 小鼠約於移植後第二至第四週之間周邊血可監測到 1% 以上的人類血癌細

胞，並且最快於移植後第六週、最慢則於移植後第十至十二週間於周邊血監測到90%以上的人類血癌細胞(圖三 B 至 E)，此時 PDX 小鼠亦接近人道實驗終點，顯示病人腫瘤細胞於小鼠體內生長快速。



然而，Pt#3 及 Pt#13 的血癌細胞於 PDX 小鼠體內生長速度則明顯慢於其餘四位病人(圖三 F)，由於六位病人所移植之細胞數接近($4 - 10 \times 10^6$ 顆細胞)，推論為該兩位病人之血癌細胞特性可能與其他四位病人相異。

3.3.2 病人之中樞神經侵犯表型可重現於 PDX 模型

由於 RS4;11 的異體移植模型可成功表現中樞神經侵犯，因此預期 PDX 模型亦可重現病人原有之診斷。本研究將六位病人之 PDX 小鼠於抵達人道實驗終點時犧牲，將小鼠含完整腦組織之頭部進行石蠟包埋，製作切片並進行組織免疫化學染色，以人類 CD19 作為特異性標的偵測病人之腫瘤細胞。

三位診斷為有中樞神經侵犯之病人(Pt#1、Pt#2、Pt#3)，其 PDX 小鼠的頭部切片成功觀察到人類 CD19 陽性細胞分布於蜘蛛網膜下腔內，並聚集於顱骨內側及腦膜附近，顯示病人之中樞神經侵犯表型成功重現，符合預期(圖四 A、B)。

然而，另外三位診斷為無中樞神經侵犯之病人(Pt#11、Pt#12、Pt#13)，Pt#11 的 PDX 小鼠亦觀察到疑似中樞神經侵犯的結果(圖四 C)，Pt#12 及 Pt#13 則未觀察到中樞神經侵犯(圖四 D)。於 Pt#11 的 PDX 小鼠頭部切片中，可觀察到少量人類 CD19 陽性細胞於小腦及大腦交界處之腦膜附近。對 Pt#11 的 PDX 小鼠腦組織以 Percoll 密度梯度離心進行人類血癌細胞分離，亦可成功分離出約 3×10^6 顆人類血癌細胞。



3.4 PDX 模型檢體 RNA 定序分析

六位病人之 PDX 模型中，有四位病人(Pt#1、Pt#2、Pt#3 及 Pt#11)之 PDX 小鼠經心臟灌流去除周邊血液後可從腦組織分離出人類血癌細胞，是為中樞神經侵犯檢體，並以同一隻 PDX 小鼠骨髓中人類血癌細胞為對照，進行 RNA 定序分析。

3.4.1 Pt#2 PDX 檢體 RNA 定序分析

Pt#2 共有兩隻 PDX 小鼠(Pt#2-6、Pt#2-9)之中樞神經侵犯檢體進行 RNA 定序分析，並各自以同一隻 PDX 小鼠之骨髓血癌細胞為對照。相對基因表現量散布圖如圖五 A 及圖五 B，以 Manhattan distance 計算出表現量調升前十的基因，可發現兩隻小鼠之數據相似(附圖一)。

根據過往文獻推論，整合素基因如 *ITGA6*、*ITGA9* 等與中樞神經侵犯有所關聯，故本研究對各整合素基因相對表現量進行分析(表三至六)。於 Pt#2-6 及 Pt#2-9 相對表現量散布圖如圖五 C 及圖五 D，可觀察到 *ITGB5* 於 Pt#2-9 之中樞神經侵犯細胞有顯著性調升，於 Pt#2-6 之中樞神經侵犯細胞則無；*ITGA2B* 則在兩隻小鼠的中樞神經侵犯細胞有顯著性調降；*ITGA6* 僅在 Pt#2-6 有調升，但並未超過 fold change 閾值[$\log_2(\text{fold change}) \geq 1.5$ or ≤ -1.5]，於 Pt#2-9 則是調降，但同樣並未超過 fold change 閾值(表四、表五)。

3.4.2 Pt#3 PDX 檢體 RNA 定序分析

Pt#3 共一隻 PDX 小鼠(Pt#3-5)之中樞神經侵犯檢體進行 RNA 定序分析，並以同一隻 PDX 小鼠之骨髓血癌細胞為對照。相對基因表現量散布圖如圖六 A。分析整合素基因相對表現量(圖五 F，表六)，觀察到 *ITGA7*、*ITGA9* 於中樞神經侵犯細胞有顯著性調升，以及 *ITGA6*、*ITGA2B* 有顯著性調降。於 Pt#2-9 觀察到之 *ITGB5*(圖六 B，表六)，在 Pt#3-5 雖有觀察到調升，但未超過 fold change 閾值。



3.4.3 Pt#11 PDX 檢體 RNA 定序分析

Pt#11 共一隻 PDX 小鼠(Pt#11-8)之中樞神經侵犯檢體進行 RNA 定序分析，並以同一隻 PDX 小鼠之骨髓血癌細胞為對照。相對基因表現量散布圖如圖七 A。分析整合素基因相對表現量(圖七 B，表七)，觀察到 *ITGA6* 於中樞神經侵犯細胞有顯著性調升，與 Pt#2 及 Pt#3 PDX 檢體相反；另有觀察到 *ITGA9* 有調升，但未超過 fold change 閾值，以及 *ITGA7* 呈現調降，同樣未超過閾值；*ITGA2B* 有顯著性調降，與 Pt#2 及 Pt#3 分析結果相同。

3.4.4 Pt#1 PDX 檢體 RNA 定序分析

Pt#1 共一隻 PDX 小鼠(Pt#1-11)之中樞神經侵犯檢體進行 RNA 定序分析，並以同一隻 PDX 小鼠之骨髓血癌細胞為對照。相對基因表現量散布圖如圖八 A。分析整合素基因相對表現量(圖八 B，表八)，觀察到 *ITGA6*、*ITGA7*、*ITGB5* 等於中樞神經侵犯細胞有顯著性調升；*ITGA2* 有顯著性調降，*ITGA2B* 雖有調降但未達統計顯著。

3.4.5 過表徵分析(Over-Representation Analysis, ORA)

本研究接著將上述分析中篩選於中樞神經侵犯細胞相對基因表現量在閾值以上 [$\log_2(\text{fold change}) \geq 1.5$] 並且呈統計顯著 ($\text{FDR } p\text{-value} \leq 0.01$) 之基因，以過表徵分析(ORA)的方式分析各 PDX 小鼠之中樞神經侵犯細胞產生富集(enrichment)的基因集。本研究以 KEGG 及 GO biological process 兩個資料庫進行分析，並以 $\text{FDR } p\text{-value} \leq 0.05$ 為統計顯著。

於五隻 PDX 小鼠的中樞神經侵犯細胞中，以 KEGG 資料庫均分析出有 ECM-receptor interaction、PI3K-Akt signaling pathway 等基因集產生富集(圖九至圖十三

之 A)；以 GO biological process 資料庫分析，Pt#2-6、Pt#3-5、Pt11-8 三隻 PDX 小鼠均分析出 Cell motility、Cell migration 等基因集有富集(圖九、圖十一、圖十二之 B)，而 Pt#3-5、Pt#11-8 及 Pt#1-11 亦分析出神經系統相關之基因集有富集(圖十一、圖十二、圖十三之 B)。



第四章 討論



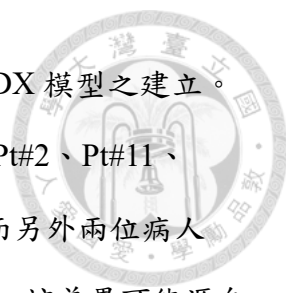
4.1 病人原有檢體之 RNA 定序分析

本研究首先對十五位 *KMT2A-r* B-ALL 病人原有檢體進行 RNA 定序分析，觀察有中樞神經侵犯之病人(共七位)與無中樞神經侵犯之病人(共八位)間是否有基因表現差異，並可能與中樞神經侵犯能力以及其發生相關。本研究以基因集富集分析(GSEA)的方式對 RNA 定序之數據進行分析，但結果並未於有中樞神經侵犯之病人發現任何基因集有顯著性的調升；此外亦根據過往文獻提出之假說[30-32]，對整合素、RANKL、化學趨化因子受體等基因之表現量進行分析，但仍未發現有基因於兩組病人間呈現表現差異。對此結果，本研究推斷原因與病人原有檢體來源有關；病人原有檢體來源為骨髓或周邊血，而非中樞神經侵犯檢體如腦脊髓液，與中樞神經侵犯相關之基因表現變化因此可能無法於非中樞神經侵犯檢體中呈現。由於未有病人之中樞神經侵犯檢體可以取得，故本研究轉以利用病人腫瘤異體移植(PDX)模型，產生中樞神經侵犯檢體以進行分析。

4.2 RS4;11 異體移植模型與 PDX 模型之建立

本研究自前述十五位病人中選取六位病人建立 PDX 模型，該六位病人中三位於診斷時有中樞神經侵犯，三位則無。PDX 模型使用 NSG™小鼠為載體，並且先以同樣為 *KMT2A-r* B-ALL 之人類血癌細胞株 RS4;11 進行前趨實驗，以確認該 PDX 模型可呈現出中樞神經侵犯之表型。

以 RS4;11 建立之異體移植模型結果為成功(圖一)，且得以自小鼠頭部切片觀察到 RS4;11 存在於蜘蛛網膜下腔區域，並聚集於腦膜附近，確認 RS4;11 可於小鼠體內表現出中樞神經侵犯表型(圖二)，而 RS4;11 具有中樞神經侵犯能力則與過往文獻符合[37]。



鑒於 RS4;11 異體移植模型建立成功，本研究以此為依據進行 PDX 模型之建立。實驗結果顯示 PDX 模型建立成功(表三)，其中四位病人(Pt#1、Pt#2、Pt#11、Pt#12)之血癌細胞於 PDX 小鼠體內皆生長快速(圖三 A 至 D)，而另外兩位病人(Pt#3、Pt#13)之血癌細胞生長速度則明顯慢於其他病人(圖三 E)。該差異可能源自於不同病人之間 PDX 小鼠移植細胞量不同，以及病人間細胞特性差異。針對移植細胞量不同之因素，不同病人之移植細胞量範圍在 $4 - 10 \times 10^6$ 之間，最高移植量僅為最低移植量的 2.5 倍，並且 Pt#3 及 Pt#13 之 PDX 小鼠皆移植 6×10^6 以上的細胞量，高於最低移植量，因此推斷此差異並不足以造成影響。該兩位病人之轉位突變皆為 *KMT2A::AFF1*，且與 Pt#2 與 Pt#12 相同，推測此差異與轉位突變之融合夥伴基因亦無關。就可取得之病人資訊，Pt#3 及 Pt#13 與其他四位病人之明顯差異為診斷時年齡，該兩位病人於診斷時年齡為十五至十六歲屬於青少年病人，相對於其他四位病人為一歲以下屬於嬰幼兒病人，該病人類群差異是否影響病人血癌細胞於 PDX 小鼠體內生長速度值得進一步探討，原十五位病人中排除兩位無任何檢體保存尚有七位病人之 PDX 模型待建立，未來將以該七位病人之 PDX 模型對該推論進行驗證。

4.3 無中樞神經侵犯病人之 PDX 模型呈現中樞神經侵犯表型

六位病人中，三位有中樞神經侵犯之病人(Pt#1、Pt#2、Pt#3)其 PDX 小鼠皆觀察到中樞神經侵犯表型(圖四 A、B)，三位無中樞神經侵犯之病人(Pt#11、Pt#12、Pt#13)則有一位病人(Pt#11)的 PDX 小鼠出現中樞神經侵犯(圖四 C)，經頭部切片與腦組織分離血癌細胞確認。過往文獻曾提出中樞神經侵犯為 B-ALL 細胞普遍具有之能力[38]，而 Pt#11 原有中樞神經侵犯表型與其 PDX 小鼠不一致，可能為其中樞神經侵犯表型尚未於病人本身表現；此外，小鼠體內的環境與人類亦有差異，該差異是否可能導致其中樞神經侵犯表型變化需要進一步探討。



4.4 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞之 RNA 定序分析

自 PDX 小鼠取得中樞神經侵犯檢體後，本研究接著對其進行 RNA 定序分析，並以各自同一隻 PDX 小鼠之骨髓血癌細胞為對照。經過分析，在不同病人的 PDX 小鼠為不同整合素基因於中樞神經侵犯細胞有所調升(表九)；於 Pt#1 主要為 *ITGA6*、*ITGA7*、*ITGB5*，於 Pt#2 為 *ITGB5*，於 Pt#3 則為 *ITGA7* 及 *ITGA9*，而在 Pt#11 則是 *ITGA6*；另外，亦發現 *ITGA2B* 在 Pt#2、Pt#3、Pt#11 的 PDX 中樞神經侵犯細胞皆為調降，於 Pt#1 雖有調降但未達統計顯著，該基因表現調降與中樞神經侵犯之關聯性需進一步探討。

於 2020 年 Shah Scharff BFS 團隊發表之研究認為 *ITGA9* 的表現量上升與 B-ALL 於中樞神經系統定殖有關[31]，而 Pt#3 的 PDX 中樞神經侵犯細胞 *ITGA9* 表現量調升與之符合。而 2018 年 Yao Hisayuki 團隊則是提出 B-ALL 細胞藉由 integrin $\alpha 6$ 與血管外壁之 laminin 結合，並由顱骨骨髓腔沿導血管(emissary vessels)爬行至蜘蛛網膜下腔內[30]，其中 integrin $\alpha 6$ 由 *ITGA6* 表達；我們雖然於 Pt#1 及 Pt#11 分析出 *ITGA6* 有調升，於 Pt#2 及 Pt#3 卻未分析出相同的結果。是否四位病人之中樞神經侵犯並非利用相同機制以及侵犯路徑有待探討。需注意的是，Yao Hisayuki 團隊的研究中使用 ALL 病人之血癌細胞以及 RCH、Nalm-6 等 B-ALL 細胞株，但並未有 *KMT2A-r* 亞型。

另外，2021 年 Sujeetha A. Rajakumar 團隊則提出 B-ALL 利用 RANK-RANKL 交互作用活化蝕骨細胞，藉由蝕骨作用使顱骨產生進入蜘蛛網膜下腔的通道[32]；RANKL 由 *TNFSF11* 基因表達，於 Pt#11 PDX 中樞神經細胞其表現量調升接近 fold change 閾值[$\log_2(\text{fold change}) = 1.474725312$]，並且有達統計顯著($p = 4.67 \times 10^{-7}$)(圖十四，表十)，於 Pt#1、Pt#2 及 Pt#3 則為調降或未調升，且並未達到統計顯著。Pt#11 之血癌細胞於 PDX 小鼠是否採用多種機制侵犯中樞神經系統需要進一步

步探討。



本研究接著以過表徵分析(ORA)的方式分析 PDX 中樞神經侵犯細胞的基因集富集，以 KEGG 資料庫皆分析出三位病人之 PDX 中樞神經侵犯細胞有 ECM receptor interaction、PI3K-Akt signaling pathway 等基因集富集，前者包含基因有 *ITGA7*、*ITGA9*、*ITGB5*，而後者包含基因有 *ITGA6*、*ITGA7* 等。以 GO biological process 資料庫則分析出與細胞運動(motility)、遷徙(migration)、定位(localization)等相關的基因集在四位病人皆有富集，以及在 Pt#1、Pt#3 和 Pt#11 分析出神經系統發展(nervous system development)的基因集有富集。綜上所述，未來將針對這些基因集中的基因與中樞神經侵犯的關聯性做進一步的探討。

第五章 結論與展望



本研究就 *KMT2A-r* B-ALL 病人原有之骨髓或周邊血檢體進行 RNA 定序分析，未發現有中樞神經侵犯病人相對無中樞神經侵犯病人有基因集顯著富集，亦未發現過往文獻提及整合素、RANKL、化學趨化因子受體等基因有表現差異。本研究推論病人原有檢體非中樞神經侵犯檢體而未能呈現相關基因表現變化，故進行 PDX 模型建立以取得中樞神經侵犯檢體。RS4;11 細胞株前驅實驗以及 PDX 實驗結果皆表明人類血癌細胞可成功移植於 NSG™ 小鼠，並且多數病人之血癌細胞於小鼠體內生長快速。於 PDX 模型中，病人原本之中樞神經侵犯表型可成功表現，惟一無中樞神經侵犯之病人其 PDX 小鼠出現中樞神經侵犯。自 PDX 小鼠腦組織分離血癌細胞進行 RNA 定序分析，以 PDX 小鼠之骨髓血癌細胞為對照發現整合素基因 *ITGA6*、*ITGA7*、*ITGA9*、*ITGB5* 等有表現量調升，於不同病人調升之基因不同，另外也發現 *ITGA2B* 基因在分析之 PDX 小鼠皆表現量調降。過表徵分析(ORA)發現 PDX 中樞神經侵犯細胞皆分析出 ECM receptor interaction、PI3K-Akt signaling pathway、細胞運動、遷徙、定位等相關基因集以及神經系統發展相關基因集富集。在 ECM receptor interaction 中包含 *ITGA7*、*ITGA9*、*ITGB5*，而在 PI3K-Akt signaling pathway 中則包含 *ITGA6*。綜上所述，本論文成功建立 PDX 模型並藉以發現與 *KMT2A-r* B-ALL 中樞神經侵犯相關之可能基因路徑。

未來研究將針對整合素基因以及過往文獻提及如 RANKL 等進一步探討不同病人間中樞神經侵犯機制的差異，亦將自基因集富集分析之結果中尋找潛在的標的，並期望解明 *KMT2A-r* 亞型 B-ALL 之中樞神經侵犯機制，以及是否於同一亞型中存在多種機制。

參考文獻

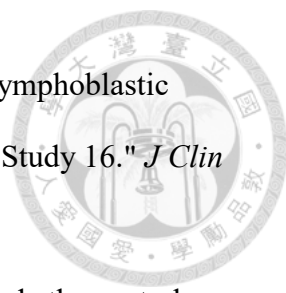


1. Inaba, H., M. Greaves, and C.G. Mullighan. "Acute lymphoblastic leukaemia." *Lancet* 381.9881 (2013): 1943-1955.
2. 財團法人中華民國癌症基金會. 財團法人中華民國兒童癌症基金會 2022 年度報告. 財團法人中華民國兒童基金會, 2023. Print.
3. Inaba, H. and C.G. Mullighan. "Pediatric acute lymphoblastic leukemia." *Haematologica* 105.11 (2020): 2524-2539.
4. "Treatment of Children with Acute Lymphocytic Leukemia (ALL)." American Cancer Society June 24 2024. Web. June 24 2024.
5. Biondi, A., et al. "Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study." *Lancet Oncol* 13.9 (2012): 936-945.
6. Pagliaro, L., et al. "Acute lymphoblastic leukaemia." *Nature Reviews Disease Primers* 10.1 (2024): 41.
7. Ganguly, S., et al. "Philadelphia Chromosome Positive and Philadelphia-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents: Current Management, Controversies and Emerging Concepts." *Indian J Pediatr* 91.1 (2024): 37-46.
8. Conter, V., et al. "Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study." *Blood* 115.16 (2010): 3206-3214.
9. Bain, B.J. and L. Estcourt, *FAB Classification of Leukemia*, in *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, S. Maloy and K. Hughes, Editors.

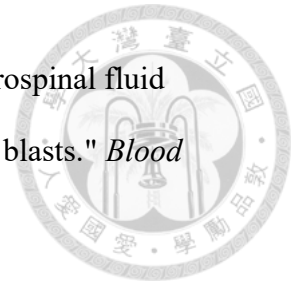


- 2013, Academic Press: San Diego. p. 5-7.
10. Alaggio, R., et al. "The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms." *Leukemia* 36.7 (2022): 1720-1748.
 11. Brady, S.W., et al. "The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia." *Nat Genet* 54.9 (2022): 1376-1389.
 12. *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020)*. 2020, S.Karger AG.
 13. Haas, O.A. and A. Borkhardt. "Hyperdiploidy: the longest known, most prevalent, and most enigmatic form of acute lymphoblastic leukemia in children." *Leukemia* 36.12 (2022): 2769-2783.
 14. Kuo, W.-H., et al. "Outcome of acute leukemia patients with central nervous system (CNS) involvement treated with total body or CNS irradiation before transplantation." *Therapeutic Radiology and Oncology* 2 (2018).
 15. Wu, S.Y., et al. "Central Nervous System Prophylaxis and Treatment in Acute Leukemias." *Current Treatment Options in Oncology* 23.12 (2022): 1829-1844.
 16. Suryaprakash, S. and H. Inaba. "Acute Lymphoblastic Leukemia with Central Nervous System Involvement-Challenges in Management." *Indian J Pediatr* 91.1 (2024): 59-66.
 17. Winick, N., et al. "Impact of Initial CSF Findings on Outcome Among Patients With National Cancer Institute Standard- and High-Risk B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group." *Journal of Clinical Oncology* 35.22 (2017): 2527-2534.
 18. Perruso, L.L., et al. "Patterns and prognostic impact of CNS infiltration in adults with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia." *Ann Hematol* 103.6

- (2024): 2033-2039.
19. Pui, C.H. and S.C. Howard. "Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia." *Lancet Oncol* 9.3 (2008): 257-268.
20. Liu, S. and Y. Wang. "Diagnosis and management of adult central nervous system leukemia." *Blood Sci* 5.3 (2023): 141-149.
21. Frishman-Levy, L. and S. Izraeli. "Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy." *Br J Haematol* 176.2 (2017): 157-167.
22. Sanchez, R., et al. "Clinical characteristics of patients with central nervous system relapse in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia: the importance of characterizing ABL1 mutations in cerebrospinal fluid." *Ann Hematol* 96.7 (2017): 1069-1075.
23. Alsadeq, A. and D.M. Schewe. "Acute lymphoblastic leukemia of the central nervous system: on the role of PBX1." *Haematologica* 102.4 (2017): 611-613.
24. Jeha, S., et al. "Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1." *Leukemia* 23.8 (2009): 1406-1409.
25. Gentile, G., et al. "Development of combination therapies with BTK inhibitors and dasatinib to treat CNS-infiltrating E2A-PBX1+/preBCR+ ALL." *Blood Adv* 8.11 (2024): 2846-2860.
26. Winters, A.C. and K.M. Bernt. "MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches." *Front Pediatr* 5 (2017): 4.
27. Górecki, M., et al. "Updates in KMT2A Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia." *Biomedicines* 11.3 (2023): 821.
28. Meyer, C., et al. "The KMT2A recombinome of acute leukemias in 2023." *Leukemia* 37.5 (2023): 988-1005.

- 
29. Jeha, S., et al. "Improved CNS Control of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Cranial Irradiation: St Jude Total Therapy Study 16." *J Clin Oncol* 37.35 (2019): 3377-3391.
 30. Yao, H., et al. "Leukaemia hijacks a neural mechanism to invade the central nervous system." *Nature* 560.7716 (2018): 55-60.
 31. Shah Scharff, B.F.S., et al. "A comprehensive clinical study of integrins in acute lymphoblastic leukemia indicates a role of $\alpha 6$ /CD49f in persistent minimal residual disease and $\alpha 5$ in the colonization of cerebrospinal fluid." *Leuk Lymphoma* 61.7 (2020): 1714-1718.
 32. Rajakumar, S.A., et al. "Targeted blockade of immune mechanisms inhibit B precursor acute lymphoblastic leukemia cell invasion of the central nervous system." *Cell Reports Medicine* 2.12 (2021): 100470.
 33. Gebing, P., et al. "A brain organoid/ALL co-culture model reveals the AP-1 pathway as critically associated with CNS involvement of BCP-ALL." *Blood Adv* (2024).
 34. Stong, R.C., et al. "Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics." *Blood* 65.1 (1985): 21-31.
 35. Goedhart, J. and M.S. Luijsterburg. "VolcanoNoseR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots." *Sci Rep* 10.1 (2020): 20560.
 36. Ge, S.X., D. Jung, and R. Yao. "ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants." *Bioinformatics* 36.8 (2019): 2628-2629.
 37. Fernández-Sevilla, L.M., et al. "Acute lymphoblastic leukemia cells are able to infiltrate the brain subventricular zone stem cell niche and impair neurogenesis." *Haematologica* 107.4 (2022): 1004-1007.

38. Williams, M.T.S., et al. "The ability to cross the blood–cerebrospinal fluid barrier is a generic property of acute lymphoblastic leukemia blasts." *Blood* 127.16 (2016): 1998-2006.



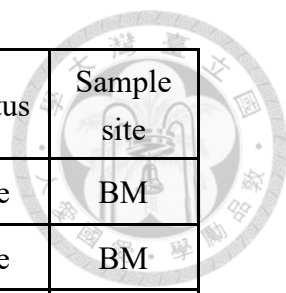
表



	CNS(+) (n=7)	CNS(-) (n=6)
Diagnosed age (year)	0.07 – 15.52 (median = 5.67)	0.25 – 16.4 (median = 0.53)
Gender		
Male	6	3
Female	1	3
Fusion partner		
<i>AFF1</i>	3	3
<i>MLLT1</i>	2	0
<i>MLLT3</i>	1	2
<i>MLLT10</i>	1	1
WBC count (k/ μ L)	11.4 – 581.6	125 – 654.21 (1 N/A)

表一、病人基本資訊

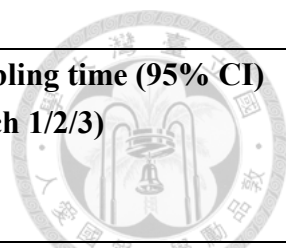
自臺大兒童醫院血液腫瘤科取得十八位 *KMT2A-r B-ALL* 病人資訊，其中三位因 RNA 定序數據來自不同批次實驗而排除，又兩位病人無任何檢體保存於後續 PDX 模型實驗排除，剩餘共十三位病人。CNS(+)，診斷時有中樞神經侵犯；CNS(-)，診斷時無中樞神經侵犯；WBC count，白血球數。



Exp Pt ID(#)	Gender	Diagnosed age (year)	Fusion	CNS status	Sample site
1	M	0.41	<i>KMT2A::MLLT1</i>	Positive	BM
2	M	0.07	<i>KMT2A::AFF1</i>	Positive	BM
3	M	15.52	<i>KMT2A::AFF1</i>	Positive	BM
11	F	0.52	<i>KMT2A::MLLT10</i>	Negative	BM
12	M	0.25	<i>KMT2A::AFF1</i>	Negative	PB
13	F	16.04	<i>KMT2A::AFF1</i>	Negative	BM

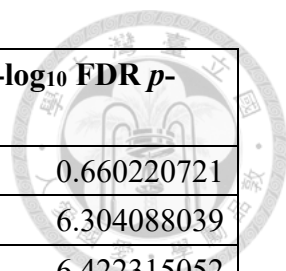
表二、PDX 模型實驗病人資訊

本研究挑選六位 KMT2A-r B-ALL 病人進行 PDX 模型之建立。CNS status，診斷時之中樞神經侵犯表型。BM，骨髓。PB，周邊血。



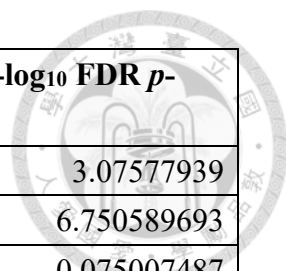
Pt ID	Age at diagnosis	PDX mouse amount	Pt CNS status	PDX mouse CNS status	Doubling time (95% CI) (batch 1/2/3)
1	0.41	13	positive	positive	6.454 (4.558 - 11.5) 15.71 (8.997 - 61.94) 15.24 (9.563 - 37.46)
2	0.07	13	positive	positive	6.540 (5.659 - 7.746) 16.21 (9.141 - 71.41) 28.17 (17.50 - 72.14)
3	15.52	5	positive	positive	63.31 (37.13 - 214.8)
11	0.52	8	negative	positive	11.55 (8.516 - 17.93) 31.92 (16.33 - 707.3)
12	0.25	8	negative	negative	17.40 (12.52 - 28.48) 14.70 (11.27 - 21.15)
13	16.04	5	negative	negative	59.96 (44.57 - 91.56)
RS4;11 (batch 1&2)	34[34]	10	positive[37]	positive	12.65 (8.064 - 29.36) 13.93 (6.695 - ∞)

表三、病人 PDX 模型資訊整理



Name	Change	Fold change (log2)	Significance (-log ₁₀ FDR <i>p</i> -value)
<i>ITGB8</i>	Unchanged	1.494733404	0.660220721
<i>ITGA9</i>	Unchanged	1.054593753	6.304088039
<i>ITGB4</i>	Unchanged	1.031809283	6.422315052
<i>ITGA6</i>	Unchanged	0.885379995	11.1869294
<i>ITGAE</i>	Unchanged	0.685737093	6.497248125
<i>ITGB2</i>	Unchanged	0.617791932	7.08004333
<i>ITGB5</i>	Unchanged	0.605693047	1.08985145
<i>ITGAM</i>	Unchanged	0.53715906	5.26525984
<i>ITGA11</i>	Unchanged	0.380811725	0.625670602
<i>ITGA10</i>	Unchanged	0.346612659	0.447991998
<i>ITGA2</i>	Unchanged	0.22372397	0.380114697
<i>ITGB1</i>	Unchanged	0.11651481	0.490181372
<i>ITGA7</i>	Unchanged	0.019017691	0.055125011
<i>ITGA5</i>	Unchanged	-0.078169269	0.291580533
<i>ITGAL</i>	Unchanged	-0.13063693	0.5518191
<i>ITGA4</i>	Unchanged	-0.198356891	1.063296713
<i>ITGAX</i>	Unchanged	-0.375151849	2.579267384
<i>ITGA1</i>	Unchanged	-0.613723452	0.834942722
<i>ITGB7</i>	Unchanged	-0.867187321	9.550564007
<i>ITGA3</i>	Unchanged	-1.187043786	0.530310142
<i>ITGB3</i>	Unchanged	-1.275767967	2.220234246
<i>ITGAV</i>	Decreased	-1.631601495	5.115621965
<i>ITGAD</i>	Decreased	-2.157462127	3.581106149
<i>ITGA8</i>	Unchanged	-4.137719835	0.485419972
<i>ITGA2B</i>	Decreased	-4.969218048	8.609527398

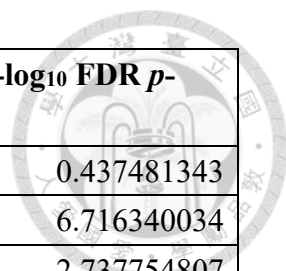
表四、整合素基因於 Pt#2-6 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量



Name	Change	Fold change (log2)	Significance (-log ₁₀ FDR <i>p</i> -value)
<i>ITGB5</i>	Increased	1.5130743	3.07577939
<i>ITGAE</i>	Unchanged	0.802342813	6.750589693
<i>ITGA10</i>	Unchanged	0.798686731	0.075007487
<i>ITGAL</i>	Unchanged	0.550576631	3.317378052
<i>ITGB2</i>	Unchanged	0.385847906	1.977964901
<i>ITGB4</i>	Unchanged	0.342810339	0.384944468
<i>ITGB1</i>	Unchanged	0.289579401	0.977354593
<i>ITGAM</i>	Unchanged	0.245649417	0.662304023
<i>ITGA9</i>	Unchanged	0.160013427	0.12315013
<i>ITGAV</i>	Unchanged	0.12048776	0.032546305
<i>ITGA4</i>	Unchanged	0.085765712	0.129481424
<i>ITGB6</i>	Unchanged	0.074103834	N/A
<i>ITGA5</i>	Unchanged	-0.0242511	0.018060459
<i>ITGB8</i>	Unchanged	-0.106193796	0.002137708
<i>ITGA3</i>	Unchanged	-0.117698957	0.00258375
<i>ITGAX</i>	Unchanged	-0.122925408	0.141476801
<i>ITGB7</i>	Unchanged	-0.309842143	0.766632842
<i>ITGA7</i>	Unchanged	-0.468940531	1.864960737
<i>ITGA2</i>	Unchanged	-0.778375195	0.588694867
<i>ITGA6</i>	Unchanged	-0.877686839	5.249691886
<i>ITGA11</i>	Unchanged	-0.959586112	0.639683234
<i>ITGA8</i>	Unchanged	-1.074001401	N/A
<i>ITGA1</i>	Unchanged	-1.113957526	0.469910505
<i>ITGB3</i>	Unchanged	-1.319397335	0.956537685
<i>ITGAD</i>	Unchanged	-1.686291611	0.863045931
<i>ITGA2B</i>	Decreased	-5.206776182	7.64028323

表五、整合素基因於 Pt#2-9 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量

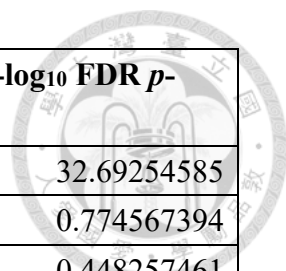
N/A，無法計算。



Name	Change	Fold change (log2)	Significance (-log ₁₀ FDR <i>p</i> -value)
<i>ITGA3</i>	Unchanged	5.296577673	0.437481343
<i>ITGA9</i>	Increased	3.284947458	6.716340034
<i>ITGA7</i>	Increased	2.32020689	2.737754807
<i>ITGB8</i>	Unchanged	0.611676859	4.750640734
<i>ITGA4</i>	Unchanged	0.490629777	3.862925688
<i>ITGA11</i>	Unchanged	0.314165943	0.181392599
<i>ITGB4</i>	Unchanged	0.067788188	0.024938841
<i>ITGB5</i>	Unchanged	0.049803282	0.039909649
<i>ITGA5</i>	Unchanged	-0.031344161	0.051939533
<i>ITGA10</i>	Unchanged	-0.238876542	0.150896435
<i>ITGAE</i>	Unchanged	-0.666720849	3.802574235
<i>ITGB1</i>	Unchanged	-0.887809074	11.40748767
<i>ITGAL</i>	Unchanged	-1.122371953	17.00663893
<i>ITGB7</i>	Unchanged	-1.438746515	8.755093757
<i>ITGAX</i>	Unchanged	-1.504369877	1.449531739
<i>ITGAV</i>	Decreased	-1.603554381	11.91075971
<i>ITGB2</i>	Decreased	-1.816327044	34.39808311
<i>ITGB3</i>	Decreased	-1.824986422	2.158346266
<i>ITGA2</i>	Decreased	-2.37351003	12.06020825
<i>ITGAD</i>	Decreased	-3.219770277	3.861565372
<i>ITGA8</i>	Unchanged	-3.304435599	N/A
<i>ITGB6</i>	Unchanged	-3.304435599	N/A
<i>ITGA6</i>	Decreased	-3.368320434	6.19259898
<i>ITGAM</i>	Decreased	-3.777279174	27.56824099
<i>ITGA2B</i>	Decreased	-4.083859706	12.27275858
<i>ITGA1</i>	Unchanged	-6.174094355	0.542071738

表六、整合素基因於 Pt#3-5 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量

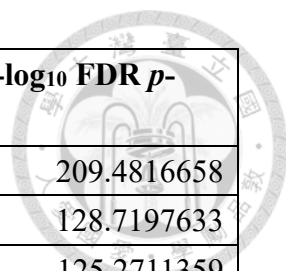
N/A，無法計算。



Name	Change	Fold change (log2)	Significance (-log ₁₀ FDR <i>p</i> -value)
<i>ITGA6</i>	Increased	4.577172123	32.69254585
<i>ITGB8</i>	Unchanged	2.008148642	0.774567394
<i>ITGA3</i>	Unchanged	1.954503131	0.448257461
<i>ITGAV</i>	Unchanged	1.375289574	1.136345112
<i>ITGA9</i>	Unchanged	1.189683166	12.32263406
<i>ITGB3</i>	Unchanged	1.05373008	0.622684736
<i>ITGA10</i>	Unchanged	0.691950115	1.175430615
<i>ITGA4</i>	Unchanged	0.618632141	5.971415949
<i>ITGAM</i>	Unchanged	0.471074095	3.250404436
<i>ITGAD</i>	Unchanged	0.352822067	0.214780825
<i>ITGA5</i>	Unchanged	0.290316168	1.296931632
<i>ITGB1</i>	Unchanged	0.27764583	1.22185077
<i>ITGB5</i>	Unchanged	-0.025250855	0.036457946
<i>ITGA1</i>	Unchanged	-0.025854864	0.000915959
<i>ITGB7</i>	Unchanged	-0.124463761	0.340829502
<i>ITGAE</i>	Unchanged	-0.125906607	0.247416251
<i>ITGAL</i>	Unchanged	-0.151510015	0.470166018
<i>ITGAX</i>	Unchanged	-0.268830647	1.189158998
<i>ITGA11</i>	Unchanged	-0.310627825	0.129888591
<i>ITGB4</i>	Unchanged	-0.319679834	0.158197125
<i>ITGB2</i>	Unchanged	-0.45990944	3.212475074
<i>ITGA8</i>	Unchanged	-0.761082032	1.347039916
<i>ITGA7</i>	Unchanged	-1.322677212	21.22736383
<i>ITGA2B</i>	Decreased	-2.290466363	2.192038176
<i>ITGA2</i>	Unchanged	-5.603789914	0.424922793

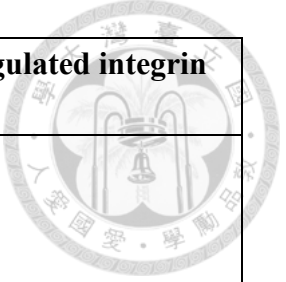
表七、整合素基因於 Pt#11-8 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量

N/A，無法計算。



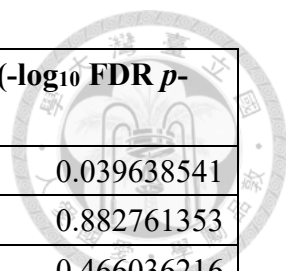
Name	Change	Fold change (log2)	Significance (-log ₁₀ FDR <i>p</i> -value)
<i>ITGB5</i>	Increased	7.182508417	209.4816658
<i>ITGA6</i>	Increased	3.536914172	128.7197633
<i>ITGAM</i>	Increased	3.480344415	125.2711359
<i>ITGA7</i>	Increased	4.888445348	74.0562227
<i>ITGAV</i>	Increased	4.436920215	42.48916767
<i>ITGB2</i>	Increased	1.562420842	37.10343504
<i>ITGAD</i>	Increased	4.547209006	36.90196875
<i>ITGAX</i>	Increased	2.890752878	36.03824265
<i>ITGB4</i>	Increased	2.916327273	16.9841538
<i>ITGA10</i>	Unchanged	1.499301276	11.40779736
<i>ITGA3</i>	Increased	8.533156131	9.916536674
<i>ITGA9</i>	Unchanged	-0.701249766	7.650626699
<i>ITGA11</i>	Increased	1.777293616	6.757405617
<i>ITGB8</i>	Increased	6.447630698	5.681515286
<i>ITGAL</i>	Unchanged	-0.41799798	2.953713705
<i>ITGA5</i>	Unchanged	-0.410867656	2.898552585
<i>ITGA1</i>	Increased	3.923236109	2.140306085
<i>ITGA2</i>	Decreased	-1.705613791	2.086955545
<i>ITGAE</i>	Unchanged	-0.3058478	1.489688727
<i>ITGA2B</i>	Unchanged	-0.500659215	1.413477585
<i>ITGB3</i>	Unchanged	0.536022572	0.722645807
<i>ITGB7</i>	Unchanged	-0.182830162	0.591979944
<i>ITGA8</i>	Unchanged	-0.196024471	0.501648011
<i>ITGB1</i>	Unchanged	0.121140433	0.389864475
<i>ITGA4</i>	Unchanged	-0.092795195	0.270542148
<i>ITGB6</i>	Unchanged	-2.179034451	0.232264453

表八、整合素基因於 Pt#1-11 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量



Pt ID	PDX mouse ID	Sample type	Upregulated integrin genes	Downregulated integrin genes
1	Pt#1-11	Brain vs BM	<i>ITGA1, ITGA3, ITGA6, ITGA7, ITGA11, ITGAD, ITGAM, ITGAV, ITGAX, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, ITGB8</i>	<i>ITGA2</i>
2	Pt#2-6	Brain vs BM	None	<i>ITGA2B, ITGAV, ITGAD</i>
	Pt#2-9	Brain vs BM	<i>ITGB5</i>	<i>ITGA2B</i>
3	Pt#3-5	Brain vs BM	<i>ITGA7, ITGA9</i>	<i>ITGA2, ITGA6, ITGA2B, ITGAV, ITGAD, ITGAM, ITGB2, ITGB3</i>
11	Pt#11-8	Brain vs BM	<i>ITGA6</i>	<i>ITGA2B</i>

表九、整合素基因於各 PDX 小鼠調升及調降統計



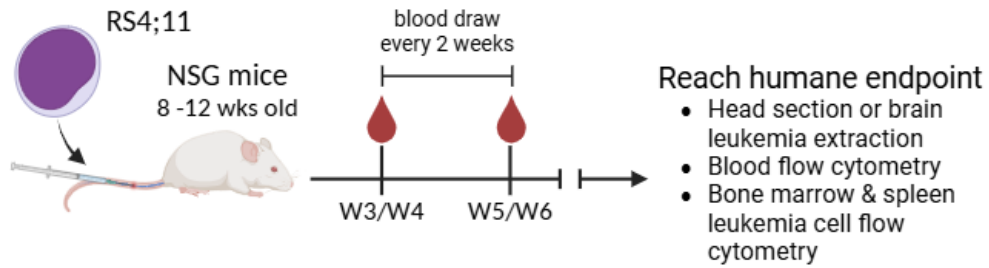
Mouse number	Change	Fold change (log2)	Significance (-log ₁₀ FDR <i>p</i> -value)
Pt#1-11	Unchanged	-0.192296609	0.039638541
Pt#2-6	Unchanged	-1.393025185	0.882761353
Pt#2-9	Unchanged	-1.862215886	0.466036216
Pt#3-5	Unchanged	0.995367185	N/A
Pt#11-8	Unchanged	1.474725312	6.330618141

表十、RANKL(基因名 *TNFSF11*)於 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量

N/A，無法計算。

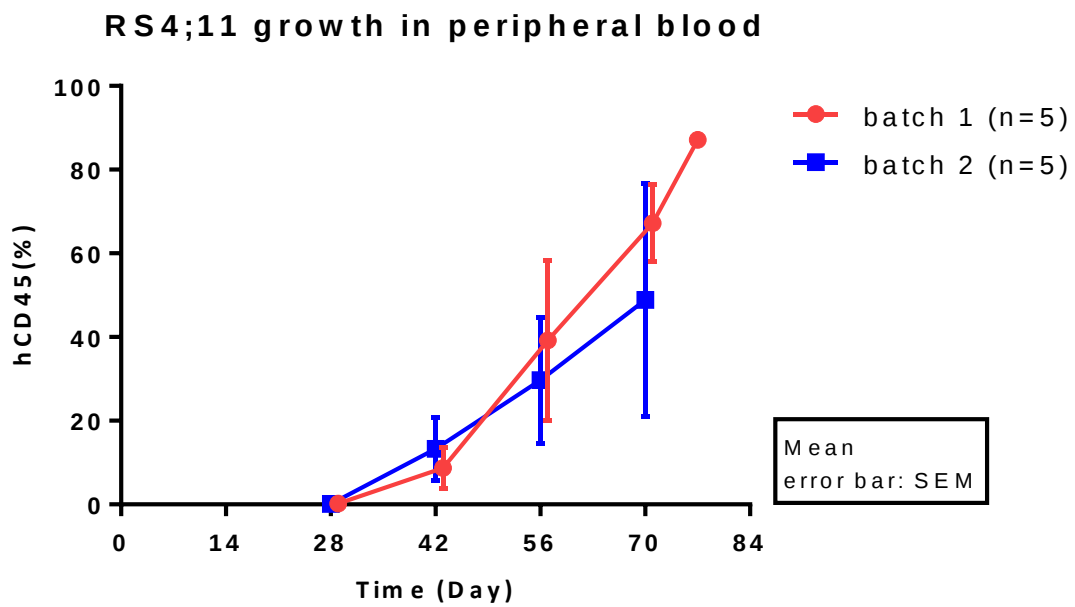


(A)

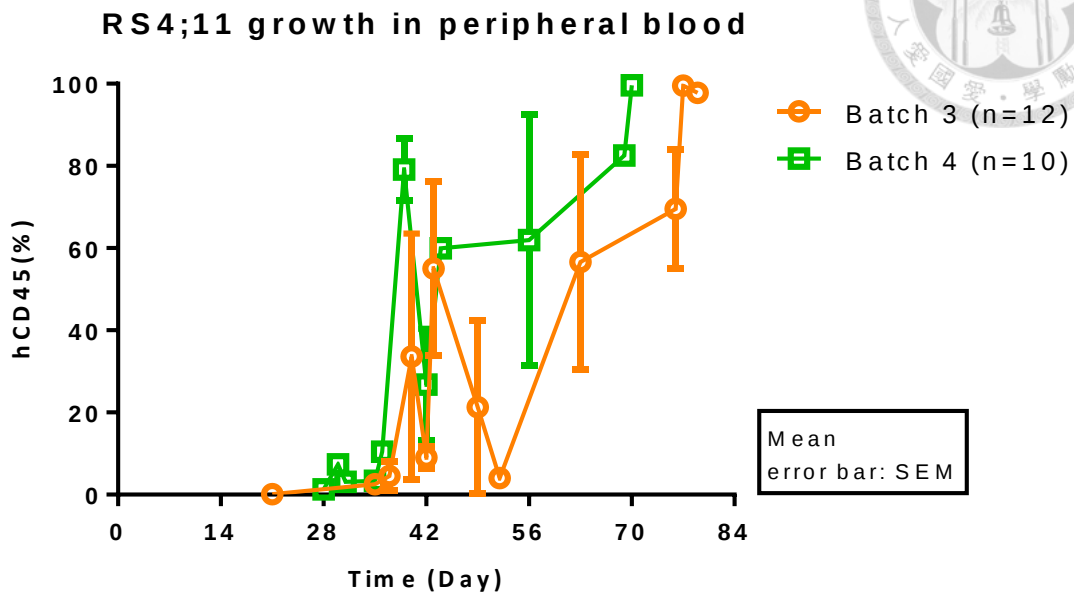


Created in BioRender.com

(B)



(C)



圖一、人類癌細胞株 RS4;11 前驅實驗

(A)RS4;11 異體移植模型實驗策略圖。該實驗共進行四個批次，人類癌細胞株 RS4;11 以 5×10^6 顆細胞量自尾靜脈注射於週齡八至十二週的 NSG 小鼠體內，第一、第二、第三個實驗批次自第四週開始每兩週進行臉頰採血以流式細胞儀監測血癌細胞成長狀況，第四個實驗批次則自第三週開始。小鼠抵達人道實驗終點時，犧牲並取得以下檢體：含完整腦組織之頭部製作石蠟包埋切片；無製作石蠟包埋切片之腦組織以 Percoll 密度梯度離心分離人類血癌細胞；自周邊血、骨髓、脾臟萃取之細胞以流式細胞儀分析人類血癌細胞占比。

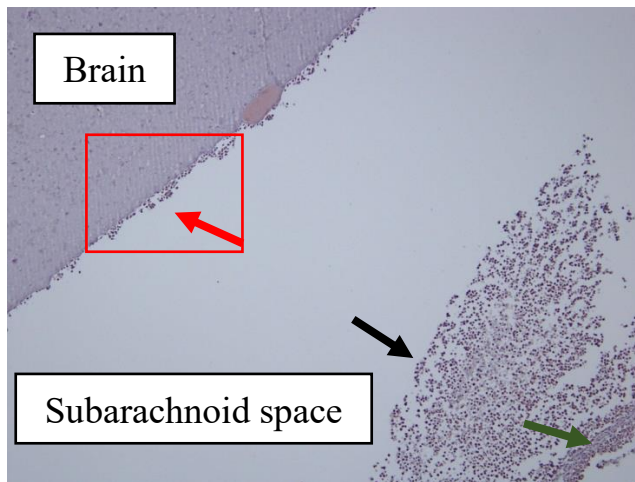
(B)第一及第二批次實驗 RS4;11 於周邊血內生長之曲線圖，RS4;11 於第四及第六週間占比可達 1% 以上，最快於第八週即可占比達 90% 以上。第一批次實驗(紅色曲線)共五隻小鼠，第二批次實驗(藍色曲線)共五隻小鼠。

(C)第三及第四批次實驗 RS4;11 於周邊血內生長之曲線圖，RS4;11 於第四週占比可達 1% 以上，最快於第六週即可占比達 90% 以上。第三批次實驗(橘色曲線)共十二隻小鼠，第四批次實驗(綠色曲線)共十隻小鼠

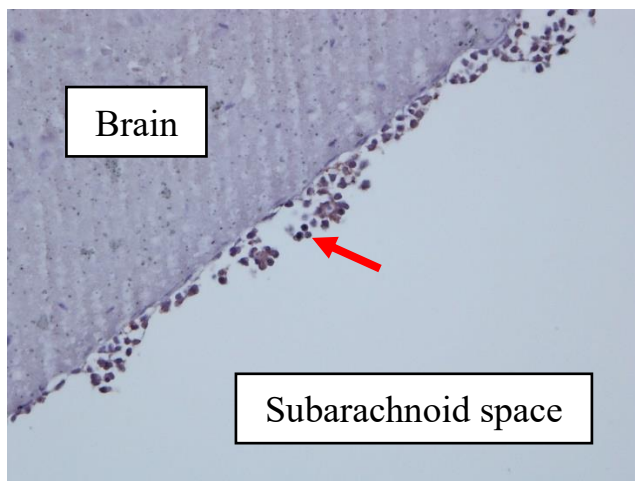
(B)、(C)圖中每一點為平均值，error bar 為 SEM



(A)



(B)



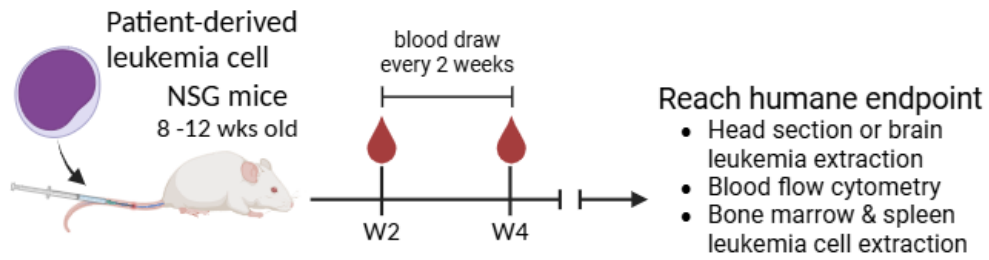
圖二、RS4;11 異體移植小鼠之頭部切片

移植 RS4;11 之 NSG 小鼠於人道實驗終點時犧牲，含完整腦組織之頭部製作石蠟包埋切片，並進行組織免疫化學染色，以人類 CD19 為特異性標的偵測 RS4;11。

(A)人類 CD19 陽性細胞分布於蜘蛛網膜下腔，並聚集於腦膜附近(紅色箭頭指向處)、顱骨內側(黑色箭頭指向處)，以及顱骨骨髓腔(綠色箭頭指向處)。放大倍率為 100 倍。

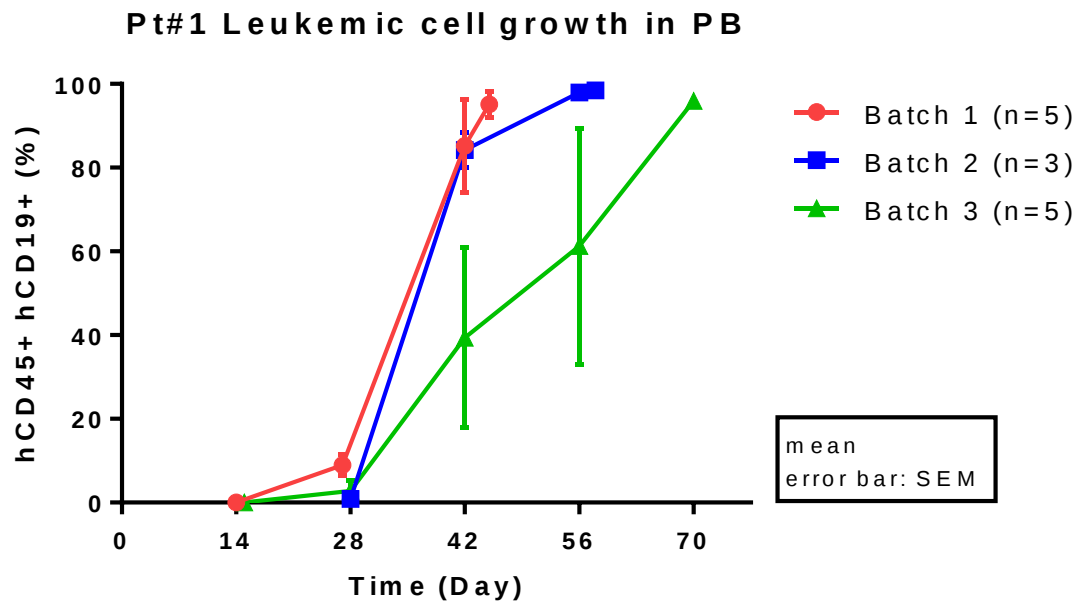
(B)圖二 A 紅色框內部分放大。人類 CD19 陽性細胞聚集於腦膜附近(紅色箭頭指向處)。放大倍率為 400 倍。

(A)

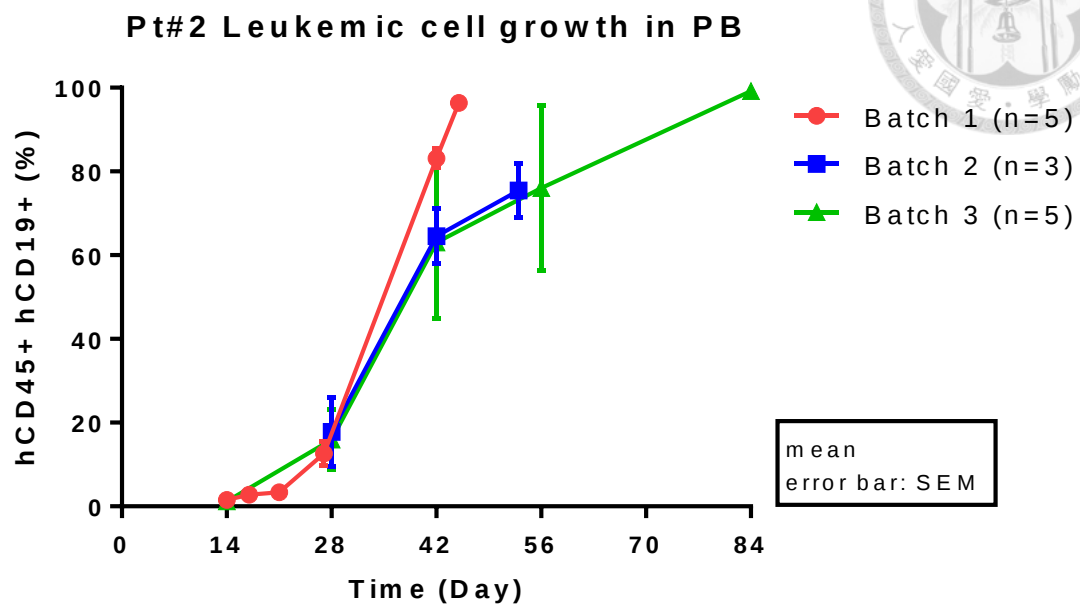


Created in BioRender.com

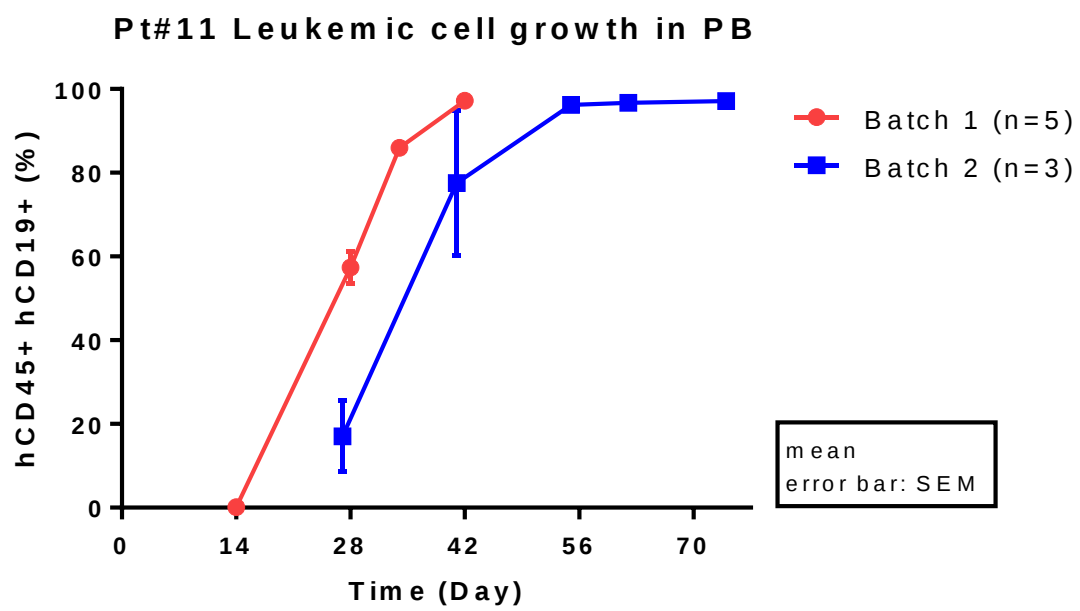
(B)



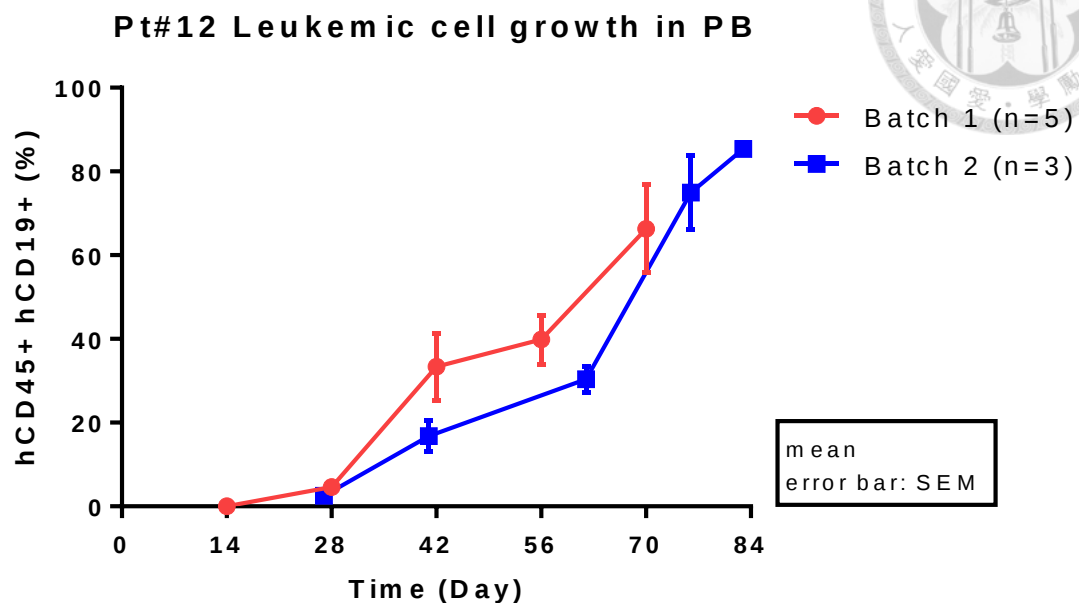
(C)



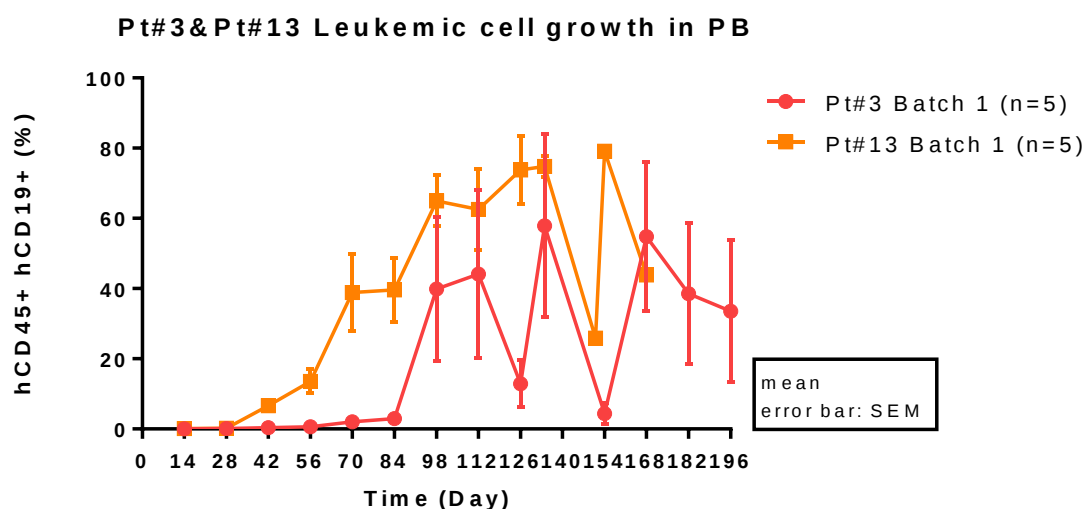
(D)



(E)



(F)



圖三、病人腫瘤異體移植(PDX)模型

(A) PDX 模型實驗策略圖。源自病人的血癌細胞自凍存狀態解凍，並自尾靜脈注射於週齡八至十二週的 NSG 小鼠體內，移植之細胞量介於 $4-10 \times 10^6$ 之間，同一病人每批次實驗每隻小鼠皆注射相同之細胞量，每批次小鼠數量為三至五隻。小鼠抵達人道實驗終點時，犧牲並取得以下檢體：含完整腦組織之頭部製作石蠟包埋切片；無製作石蠟包埋切片之腦組織以 Percoll 密度梯度離心分離人類血癌細

胞；自周邊血、骨髓、脾臟萃取之細胞以流式細胞儀分析人類血癌細胞占比，並且將骨髓、脾臟萃取之細胞進行凍存。

(B) Pt#1 之血癌細胞於 PDX 小鼠周邊血生長曲線圖。血癌細胞於移植後第二至第四週間占比達 1%，並最快於第七週占比達 90% 以上。Pt#1 共進行三個批次 PDX 實驗，第一批次移植 10×10^6 顆細胞，第二批次移植 6×10^6 顆細胞，第三批次移植 4×10^6 顆細胞。

(C) Pt#2 之血癌細胞於 PDX 小鼠周邊血生長曲線圖。血癌細胞於移植後第二至第四週間占比達 1%，並最快於第七週占比達 90% 以上。Pt#2 共進行三個批次 PDX 實驗，第一批次移植 7×10^6 顆細胞，第二與第三批次移植 10×10^6 顆細胞。

(D) Pt#11 之血癌細胞於 PDX 小鼠周邊血生長曲線圖。血癌細胞於移植後第二至第四週間占比達 1%，並最快於第五週占比達 90% 以上。Pt#11 共進行兩個批次 PDX 實驗，第一批次移植 10×10^6 顆細胞，第二與第三批次移植 6×10^6 顆細胞。

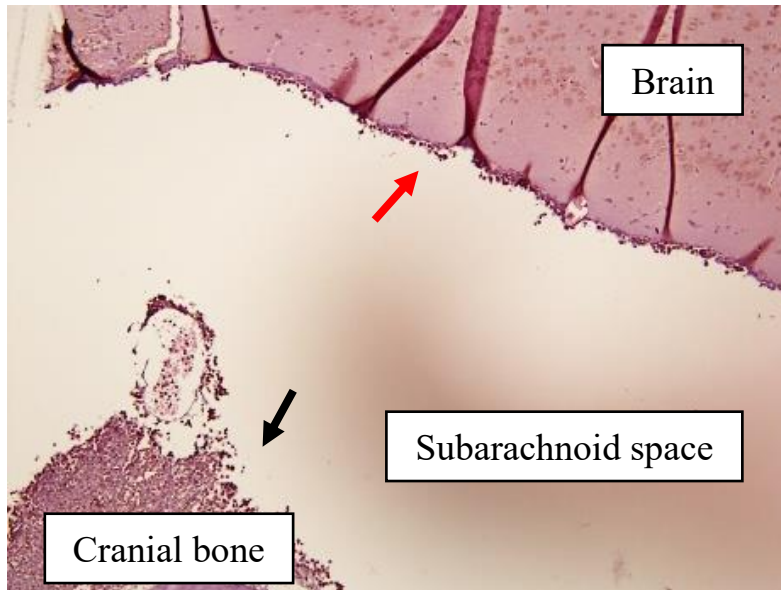
(E) Pt#12 之血癌細胞於 PDX 小鼠周邊血生長曲線圖。血癌細胞於移植後第四週占比達 1%，並最快於第十至十二週間占比達 90% 以上。Pt#11 共進行兩個批次 PDX 實驗，第一批次移植 7×10^6 顆細胞，第二與第三批次移植 10×10^6 顆細胞。

(F) Pt#3 及 Pt#13 之血癌細胞於 PDX 小鼠周邊血生長曲線圖，兩位病人之血癌細胞明顯比其他四位病人生長較慢。Pt#3 血癌細胞於移植後第十週占比達 1%，並最快於第十六週占比達 90% 以上；Pt#13 血癌細胞於移植後第四至第六週占比達 1%，並最快於第十六週占比達 90% 以上。兩位病人皆只進行一批次 PDX 實驗，Pt#3 移植 8×10^6 顆細胞，Pt#13 移植 6×10^6 顆細胞。

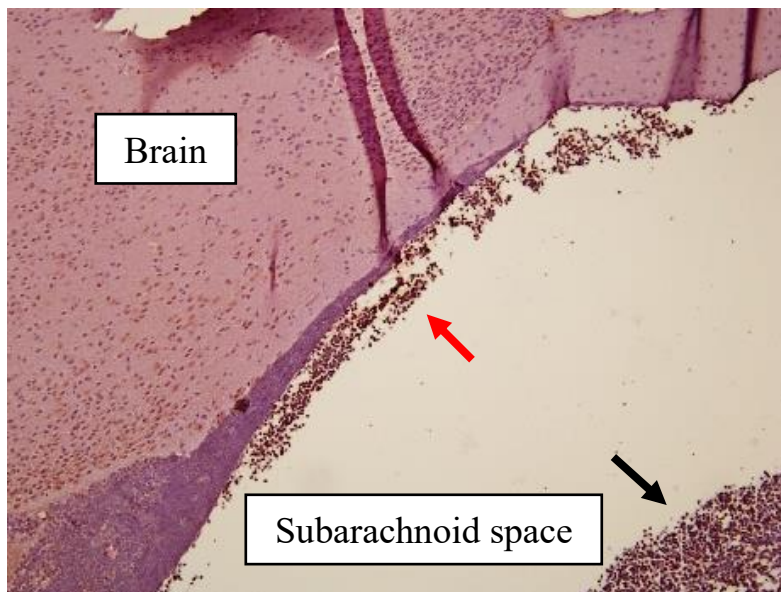
(B)至(F)圖中每一點為平均值，error bar 為 SEM



(A)

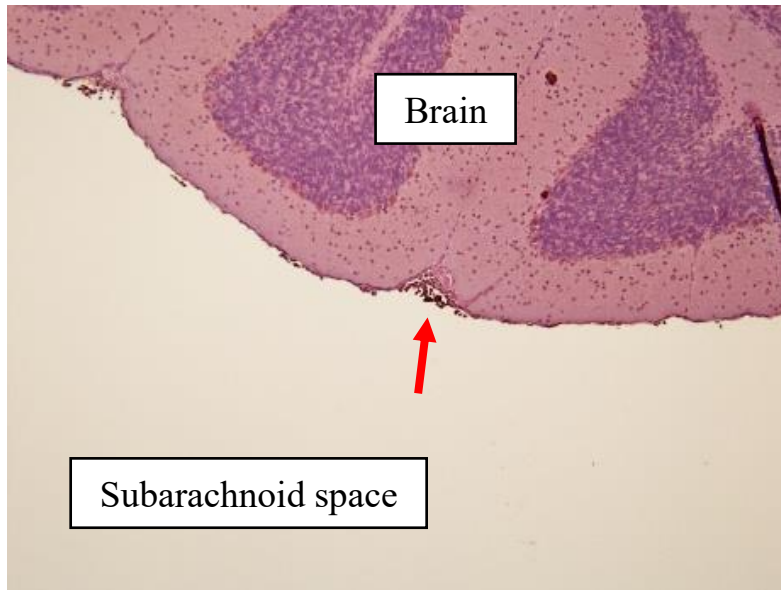


(B)

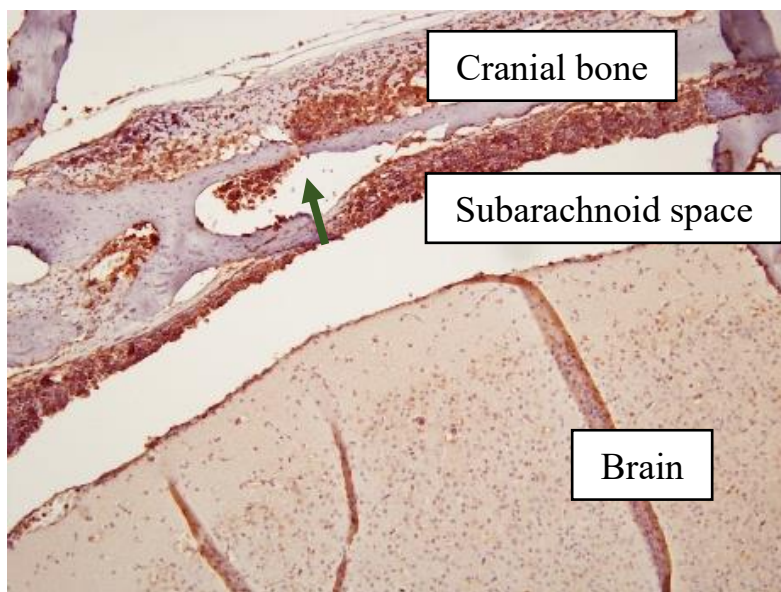




(C)



(D)



圖四、PDX 小鼠頭部切片

移植病人血癌細胞之 NSG 小鼠於人道實驗終點時犧牲，含完整腦組織之頭部製作石蠟包埋切片，並進行組織免疫化學染色，以人類 CD19 為特異性標的偵測人類血癌細胞。



(A) Pt#1 之 PDX 小鼠頭部切片。人類 CD19 陽性細胞聚集於腦膜附近(紅色箭頭指向處)及顱骨內側(黑色箭頭指向處)。該病人診斷時有中樞神經侵犯，PDX 小鼠成功呈現其表型。

(B) Pt#2 之 PDX 小鼠頭部切片。人類 CD19 陽性細胞聚集於腦膜附近(紅色箭頭指向處)及顱骨內側(黑色箭頭指向處)。該病人診斷時有中樞神經侵犯，PDX 小鼠成功呈現其表型。

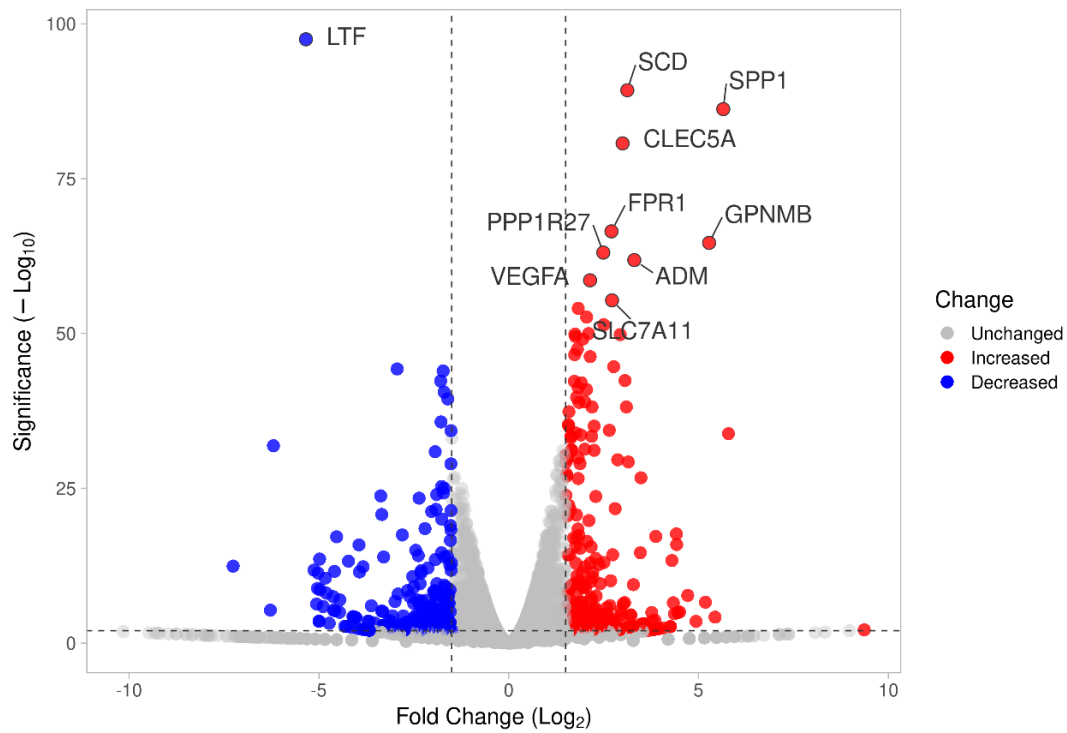
(C) Pt#11 之 PDX 小鼠頭部切片。切片顯示少量人類 CD19 陽性細胞聚集於小腦腦膜附近(紅色箭頭指向處)。該病人診斷時無中樞神經侵犯，PDX 小鼠則呈現中樞神經侵犯表型。

(D) Pt#12 之 PDX 小鼠頭部切片。切片顯示無血癌細胞分布於蜘蛛網膜下腔處，僅侷限於顱骨骨髓內。該病人診斷時無中樞神經侵犯，PDX 小鼠成功呈現其表型。



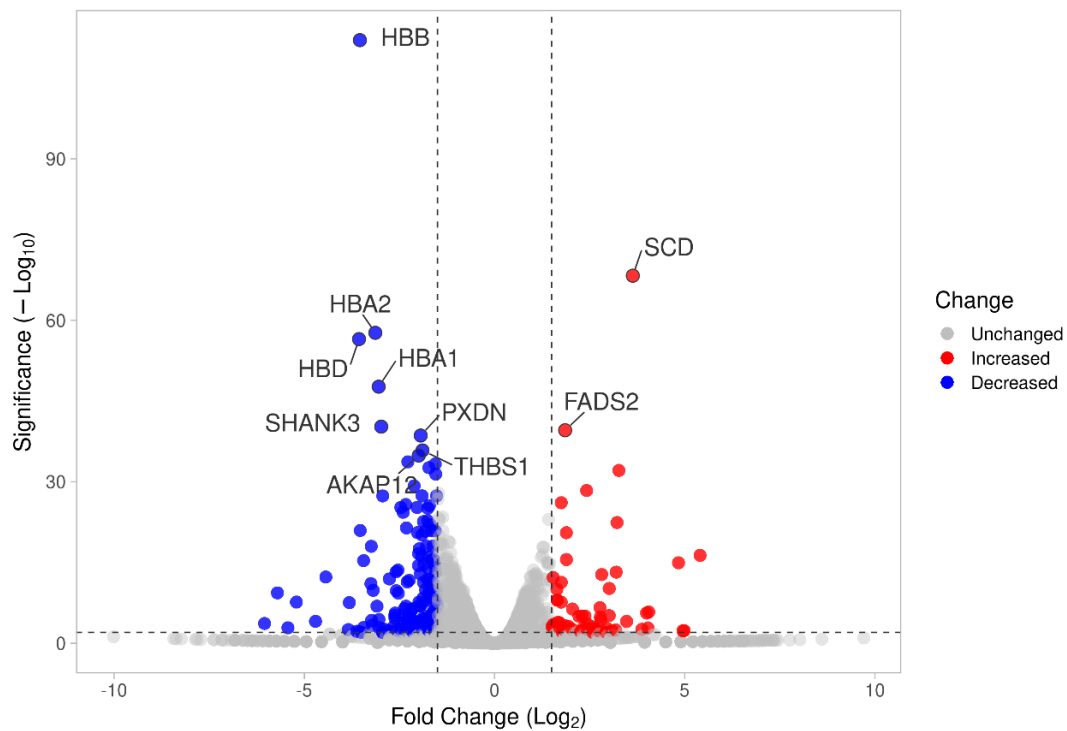
(A)

Pt#2-6BRAINvsBM



(B)

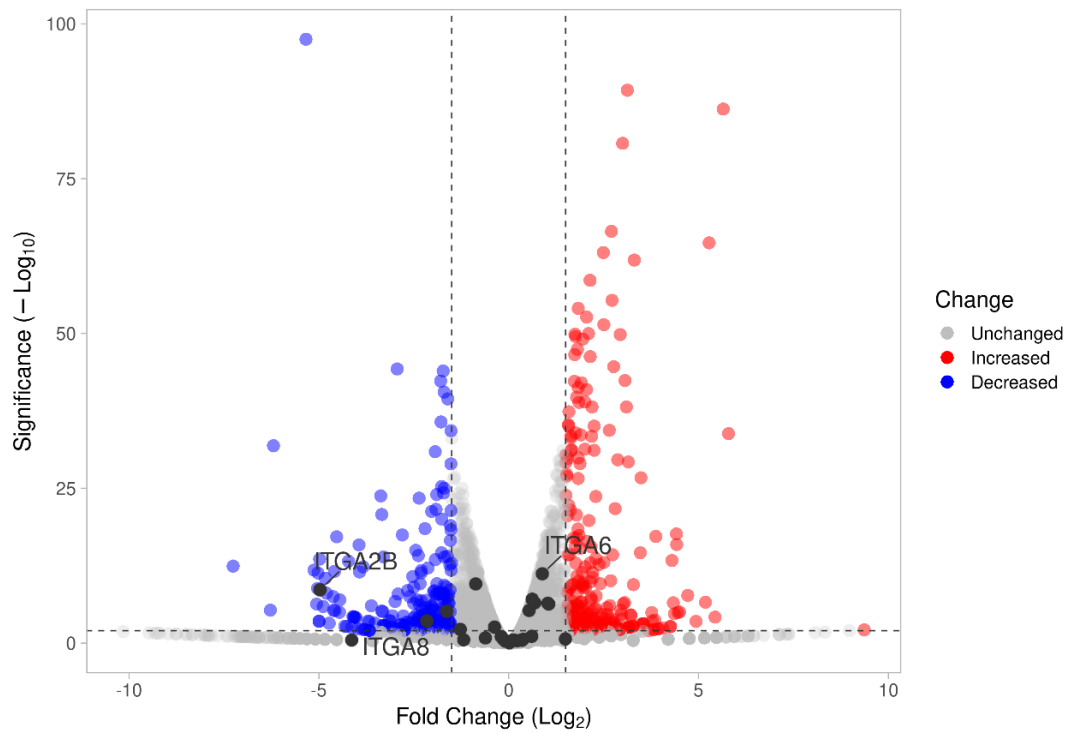
Pt#2-9BRAINvsBM





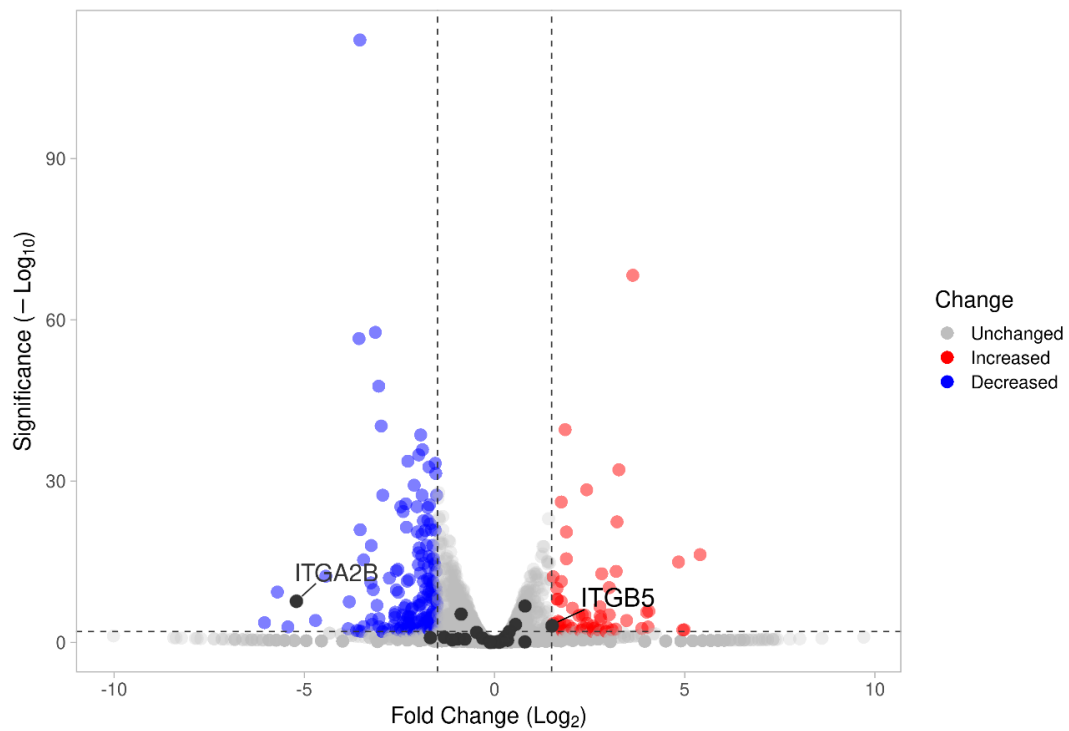
(C)

Pt#2-6BRAINvsBM_integrin



(D)

Pt#2-9BRAINvsBM_integrin



圖五、Pt#2 PDX 小鼠中樞神經侵犯檢體相對基因表現量散布圖

PDX 小鼠經心臟灌流去除周邊血液後，自腦組織分離人類血癌細胞，以同一隻小鼠之骨髓血癌細胞為對照進行 RNA 定序分析，並繪製相對基因表現量散布圖。

(A) Pt#2-6 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞基因表現量散布圖。

(B) Pt#2-9 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞基因表現量散布圖。

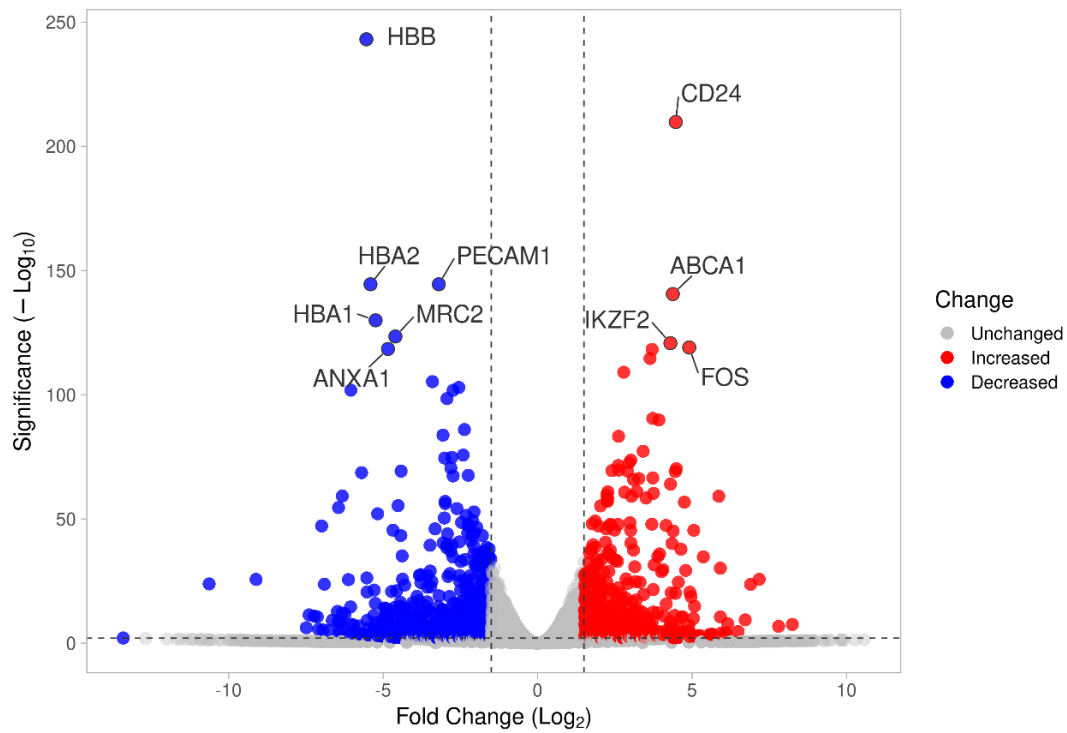
(C) Pt#2-6 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞整合素基因表現量散布圖。*ITGA2B* 於中樞神經侵犯細胞呈現表現量調降；*ITGA6* 則呈現調升，但未超過 fold change 閾值。

(D) Pt#2-9 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞整合素基因表現量散布圖。*ITGB5* 於中樞神經侵犯細胞呈現表現量調升；*ITGA2B* 則呈現調降；*ITGA6* 呈現調降，但未超過 fold change 閾值。



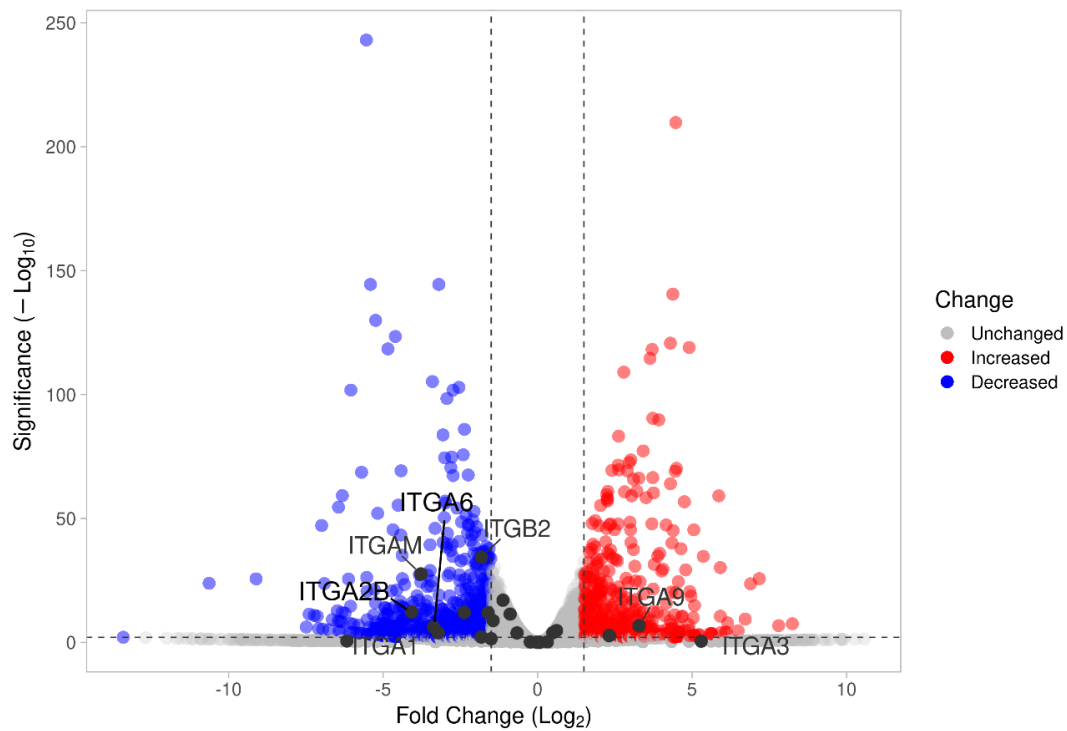
(A)

Pt#3-5BRAINvsBM



(B)

Pt#3-5BRAINvsBM_integrin



圖六、Pt#3 PDX 小鼠中樞神經侵犯檢體相對基因表現量散布圖

PDX 小鼠經心臟灌流去除周邊血液後，自腦組織分離人類血癌細胞，以同一隻小鼠之骨髓血癌細胞為對照進行 RNA 定序分析，並繪製相對基因表現量散布圖。

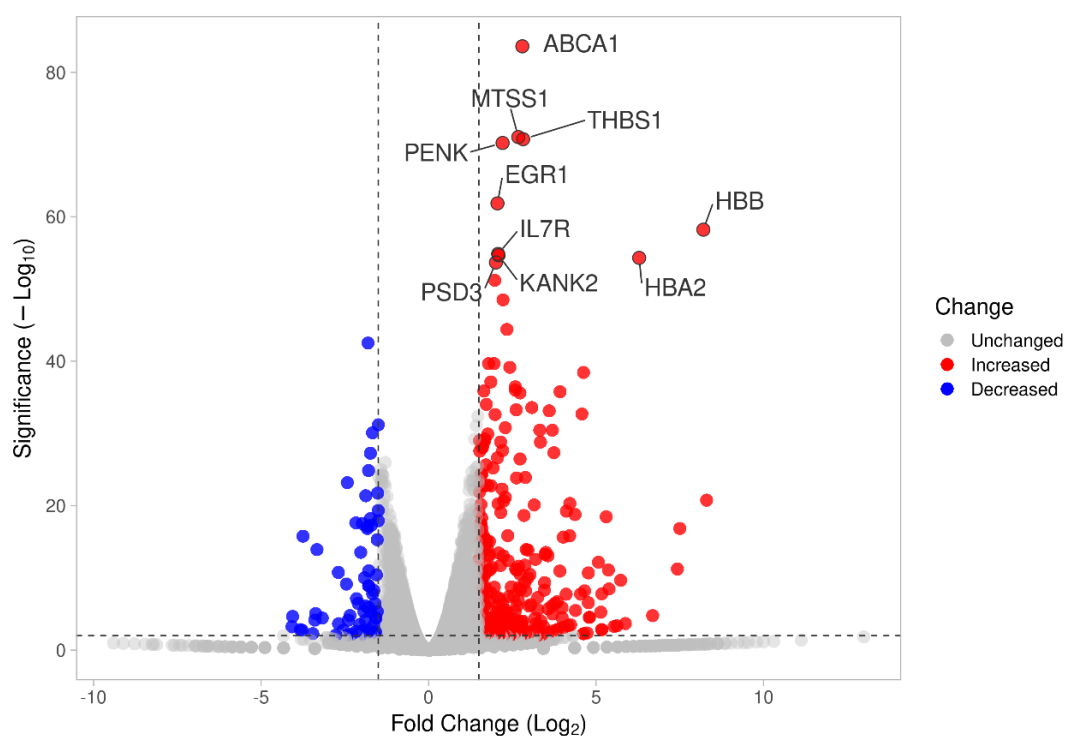
(A) Pt#3-5 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞基因表現量散布圖。

(B) Pt#3-5 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞整合素基因表現量散布圖。*ITGA7* 及 *ITGA9* 於中樞神經侵犯細胞呈現表現量調升；*ITGA2B* 及 *ITGA6* 則呈現調降。

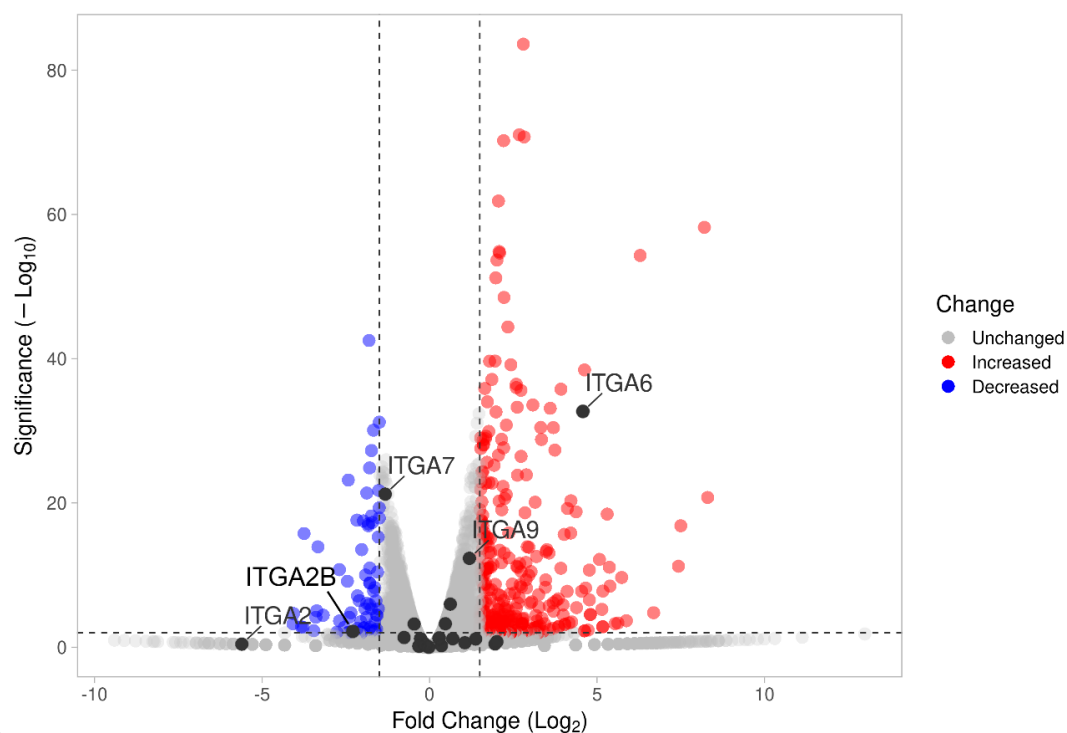


(A)

Pt#11-8BRAINvsBM



Pt#11-8BRAINvsBM_integrin



(B)

圖七、Pt#11 PDX 小鼠中樞神經侵犯檢體相對基因表現量散布圖

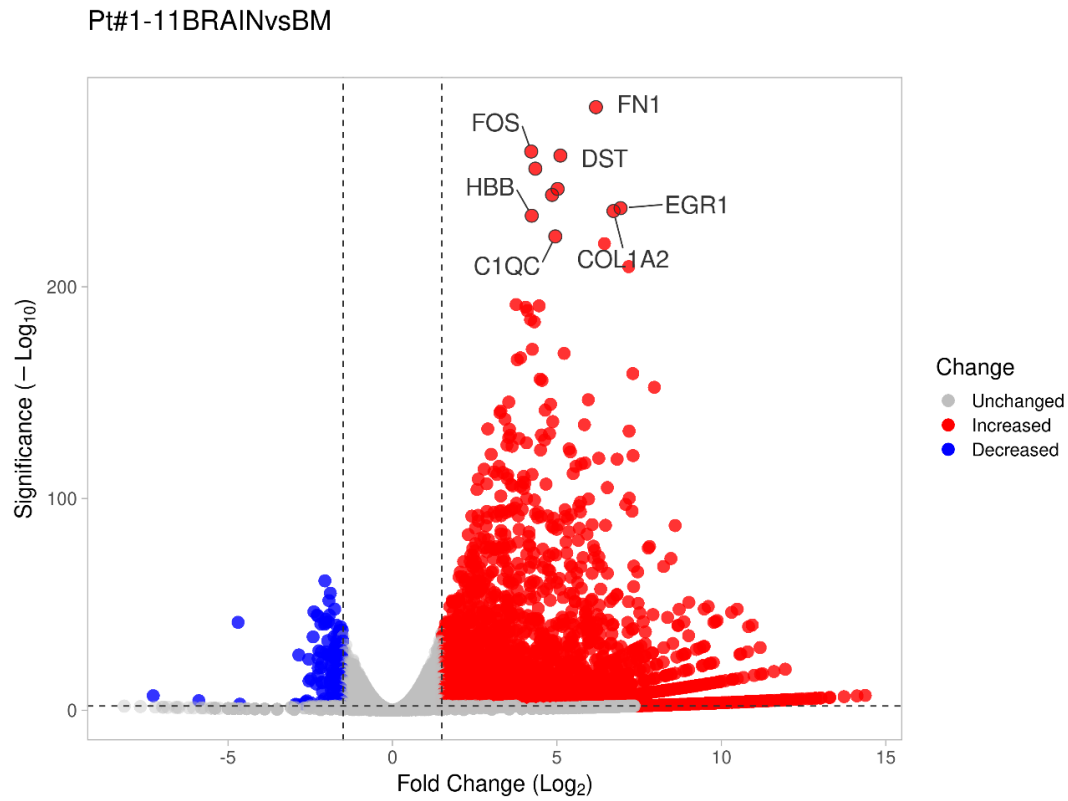
PDX 小鼠經心臟灌流去除周邊血液後，自腦組織分離人類血癌細胞，以同一隻小鼠之骨髓血癌細胞為對照進行 RNA 定序分析，並繪製相對基因表現量散布圖。

(A) Pt#11-8 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞基因表現量散布圖。

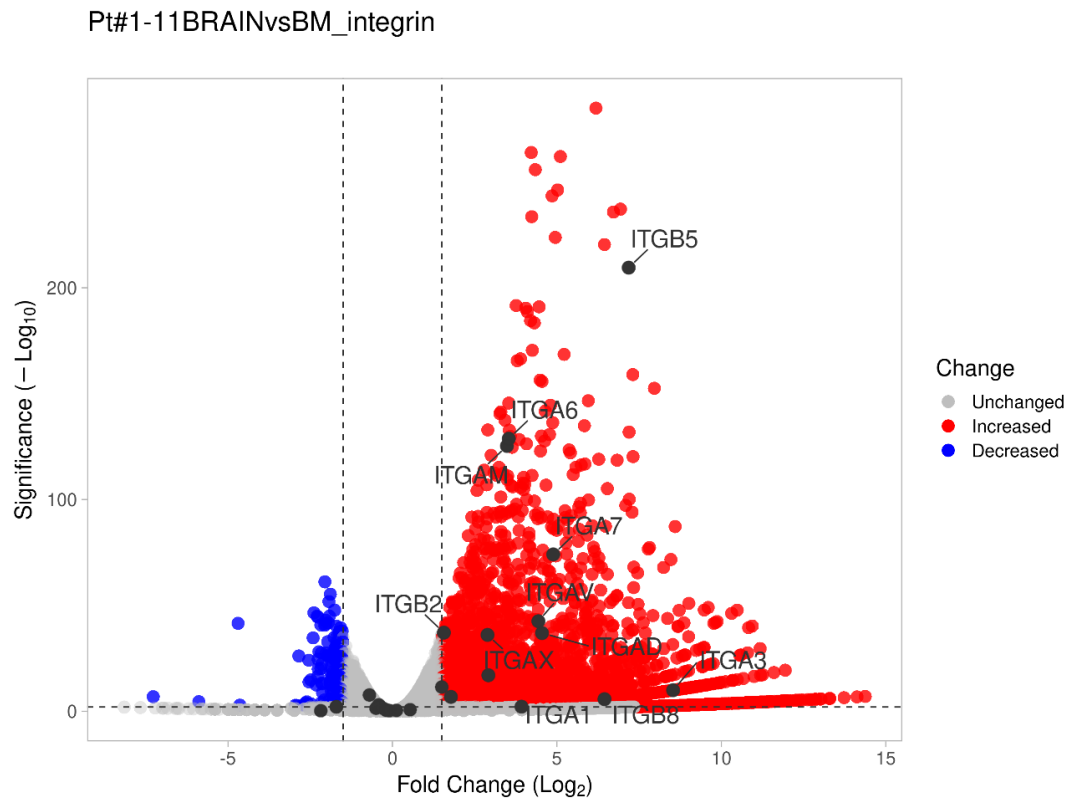
(B) Pt#11-8 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞整合素基因表現量散布圖。*ITGA6* 於中樞神經侵犯細胞呈現表現量調升；*ITGA2B* 則呈現調降。



(A)



(B)



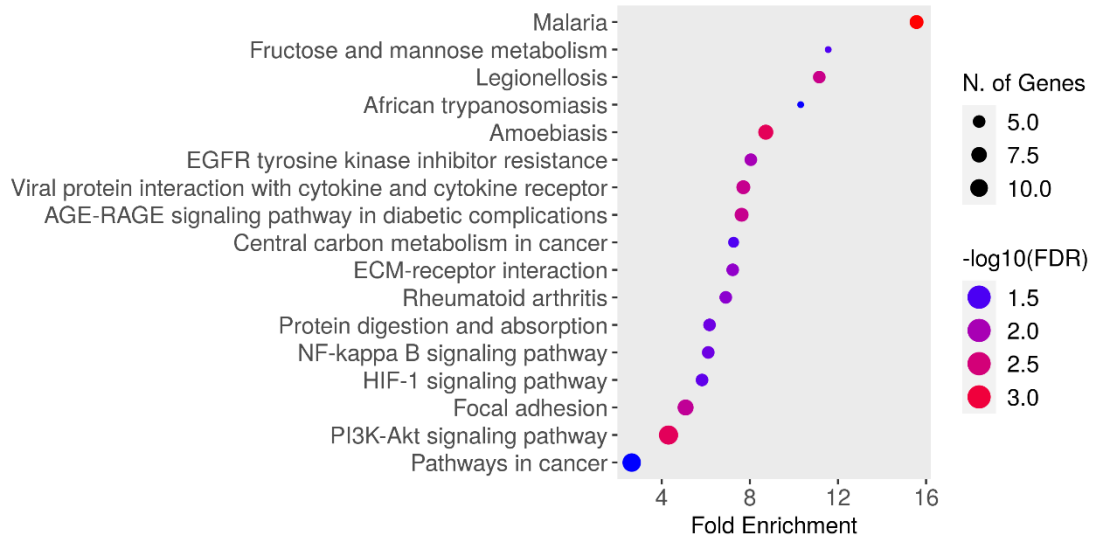
圖八、Pt#1 PDX 小鼠中樞神經侵犯檢體相對基因表現量散布圖

PDX 小鼠經心臟灌流去除周邊血液後，自腦組織分離人類血癌細胞，以同一隻小鼠之骨髓血癌細胞為對照進行 RNA 定序分析，並繪製相對基因表現量散布圖。

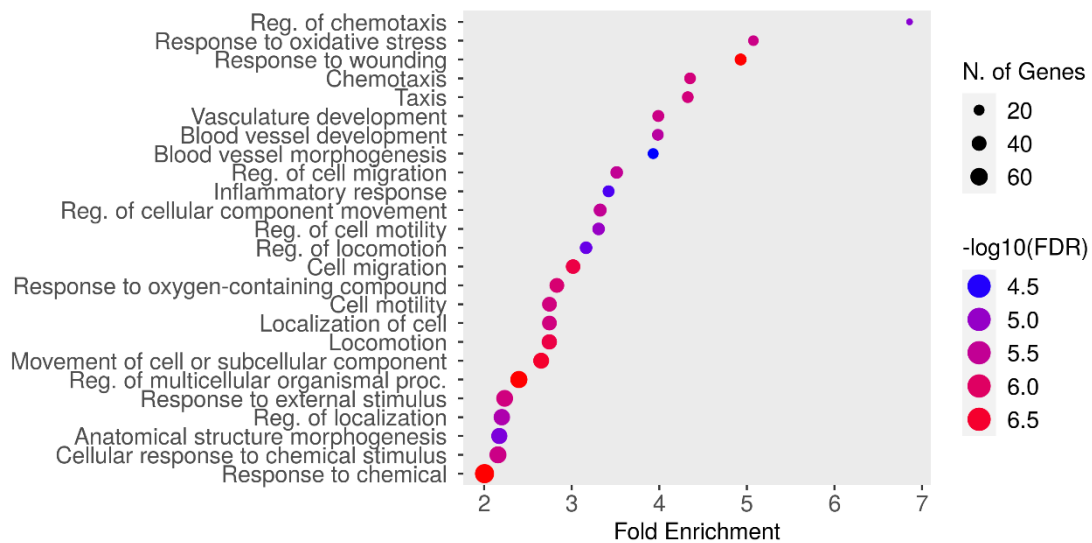
(A) Pt#1-11 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞基因表現量散布圖。

(B) Pt#1-11 PDX 小鼠中樞神經侵犯細胞相對骨髓血癌細胞整合素基因表現量散布圖。數個整合素基因如 *ITGA6*、*ITGA7*、*ITGB5* 等於中樞神經侵犯細胞呈現表現量調升；*ITGA2* 則呈現調降。

(A)



(B)



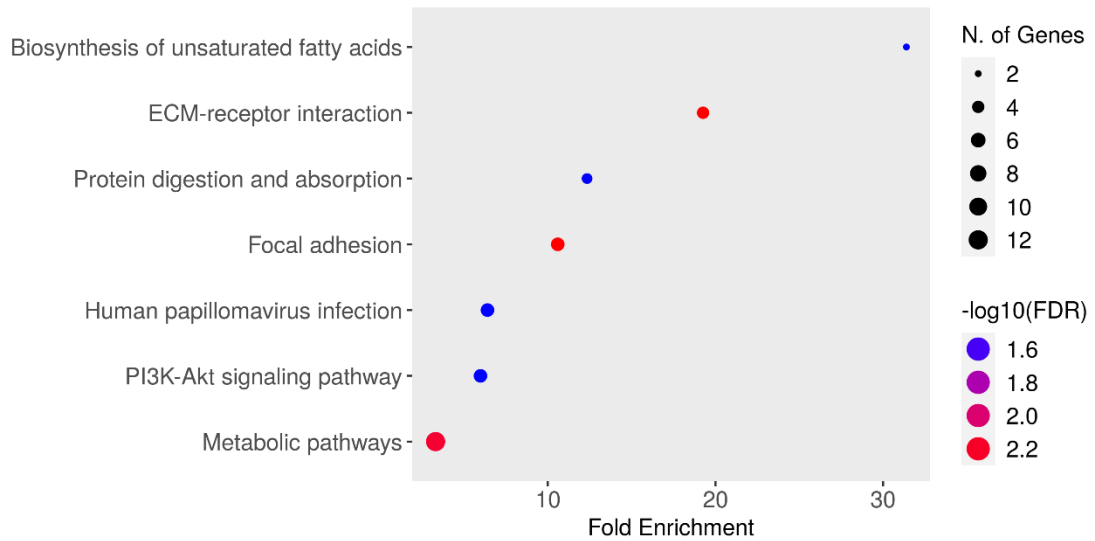
圖九、Pt#2-6 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析

(A)、(B)分別以 KEGG 及 GO biological process 資料庫進行分析。

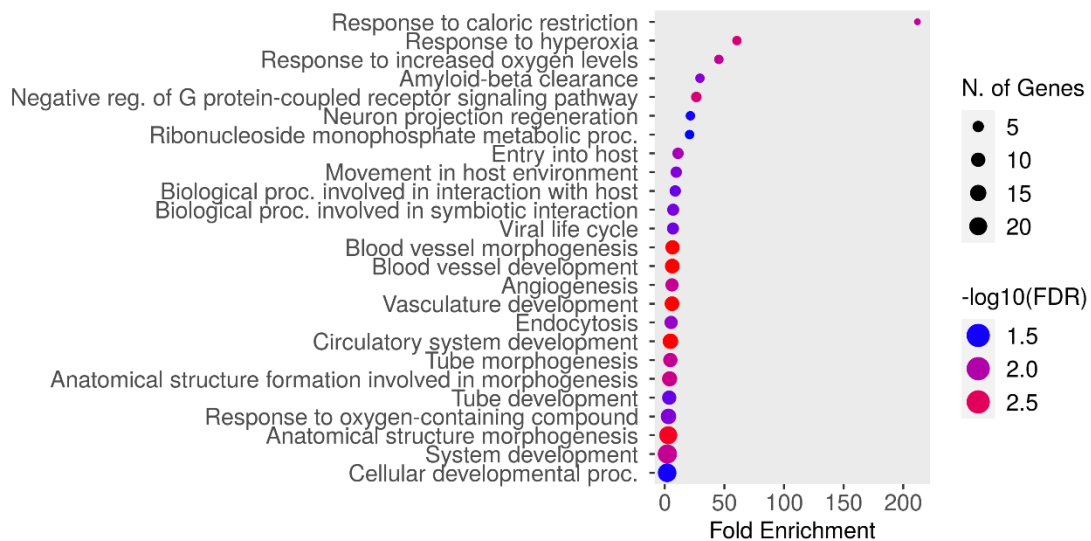
(A)以 KEGG 資料庫分析，ECM receptor signaling pathway 及 PI3K-Akt signaling pathway 基因集產生富集。

(B)以 GO biological process 資料庫分析，Chemotaxis、Cell migration、Cell motility 等與細胞移動、遷徙相關的基因集產生富集。

(A)



(B)



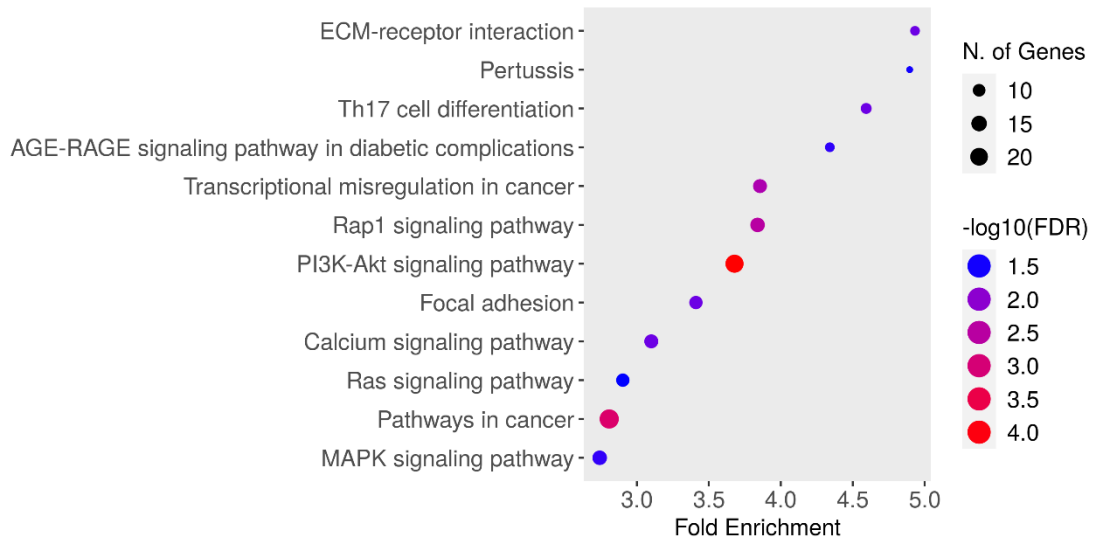
圖十、Pt#2-9 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析

(A)、(B)分別以 KEGG 及 GO biological process 資料庫進行分析。

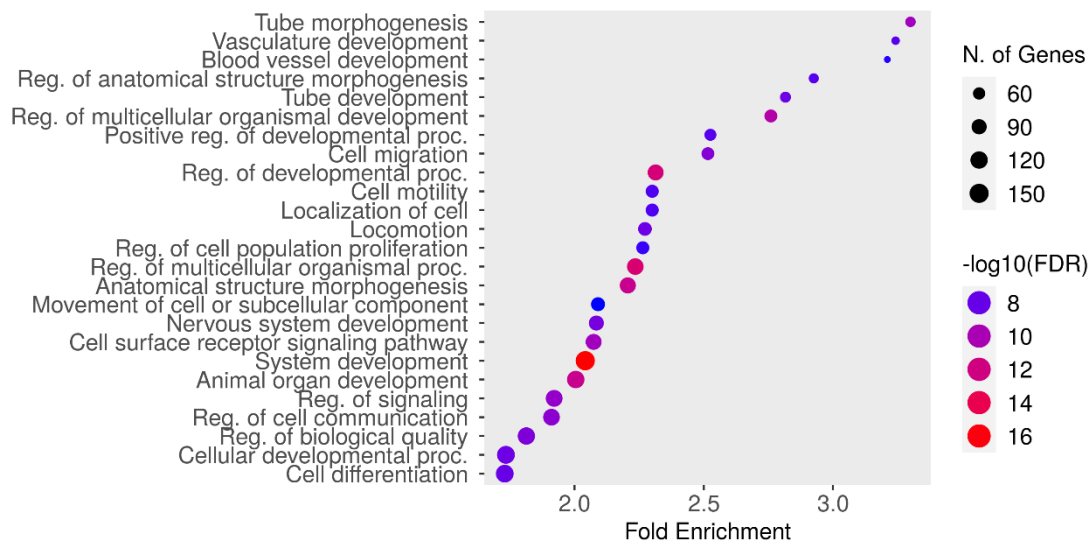
(A)以 KEGG 資料庫分析，ECM receptor signaling pathway 及 PI3K-Akt signaling pathway 基因集產生富集。

(B)以 GO biological process 資料庫分析，Blood vessel morphogenesis、Blood vessel development、Angiogenesis 等與血管相關的基因集產生富集。

(A)



(B)



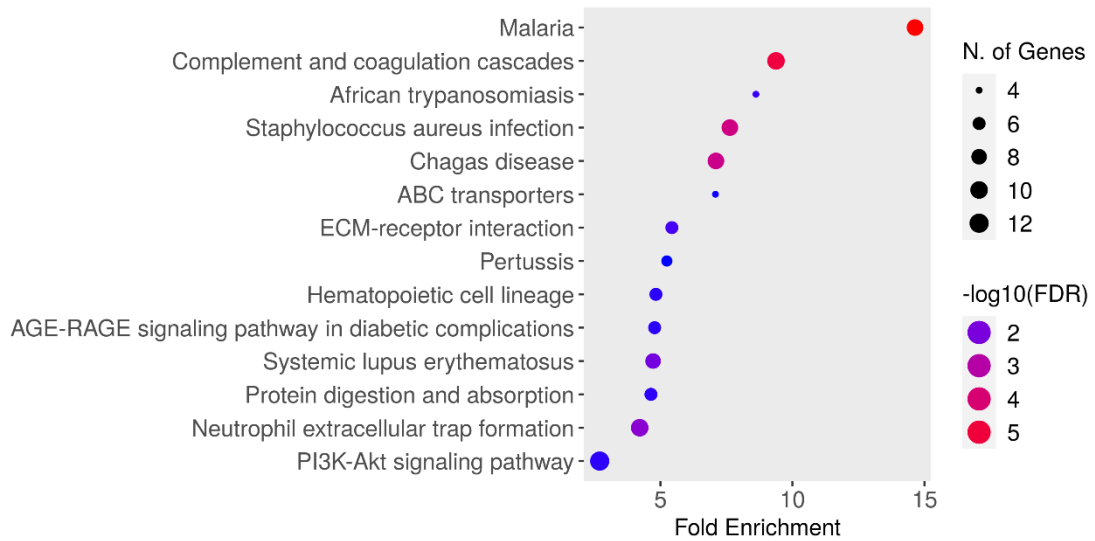
圖十一、Pt#3-5 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析

(A)、(B)分別以 KEGG 及 GO biological process 資料庫進行分析。

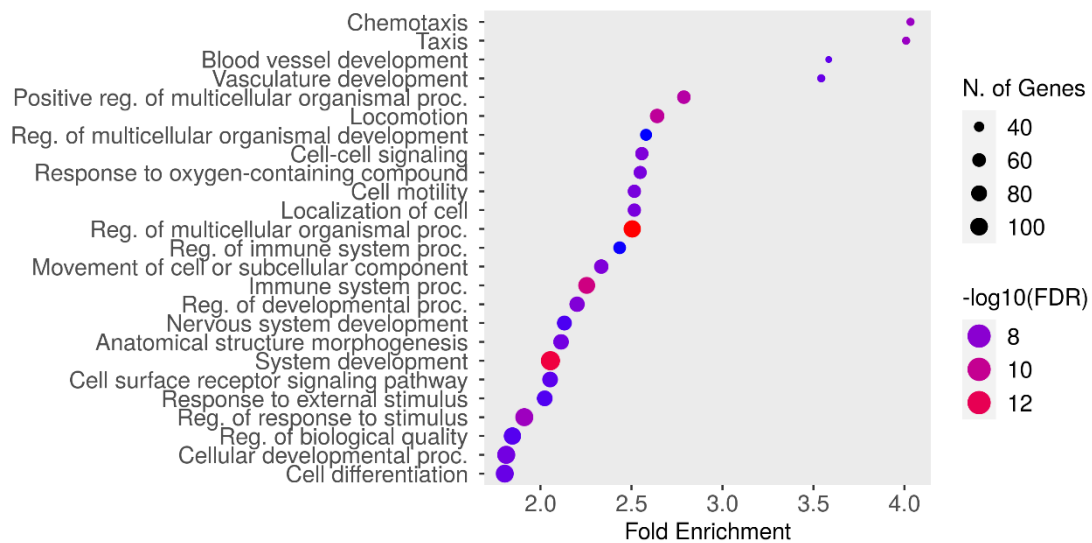
(A)以 KEGG 資料庫分析，ECM receptor signaling pathway 及 PI3K-Akt signaling pathway 基因集產生富集。

(B)以 GO biological process 資料庫分析，Cell migration、Cell motility 等與細胞移動、遷徙相關的基因集以及 Nervous system development 產生富集。

(A)



(B)



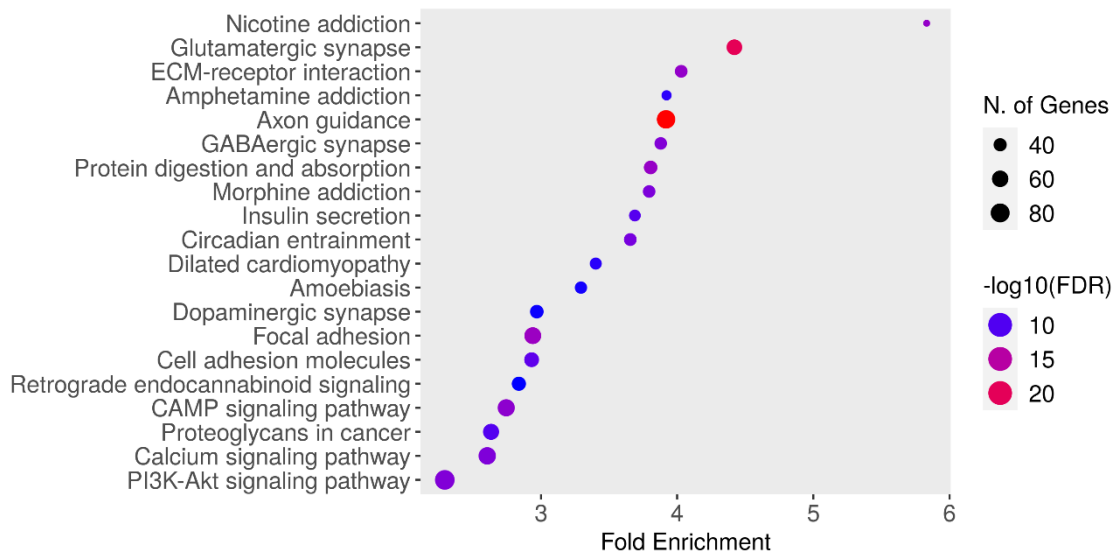
圖十二、Pt#11-8 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析

(A)、(B)分別以 KEGG 及 GO biological process 資料庫進行分析。

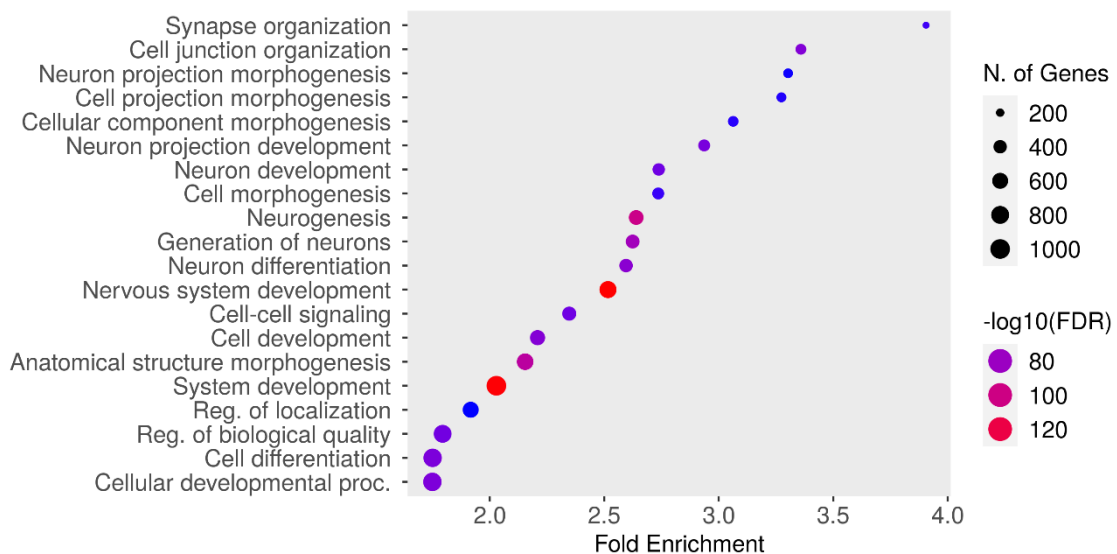
(A)以 KEGG 資料庫分析，ECM receptor signaling pathway 及 PI3K-Akt signaling pathway 基因集產生富集。

(B)以 GO biological process 資料庫分析，Chemotaxis、Cell motility 等與細胞移動、遷徙相關的基因集以及 Nervous system development 產生富集。

(A)



(B)



圖十三、Pt#1-11 中樞神經侵犯細胞基因集富集分析

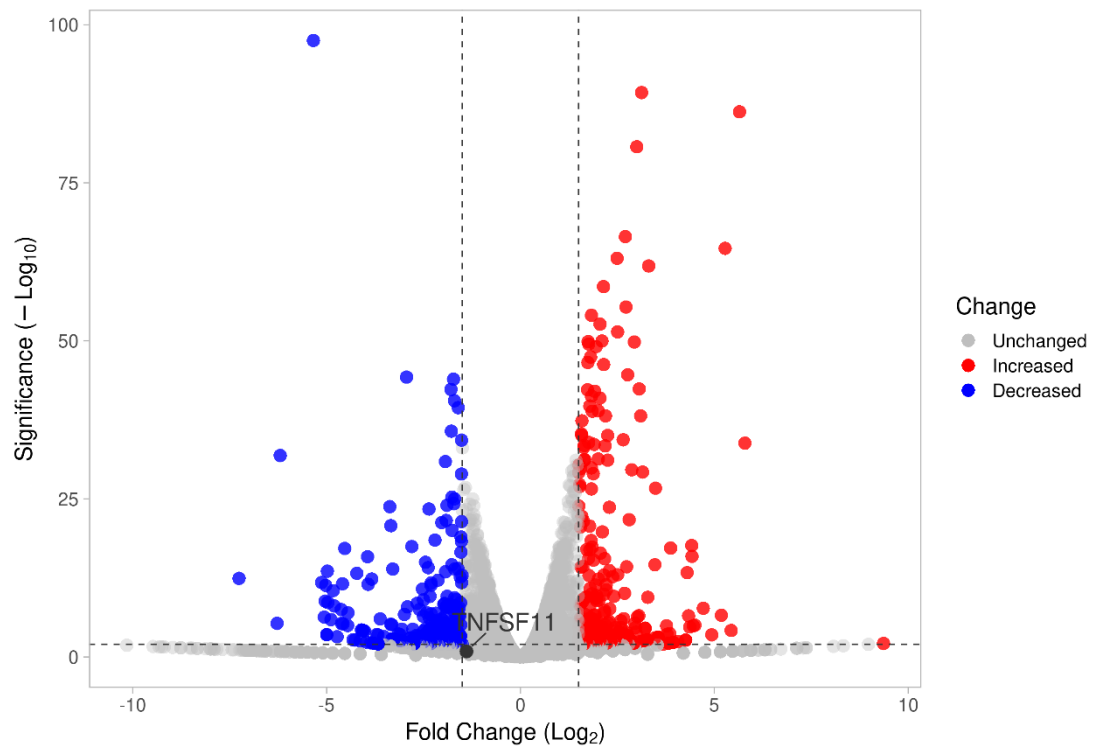
(A)、(B)分別以 KEGG 及 GO biological process 資料庫進行分析。

(A)以 KEGG 資料庫分析，ECM receptor signaling pathway 及 PI3K-Akt signaling pathway 基因集產生富集。

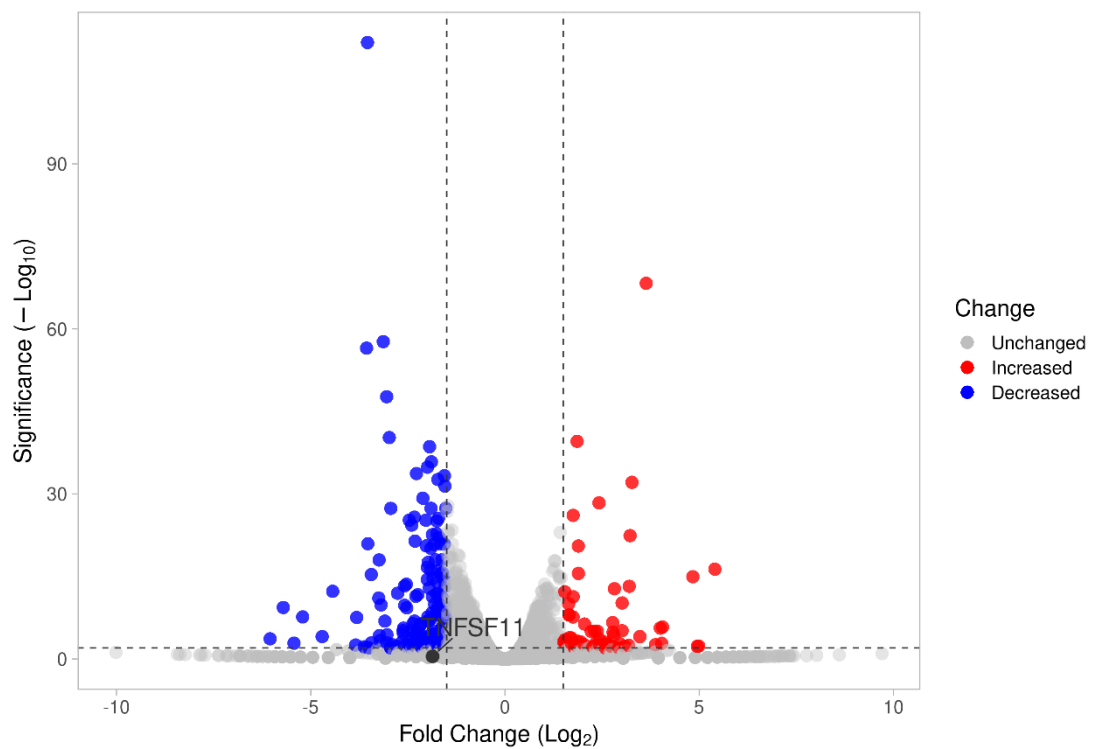
(B)以 GO biological process 資料庫分析，Chemotaxis、Cell motility 等與細胞移動、遷徙相關的基因集以及 Nervous system development 產生富集。



Pt#2-6BRAINvsBM_RANKL

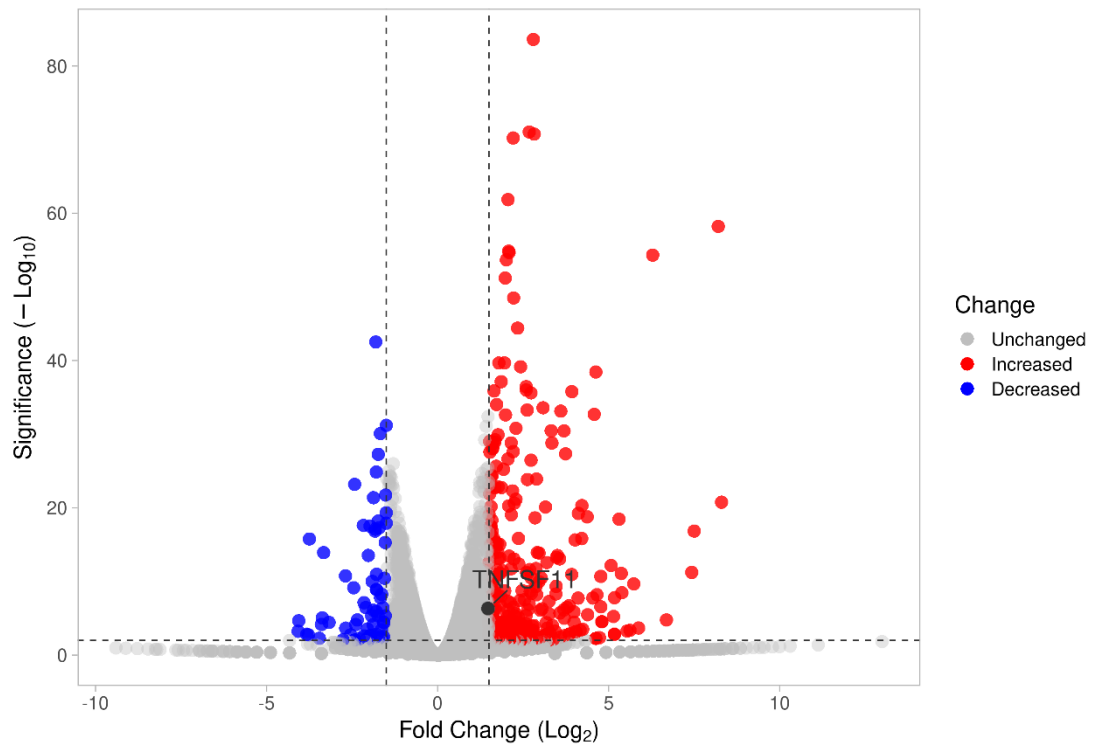


Pt#2-9BRAINvsBM_RANKL

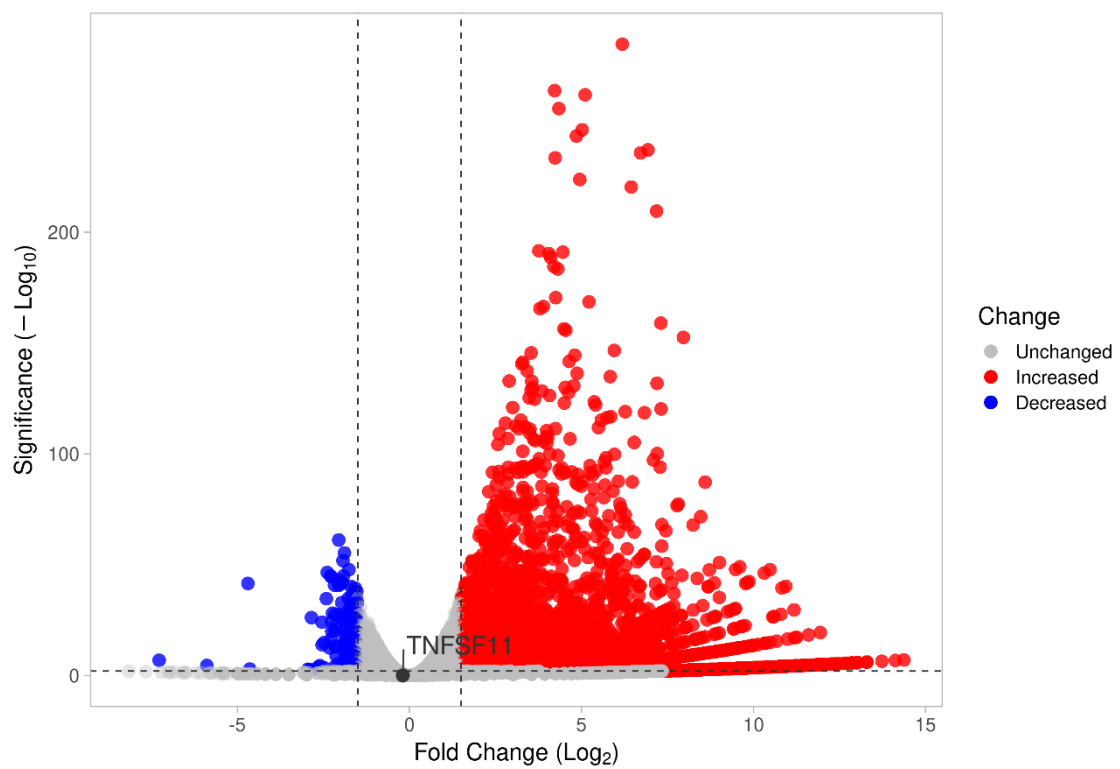




Pt#11-8BRAINvsBM_RANKL



Pt1-11BRAINvsBM_RANKL



圖十四、RANKL(基因名 *TNFSF11*)於 PDX 中樞神經侵犯細胞相對表現量散布

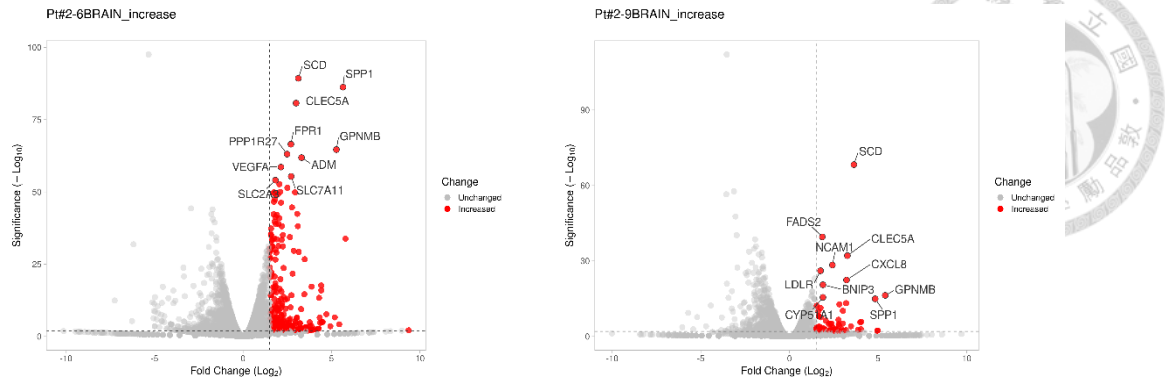
圖。Pt#3-5 之數據由於 *TNFSF11* 相對表現量之 *p*-value 無法計算，故無法呈現



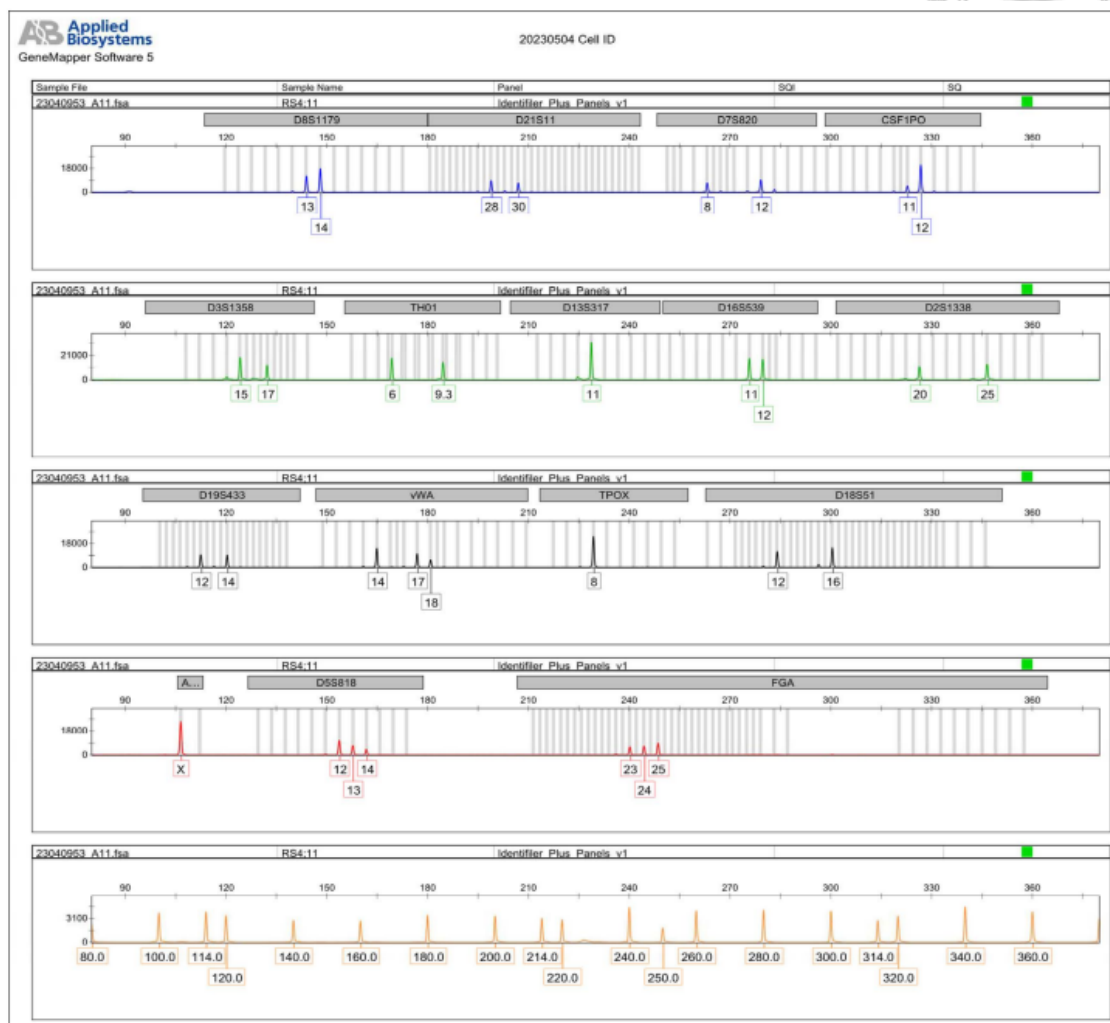
附錄

	Sample	TH01	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX	Match %
樣本鑑定結果	RS4;11	6,9,3	12,13,14	11	8,12	11,12	11,12	X	14,17,18	8	-
ATCC STR資料庫結果	RS4 (11) LeukemiaHuman	6,9,3	12,13	11	8,12	11,12	11,12	X	14,17	8	100
	SW 626 Ovarian AdenocarcinomaHuman	9,3	12	11	10,12	11	11	X	17,18	8	91
	CCD-973 SK (SKIN, NORMALCONTROL, HUMAN)	6,9,3	12,13	11,12	8,11	11,12	11,12	X	14,17	8	88
	NCI-H2135 HUMAN LUNG CARCINOMA	9,3	12,13	12	11,12	11,12	12	X	17,18	8	85
	U-CH2 ChordomaHuman	6,9,3	10,11	11	8,12	12	11,12	X	17	8	85
	ChaGo-K-1 Bronchogenic CarcinomaHuman	9,3	12	11	8,12	11	10	X,Y	17,18	8	83
	DempseySkin Fibroblast; Human	8,9,3	11,13	11	8,12	11,12	11,12	X,Y	17,18	8	81
	HCC827 Lung CarcinomaHuman	6	12	9	11,12	12	11	X	18	8	80
	HCM-CSHL-0322-C20; Cancer Model; Primary; Rectal cancer; Hum	6,9	12,13	8,11	12	11,12	11,12	X	14	8,9	80
	HCC827-GAS-Luc2	6	12	9	11,12	12	11	X	18	8	80

附表一、RS4;11 STR 基因型鑑定結果。該表擷取自委託之鑑定報告書。



附圖一、Pt#2-6 與 Pt#2-9 PDX 中樞神經侵犯細胞相對基因表現量比較。



附圖二、RS4;11 STR 基因型鑑定毛細管電泳結果。該圖擷取自委託之鑑定報告書。