

知識天地

果蠅卵巢生殖幹細胞的老化

許惠真助研究員、柯懿庭、高詩涵（本院細胞與個體生物學研究所）

摘要

幹細胞會進行自我更新(self-renewal)，以快速的更替方式維持及再生受損組織，並確保組織和器官功能保持在最佳狀態。透過對局部、全身和環境因子的反應，幹細胞會受多層次的環節控制。老化影響代謝、肌肉、再生和認知功能的惡化，進而影響壽命是很普遍的過程。但我們對於哪些老化相關的分子機制改變了幹細胞的瞭解還是很少。我們的研究結果顯示，老化會造成果蠅卵巢生殖幹細胞數量的下降以及類腫瘤生殖幹細胞(tumorous GSCs)的形成。有趣的是，加速生殖幹細胞的分裂，或是延遲細胞分裂都加速了生殖幹細胞在老化過程中的流失速度。隨著果蠅的老化，壞損的DNA在生殖幹細胞中不斷的累積，且生殖幹細胞細胞週期的S階段也被延長。除此之外，腫瘤生殖幹細胞（脫離了調控正常幹細胞的微環境niche）仍會以類似正常生殖幹細胞的模式對老化產生反應，這表示生殖幹細胞不需要微環境所釋放的訊號來感測或對老化作出反應。最後，我們亦發現已交配和沒交配過的母果蠅其生殖幹細胞有相似的行為，這表示公母果蠅之間的交配行為不會影響老化對生殖幹細胞的影響。總括我們所有的結果發現老化和飲食對幹細胞分裂週期的影響是由胰島素訊號引導造成，這強調出調控幹細胞老化的複雜性及卵巢癌與老化之間的連結關係。

前言

果蠅是一種壽命不長的生物，此特性再加上其遺傳方面的技術應用促使果蠅被用來研究不同生理老化過程中的細胞反應。更重要的是母果蠅生殖幹細胞具有明顯的特徵可供辨識，使其成為極佳的模式生物，以用來研究幹細胞是如何對老化作出反應。

一顆母果蠅卵巢由16~20條卵巢管組成，用來製造卵。在卵巢管的最前端的結構稱為germarium。Germarium的最前端有由6-8顆cap cells所組成的環境(niche)，會維持著2~3個生殖幹細胞。生殖幹細胞會直接與cap cells接觸。每一個生殖幹細胞中都會有一個類似膜構造的胞器(稱為fusome)會位在靠cap cells的位置。以免疫染色的方法標定fusome上的蛋白，以及根據生殖細胞的位置就能標訂出卵巢生殖幹細胞。一顆生殖幹細胞在進行細胞分裂後會產生一顆子細胞，這個子細胞會繼續進行四次不完全分裂，形成由16顆細胞組成的cyst；cyst中的細胞由分枝狀的fusome進行內部連結。有16顆細胞的cyst接著被一層體細胞包圍，而這整個結構會從germarium排出，形成一個卵室(egg chamber)。這個卵室最後會發育成為成熟的卵。

胰島素和類胰島素生長因子(insulin-like growth factor) 訊息傳遞路徑是在演化中被保留下來的營養感測系統，能在許多組織中控制幹細胞的分裂。在果蠅中，胰島素訊息傳遞路徑是藉由insulin-like peptide 與受器dInr的結合來活化的。過去的研究顯示胰島素訊息可以透過對飲食的反應直接控制生殖幹細胞分裂週期的G2階段。更引人注意的是胰島素訊號在卵巢老化的過程中會逐漸減弱，而生殖幹細胞的分裂率也會隨著老化下降。但是目前不清楚老化是否參與在胰島素訊號對於生殖幹細胞週期的G2階段的控制。

生殖和壽命之間有著緊密的連結，透過體細胞(soma)和生殖腺(germline)間的訊號互相合作來調節生物老化的速度。在線蟲及果蠅體內，藉由活化胰島素訊號的抑制因子FOXO來移除生殖細胞可延長壽命。相反地，其他用線蟲的研究結果指出，來自體細胞的訊息會透過胰島素訊息與營養感測系統合作來控制生殖狀況。一篇最近的研究結果顯示，雄雌性線蟲的交配會促進生殖幹細胞的增生和卵子發育而造成母線蟲的壽命減短。而在果蠅交配時，雄性的sex peptide會刺激卵黃蛋白堆積在卵母細胞而促使卵的產生。但在老化的過程中，交配是否會影響生殖幹細胞的維持和分裂並不清楚。

我們的研究成果顯示，老化會造成生殖幹細胞在老化過程中的流失(圖一)。此外，老化調控生殖幹細胞分裂週期的S階段而不是像胰島素訊息是調控在G2的階段。隨著老化，壞損的DNA累積在生殖幹細胞中，並誘使腫瘤生殖幹細胞脫離微環境(圖二)。這顯示在老化中，影響幹細胞分裂的訊息可以不受niche的調控。此外，我們認為老化造成的生殖幹細胞分裂率下降，可能是造成幹細胞數量的流失的原因。最後，我們亦發現在老化的過程中，交配與否並不會影響生殖幹細胞的數量或分裂。

結果摘錄

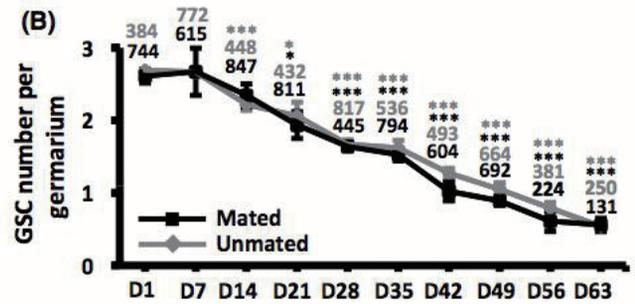
一、不管是否交配過，生殖幹細胞的數量都會隨著老化下降

我們先以和 cap cells之間相連結於生殖幹細胞的 fusomes來確定生殖幹細胞的位置，來計算不同年齡的果蠅，其germaria中的生殖幹細胞數量。剛孵化不久的果蠅，其germarium中有 2.6 ± 0.1 顆生殖幹細胞 ($n = 744$ 個 germaria)，而7天大的果蠅也有類似的幹細胞數目 (2.7 ± 0.3 顆生殖幹細胞, $n = 615$)。但孵化兩週後的果蠅，其生殖幹細胞數量開始有明顯的下降。到了孵化63天後，生殖幹細胞數量相較於孵化後7天的果蠅則是下降到22% (0.6 ± 0.1 顆生殖幹細胞, $n = 131$)。

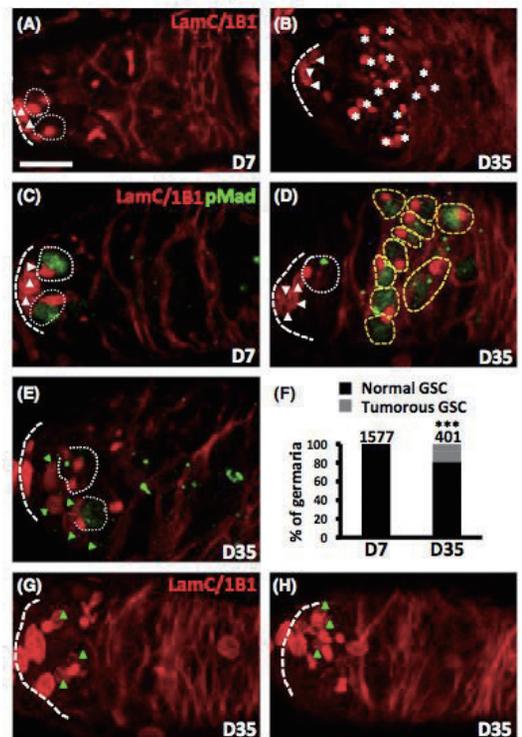
而53天和63天大的果蠅卵巢中，有一半的germaria已失去功能。這些結果驗證了之前的研究所提出的“生殖幹細胞數量會隨著老化而下降”的論點，也與“睪丸的生殖幹細胞會隨著老化而數量下降”這個發現符合。因卵是由生殖幹細胞發育而成的 因此交配會使卵的數量增加，進而加快在老化過程中生殖幹細胞流失的速度。我們發現實驗中的母果蠅生殖幹細胞不管是已交配和未交配過的情況下有類似的數量，這表示在老化的過程中，交配的行為不會影響生殖幹細胞的數量。

二、老化會誘發腫瘤生殖幹細胞的形成，並造成卵巢中cap cells變大顆且出現在不正常的位置

受損的DNA常會造成基因組 (genome) 的不穩定，且有很高的機率會伴隨著腫瘤的形成。我們在老的germaria中發現了類似腫瘤的生殖幹細胞。在年輕的germaria (7天大, $n = 1577$) 中，能在其前端發現2~3顆生殖幹細胞，後面則有分枝狀fusomes、正在分化的cysts。然而，在35天大的germaria ($n = 401$) 中，約有20%的germaria，其後半部份被有著“圓形” fusomes 的生殖幹細胞佔據 (用星號標示)，顯示這些細胞具有未分化、像腫瘤的特質。而老化引起的類腫瘤生殖細胞和年輕的生殖幹細胞的pMad (是與自我更新機制有關的Dpp訊息調控因子，可作為生殖幹細胞的標記) 的表現程度類似，這個結果顯示這些未分化的生殖細胞就是腫瘤生殖幹細胞。就如我們預期的，35天的生殖幹細胞，其pMad表現量明顯下降。我們還發現56天的germaria有少量的類腫瘤生殖幹細胞，這些細胞可能是老化造成germaria退化的原因。除了腫瘤生殖幹細胞的累積，35天的germaria中，有36.8%含有變大、出現在不正常位置的niche cells (綠色三角形標示)，這些 niche cells可用LamC在核膜的表現和它們與生殖幹細胞的接觸來辨識。這些老化的niche cells遠離了germaria的前端(正常的niche cells在年輕germaria的位置(白色三角形標示))。我們甚至很常看到單獨只有出現在不正常位置的niche cells 而沒有腫瘤生殖幹細胞的germaria 或是相反的情況，顯示這兩種情況的發生並沒有直接的關係存在。



圖一 已交配和未交配過的雌果蠅，其生殖幹細胞數目的平均值皆會隨著年齡下降。D代表果蠅的年齡。分析的 germaria 數目標示在每個時間點的誤差線方。*代表P值小於 0.05；***代表P值小於 0.001。誤差線來源為平均值加減標準差值的結果。



圖二 老化的germaria出現了腫瘤生殖幹細胞、變大或出現在不正常的位置的niche cells(A~E) 7天 (A, C) 和35天 (B, D, E) 的germaria。用1B1 (紅色, fusomes) 和LamC (紅色, niche cell) 來標示;(C~E) 還有用pMad (綠色, 具幹細胞特質的細胞) 標示。虛線畫出germaria前端的邊緣。白色虛線圈標示正常的生殖幹細胞；黃色虛線圈標示腫瘤生殖幹細胞；星號標示腫瘤生殖幹細胞的 fusomes。比例尺：10 μ m。(F) 7天和35天，帶有正常和腫瘤幹細胞的germaria百分比。生殖幹細胞的數目寫在柱狀體的上方。***代表P值小於 0.001。(G, H) 35天大的germaria。用1B1 (紅色, fusomes) 和LamC (紅色, niche cell) 來標示；白色三角形指出正常的niche cells, 綠色三角形指出變大及出現在不正常的位置的niche cells。