

In vitro differentiation of germ cells from stem cells—a comparison between primordial germ cells and *in vitro* derived primordial germ cell-like cells

W^o G^o C Chen, M^o De Felici, W^o Shen

Ἰ θυακρῖτῃ Ἰϋαεῖτῃ Δῖαβεμῃτῖκῖν Δῖκαῖν

「ステムセルから生殖細胞への体外分化—始原生殖細胞(PGC)と体外導引始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)比較」

概論

ステムセルの幾らかは限りなく幾つかの或いは全くの細胞系統に分化する事の出来る能力をメンテナンスしながら繁殖出来るユニークなセルタイプである。2003年 Hans R. Schöler らのグループは体外マウス ESCell から卵母細胞如細胞を生成出来る事を報告した。あれから 10 年、どこかでこの研究が進捗しただろうか？達成した功績は？そして依然として残っている課題は？しかしながら最近になって以上のトピックについての多くのレビューが発表されている。この研究でこれまでに検討された体外と体内の胚から区離された始原生殖細胞(PGC)と最もスピーシーの研究が進んでいるマウスのステムセルの異なるタイプから生成された始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)の発生ポテンシャルをフォーカスする。事実始原生殖細胞(PGCs)の形成と分化は男女どちらの配偶子形成にとっても枢必であり体外での始原生殖細胞(PGCs)の正確な生産は機能する生殖細胞を得る基礎となる。

事実

胚或いは胎児に生じる配偶子形成の幾つかの段階は再び実証され著しい進展をなし、体外での出征後生殖腺から生成した卵母細胞と製紙を得る事は既に果たされている。

機能性配偶子を生じるステムセル由来の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)のポテンシャルはある程度肯定性のある結果で幾つかの論文で研究されている。

マウス多分化性ステムセルから生成された人工生殖細胞は子孫を生成出来る精子と卵母細胞に分化出来る機能が備わっている事が章かとなった。

研究事案

胚或いは胎児由来の始原生殖細胞(PGCs)とステムセル由来の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)の主な違いがなにか？

人工生殖細胞は将来の人類の医療に実践する事が出来るか？

生存可能な子孫がステムセル由来配偶子であるまさしく健康な個体から生成されているか？

始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)にとって減数分裂を開始しエピジェネティックリプログラミングを為果する体外環境が十分であるか？

卵母細胞如細胞(OLCs)が体外でマウス ES 細胞から生成することが出来る事を実証した Hübner らによる 2003 年の研究の開始から 1、ステムセルからの生殖細胞導引に拠りある人々には勇気と希望を、それ以外の人々には恐怖の感覚が湧き上がった。Hübner と氏に続く研究 2.3.4.5.6.7. が生殖系列のユニークでミステリアスな特性を全く以て打ち消した。事実哺乳類で致死性細胞体と連続性を維持し得ない生殖系列から由来する生殖細胞が存在する。生殖細胞生物学に従事する多くの研究者は、しかしながら以上の結果の幾つかに驚嘆した。事実 Hübner や氏以外の研究者の論文で急いで生成された人工生殖細胞が本来の生殖細胞で証されていない隠れざる体外発達能力を有していた。いくつかの段階だけが体外で再び構成する事の出来る非常に複雑なプロセスである事を生殖生物学の科学者は知っているとはいえ卵母細胞と精子は、魔法の培養皿に添えられているかの如しだった。然しながら同時に生殖生物学の科学者は 2 つの主な理由に拠り以上の結果に魅惑された。第一にステムセルからの体外配偶子形成モデルが、主に実験手法の限られているヒトでの配偶子形成機構を研究し章かとするを簡単にすると実証されたからである。第 2 に、人工生殖細胞が著しく改善し、生殖補助技術の実際の手順の効率を更に上げ代替不妊治療を推進する事が出来る事となったからである。あまたのスピーシーの最ず人類の生殖行為の急変シナリオは想定する事が困難な結果へ帰結する事が思偲出来る。事実 Hübner の研究から始まる幾多の論文はヒトを内包する多くのスピーシーの、ステムセルから生殖細胞の生成を章かとした 8。特に肝枢なのはある研究者らがマウスの ESCell と iPSCell から体外培成を行った男女生殖細胞様細胞由来の子児の生成論文を章かとした事である 9.10。始原生殖細胞(PGCs)から始まる男女生殖細胞系列は、胚由来の始原生殖細胞(PGCs)の特性及び発達能力とその対応するステムセルから体外で生成された始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)の確実な情報が機能生殖細胞を得る環境を章かとする由で枢必であろう。論文でそのトピックにフォーカスする。

マウス配偶子形成概論

生殖細胞を生成する或いは体外配偶子再形成フェーズを試みる時機想定される生成された生殖細胞の発達段階を確立する事がエッセンスとなる。ここで論じた研究のほとんどはマウスで実験が為されている。配偶子形成の間、マウス配偶子形成と生殖細胞形成に関連する鍵となる遺伝子とその機能の概論を章かとする(表 1)。

セスはあらゆる哺乳類に於いて体外で完全に再生されていない。然しながら胚または胎児に生じるこのプロセスの幾つかの段階が再生され体外での出生後生殖腺から発達した配偶子を得るという著しい進歩が為される事が成就した。昨今では始原生殖細胞(PGCs)から機能配偶子を生成するより頼もしいアプローチが胚から或いは体性腺細胞と始原生殖細胞(PGCs)の思春期前の或いは壮体の宿主の生殖腺への再凝集の後に採取された始原生殖細胞(PGC)が内包する組織の体内移植に基づいている。

胚盤葉上層からの始原生殖細胞(PGCs)の体外導引

2005年 Ohinata らは始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)へ胚盤葉上層細胞の分化を誘導する堅固な体外培養プロトコルを考案した¹⁸。研究チームは始原生殖細胞(PGC)前駆体で表象される Prdm1 (Blimp1 として知られる) または Prdm14 をコードする遺伝子アップストリーム調整エレメントに拠って表象が制御されている遺伝子組み換え蛍光レポーター遺伝子を使い、単離された胚盤葉上層の浮遊培養皿へ BMP と WNT3 を添加し始原生殖細胞(PGC)形成をモニタリングした^{18,19,20,21}。研究チームは以上のレポーターが導引された胚盤葉上層細胞が正当な規律で生殖細胞特異的遺伝子を表象し体内の生殖細胞に似た特徴的なクロマチン修飾を表示することを章かとした。最も枢必要な事は彼らが始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が体内の始原生殖細胞(PGC)の如く思春期前のマウスの精巣の精細管に移植した時に生存能力の有るマウスを生成する為に卵母細胞を受精させたとしても精子に分化することができると実証した事である。

始原生殖細胞(PGCs)から区離され体外育成された卵母細胞と EG 細胞(Embryonic Germ Cell)

性交後 11.5 日から 12.5 日(dpc)の生殖隆起から得られたマウス始原生殖細胞(PGCs)は普通アポトーシスによる変性を受ける前の 3 から 4 日間だけ育成を維持する事が出来る(図 1 と 2)^{22,23}。この時に細胞単層が始原生殖細胞(PGC)の生存と増殖をサポートする為に必要であると考えられていたが、Farini と共同研究者は細胞単層が始原生殖細胞(PGC)が体外で減数分裂を行う為に必要でない事を証明した²⁴。事実この論者たちは最小限の生殖細胞を混入した男女の始原生殖細胞(PGC)が成長因子のカクテルを導入すると減数分裂前期へ入り太糸期/複糸期まで進行する事を実証した。さておいてマウスの始原生殖細胞(PGC)は、成長因子のコンビネーションの連続的存在下で 7-10 日間胚性線維芽細胞単層上に維持され正常な分化経路から逸脱し、ES 如細胞の営巣繁殖地域を形成し EG 細胞(Embryonic Germ Cell)と呼称される事が既に章かとなっている^{25,26,27}。このような生態は生殖腺内始原生殖細胞(PGC)(11.5-12.5 dpc,約 3%)でよりも生殖腺前駆体始原生殖細胞(PGC) (8.5-10.5 dpc,約 18%)でより頻繁に生じ特定のマウス系統の胎児の精巣に発生する胚性癌細胞²⁸での始原生殖細胞(PGCs)変換に似ていた²⁹。EG 細胞(Embryonic Germ Cell)もヒト始原生殖細胞(PGCs)に由来する。今節フィブロネクチン上および GSK3 および ERK キナー

ゼ阻害剤(2i)の存在の基で培成するとマウス始原生殖細胞(PGCs)が細胞単層の非存在の基で EG 細胞を生じ得る事が章かとなっている 30.31。

図 1

減数分裂前の女性マウスの始原生殖細胞(PGCs)から体外卵形成の段階で再生する主な実験的アプローチと結果の概略(テキストに詳細を記述)

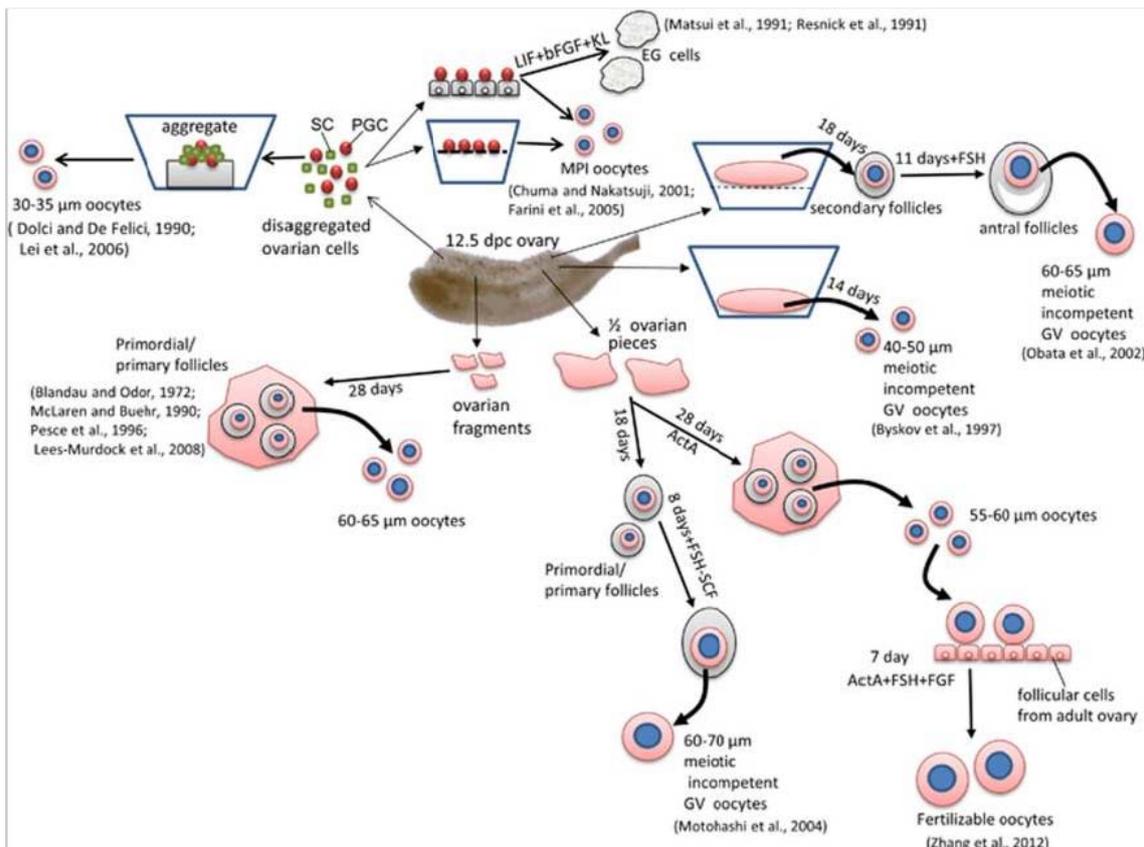
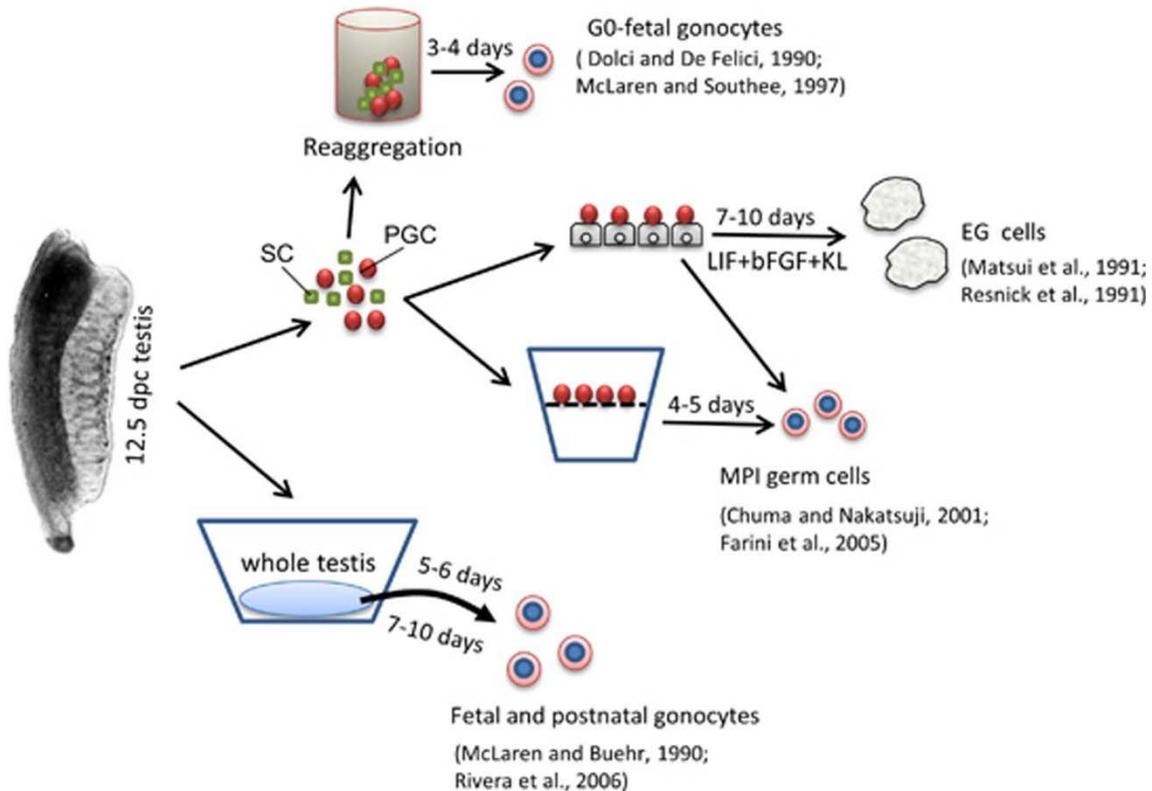


図 2

性交後 12.5 日(dpc)男性マウスの始原生殖細胞(PGCs)から体外精子形成の段階を再生する主な実験的アプローチと結果の概略(テキストに詳細を記述)



知っての通り 1つの論文のみが、生殖腺前駆体の男女始原生殖細胞(PGCs)が性交後 10.5 日(dpc)の AGM(aorta gonad mesonephros)領域の内因性体細胞とミックスし KL(Kit Ligand)生成細胞上に培養したとき単分子層が体内の状況とタイミング比較を行っていた減数分裂前期に入り発達する事が出来た事を章かとした 32。このような結果の部分相違として Farini らは区離された 10.5 日(dpc)の始原生殖細胞(PGCs)が減数分裂を行い、Sycp3、DMC1、REC8 などの減数分裂遺伝子を表象する事が出来たがこの始原生殖細胞(PGCs)は培養 5 日後の細糸期段階以降へ進行することが出来なかったと論じた。同齡の始原生殖細胞(PGCs)は然しながら無傷 AGM(Aorta Gonad Mesonephros)で育成した時、減数分裂前期に入り発達する事が出来た。

女性始原生殖細胞(PGCs)から体外で生成された卵母細胞が発達を続け卵胞に封入される能力は研究されて来なかった。間接的データは然しながら前顆粒膜細胞を帯同せうすに主な卵母細胞が体外での成長フェーズを開始する事が出来るが卵胞の存在する卵巢体細胞を形成していないことを章かとしている。事実 Klinger と De Felici は胎児の卵巢から区離された始期卵母細胞は、KL(Kit Ligand)の刺激により成長フェーズに入る事を証し 33、Lei らは分化の 10 から 11 日後の始原生殖細胞(PGCs)が始期卵母細胞へと発達したが生殖

腺体細胞と凝縮する時に卵胞を形成する事が出来なかったと論じた 34。

総括すると以上の実験は区離された体外男女始原生殖細胞(PGCs)生殖腺が正しい成長因子のカクテルが供給されている時減数分裂前期に入り発達出来る事を証した。いずれのケースでも減数分裂を行い減数分裂前期に入る能力を獲得する為に生殖隆起の発達のマイクロの環境が始原生殖細胞(PGCs)生殖腺にとって枢必であろう。

生殖腺組織内の始原生殖細胞(PGCs)の体外で育成した卵母細胞と原生殖細胞

生殖腺組織内で体外維持された女性始原生殖細胞(PGCs)の発達能力は基本として器官育成、卵巣組織部分育成、始原生殖細胞(PGCs)凝集体部分育成の 3 実験アプローチから研究が実施された(図 1 と 2)。

知る限りだとマウス胚性卵巣の器官体外育成を活使して得られた卵形成のより進歩した発達段階は前胞状および胞状卵胞段階だった 35.36.37。特に Obata と共同研究者たちは体外育成系の 2 段階を経て性交後 12.5 日(dpc)卵巣から卵胞の採取を行った。特記すべきはその卵胞から得られた胚胞卵母細胞は 60~65 μm の直径に達したが減数分裂を再開することが出来なかったという事である。

ある研究者たちは胚卵胞の全体或いは幾つかを育成皿の底に凝着して広がる事の出来る育成を行った 38.39.40.41.42。この育成だとマウス始原生殖細胞(PGCs)は始原または初期卵胞に組み込む事が出来るので効率的な卵母細胞形成を行う事が出来た。以上の構造で卵母細胞は直径 65 から 70 μm に成らんとするまでに驚くべき成長を行ったがしかし減数分裂を再開し完成する能力を得る事が出来なかった。然しながら昨今となりて Zhang らが、その卵母細胞の少数が、Actin Alpha(ActA)が全育成時間培地に存在したとき減数分裂の再開と受精を行う事が出来ると実証した。

最後の第 3 実験アプローチで区離され、そして同じか異なる齢の生殖腺細胞或いは違う細胞タイプと凝集された女性始原生殖細胞(PGCs)は減数分裂を行い直径 30~35 μm の始期卵母細胞を生じた。以上の細胞は然しながら卵胞を形成し、更なる体外成長フェーズに進む事が出来なかった 34.38.43。

以上の体外実験は体外育成した卵巣組織に存在する第一卵母細胞に女性始原生殖細胞(PGCs)の発達を導引する事が比較的簡単である事を高調している。この体外実験は更に卵母細胞の大部分が減数分裂前期を完了する事が出来、正しい卵胞から成長フェーズを開始し完了する事が出来る事を証している。然しこれまでに立案された体外条件だと卵母細胞が十分な成長を行ったとしても減数分裂生成と受精を行う事が稀で受精後の胚の発育を行

う事が出来なかった。

胚性精巣や精巣組織を体外培成した男性始原生殖細胞(PGCs)の発達能力に関する有効な情報がほとんど存在しなかった。初期の論文は性交後 12.5 日(dpc)の男性始原生殖細胞(PGCs)がそれと同じ或いは違うタイプの、体内で実施されるが如く細胞周期 G0 を開始し精原細胞前駆体を停止する体細胞と凝集すると述べていた 38.43。さて、性交後 11.5 日(dpc)の生殖隆起から得られた男性始原生殖細胞(PGCs)は独自の性腺細胞或いは肺細胞と凝集する時、減数分裂を行う 44。培成された無傷精巣も性交後 12.5 日(dpc)で細胞周期 G0 の停止を行ったが精巣コードが正しく入力されない時だけ生殖隆起は性交後 11.5 日(dpc)で減数分裂を行う 38.45。一度形成されると精原細胞前駆体は器官培成で数日間生存する事が出来、出生後原生殖細胞と同等の発達段階へと届く事が出来る 46。然しながら男性始原生殖細胞(PGCs)が以上の条件で精子形成を行えるかどうかは不明である。

事実出生後精原細胞から体外で哺乳動物の精子形成全体を再構成する為に複雑な証明が為された。面白い事に生後或いは思春期より前のマウスの原生殖細胞/精原細胞を完全な体外精子形成するという論文が今になって提供されている。Sato らは唯一の原生殖細胞或いは始原精原細胞を内包する新生マウスの精巣組織パーツが無血清培成条件で精子細胞と精子を体外生成する事が出来ると実証した 47。得られた精子細胞と精子は細胞質内受精を経て健康で受精可能な子児となる事が出来た。同じ理論で Sato らは Spermatogonial Stem Cells(SSCs)からの精子形成をも証した 48。柔らかな寒天での立体精巣培成に基づく理論に拠り、とても低効率だが思春期前の精原細胞に生殖細胞の減数分裂と形態学的に云うところの精子へ進行が出来る 49。

以上の最終結果が。一度男性始原生殖細胞(PGCs)が生後の原生殖細胞/精原細胞へ導引されると以上の理論で完全な体外精子形成が施行されるという事を実証している。

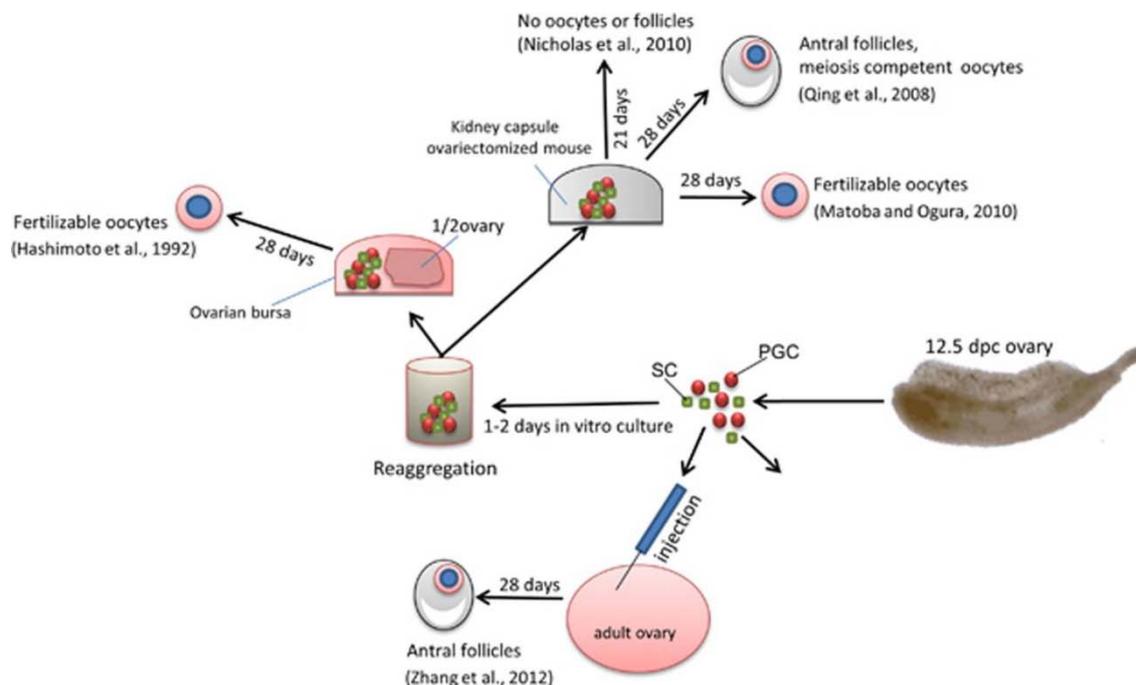
生体移植始原生殖細胞(PGCs)由来の精子と卵子

卵巣体細胞で減数分裂前女性始原生殖細胞(PGCs)を凝集する或いは腎臓カプセルや同系宿主卵巣嚢に移植する事によって卵巣を再び構築すると前胞状および胞状卵胞を形成し、減数分裂有能であっても受精した卵母細胞へと発展する事が出来るという論文がすくなく存在する(図 3)34.50.51。以上の点に関して、卵巣の発達段階がありそこから始原生殖細胞(PGCs)が区離され生殖細胞と体細胞相互交流の正しいシンクロナイゼーションが為される事が生殖細胞の生存および移植後卵形成完了の為に枢必である事を指摘する事が肝心である。事実 Nicholas らは性交後 13.5 日(dpc)以前の再構成移植卵巣内で始原生殖細胞は減数分裂前期を完成したが生存を続け卵胞を形成する事が出来なかったと実証した。性交後 12.5 日(dpc)の始原生殖細胞(PGCs)を後の発達段階の胎児の卵巣由来体細胞と凝集さ

せた時も上記の結果となり、以上の始原生殖細胞(PGCs)は腎臓カプセル移植後或いは体外培養の最中に卵胞を形成する能力が存在する 34.50。しかし上記を引用した他の論文が性交後 12.5 日(dpc)卵巣細胞の凝集体が受精可能な卵母細胞を生成する事が出来たと伝えている 52.53。

図 3

減数分裂前の女性マウスの始原生殖細胞(PGCs)からの生体卵形成段階を再生する為に活用する主な実験的アプローチと結果の概略(テキストに詳細を記述)



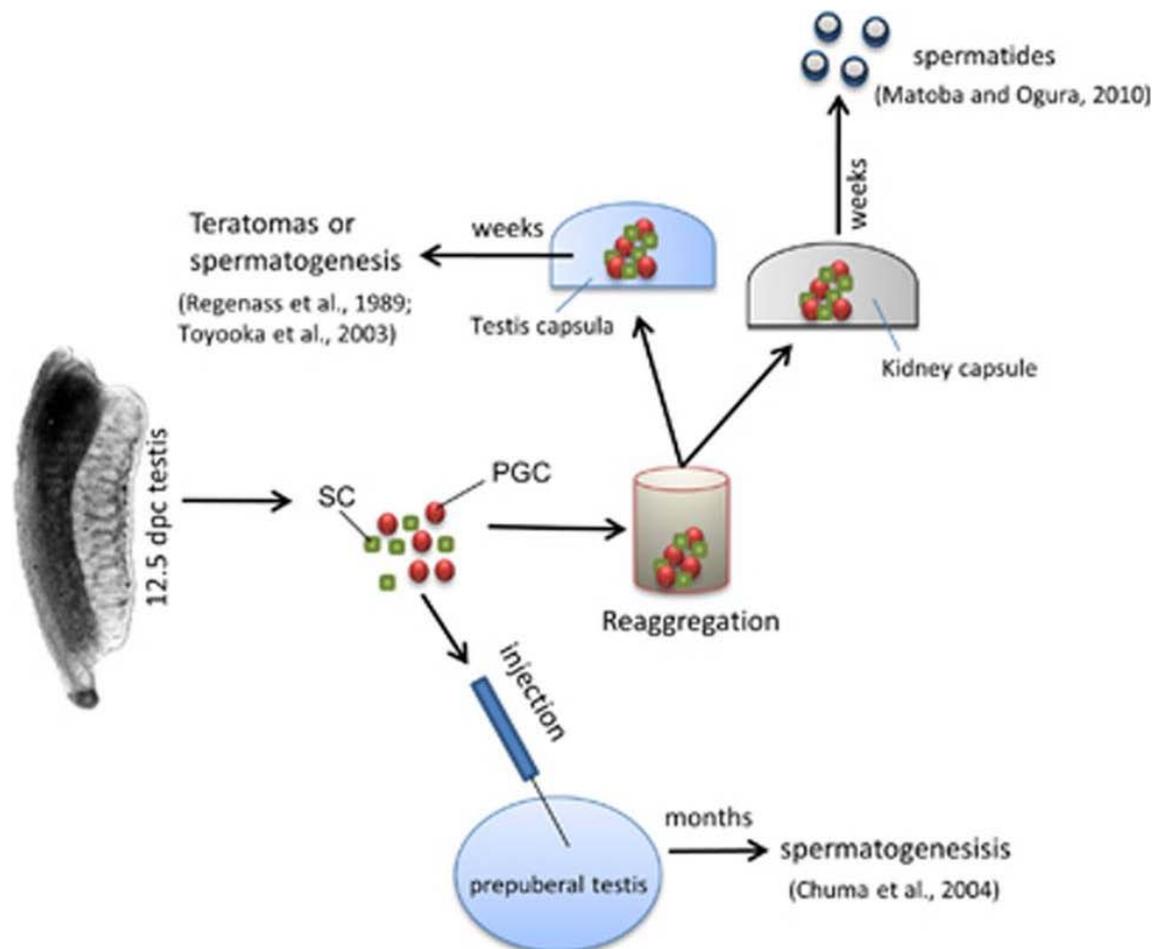
昨今 Zhang らは性交後 12.5 日(dpc)の胎児から得られた蛍光 GFP(Green Fluorescent Protein)卵巣細胞を直接女性壮体レシピエント卵巣へ注入した 54。2 か月後 Zhang らは胞状卵胞と前胞状卵胞が卵母細胞と周囲の顆粒膜細胞が蛍光 GFP(Green Fluorescent Protein)を表象すると把握した。Zou らは女性壮体マウスの卵巣へ移植されると想定されるマウスの OSC(Oogonial Stem Cell)が生存能力のある子孫を作り出すことが出来る事を伝えた 55。軌を一にする結果が壮体ヒト卵巣皮質生体検査組織に注入され、更に免疫抑制女性マウスに移植されたと想定される OSC(Oogonial Stem Cell)が生殖年齢の女性から単離された時も生じる事が実証された 56。以上の結果は卵巣の環境が確実に正しい卵形成をサポートする為に枢要であるだけでなく通常、胎児そして出生後早期の年齢で生じる卵形成のプロセスが壮体の個体の出生後の卵巣で、或いは異所箇所が生じる事を証している 57.58.59。

体内移植で精子形成を行うという男性の生殖腺前駆体と生殖腺の始原生殖細胞(PGCs)

の能力は幾つかの論文で研究が存在する(図 4)。以前の研究は性交後 12.5 から 15.5 日(dpc)のマウス精巣は壯体精巣被膜下に移植された精子形成か或いは精細管と精巣の構造奇形を再び構成する事を証している 60.61。続く Brinster らの精子の研究 62 は不妊のレシピエントマウスの精巣へのドナーマウスからの精原細胞の移植は、ドナー由来の精子形成の結果に至ると論じた。Chuma らは男性のエピブラストと始原生殖細胞(PGCs)が思春期前不妊マウスの精細管への移植の後驚くべき事に精子形成コロニーを確立すると報じた 63。Matoba と Ogura は精子細胞は男性の性交後 12.5 日(dpc)始原生殖細胞(PGCs)から得ることが出来、壯体マウス腎臓被膜下移植を行い通常の卵母細胞へ移植すると意義深いことに生存能力のある生じさせることができると報じた 53。

図 4

性交後 12.5 日(dpc)男性マウス始原生殖細胞(PGCs)から生体内精子形成の段階を再生する実験アプローチと結果の概略(テキストに詳細を記述)



壯体の精巣の奇形または分化した生殖細胞へ移植した男性始原生殖細胞(PGCs)はドナーの遺伝子型の臨界影響を受けていて体内条件下で生存し続けると時間と空間でフレキシブルな発達を示す論が存在する。特に枢必なのが出生後の精巣細管が少なくとも思春期ま

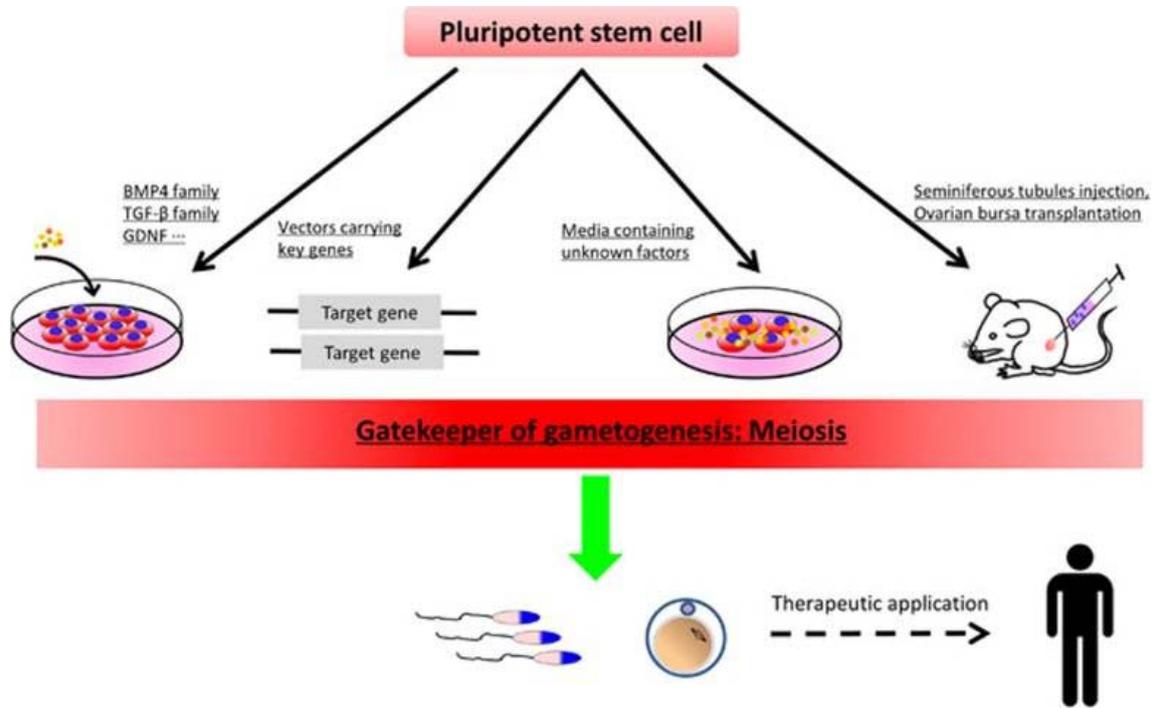
で、エピブラストから生後精原基細胞へ完全な生成プロセスを行う為、男性始原生殖細胞(PGCs)へマイクロ環境を与えられると論じていることである。

始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)からの体外生体内配偶子形成

Hübner ら 1 から Hayashi ら 9.10 の画期的研究で ESCell、iPSCell から壮体基細胞に亘る多彩な基細胞から始原生殖細胞如細胞(PCGLCs)が由来すると論じた。今回の論文の対象となっていない以上の論文の詳細な記述と議論が他の論文に存在する 2.4.5.6.64.65.66.67.68.69.70。あっさりと言うならば始原生殖細胞(PGCs)導引術式が度々論議されるという事だ。胚様体の形成が外胚葉から男性始原生殖細胞(PGCs)分化を導引し BMP4 と WNT3 などのサイトカインの成長因子が使用される事が知られている(いくつかの研究では、始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が EB から自発形成するという。Geijsen ら 71 Vincent ら 72 の研究)。生殖細胞得意 Dazl 遺伝子と Mvh 遺伝子などの生殖細胞形成を調整する鍵遺伝子の過剰表象 73.74。始原生殖細胞如細胞(PCGLCs)へ知られざるファクターを導引した調整培地(図 5)75.76。以上の研究のほとんどはしかしながら不備が存在する。例えば基細胞(Stem Cell)と始原生殖細胞(PGCs)、そして体外で生成された始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)の正確な分子特性の区別の不備。最も枢必要な事は以下で議論されるように以上の始原生殖細胞如細胞(PCGLCs)の性能が機能配偶子を生じる事が幾つかの論文で部分的に肯定的な結果で論じられた事である。

図 5

生殖細胞の導引術式と医療アプリケーションのポテンシャル



2011 から 2012 年の Hayashi らに拠る論文 9.10 は ESCell や iPSCell から始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)から始原生殖細胞を導引する最高水準のプロトコルだと認識されている。この手順だと基細胞は移植後のエピブラストの状態を維持する細胞の新型へ分化し、それはエピブラスト様細胞(EpiLCs)と呼称が為されている。他の成長因子のカクテルの導引の後エピブラスト様細胞(EpiLCs)は確実に(約 30%)体内で生じる事象が如く始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)へ分化した。以上のメソッドを活使して昨今 ESCell から始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が得られている。面白いことに Saitou らの研究グループは成長因子がなくとも転写因子 Blimp1、Prdm14 そして Tfap2c (AP2 γ として知られている)の過剰表象がマウスエピブラスト様細胞(EpiLCs)を迅速効率的に始原生殖細胞(PGCs)へ導引すると証じた 77。Hayashi がプロトタイプである術式も明らかな進歩が存る 78。始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)は生体内移植後に受精可能な精子と卵母細胞へ分化し得るとの Hayashi らの伝証を論じるとする。

体外へ区離された始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)由来の男性生殖細胞と卵母細胞

存じの通り始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が体外で正常な減数分裂前期を行う事を証する説得力のある論が存在しない。事実数人の論者が減数分裂遺伝子や SCP3、 γ H2AX 或いは DMC1 という蛋白質の表象を論じたがその性能を研究したところで減数分裂の染色

体の典型的な形態学的形式で深刻なエラーの報告が為された 79.80.81。

以上の顛末も存在するが初期の Hübner の研究とそれに続く論文で培成皿の基細胞で卵母細胞如構造或いは卵母細胞如細胞(OLCs)の形成が実証されている 52.76.80.82.83.84.85。男女胎児 porcine 或いは新生児マウスからの皮膚由来基細胞から卵丘卵母細胞複合体のような凝集体が生じるのが驚くべき事である 75.86.87.88.89.90。然しながら全くのケースで卵母細胞如細胞(OLCs)は形態学的なそして原子構成異常を起こし、機能性証明が為されていなかった。ある体外条件だと幾つかのタイプの基細胞が減数分裂から独立した形態学的原子構成的な卵母細胞の特徴と卵胞部分を得る事が出来る積義が通じるだろう 91。事実 Dokscin らが論じた通りマウス卵母細胞の成長および分化は減数分裂の染色体イベントと解離している 92。幾つかの生き残った Stra8 の存在しない成長し卵母細胞如細胞(OLCs)へ分化した女性生殖細胞は透明帯へ一体化され卵胞へ組み込まれ減数分裂がはじまる事なく排卵と受精が為され、特に興味深い事に以上の卵母細胞は体外受精後の 2 細胞期に停止した事が実証されている。

体外でのハプロイド男性生殖細胞の形成がマウス 71.82.93.94 とヒト 73.74.95.96.97 の EScell、iPSCell、そして壯体基細胞由来の円形精子細胞或いは精子の形態をしていることが幾つかの論文で伝えられている。然しながらこのプロセスの効率はとても低く、テストを行うとハプロイド細胞が部分的にしか機能しないことが証じられた。事実マウスにおいて体外で生成されたハプロイド細胞が卵母細胞と受精出来るとした論文は 2 つだけである。Geijsen らはレチノイン酸(RA)で処されマウス胚体(EB)で区離されたハプロイド細胞を検出し卵母細胞への細胞の注入が低速でのエピプラスト様構造の形成へと至る事を証した。Nayernia ら 93 は ES 細胞単層からの精子のような形態を有するハプロイド細胞の誘導と細胞質内注射による子孫生成が出来たがこれは成長異常の為に生誕 5 か月以内で死亡したと伝え。

生殖腺体内始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)を体外培成した卵母細胞と原生殖細胞

上述の通り実験アプローチが区々存在し、体外で培成した胚性卵巣組織内の成長した卵母細胞へ女性始原生殖細胞(PGCs)由来の胚の発達導引を行う事は比較して簡単だと謂える。ある決まった条件で卵母細胞が卵胞を形成し稀にであるが成長フェーズを完成して受精を行う事が可能である 42。然しながら全くのケースで卵母細胞如細胞(OLCs)は形態学的なそして原子構成異常を起こし、機能性証明が為されていなかった。

知る限りだと胚由来の卵巣組織内での始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)の体外培成の唯一の試みは Hayashi と Surani に拠って為された 98。エピプラスト様細胞(EpiLCs)由来の

StellaGFP(Green Fluorescent Protein)活性始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)は性交後 12.5 日(dpc)卵巣の生殖腺細胞とミックスし、遠心区離の後、細胞懸濁液が凝集体に残されトランスウェルインサート上にある性交後 12.5 日(dpc)卵巣の小さなピースの隙間へ種播された。育成から 40 日後、同じ共同育成に存在する内因性生殖細胞と区別の出来ない強い StellaGFP(Green Fluorescent Protein)表象のある卵母細胞如細胞(OLCs)は 5000 始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)に 1 卵母細胞の頻度だったが存在が確認された。

精巣組織内で育成された男性胚由来始原生殖細胞(PGCs)が精原細胞或いは原生殖細胞へ分化する能力と乖離しているという入手可能な情報が始原生殖細胞(PGCs)が精子形成を行わないその所以だった。体外で精子形成を再び構成する事が困難であり可能でない事は前のパラグラフで述べた。精巣組織内またはセルトリ細胞単層上の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)を長い間維持するという試みは為されていない。男性始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)を識別しハプロイド状態で胚体に維持する研究をすると、始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)がある程度分化する事の出来る精巣と似た構造を形成すると仮定する事が出来るだろう。

育成した生後あるいは思春期前の原生殖細胞で精子形成を可能とする新たな術式として男性(XY)始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)を精原細胞/原生殖細胞へ分化し完全な精子形成させようとする上述した試みが伝えられている。

体内移植された始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)由来の精子と卵母細胞

上述の通り、胚由来の始原生殖細胞(PGCs)を少なくとも性交後 13.5 日(dpc)から卵巣体細胞と凝縮し腎臓カプセル或いは同遺伝子系マウスの卵巣嚢下へ移植すると受精可能な卵母細胞を生成する事が出来ると幾つかの論文が伝えていて、始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が上記の能力を有するかどうか研究する為この研究的アプローチを活使している。

Nicholas らはマウス ESCell から得られた蛍光 GFP(Green Fluorescent Protein)始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)を乖離した新生マウスの卵巣組織と凝縮した 80。レシピエントマウスの腎臓被膜下への移植後、論者は始期卵胞内の 2 つの移植ピースに幾つかの蛍光 GFP(Green Fluorescent Protein)卵母細胞が存在する事を確認した。上記の結果が Dyce ら、Chuang ら 90.99Hayashi らの研究からも得られ、彼らは性交後 12.5 日(dpc)でホストマウスの卵巣嚢下で生体移植を行った卵巣細胞である エピブラスト様細胞(EpiLCs)(上述)から得られた蛍光 GFP(Green Fluorescent Protein)始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)の凝縮後卵母細胞を得る最も効果の有る術式を論じている。

エピプラスト様細胞(EpiLCs)由来の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)は胚由来の始原生殖細胞(PGCs)のように思春期前のマウス精細管に移植すると精子に分化する事が出来たと Hayashi らが報告した 9。この精子は体外での顕微授精を経て健康な個体を生じた。Zhu らが伝えたところによるとマウス胚体の iPSCell から生じた生殖細胞はレシピエントの精巣に移植した後、精原細胞から円形精子細胞へと至る男性生殖細胞に分化する事が出来た 100。Toyooka らは男性始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)から精子を生成した最初の成功者として記録されて然るべきであろう 61。胚体から生殖細胞を導引する為に BMP4 を活使した論者は男性始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が宿主精巣カプセルの下へ移植された時性交後 12.5 日(dpc)の精巣から生成した生殖腺細胞の凝集体で精子へ分化する事が出来たと伝えている。だが以上の細胞の生殖能力については研究されていない。

結論

マウスから生まれる人工生殖細胞は精子と卵母細胞に分化し健康な個体を生じさせる事が出来たので機能するという事が出来る。この点でマウスの始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)の生態はマウスの始原生殖細胞(PGCs)のそれと同じく機能すると言える。しかしながらこの2つの細胞は生体反応で明らかな違いが存在した。上記の違いの理由は明確とは言えないが、この結果は始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が胚由来の始原生殖細胞(PGCs)と同一性が存在しないという事を証し生殖隆起が、始原生殖細胞(PGCs)の生存/繁殖および分化に必須の因子を生成している事を仄めかしている。それゆえに人工と自然の始原生殖細胞(PGCs)は内部に同封される或いは配偶子形成を経て成長するために適した体細胞と再凝集する必要があるという事は驚くべき事とは言えない。しかしながら体外での精子形成と卵子形成を完成させる為の十分な体外培成条件はいまもって確立されていない。

全般として区離された体外始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)を再び構成する為に最も困難な事は減数分裂の正しい始まりと進行、そして男性女性の配偶子形成に伴うエピジェネティックな変化という2つのプロセスである。基細胞から生殖細胞を導引する過程でエピジェネシスと減数分裂が正しく発生するかどうかを決定する事は正しい配偶子機能を取得する為に明らかに枢要である。効率的に減数分裂を受ける幹細胞由来の生殖細胞の明らかな失敗にもかかわらず減数分裂の始まり進行を制御する原子構成構造機構と減数分裂の失敗原因の究明の研究機会を提供している。

体外での配偶子形成前提条件として生体内配偶子形成構造機構の包括した理解を行うべきである。以上の複雑なプロセスの多くが知られざるままであり配偶子形成の異なる依存段階獲得と 3Dマイクロ環境での生殖細胞の体外長時間生命維持を行い得る共培成術の進

歩は基細胞から生殖細胞をレンダリングする為に必要な信頼性の高い手段を提供するであろう。基細胞から生殖細胞を生産する最初の一步は既に約束されているが然しその道範は長く遠い。

Glossary

ES embryonic stem

PGCs primordial germ cells

PGC-LC PGC-like cells

OLCs oocyte-like cells

iPS induced pluripotent stem

dpc days post coitum

dpp days postpartum

BMP bone morphogenetic proteins

WNT3 wntless-type 3

KL kit ligand

RA retinoic acid

EG embryonic germ

GSK3 glycogen synthase kinase 3

ERK extracellular signal regulated kinase

AGM aorta-gonad-mesonephros

ActA Activin A

SSCs spermatogonial stem cell

GFP green fluorescent protein

OSCs oogonia stem cells

EBs embryoid bodies

SDSCs skin-derived stem cells

EpiLCs epiblast-like cells, EpiSCs, epiblast stem cells

References

1. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300: 1251–1256. [[PubMed](#)]
2. Newson AJ, Smajdor AC. Artificial gametes: new paths to parenthood? *J Med Ethics* 2005; 31: 184–186. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
3. Scholer HR, Wu G. Oocytes originating from skin? *Nat Cell Biol* 2006; 8: 313–314. [[PubMed](#)]
4. Hua J, Sidhu K. Recent advances in the derivation of germ cells from the embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 399–411. [[PubMed](#)]
5. Hayashi K, Saitou M. Perspectives of germ cell development *in vitro* in mammals. *Anim Sci J* 2014; 85: 617–626. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
6. Handel MA, Eppig JJ, Schimenti JC. Applying 'gold standards' to in-vitro-derived germ cells. *Cell* 2014; 157: 1257–1261. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
7. Magnusdottir E, Surani MA. How to make a primordial germ cell. *Development* 2014; 141: 245–252. [[PubMed](#)]
8. Irie N, Weinberger L, Tang WW, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS et al. SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 2015; 160: 253–268. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
9. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 2011; 146: 519–532. [[PubMed](#)]
10. Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from *in vitro* primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 2012; 338: 971–975. [[PubMed](#)]
11. Tam PP, Snow MH. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1981; 64: 133–147. [[PubMed](#)]
12. Lobascio AM, Klinger FG, Scaldaferrri ML, Farini D, De Felici M. Analysis of programmed cell death in mouse fetal oocytes. *Reproduction* 2007; 134: 241–252. [[PubMed](#)]
13. De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldaferrri ML, Iona S, Lobascio M. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 182–191. [[PubMed](#)]
14. Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24: 263–286. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
15. Sakai Y, Suetake I, Shinozaki F, Yamashina S, Tajima S. Co-expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a2 and Dnmt3L in gonocytes of mouse embryos. *Gene Expr Patterns* 2004; 5: 231–237. [[PubMed](#)]
16. Hecht NB, Bower PA, Waters SH, Yelick PC, Distel RJ. Evidence for haploid expression of mouse testicular genes. *Exp Cell Res* 1986; 164: 183–190. [[PubMed](#)]
17. Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse. *Nature* 1957; 180: 1137–1138. [[PubMed](#)]
18. Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005; 436: 207–213. [[PubMed](#)]

19. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K, Saitou M. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev* 2008; 22: 1617–1635. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
20. Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M et al. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet* 2008; 40: 1016–1022. [[PubMed](#)]
21. Grabole N, Tischler J, Hackett JA, Kim S, Tang F, Leitch HG et al. Prdm14 promotes germline fate and naive pluripotency by repressing FGF signalling and DNA methylation. *EMBO Rep* 2013; 14: 629–637. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
22. De Felici M. Twenty years of research on primordial germ cells. *Int J Dev Biol* 2001; 45: 519–522. [[PubMed](#)]
23. De Felici M, Scaldaferrri ML, Lobascio M, Iona S, Nazzicone V, Klinger FG et al. Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 197–206. [[PubMed](#)]
24. Farini D, Scaldaferrri ML, Iona S, La Sala G, De Felici M. Growth factors sustain primordial germ cell survival, proliferation and entering into meiosis in the absence of somatic cells. *Dev Biol* 2005; 285: 49–56. [[PubMed](#)]
25. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992; 359: 550–551. [[PubMed](#)]
26. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; 70: 841–847. [[PubMed](#)]
27. Moe-Behrens GH, Klinger FG, Eskild W, Grotmol T, Haugen TB, De Felici M. Akt/PTEN signaling mediates estrogen-dependent proliferation of primordial germ cells *in vitro*. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2630–2638. [[PubMed](#)]
28. Donovan PJ. The germ cell—the mother of all stem cells. *Int J Dev Biol* 1998; 42: 1043–1050. [[PubMed](#)]
29. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13726–13731. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
30. Leitch HG, Blair K, Mansfield W, Ayetey H, Humphreys P, Nichols J et al. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development* 2010; 137: 2279–2287. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
31. Leitch HG, Nichols J, Humphreys P, Mulas C, Martello G, Lee C et al. Rebuilding pluripotency from primordial germ cells. *Stem Cell Rep* 2013; 1: 66–78. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
32. Nakatsuji N, Chuma S. Differentiation of mouse primordial germ cells into female or male germ cells. *Int J Dev Biol* 2001; 45: 541–548. [[PubMed](#)]
33. Klinger FG, De Felici M. *In vitro* development of growing oocytes from fetal mouse oocytes: stage-specific regulation by stem cell factor and granulosa cells. *Dev Biol* 2002; 244: 85–95. [[PubMed](#)]
34. Lei L, Zhang H, Jin S, Wang F, Fu M, Wang H et al. Stage-specific germ-somatic cell interaction directs the primordial folliculogenesis in mouse fetal ovaries. *J Cell Physiol* 2006; 208: 640–647. [[PubMed](#)]
35. Obata Y, Kono T, Hatada I. Gene silencing: maturation of mouse fetal germ cells *in vitro*. *Nature* 2002; 418: 497. [[PubMed](#)]

36. Dong HS, Li L, Song ZH, Tang J, Xu B, Zhai XW et al. Premeiotic fetal murine germ cells cultured *in vitro* form typical oocyte-like cells but do not progress through meiosis. *Theriogenology* 2009; 72: 219–231. [[PubMed](#)]
37. Song Z, Min L, Pan Q, Shi Q, Shen W. Maternal imprinting during mouse oocyte growth *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387: 800–805. [[PubMed](#)]
38. McLaren A, Buehr M. Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ Dev* 1990; 31: 185–195. [[PubMed](#)]
39. Pesce M, Cerrito MG, Travia G, Russo MA, De Felici M. *In vitro* development of growing oocytes from fetal and early postnatal mouse ovaries. *Int J Dev Biol* 1996; 229S–230S. [[PubMed](#)]
40. Byskov AG, Guoliang X, Andersen CY. The cortex-medulla oocyte growth pattern is organized during fetal life: an *in-vitro* study of the mouse ovary. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 795–800. [[PubMed](#)]
41. Lees-Murdock DJ, Lau HT, Castrillon DH, De Felici M, Walsh CP. DNA methyltransferase loading, but not de novo methylation, is an oocyte-autonomous process stimulated by SCF signalling. *Dev Biol* 2008; 321: 238–250. [[PubMed](#)]
42. Zhang ZP, Liang GJ, Zhang XF, Zhang GL, Chao HH, Li L et al. Growth of mouse oocytes to maturity from premeiotic germ cells *in vitro*. *PloS One* 2012; 7: e41771. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
43. De Felici M, Dolci S. Cellular interactions of mouse fetal germ cells in *in vitro* systems. *Curr Top Dev Biol* 1987; 23: 147–162. [[PubMed](#)]
44. McLaren A, Southee D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol* 1997; 187: 107–113. [[PubMed](#)]
45. Byskov AG, Saxen L. Induction of meiosis in fetal mouse testis *in vitro*. *Dev Biol* 1976; 52: 193–200. [[PubMed](#)]
46. Livera G, Delbes G, Pairault C, Rouiller-Fabre V, Habert R. Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 507–521. [[PubMed](#)]
47. Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N et al. *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun* 2011; 2: 472. [[PubMed](#)]
48. Sato T, Katagiri K, Kubota Y, Ogawa T. *In vitro* sperm production from mouse spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. *Nat Protoc* 2013; 8: 2098–2104. [[PubMed](#)]
49. Abu Elhija M, Lunenfeld E, Schlatt S, Huleihel M. Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in a soft agar culture system. *Asian J Androl* 2012; 14: 285–293. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
50. Nicholas CR, Haston KM, Pera RA. Intact fetal ovarian cord formation promotes mouse oocyte survival and development. *BMC Dev Biol* 2010; 10: 2. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
51. Koichiro H, Motoko N, Nakatsuji N. Mouse offspring derived from fetal ovaries or reagggregates which were cultured and transplanted into adult females. *Development, Growth & Differentiation* 1992; 34: 233–238.
52. Qing T, Shi Y, Qin H, Ye X, Wei W, Liu H et al. Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. *Differentiation* 2007; 75: 902–911. [[PubMed](#)]
53. Matoba S, Ogura A. Generation of functional oocytes and spermatids from fetal primordial germ cells after ectopic transplantation in adult mice. *Biol Reprod* 2011; 84: 631–638. [[PubMed](#)]

54. Zhang H, Zheng W, Shen Y, Adhikari D, Ueno H, Liu K. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 12580–12585. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
55. Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 631–636. [[PubMed](#)]
56. White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 2012; 18: 413–421. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
57. Chen B, Zhang L, Tang J, Feng X, Feng Y, Liang G et al. Recovery of functional oocytes from cultured premeiotic germ cells after kidney capsule transplantation. *Stem Cells Dev* 2013; 22: 567–580. [[PubMed](#)]
58. Shen W, Li L, Bai Z, Pan Q, Ding M, Deng H. *In vitro* development of mouse fetal germ cells into mature oocytes. *Reproduction* 2007; 134: 223–231. [[PubMed](#)]
59. Shen W, Zhang D, Qing T, Cheng J, Bai Z, Shi Y et al. Live offspring produced by mouse oocytes derived from premeiotic fetal germ cells. *Biol Reprod* 2006; 75: 615–623. [[PubMed](#)]
60. Regenss U, Friedrich TD, Stevens LC. Experimental induction of testicular teratomas in dissociated-reaggregated chimaeric gonads. *J Embryol Exp Morphol* 1982; 72: 153–167. [[PubMed](#)]
61. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11457–11462. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
62. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11298–11302. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
63. Chuma S, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S et al. Spermatogenesis from epiblast and primordial germ cells following transplantation into postnatal mouse testis. *Development* 2005; 132: 117–122. [[PubMed](#)]
64. Surani MA. Stem cells: how to make eggs and sperm. *Nature* 2004; 427: 106–107. [[PubMed](#)]
65. Aflatoonian B, Moore H. Germ cells from mouse and human embryonic stem cells. *Reproduction* 2006; 132: 699–707. [[PubMed](#)]
66. Wu MY, Chow SN. Derivation of germ cells from mouse embryonic stem cells. *J Formos Med Assoc* 2005; 104: 697–706. [[PubMed](#)]
67. West JA, Daley GQ. *In vitro* gametogenesis from embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 688–692. [[PubMed](#)]
68. Oktem O, Oktay K. Stem cells: a perspective on oocytes. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1127: 20–26. [[PubMed](#)]
69. Marques-Mari AI, Lacham-Kaplan O, Medrano JV, Pellicer A, Simon C. Differentiation of germ cells and gametes from stem cells. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 379–390. [[PubMed](#)]
70. Volarevic V, Bojic S, Nurkovic J, Volarevic A, Ljujic B, Arsenijevic N et al. Stem cells as new agents for the treatment of infertility: current and future perspectives and challenges. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 507234. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]

71. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggen K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004; 427: 148–154. [[PubMed](#)]
72. Vincent JJ, Li Z, Lee SA, Liu X, Etter MO, Diaz-Perez SV et al. Single cell analysis facilitates staging of Blimp1-dependent primordial germ cells derived from mouse embryonic stem cells. *PLoS One* 2011; 6: e28960. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
73. Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 2009; 462: 222–225. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
74. Medrano JV, Ramathal C, Nguyen HN, Simon C, Reijo Pera RA. Divergent RNA-binding proteins, DAZL and VASA, induce meiotic progression in human germ cells derived *in vitro*. *Stem Cells* 2012; 30: 441–451. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
75. Dyce PW, Liu J, Tayade C, Kidder GM, Betts DH, Li J. *In vitro* and *in vivo* germ line potential of stem cells derived from newborn mouse skin. *PLoS One* 2011; 6: e20339. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
76. Lacham-Kaplan O, Chy H, Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* 2006; 24: 266–273. [[PubMed](#)]
77. Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, Saitou M. Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors *in vitro*. *Nature* 2013; 501: 222–226. [[PubMed](#)]
78. Li Y, Wang X, Feng X, Liao S, Zhang D, Cui X et al. Generation of male germ cells from mouse induced pluripotent stem cells *in vitro*. *Stem Cell Res* 2014; 12: 517–530. [[PubMed](#)]
79. Tedesco M, Desimio MG, Klinger FG, De Felici M, Farini D. Minimal concentrations of retinoic acid induce stimulation by retinoic acid 8 and promote entry into meiosis in isolated pregonadal and gonadal mouse primordial germ cells. *Biol Reprod* 2013; 88: 145. [[PubMed](#)]
80. Nicholas CR, Haston KM, Grewall AK, Longacre TA, Reijo Pera RA. Transplantation directs oocyte maturation from embryonic stem cells and provides a therapeutic strategy for female infertility. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 4376–4389. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
81. Novak I, Lightfoot DA, Wang H, Eriksson A, Mahdy E, Hoog C. Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells* 2006; 24: 1931–1936. [[PubMed](#)]
82. Kerkis A, Fonseca SA, Serafim RC, Lavagnoli TM, Abdelmassih S, Abdelmassih R et al. *In vitro* differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells* 2007; 9: 535–548. [[PubMed](#)]
83. Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 11–20. [[PubMed](#)]
84. Salvador LM, Silva CP, Kostetskii I, Radice GL, Strauss JF 3rd. The promoter of the oocyte-specific gene, *Gdf9*, is active in population of cultured mouse embryonic stem cells with an oocyte-like phenotype. *Methods* 2008; 45: 172–181. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
85. Yu Z, Ji P, Cao J, Zhu S, Li Y, Zheng L et al. *Dazl* promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells. *J Mol Cell Biol* 2009; 1: 93–103. [[PubMed](#)]

86. Dyce PW, Shen W, Huynh E, Shao H, Villagomez DA, Kidder GM et al. Analysis of oocyte-like cells differentiated from porcine fetal skin-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20: 809–819. [[PubMed](#)]
87. Dyce PW, Wen L, Li J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 384–390. [[PubMed](#)]
88. Park BW, Shen W, Linher-Melville K, Li J. Deleted in azoospermia-like enhances *in vitro* derived porcine germ cell formation and meiosis. *Stem Cells Dev* 2013; 22: 939–950. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
89. Shen W, Park BW, Toms D, Li J. Midkine promotes proliferation of primordial germ cells by inhibiting the expression of the deleted in azoospermia-like gene. *Endocrinology* 2012; 153: 3482–3492. [[PubMed](#)]
90. Park BW, Pan B, Toms D, Huynh E, Byun JH, Lee YM et al. Ovarian-cell-like cells from skin stem cells restored estradiol production and estrus cycling in ovariectomized mice. *Stem Cells Dev* 2014; 23: 1647–1658. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
91. Sun YC, Cheng SF, Sun R, Zhao Y, Shen W. Reconstitution of gametogenesis *in vitro*: meiosis is the biggest obstacle. *J Genet Genomics* 2014; 41: 87–95. [[PubMed](#)]
92. Dokshin GA, Baltus AE, Eppig JJ, Page DC. Oocyte differentiation is genetically dissociable from meiosis in mice. *Nat Genet* 2013; 45: 877–883. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
93. Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rath sack K, Drusenheimer N et al. *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 2006; 11: 125–132. [[PubMed](#)]
94. Lue Y, Erkkila K, Liu PY, Ma K, Wang C, Hikim AS et al. Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. *Am J Pathol* 2007; 170: 899–908. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
95. Eguizabal C, Montserrat N, Vassena R, Barragan M, Garreta E, Garcia-Quevedo L et al. Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2011; 29: 1186–1195. [[PubMed](#)]
96. Panula S, Medrano JV, Kee K, Bergstrom R, Nguyen HN, Byers B et al. Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 752–762. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
97. Easley CA 4th, Phillips BT, McGuire MM, Barringer JM, Valli H, Hermann BP et al. Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep* 2012; 2: 440–446. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
98. Hayashi K, Surani MA. Self-renewing epiblast stem cells exhibit continual delineation of germ cells with epigenetic reprogramming *in vitro*. *Development* 2009; 136: 3549–3556. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
99. Chuang CY, Lin KI, Hsiao M, Stone L, Chen HF, Huang YH et al. Meiotic competent human germ cell-like cells derived from human embryonic stem cells induced by BMP4/WNT3A signaling and OCT4/EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) selection. *J Biol Chem* 2012; 287: 14389–14401. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
100. Zhu Y, Hu HL, Li P, Yang S, Zhang W, Ding H et al. Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells): an *in vitro* and *in vivo* study. *Asian J Androl* 2012; 14: 574–579. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
101. Aramaki S, Hayashi K, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H et al. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell* 2013; 27: 516–529. [[PubMed](#)]
102. Weber S, Eckert D, Nettersheim D, Gillis AJ, Schafer S, Kuckenber g P et al. Critical function of AP-2gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance. *Biol Reprod* 2010; 82: 214–223. [[PubMed](#)]

103. Sasaki K, Yokobayashi S, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Kurimoto K et al. Robust *in vitro* induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2015; 17: 178–194. [[PubMed](#)]
104. Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 2002; 418: 293–300. [[PubMed](#)]
105. Reynolds N, Collier B, Maratou K, Bingham V, Speed RM, Taggart M et al. Dazl binds *in vivo* to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of Mvh in germ cells. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3899–3909. [[PubMed](#)]
106. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R et al. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 2000; 14: 841–853. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
107. Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, Hassold TJ, de Rooij DG, van Pelt AM et al. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 14976–14980. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]