

Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice

Katsuhiko Hayashi, Sugako Ogushi, Kazuki Kurimoto, So Shimamoto, Hiroshi Ohta, Mitinori Saitou

Ἡ Θυσία ἑαυτοῦ διανεμητικὸν Δίκαιον

「体外培養で得られた始原生殖細胞由来卵子からのマウスの産出」

概論

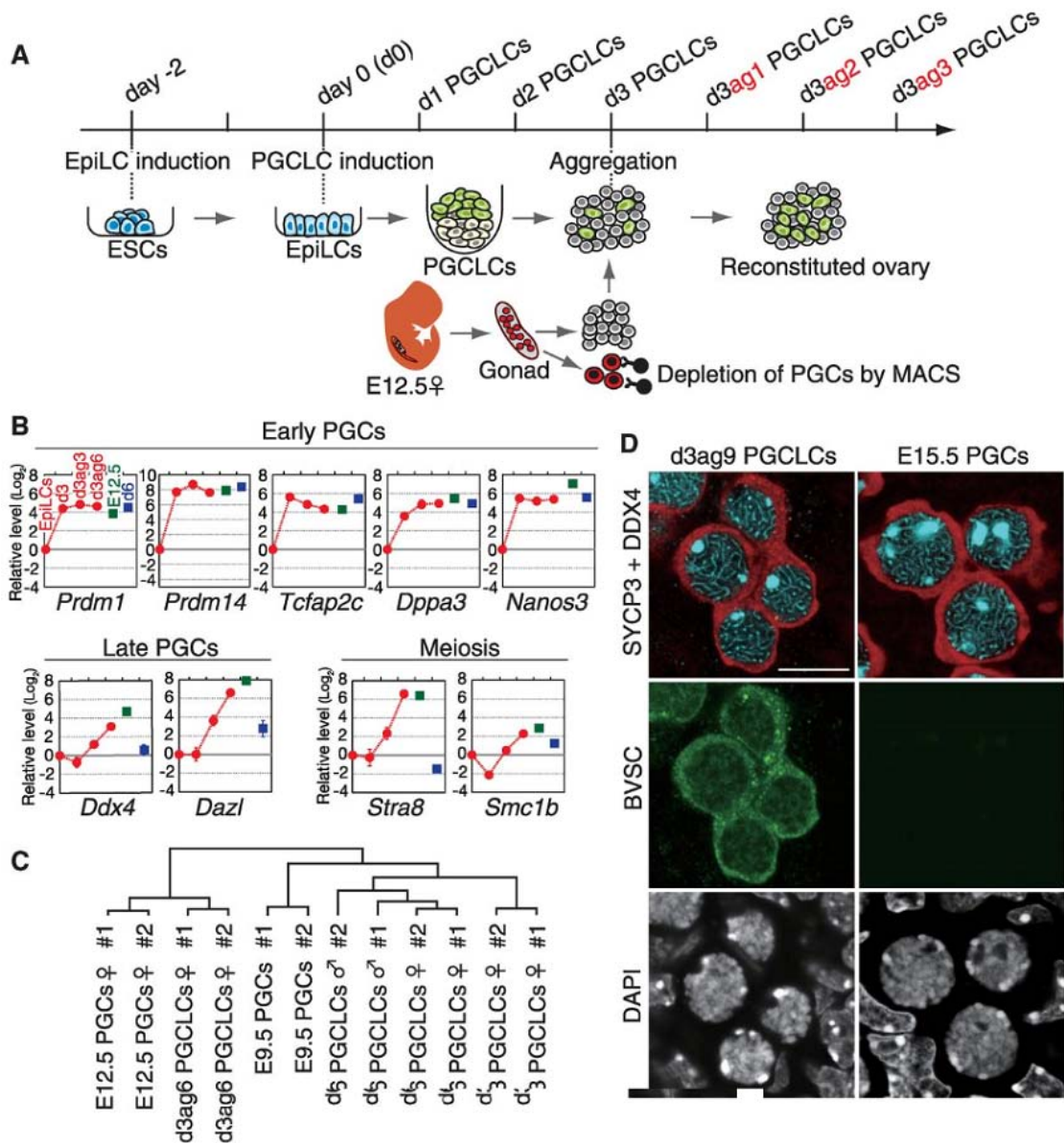
試験管内での女性生殖細胞の発生の再構成は生殖生物学と医学のキーチャレンジである。それでは女性(XX)胚性幹細胞およびマウスにおいて誘発された多能性幹細胞は、始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)に誘導され、この始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)は再び構成された卵巣などの女性生殖腺の体細胞と凝集するとき X-再活性化、インプリント消去、および嚢胞形成を受けて、減数分裂の可能性を示しマウスの卵巣囊の下に移植されると再構成された卵巣内始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)は胞段階の卵母細胞に成熟して、それから試験管内成熟と受精の後の子孫繁栄に貢献するという事をここに示すことにする。私達の培養システムは全能性獲得及び試験管内全女性生殖細胞の開発再構成を含めた女性生殖細胞の鍵となる特性の調査の強固な基盤として機能する。

始原生殖細胞(PGCs)の多能性胚版葉上層に由来する哺乳類の生殖細胞系列は性的に型開発を行い男性では精子を。女性では卵子を生成する。精子と卵子は、哺乳動物のライフサイクルの基礎となる、完全な発生能を有する受精卵を形成する為に受精する。ES細胞(ESC)および男性(XY)マウスから誘導された多能性幹細胞(iPS細胞)はエピブラスト様細胞(EpiLCs)に導かれ、今度は、精子形成および子孫生産のための妥当な機能を持つ始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)に誘引される事を前以て提示している(1)。エピジェネティクスレベルも入れて、男性(XY)と女性(XX)の胚性幹細胞(ESC)の違いを考慮すると(2)、男性と女性の生殖細胞の発達が著しく異なる機構と一緒に(3)、このシステムが女性の発生経路を再構成するかどうか、そして始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が卵母細胞の前駆体として完全に機能するかどうかという基本的なチャレンジがこのこっている。

この可能性を探る為に、Prdm1(Blimp1として知られている)-mVenusとDppa3(ステラとも呼ばれる)-ECFP(BVSC)導入遺伝子(Prdm1とDppa3は始原生殖細胞で特異表象を示す)(4)を生成する女性のES細胞群(ESCs)を抽出し、エピブラスト如細胞(EpiLCs)へ更に始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)(補助素成とメソッドを参照の事)へ誘導した。女性のES細胞(ESC)からエピブラスト様細胞(EpiLC)と始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)誘導のダイナミクス(H18とH14ヌクレオチドプローブ系統)は男性のES細胞(ESC)と類似が存在していた(Supplementary Material1図)(1)。さらに始原生殖細胞如細胞(PGCLC)を特徴化する由で、「卵巣再構成」の戦略を選択した。この戦略は、その後卵形成のためレシピエント

マウスの卵巣嚢または腎臓カプセル下に移植される試験管内卵巣再構成の為、女性の始原生殖細胞(PGC)と胚性生殖腺体細胞を集約することが出来る(図 1A)(5,6)。ES 細胞群(ESC_s)のヌクレオチドプローブ H18 は始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)へと誘導され、始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)誘導の 3 日 (d3)より 6 日(d6) の時期と同じ時期 BV 活性細胞が蛍光活性化細胞ソートで分類され E12.5(12.5 胚日)生殖腺の体細胞をさらに培養物のために(1000 個の始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)+10000 個の体細胞)で再凝集した(図 1A と図矢印 2A)。3 日(D3)の始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)が再構成卵巣で堅固な繁殖を示し(図矢印 2 および補足テキスト)遺伝表象とエピジェネティックプロファイル(X 不活性化または再活性化とインプリンティング)に関して胚性卵巣の始原生殖細胞(PGCs)つまり E12.5(12.5 胚日)の始原生殖細胞(PGCs)と似た 6 日へ到達した前減数分裂段階の再構成卵巣内(d3ag6)の始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)の如き発達進行を行う(図 1、B と C、Supplementary Material3 と Supplementary Material4、更に補足テキスト)。再構成卵巣内で、3 日(d3)と 6 日(d6)始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)は減数分裂前期の接合糸期段階に進むことができる[SYCP3 の表象およびローカリゼーションパターン(シナプトネマ構造タンパク質 3)(図 1D、Supplementary Material 図 3、および補足テキスト)に拠り決定] 検証し、始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)の減数分裂の可能性を実証した。

図 1



再構成卵巣内女性始原生殖細胞如細胞(PGCLC)発達。

(A)3日(d3)始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)と始原生殖細胞如細胞(PGCLC)誘導および卵巣の再構成のスキーム。Supplementary Material 図Aも参照の事。MACS、磁気活性細胞分類。

(B)始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)発達中および12.5胚日(E12.5)の始原生殖細胞(PGC)の遺伝表象、各DNAの独立した2つの維持機構体遺伝子ArbpとPPIAの平均CT値から Δ CT(閾値サイクルの差)を導出した。Prdm1表(左上)の表示通りEpiLCsの値を0とし、各ポイント、LOG₂スケール(標準偏差を導入)、3日(D3)の始原生殖細胞如細胞(PGCLC)開発(EpiLCs、D3、d3ag3、d3ag6のPGCLCs、赤い丸印で表示)、胚日(E12.5)のPGC(緑の四角で表示)、6日(d6)のPGCLCs(青の四角で表示)の2つの独立した実験からの平均

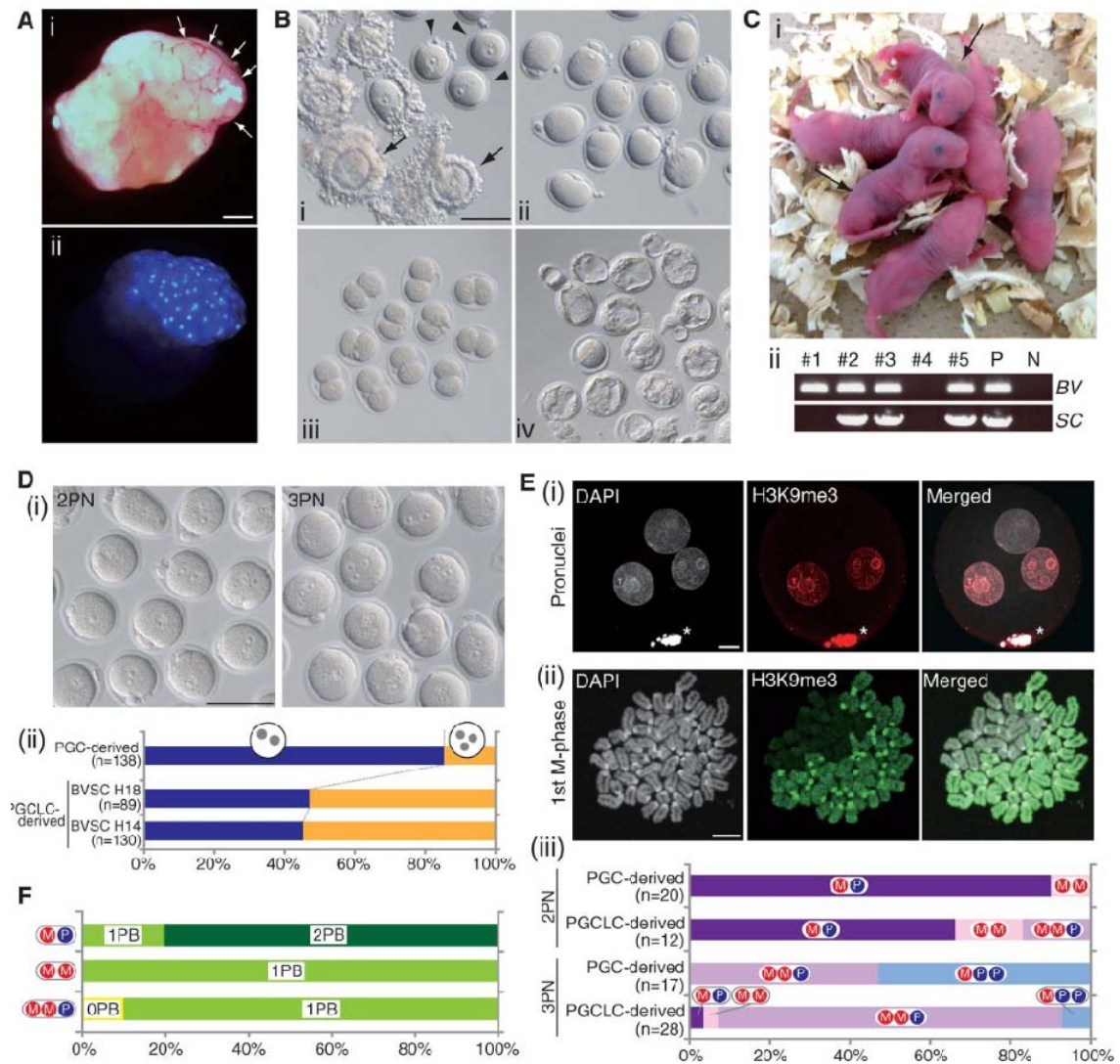
の値を表示している。

(C)d3(3日、メス)、d6(6日、オスとメス)、および d3ag6(メス)PGCLCs と、 E9.5(胚日 9.5)および E12.5(胚日 12.5、メス)の PGC のマイクロアレイデータの階層的クラスタリング。

(D)DDX4 の表象(デッドボックスポリペプチド 4、~E11.5(胚日 11.5)の後に生殖細胞で表象する細胞質型 RNA ヘリカーゼ)(赤)、SYCP3(対合複合タンパク質 3、減数分裂相同染色体間の対合複合体の成分、ライトブルー)、BVSC(Blimp1-mVenus とステラ-ECFP)伝達体(緑)、d3ag9 の PGCLCs(9日間再構成された卵巣内で培養 D3 の PGCLCs)と E15.5(胚日 15.5)の PGC の 4'、6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)染色(白)。スケールバー設定 10 μ m。

卵を形成する始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)のポテンシャルを探る為、d3 の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)、d6 PGCLCs、ステラ-EGFP (SG)活性 E12.5(胚日 12.5)女性の PGC (B.Payer et al, Generation of stella-GFP transgenic mice: A novel tool to study germ cell development. *Genesis* 44, 75 (2006).) (5000 個 PGCLCs または E12.5(胚日 12.5)の PGC プラス 50,000 個の体細胞) で再構成卵巣を生成し、それぞれの再構成卵巣を分化 d2(2日)ヌードマウス(レシピエント卵巣ごとに再構成された2つの卵巣)の卵巣嚢へ移植を行った。移植から4週間と4日を経てレシピエントと再構成卵巣の複合体の分離を行った。始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)と再構成された卵巣、D3 PGCLCs との再構成卵巣で特にかなりの成長を示し脈管発達を行い成長しているか、あるいは既に成長した卵母細胞の存在を示す強い SC [Dppa3/ステラ-ECFP] 蛍光を示した(Supplementary Material2 図 A 上存在)。SC-活性のドナー細胞が卵母細胞如細胞へ貢献し、ほぼ全てが十分に成長した卵核胞段階(GV)へ到達し十分に成長したレシピエント卵胞の如き顆粒膜細胞と卵胞膜細胞の複数の層を維持する事を組織切片が明らかにし始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)が同期単一波で卵の形成を行っている事を示している(Supplementary Material 図 B)。E12.5(胚日 12.5)の始原生殖細胞(PGC)が単一波で再構成された卵巣内で卵形成を行い(Supplementary Material5 図 A)、その表象は以前の観測と編絡している(6)。

図 2



卵形成、胚発生、および雌始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)の子孫。

(A)再構成卵巣内の雌始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)卵形成。

(i) レシピエント卵巣と再び構成を行った卵巣の複合体(矢印で示す)。スケールバー500 μ m。

(ii) 複合体の CFP(シアン蛍光タンパク質)蛍光。

(B) IVM(体外成熟培養)と PGCLC 由来の卵母細胞の IVF(体外受精)後試験管内発達に拠る成熟。(i)GV(卵核胞)と(ii)減数分裂中期卵母細胞と 2 細胞胚(iii)と胚盤胞(iv)。矢筈の有る矢は COCs(卵子卵丘細胞複合体)を示し鋸だけの矢が DOs(去剥化卵子)を示す。スケールバー100 μ m。

(C)(i)PGCLC 由来の子孫(黒目、矢印)と(ii)を BVSC(Blimp1-mVenus とステラ-ECFP)導入遺伝子に拠る遺伝子型活性(P)陰性 (N)制御判定。

(D)(i)PGCLC 由来の受精卵と IVF(体外受精)後に生まれた 2PN(2 前核)(left)或いは 3PN(3

前核)(right)を目視判定。スケールバー100 μ m。

(ii)2PN(2 前核)と 3PN(3 前核)受精卵と PGC と PGCLCs(ES 細胞由来の H18 と H14 スクレオチドプローブ)の卵母細胞を IVF(体外受精)後に採取を行った卵母細胞のパーセンテーション。n=受精卵数。

(E)(i)H3K9me3(リジントリメチル化ヒストン H3)(赤)および DAPI(4' 6 ジアミジノ 2 フェニルインドール)(白)で染色を行った第一(最初)ピギーバック(Piggy Bac,PB)トランスポゾン(*)を行った卵子と父化された卵母細胞から生じた三倍体受精卵。

(ii)H3K9me3(リジントリメチル化ヒストン H3)(緑)および DAPI(4' 6 ジアミジノ 2 フェニルインドール)(白)で染色を行った卵子と 2 母性 3 倍体受精卵。

(i)と(ii)のスケールバー=10 μ m。

(iii)始原生殖細胞如細胞(PGCLC)或いは始原生殖細胞(PGC)由来受精卵と卵母細胞のM母伝P父伝で表示された染色遺伝構成パーセンテーション。

(F) 極体(PB)は PGCLC 由来の受精卵で観査された。 0 極体(PB) =極体(PB)が検出されない。 1 極体(PB)=最初の極体(PB)が検出。 2 極体(PB)=第二の極体(PB)が検出。

始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)と始原生殖細胞(PGCs)に拠るGV(卵核胞)卵母細胞の形成の形態と効率を評価する為に、再構成卵巣内の卵胞と卵母細胞の機械分離を行った。野生型(WildType)卵巣内のGV(卵核胞)卵胞と卵母細胞を3週間で機械分離することも行った。6日(d6)始原生殖細胞如細胞(PGCLC)由来の再構成卵巣中りのGV(卵核胞)卵母細胞の平均の数はより少なかったのに対して

(3.1)、3日(d3)始原生殖細胞如細胞(PGCLC)と胚日12.5(E12.5)始原生殖細胞(PGC)由来のそれはほぼ同数だった(それぞれ33.4と32.3)(表1)。これは再構成卵巣内で6日(6d)にあらず3日(3d)の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が堅固に繁殖する理由の一つかもしれない(Supplementary Material2 図A)。3週間の時点での野生型(WildType)卵母細胞のほとんど(~65%)が卵丘卵母細胞複合体(COC)として区離したのに対して始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)と始原生殖細胞(PGCs)由来の卵母細胞のほとんど(~60%)は去剥化卵子(DOs)として区離した(Supplementary Material6 図A)。

更に始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)由来の卵母細胞は他の二つのグループの卵母細胞より高い頻度で異常楕円を示した(Supplementary Material6 図A)。

以上の結果は始原生殖細胞如細胞(PGCLC)とE12.5(胚日12.5)始原生殖細胞(PGC)再構成卵巣発達は実に正常に表示されているが、それは卵丘卵母細胞複合体(COC)形成での不安定性を帯同し始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)由来のGV(卵核胞)卵母細胞が特定の頻度で幾つかの細胞骨格未熟とそして、或いは脆弱性を示すことが有る事を仄めかしている。

表

ドナー	回復した移植	総卵母細胞 (GVs) (/移植)	減数分裂中期卵母細胞 (%)	体外受精	受精確率 (%)	育成	2細胞胚	胚移植	子児
卵母細胞 (3週時)	-	0	65(39.4)	59	57(96.6)	57	55(96.5)	55	7(12.7)
12.5胚日 (E12.5) 始原生殖細胞	15	485(32.3)	223(46.0)	223	127(57.0)	113	85(75.2)	75	13(17.3)
3日 (d3) 始原生殖細胞如細胞	16	535(33.4)	319(59.6)	243	204(84.0)	204	127(62.3)	127	5(3.9)
6日 (d6) 始原生殖細胞如細胞	20	62(3.1)	28(45.2)	-	-	-	-	-	-
3日 (d3) 始原生殖細胞如細胞	36	1565(43.5)	507(32.4)	507	342(67.5)	236	163(69.31)	163	14(b 3, a1 11)
12.5胚日 (E12.5) 始原生殖細胞	10	145(14.5)	67(46.2)	-	-	-	-	-	-

*始原生殖細胞 (PGCs) は細胞区離 (MACS) によってソートされている

3週時卵巣、胚日 12.5日 (E12.5) の PGC と始原生殖細胞如細胞 (PGCLCs) 由来の卵母細胞子世。

3日 (d3) 始原生殖細胞如細胞 (PGCLCs) と始原生殖細胞 (PGC) 由来の3週間時点の卵母細胞と野生型 (WildType) 卵母細胞の対外成熟 (IVM) と体外受精 (IVF) を行った (Supplementary Material6 図 B)。卵丘卵母細胞複合体 (COC) の安定性や形状の違いがあるにもかかわらず、減数分裂中期に達した PGCLC 由来の卵母細胞は、他の胞から成る卵母細胞と該当するが如く2細胞胚へと発達を行った (図 2B、Supplementary Material6 図 C、表 1)。始原生殖細胞如細胞 (PGCLCs) 由来の2細胞胚の幾つかは体外で更に胚盤胞へと発達を行った [19 of 46 (19/46), ~39%] (図 2B)。そして始原生殖細胞如細胞 (PGCLCs) とそれ以外の胞胚から継母を離す由で移植を行った。始原生殖細胞如細胞 (PGCLCs) (5/127, ~3.9%) と胚日 12.5 (E12.5) 始原生殖細胞 (PGCs) (13/75, ~17.3%) と野生型 (WildType) 3週時卵母細胞 (7/55, ~12.7%) 由来の2細胞胚から新生児マウスを生み出す事が出来た (図 2C、図 Supplementary Material7A、表 1)。以上全くの子孫が壮体へと成長した。始原生殖細胞如細胞 (PGCLCs) 由来個体は BVSC (Blimp1-mVenus とステラ-ECFP) 導入遺伝子、ノーマルインプリンティングパターン、そして不妊性の子孫を生んだ (図 2C および Supplementary Material 図 7、B と D)。以上の検証が ES 細胞から導引された女性の PGCLCs が完全機能卵母細胞形成を出来る事を実証している。

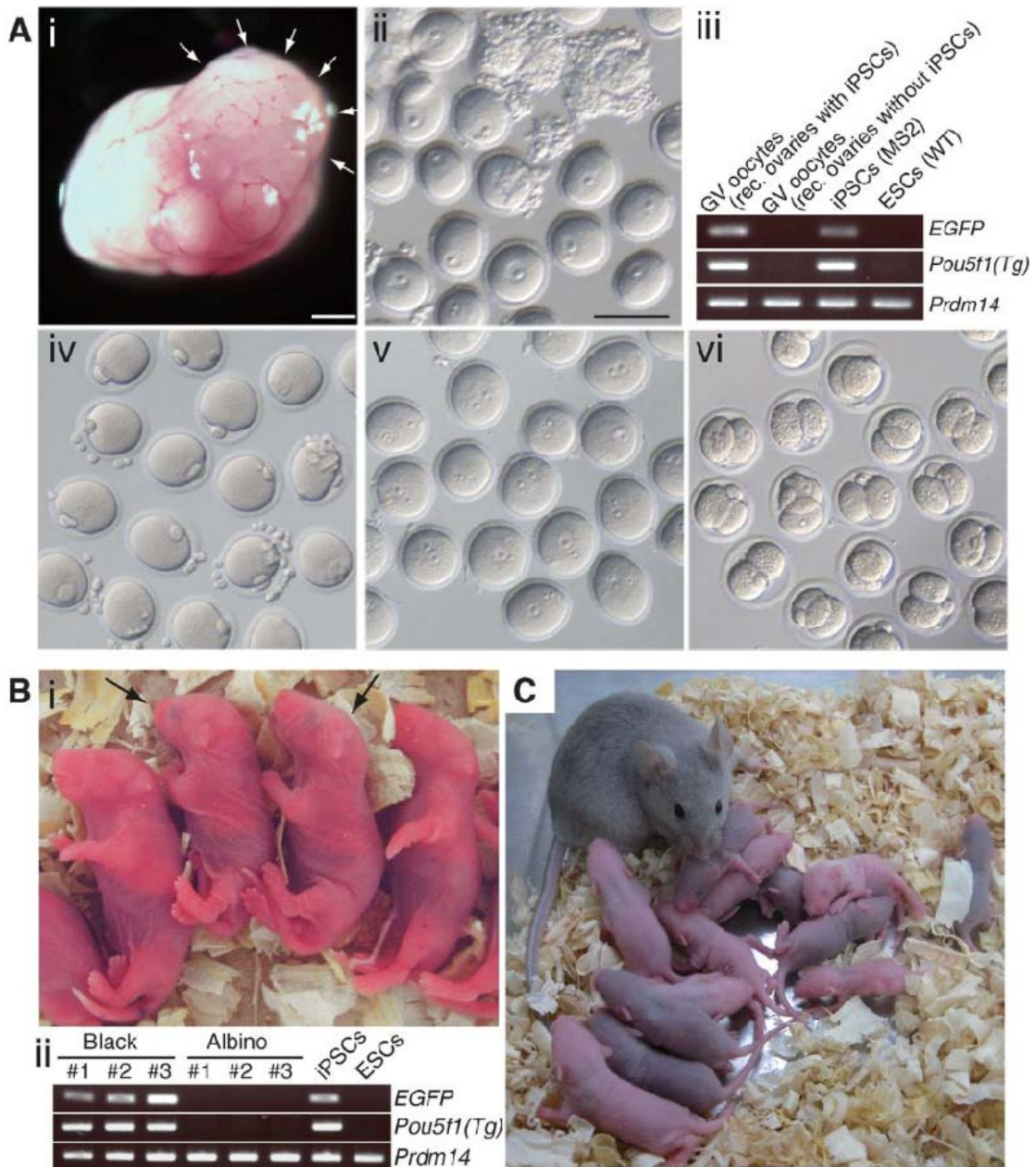
然しながら始原生殖細胞如細胞 (PGCLC) 由来児を生む事 (~3.9%) が胚日 12.5 (E12.5) 始原生殖細胞 (PGC) 由来児或いは野生型 (WildType) 3週時卵母細胞由来児を生む (~12.7 and ~17.3%, respectively) よりリスクであった (表 1)。根底に横たわる構造機構の本質を悟るべく始原生殖細胞如細胞 (PGCLCs) 由来卵母細胞の減数分裂の研究を行った。対外育成 (IVM) に拠って導引された始原生殖細胞如細胞 (PGCLC) 由来の減数分裂中期卵母細胞のほとんどが始原生殖細胞如細胞 (PGCLC) 由来の卵母細胞の比較的正常な始期減数分裂を示しな

がら章かにノーマルな減数分裂紡錘体(Spindle)と第1極体(PBs)を形成した(Supplementary Material 図 8A)。だが、前核段階で体外受精(IVF)に抛り形成されたPGCLC由来受精卵を証査すると、その約半分(~52.8%)が3前核(3PN)を有していたのだが、始原生殖細胞(PGC)由来の卵母細胞の大部分(~85.5%)が通常の2前核(2PN)フェノタイプで有る事が章かとなった(図 2D)。始原生殖細胞如細胞(PGCLC)由来の3前核(3PN)受精卵のほとんどがヒストンH3リジン9トリメチル(H3K9me3)活性の2つの母系染色体(8)と1つの父系染色体を有していたが、始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)由来の2前核(2PN)受精卵の約65%が父系染色体と母系染色体を1つずつそれ以外がMM 或いはPmmのパターンを有していた(図 2E)。3前核(3PN)受精卵の全ての検査を行うと第2極体(PB)を押し出す事が出来ず2細胞胚と3倍体染色体を移送した(図 2F と Supplementary Material 図 8、B と C)。以上の検証が始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)由来の卵母細胞と受精卵の小集合が第2極体(PB)を押し出す事が出来ず体外受精(IVF)の後2母性3倍体(MMP)フェノタイプと2母性2倍体(MM)フェノタイプという結果を生じた。この不備は始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)由来の2細胞胚低出生率に起因している(表 1)。以上の検証と事実に基づく、3倍体はマウスの発達へ対応せず(9)、始原生殖細胞如細胞(PGCLC)由来の卵母細胞からの全くの子孫がノーマルな2倍体核型を証した(図 Supplementary Material 8D)。

女性 iPSCell を完全機能卵母細胞に導引する事が出来るか調べた。始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)へMS2 iPSCell(POU5F1-EGFP 導入遺伝子を有する女性ミックス系バックグラウンドマウス C57BL/6 の胚線維芽細胞を由来とする)(J. Silva et al, Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. Cell 138, 722 (2009).)を導引した。d4(4日)の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)を内包する浮遊集体(インテグリンβ3はPGCLC導引のd4(4日)後に特異表象を示すので、我々はd4(4日)の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)で行った)(Supplementary Material 図 9、A と B)と生成された再構成卵巣由来の活性BVとはほぼ細胞形態同一性がある(10)インテグリンβ3とSSEA1活性細胞を精製した。制御策としてiPSCell由来のPGCLCsを除外し幾つかのソートされてない内在性PGC(ICRバックグラウンド(マウスソートネーミング))で再構成卵巣生成を行った。移植の後、iPSCell由来のPGCLCsで再び構成した卵巣は制御した卵巣(全移植の14.5%)より多くの成長している或いは成長した卵胞(全移植の43.5%)を生み出し(図 3A と表 1)、それはiPSCell由来のPGCLCsが卵の形成に貢献している(iPSCell技術が確率の上昇を支援している)事を仄めかしている。再構成卵巣内でPOU5F1-EGFP導入遺伝子がを検出可能な蛍光を表象しなかったが(Supplementary Material 図 9、C から F)、iPSCell由来の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)を含む再び構成された卵巣から特にGV(卵核胞)卵母細胞はEGFP(enhanced green fluorescent protein)とPOU5F1レトロウイルス導入遺伝子を生成し(図 3A)、iPSCell由来の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)の卵形成への貢献を実証している。以上の卵母細胞で体外受精(IVF)と対外培成(IVM)を行い、2前核(2PN)受精卵に由来する2細胞胚

を継母へと移した(図 3A)。こうして黒目の 3 子孫を得る事となりこの 3 子孫は EGFP(enhanced green fluorescent protein)と POU5F1 導入遺伝子を生成しながら壮体へと発達した (Fig. 3、B と C、Supplementary Material 図 9G)。女性 ESCell の如く女性 IPSCell は始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)へ体外で導引する事が出来、その始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)が正常機能卵母細胞へと培成する事が出来るとの結論となった。

図 3



女性の iPSCCell 由来の PGCLCs からの卵形成、胚発生、そしてマウス

(A) iPSCCell 由来の PGCLCs からの卵形成、胚発生

(i) レシピエントの明視野像と再び構成された(矢印)卵巣の複体。スケールバー、500 μ m。

(ii) 再び構成された卵巣から区離されたGV(卵核胞)卵母細胞。スケールバー100 μ m。

(iii) iPSCCell 由来の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)で再び構成された卵巣から或いは制御卵巣、IPSCCell、および野生型(WildType)ESCell から成る GV 卵母細胞のエレメントで証した遺伝子型。

(iv から vi) 減数分裂中期卵母細胞

(iv)受精卵

(v)2 細胞胚

(vi)GV (卵核胞)卵母細胞から(ii)へ

(B) (i) iPSCell 由来の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)(矢印)から生じた黒目のマウスと

(ii)アルビノ児、IPSCell、および野生型(WildType)ESCell の遺伝子型のエレメントによって証された遺伝子型。

(C)iPSCell 由来の始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)から妊性の女性子孫。

先行研究は ES 細胞が子孫生出来まで至らなかったが卵母細胞如細胞に分化することが出来る事を主張した(11)。以上に抛りて女性の ES 細胞と IPSCell は始原生殖細胞如細胞(PGCLCs)に導引され対外で再び構成された卵巣で完全な発達を行い、生体内移植の時完全機能GV (卵核胞)卵母細胞へと更に生成した事を実証した。先行研究と総して(1)体外での多能性幹細胞ベースの配偶子を生み出すエッセンシャルなファーストステップの再構成は、両性で確としている。胚日 12.5(E12.5)始原生殖細胞(PGC)由来の卵母細胞と受精卵と違って、始原生殖細胞如細胞(PGCLC)由来の卵母細胞と接合体の約半分は、第 2 極体(PB)を押出する事が出来なかった。この機能不全の根底に存在する構造機構はさらなる研究を希求している。先行研究と総して(12,13)以上のシステムがマウスだけでなくヒトを内包した哺乳類の体外女性生殖系列発生を研究し再び構成する堅固な基礎となりて機能する。

Supplementary Materials

Materials and Methods

Supplementary Text

Figs. S1 to S9

Table S1

References (14-36)

References and Notes

4

1.K. Hayashi, H. Ohta, K. Kurimoto, S. Aramaki, M. Saitou,

Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. Cell 146, 519 (2011).

CrossRef. Medline. Web of Science. Google Scholar.

4

2.I. Zvetkova et al.Global hypomethylation of the genome in XX embryonic stem cells. Nat. Genet. 37, 1274 (2005).

CrossRef. Medline. Web of Science. Google Scholar.

3.H. Sasaki, Y. Matsui, Epigenetic events in mammalian germ-cell development: Reprogramming and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 9, 129 (2008).

Medline.Web of Science.Google Scholar.

↵

4.Y. Ohinata, M. Sano, M. Shigeta, K. Yamanaka, M. Saitou,

A comprehensive, non-invasive visualization of primordial germ cell development in mice by the Prdm1-mVenus and Dppa3-ECFP double transgenic reporter. *Reproduction* 136, 503 (2008).

Abstract/FREE Full Text.

↵

5.K. Hashimoto, M. Noguchi, N. Nakatsuji,

Mouse offspring derived from fetal ovaries or reagggregates which were cultured and transplanted into adult females. *Dev. Growth Differ.* 34, 233 (1992).

CrossRef.Web of Science.Google Scholar.

↵

6.S. Matoba, A. Ogura,

Generation of functional oocytes and spermatids from fetal primordial germ cells after ectopic transplantation in adult mice. *Biol. Reprod.* 84, 631 (2011).

Abstract/FREE Full Text.

↵

7.B. Payer et al.

Generation of stella-GFP transgenic mice: A novel tool to study germ cell development. *Genesis* 44, 75 (2006).

CrossRef.Medline.Web of Science.Google Scholar.

8.F. Santos, A. H. Peters, A. P. Otte, W. Reik,

W. Dean, Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev. Biol.* 280, 225 (2005).

Google Scholar.

9.M. H. Kaufman, S. Speirs,

The postimplantation development of spontaneous digynic triploid embryos in *LT/Sv* strain mice. *Development* 101, 383 (1987).

Abstract.

10.J. Silva et al.

Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138, 722 (2009).

CrossRefMedlineWeb of ScienceGoogle Scholar

↵

11.K. Hübner et al.

Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300, 1251 (2003).

[Abstract/FREE Full Text](#)

↵

12.J. J. Eppig, M. J. O'Brien,

Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* 54, 197 (1996).

[Abstract](#)

↵

13.Y. Obata, T. Kono, I. Hatada,

Gene silencing: maturation of mouse fetal germ cells in vitro. *Nature* 418, 497 (2002).

[CrossRef](#)[Medline](#)[Google Scholar](#)

↵

14.Y. Seki et al.

Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice.

Development 134, 2627 (2007).

[Abstract/FREE Full Text](#).

15.T. Yoshimizu et al.

Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev. Growth Differ.* 41, 675 (1999).

[CrossRef](#)[Medline](#)[Web of Science](#)[Google Scholar](#)

.

16.P. Quinn, J. F. Kerin, G. M. Warnes,

Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid.

Fertil. Steril. 44, 493 (1985).

[Medline](#)[Web of Science](#)[Google Scholar](#).

17.D. Lucifero, C. Mertineit, H. J. Clarke, T. H. Bestor, J. M. Trasler,

Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 79, 530 (2002).

[CrossRef](#)[Medline](#)[Web of Science](#)[Google Scholar](#).

18.J. Sharif et al.

The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450, 908 (2007).

[CrossRef](#)[Medline](#)[Web of Science](#)[Google Scholar](#).

19.Y. Kumaki, M. Oda, M. Okano,

QUMA: Quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 36, W170 (2008).

[Abstract/FREE Full Text.](#)

20.M. Yamaji et al.

Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat. Genet.* 40, 1016 (2008).

[CrossRefMedlineWeb of ScienceGoogle Scholar.](#)

21.K. Kurimoto et al.

An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* 34, e42 (2006).

[Abstract/FREE Full Text.](#)

22.K. Kurimoto, Y. Yabuta, Y. Ohinata, M. Saitou,

Global single-cell cDNA amplification to provide a template for representative high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nat. Protoc.* 2, 739 (2007).

[CrossRef.Medline.Web of Science.Google Scholar.](#)

23.C. Li, W. H. Wong,

Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 31 (2001).

[Abstract/FREE Full Text.](#)

24.A. I. Saeed et al.

TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374 (2003).

[Medline.Web of Science.Google Scholar.](#)

25.M. Yamaji et al.

Functional reconstruction of NANOS3 expression in the germ cell lineage by a novel transgenic reporter reveals distinct subcellular localizations of NANOS3. *Reproduction* 139, 381 (2010).

[Abstract/FREE Full Text.](#)

26.Y. Seki et al.

Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.* 278, 440 (2005).

[CrossRef.Medline.Web of Science.](#)

27.M. E. Pepling, A. C. Spradling,

Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125, 3323 (1998).

[Abstract](#).

28.K. Plath et al.

Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300, 131 (2003).

[Abstract/FREE Full Text](#).

29.J. Silva et al.

Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed·Enx1 polycomb group complexes. *Dev. Cell* 4, 481 (2003).

[CrossRef](#).[Medline](#).[Web of Science](#).[Google Scholar](#).

30.S. Erhardt et al.

Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development* 130, 4235 (2003).

[Abstract/FREE Full Text](#).

31.S. Rastan, E. J. Robertson,

X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90, 379 (1985).

[Abstract/FREE Full Text](#)

32.N. Takagi, O. Sugawara, M. Sasaki,

Regional and temporal changes in the pattern of X-chromosome replication during the early post-implantation development of the female mouse. *Chromosoma* 85, 275 (1982). [CrossRef](#)[Medline](#)[Web of Science](#)[Google Scholar](#)

[CrossRef](#).[Medline](#).[Web of Science](#).[Google Scholar](#).

33.S. S. Tan, E. A. Williams, P. P. Tam,

X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo. *Nat. Genet.* 3, 170 (1993).

[CrossRef](#).[Medline](#).[Web of Science](#).[Google Scholar](#).

34.P. P. Tam, S. X. Zhou, S. S. Tan,

X-chromosome activity of the mouse primordial germ cells revealed by the expression of an X-linked lacZ transgene. *Development* 120, 2925 (1994).

Abstract.

35.P. Hajkova et al.

Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* 117, 15 (2002).

CrossRef.Medline.Web of Science.Google Scholar.

36.J. Lee et al.

Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 129, 1807 (2002).

Medline.Web of Science.Google Scholar.

Acknowledgments: We thank J. Silva and A. Smith for the MS2 female iPSCs, K. Okita and S. Yamanaka for the female iPSCs, and Y. Matsui for the GOF18-ESCs. We also thank S. Matoba and A. Ogura for their advice on ovary reconstitution, S. Aramaki and Y. Ishikura for assistance, and T. Mori for encouragement. This study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; by JST-PRESTO/CREST/ERATO; by the Takeda Science Foundation; and by the the Academia for Repro-regenerative Medicine. The accession number for the microarray data presented in this study is GSE40716 [Gene Expression Omnibus (GEO) database].