

哺乳類の始原生殖細胞研究の最前線

林, 克彦
九州大学大学院医学研究院ヒトゲノム幹細胞医学分野

<https://doi.org/10.15017/1477815>

出版情報：福岡醫學雑誌. 105 (10), pp.196-203, 2014-10-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

哺乳類の始生殖細胞研究の最前線

九州大学大学院医学研究院 ヒトゲノム幹細胞医学分野

林 克 彦

はじめに

生殖細胞は次世代の個体を作る唯一の細胞系列であり、様々な特異的な分化過程を経たのちに卵子や精子となる。体細胞系列では発生・分化の進行にともない細胞の分化可塑性が減少するが、生殖細胞系列では最終分化産物である卵子と精子が受精することにより、胎盤を含んだ全ての細胞系列に分化できる（全能性をもつ）受精卵となる。生殖細胞系列の分化過程の異常は配偶子欠失など不妊症の原因となるほか、次世代の個体の発生・発育障害の原因ともなる。このように生物学的・医学的に重要な意味をもつ生殖細胞はどのようにして発生してくるのであろうか？本稿では近年の分子生物学的解析により徐々に明らかになりつつある生殖細胞系列の分化の実態、特にすべての生殖細胞系列の源である始生殖細胞の分化メカニズムについて紹介する。また我々が開発した生殖細胞系列の発生過程を体外培養で再構築する分化誘導系についても紹介する。

1. 生殖細胞系列サイクルのはじまり

卵子や精子を最終分化産物と考えるとこれらの生殖細胞系列のはじまりは始生殖細胞（Primordial Germ Cells:PGCs）にまでさかのぼる（図1）¹⁾²⁾。PGCsの分化は胚発生の早い時期に起こり、マウスでは胚齢6日目前後、ヒトでは2週目であると考えられている。この時期の胚は卵割を経て形成された胚盤胞が子宮に着床してから間もない原腸陥入期前後の発生段階にあたる。原腸陥入時の胚において多能性細胞集団エピプラストは周囲の組織からのシグナルにより様々な細胞系列に分化するが、PGCsも同時期にエピプラストから誘導される（詳細は後述）。分化当初は胚の後局に位置しているPGCsは発生の進行に伴い、将来の卵巣もしくは精巣となる生殖巣に遊走する。分化初期のPGCsは機能的な雌雄差を認めないが、生殖巣において周囲の体細胞から性特異的なシグナルを受けることにより、雌雄それぞれの分化過程にはいる。すなわち雌では直ちに減数分裂の前期に入り卵母細胞としての分化を始め、雄では増殖を繰り返した後にGI期で細胞分裂を停止し、出生後に精子幹細胞となる。その後、成体においておもに性ホルモンの制御下で雌雄に応じて著しく形状と機能の異なる配偶子を形成する（図1）。

2. PGCsの初期分化における遺伝子発現制御とエピゲノム再編成

遺伝的な解析から、マウスではPGCsを誘導するシグナルは隣接する胚体外外胚葉から分泌されるBMP4であり、そのシグナルはSmad1やSmad5によりエピプラストの細胞内に伝達される（図2）。興味深いことに細胞標識の実験からPGCsになるエピプラストの予定胚領域は最も近位（つまり胚体外外胚葉に近い領域）であることが明らかになっている³⁾。この領域はBMP4のシグナルが最も強い領域であり、BMP4の量的なシグナルがPGCsの細胞運命を決定していることを示唆している。実際にBMP4ヘテロ欠損胚（BMP4 +/-）では分化初期のPGCsの数が半減し、BMP4ホモ欠損胚（BMP4 -/-）ではPGCsの分化は認められない⁴⁾。Smad1やSmad5はこのBMP4のシグナルを伝達する分子であるが、Smad1ホモ欠損胚（Smad1 -/-）⁵⁾、Smad5ホモ欠損胚（Smad5 -/-）⁶⁾に加えてSmad1/5ダブルヘテロ欠損胚（Smad1 +/-, Smad5 +/-）の胚でもPGCsの顕著な分化障害が認められる⁷⁾。このことはBMP4シグナルの量依

存的な PGC 分化はリガンド、シグナル分子双方によって制御されていることを示しており、この点において Smad1 と Smad5 の機能的差異は少ないものと考えられる。Smad1 や Smad5 の標的遺伝子の同定は PGCs の運命決定の分子メカニズムを知る上で重要であるが、これまでのところ不明な点が多い。その大きな要因としてはエピブラストや分化初期の PGCs には数量的な制限があり、解析の方法が限られていることにある。我々はこの実験的制約を解消するために、体外培養において PGCs の初期分化過程を再現する方法を開発した（後述）。

BMP4 により分化が誘導された PGCs は生殖細胞系列特異的な遺伝子発現プログラムを実行する（図 2）。そのプログラムは大きく 2 つに分けられ、ひとつは Hox 遺伝子群などの体細胞遺伝子発現プログラムの停止、もうひとつは多能性細胞プログラムの再起動である。前者のプログラムにおいて中心的な働きをする転写因子は、活性化 B 細胞を形質細胞に転換させる機能で有名な Blimp1 (Prdm1) である。Blimp1 は PGCs で最も早期に発現する遺伝子のひとつである。マウスの Blimp1 ホモ欠損胚 (Blimp1^{-/-}) では PGCs の分化が極めて初期過程において阻害されており⁸⁾、Blimp1 を欠損した PGCs では体細胞遺伝子の脱抑制が認められる⁹⁾。つまり Blimp1 は PGCs においては体細胞遺伝子発現プログラムを抑制することにより PGCs の正常な分化を助けていると考えられる。Blimp1 は PGCs や形質細胞の分化のほか、皮膚や小腸の幹細胞の運命決定にも重要であることが知られており¹⁰⁾⁻¹³⁾、それぞれの細胞系列において同じ遺伝子が細胞運命を決定していることは興味深い。

分化初期の PGCs では胚齢 7 日目までにエピブラストで一旦発現が抑制される多能性細胞特異的な遺伝子 Nanog や Prdm14 が再発現する⁹⁾。原腸陥入以降にこれらの多能性細胞特異的な遺伝子の発現を認めるものは全ての細胞系列の中で PGCs のみである。これらの遺伝子の PGCs における機能については遺伝子欠損動物を用いた解析から徐々に明らかにされつつある¹⁴⁾¹⁵⁾。いずれの遺伝子欠損胚においても PGCs の発生は阻害されるが、その原因についてはまだ不明な点が多い。しかし様々な先行研究から Nanog や Prdm14 の PGCs の分化における役割のひとつは後述するようなエピゲノムリプログラミングの制御にあると考えられる¹⁶⁾¹⁷⁾。

エピゲノムは DNA やヒストンなどの化学的修飾により規定されるゲノム情報の総称であり、DNA 配列を変化させることなくゲノムの機能に差異をつくる本質である。クローン動物の作出でわかるとおり体細胞の核が全能性を獲得するのは、まさしくエピゲノムの再編によるものである。発生の分化過程において PGCs は内因性のリプログラミング因子を駆使してエピゲノムの再編を行っており、実際に PGCs のゲノム DNA やヒストンの化学的修飾には著しい変化が認められる（図 2）。例えばエピブラストのゲノム DNA において 70% 以上の CpG 配列がメチル化されているのに対し、PGCs ではその割合が徐々に減り、胚齢 13 日目では 10% 前後まで低下する¹⁸⁾。また遺伝子発現やゲノムの安定性に関係するヒストンメチル化のうち、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのジメチル化 (H3K9me2) がゲノムの広範囲で減少するとともに、ヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) が亢進する¹⁹⁾。しかしながら PGCs に見られるエピゲノムの再編が受精卵での全能性の獲得に具体的にどのように寄与しているのかについては、不明な点が多い。興味深いことに前述した Prdm14 を欠損する PGCs では H3K9me2 のメチル化の減少が認められない。また Prdm14 は DNA メチル化を付加する酵素である Dnmt3a や Dnmt3b の発現を抑えることから、DNA のメチル化レベルの低下に貢献しているものと考えられる。また Nanog を欠損させた PGCs は胚齢 11 日から 12 日にかけて消失する¹⁴⁾。これに加えて Nanog は ICM や iPS 細胞におこるエピゲノムの再編に関与していることが示唆されており¹⁶⁾、PGCs においても同様の機能があると考えられる。エピゲノムの再編現象の詳細な解析やその制御メカニズムの解明は受精卵の全能性を理解する上で重要であると考えられているが、上述した PGCs の運命を決定するシグナルに関する研究と同様に、数量的な制限により得られる知見が限られている。

3. PGCs の分化過程を体外で再現する試み

実験的に利用できる胚内の PGCs の数量的な制約を克服するために、ES 細胞などの多能性幹細胞から



図1 マウスにおける生殖細胞系列の分化

全能性をもつ受精卵から卵割を経て形成された胚盤胞は将来胎仔になる多能性細胞を含む内部細胞塊 (ICM) をもつ。ICM 内の多能性細胞は着床後にエピブラストとなり周囲の組織からのシグナルに応じて原腸陥入を引き起こす。始原生殖細胞 (PGCs) は胚体外外胚葉からのシグナルに応じて分化する。PGCs はその後、将来の卵巣もしくは精巣である生殖巣に移動したのちに、性に応じて卵子または精子に分化する。

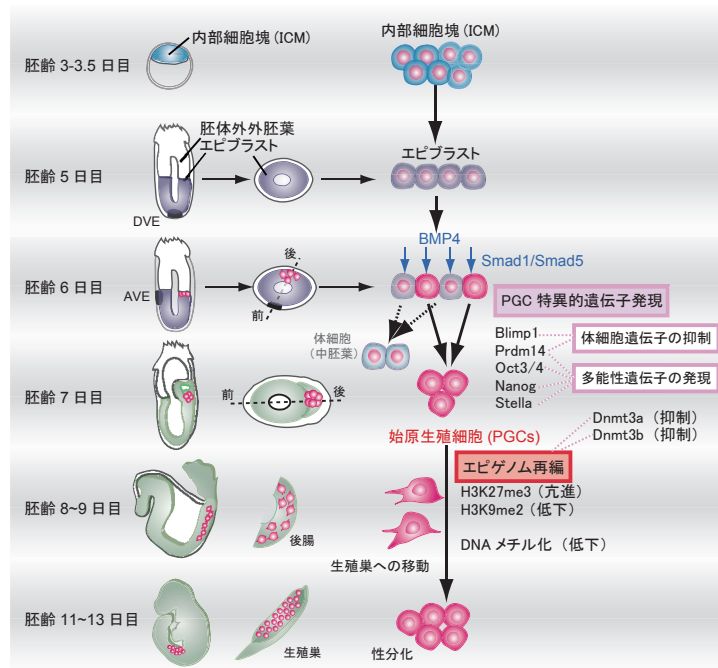


図2 PGCs の詳細な分化様式

ICM 由来のエピブラストは胚体外外胚葉から分泌される BMP4 に反応して PGCs に分化する。PGCs では特異的な遺伝子発現が誘起され、体細胞遺伝子の抑制や多能性細胞特異的な遺伝子の発現が認められる。PGCs では大規模なエピゲノムリプログラミングが起こっており、ヒストン H3K27 のトリメチル化の亢進、ヒストン H3K9 のジメチル化と DNA メチル化の減少が認められる。PGCs における Dnmt3a/b などの DNA メチル化酵素の発現抑制は DNA メチル化の減少に関わっていると考えられている。

PGCs を分化誘導する体外培養系を構築する必要があった。これまでも多能性幹細胞から PGCs を分化誘導する試みは報告されているが^{20)~24)}、これらは主に ES 細胞の未分化性を維持する LIF などを培養液中から除くことにより様々な細胞に分化した中から PGC 様の細胞を単離する方法であった。これらの方法はいずれも効率が低く、さらには得られた PGCs に由来する健全な新生仔の産生には至っていない。体外培養での分化過程における遺伝子発現やエピゲノム再編の正確性は、得られる PGCs の機能性に反映すると考えられる。このため健全な産仔が得られるか否かについては体外で分化誘導した PGCs を評価する上で重要な指標である。我々は胚内の PGCs の分化過程をできるだけ正確に再現するために PGC 特異的遺伝子 *Blimp1* および *Stella* の発現制御領域の下流に蛍光タンパク質 *Venus* および *ECFP* をコードする遺伝子をそれぞれ組み込んだレポーター遺伝子 (*Blimp1*-*mVenus* と *Stella*-*ECFP*: *BVSC*) をもつマウスから樹立した ES 細胞を用いて分化培養系を構築した。

マウスの ES 細胞は胚齢 3.5 日目の胚盤胞由来であるため、胚齢 6 日目前後の PGCs の細胞運命の決定までには約 3 日を要するはずである。その間にまずエピブラストに分化させた後に BMP4 の刺激により PGCs に分化させる培養系を構築しなければならない。我々はこれまでの多能性細胞に関する研究から²⁵⁾²⁶⁾、ES 細胞をエピブラストに近い状態の細胞に分化させるためには *Activin* と *FGF* のシグナルが重要であることを想定していた。そこで *BVSC*-ES 細胞を *Activin A* と *bFGF* を含む培地で培養した。種々の条件検討の結果、培養開始後 2 日目に胚内のエピブラストと非常によく似た遺伝子発現パターンをもつエピブラスト様細胞 (*Epiblast*-like cells: *EpiLCs*) を分化誘導する培養方法を確立した。この *EpiLCs* は BMP4 依存的に 2 日以内に *Blimp1*-*mVenus* を、4 日以内に *Stella*-*ECFP* を発現し、PGC 様細胞 (*PGC*-like cells: *PGCLCs*) へ分化することが明らかになった (図 3)²⁷⁾。PGCLCs は胚内の PGCs と良く似た遺伝子発現パターンをもち、さらには免疫染色によるエピゲノムの観察の結果、胚内の PGCs と同じように DNA のメチル化の減少、H3K9me2 の減少と H3K27me3 の亢進が認められた。これらのことから、ES 細胞-EpiLCs-PGCLCs の細胞系譜は、胚内における ICM-エピブラスト-PGCs の分化過程を正確に再現しているものと考えられた (図 3)。

4. PGCLCs の配偶子への分化能

上述したように体外で分化誘導した PGCLCs を評価するためには、機能的な配偶子への分化能を検討する必要がある。胚の PGCs は精巣の精細管に移植すると個体発生能をもつ精子に分化する報告に基づき²⁸⁾、我々は雄の ES 細胞から分化誘導した PGCLCs (誘導培養 6 日目) を自身の精子形成細胞をもたない *c-kit* 変異 (*W/W^v*) マウスの精細管内に移植することにより、機能的な精子への分化能を評価した (図 4)。その結果、移植後 10 週目の精細管に PGCLC 由来の精子の形成を認めた²⁷⁾。それらの精子は顕微授精により卵子細胞質内に導入すると受精反応を示し、得られた受精卵は健全な新生仔に発生した。これらの個体は通常のマウスと同じように成長し、雌雄ともに野生型のマウスとの交配により妊孕性が確認された。以上のことから雄の PGCLCs は機能的な精子にまで分化できることが証明された。

次に雌の ES 細胞から分化誘導した PGCLCs の卵子への分化能を評価した。雄とは異なり生殖細胞の卵巣への移植はそれほど確立された実験系はない。我々は先行研究²⁹⁾³⁰⁾ を参考に PGCLCs を単独ではなく、卵子形成を補助する胚齢 12 日目の雌の生殖巣 (将来の卵巣) の体細胞と共に免疫不全マウスの卵巣嚢内に移植した (図 4)。その結果、移植後約 1ヶ月目の卵巣には多数の PGCLC 由来の卵母細胞が確認された。これらの卵母細胞は体外成熟培養により受精可能な卵子にまで分化し、野生型の雄の精子と体外受精させた受精卵は健全な新生仔に発生した³¹⁾。このことから雌の ES 細胞から分化誘導した PGCLCs は機能的な卵子に分化する能力をもつことが証明された。

5. iPS 細胞からの PGCLCs の分化誘導と配偶子形成

上述した分化誘導系はレポーター遺伝子の発現を指標に PGCLCs を単離するが、レポーター遺伝子をもっていない ES 細胞や iPS 細胞には適用できない。我々は PGCLCs の細胞表面に特異的に発現する内因

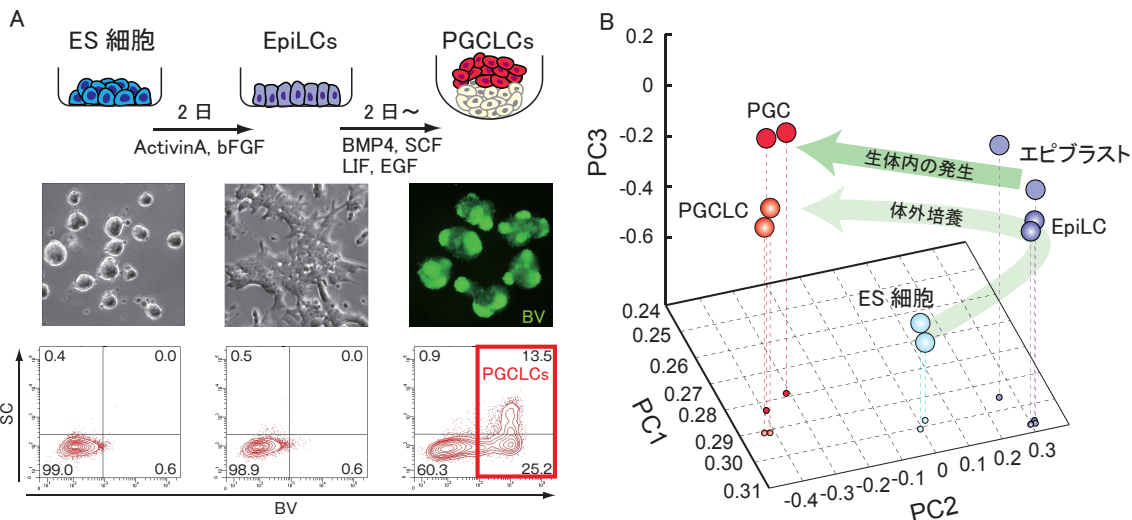


図3 体外培養によるES細胞からのPGCsの分化誘導系

(A) (上段) ES細胞をActivinAとbFGFの存在化で培養するとエピプラスト様細胞(EpiLCs)に、BMP4等と培養するとPGC様細胞(PGCLCs)に分化する。(中段)それぞれの細胞の形態を示す。PGCLCsはBlimp1-mVenus(BV)の発現を蛍光顕微鏡下で観察したもの。(下段)PGCLCsへの分化を示すFACS解析。レポーター遺伝子BVとSCはPGCLCsに分化した細胞に発現する。(B) ES細胞からPGCLCsまでの分化過程の遺伝子発現の変化を胚のPGCsの分化過程のものと比較した主成分分析。エピプラストからPGCLCsの分化は胚のエピプラストからPGCsへの分化をよく踏襲している。

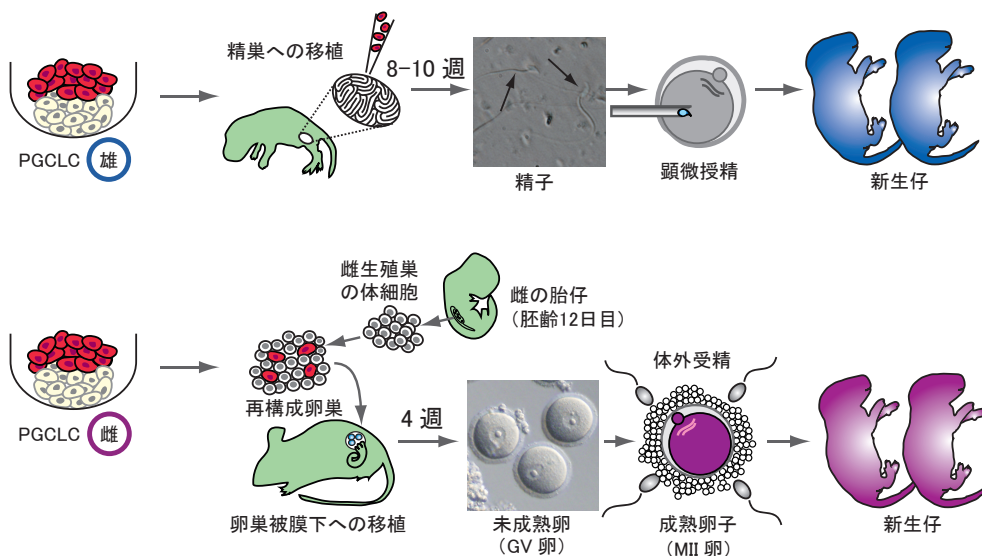


図4 PGCLCsの移植による配偶子への分化

雄のPGCLCsを精巣に移植することにより精子が得られる。またその精子は卵子へ注入することにより個体発生能をもつ受精卵を構成した。雌のPGCLCsは胚齢12日目の雌の生殖巣の体細胞と共に免疫不全マウスの卵巣嚢内に移植すると、移植された体内においてGV卵まで分化し、その後体外培養により受精可能な成熟卵子まで分化する。これらの卵子も野生型の精子と受精させることにより個体発生能をもつ受精卵となる。

性のタンパク質の同定と抗体による標識を試みた。先行研究により報告されている PGCs の細胞表面に発現するタンパク質に対する抗体を PGCLCs と反応させたところ、 $\beta 3$ インテグリン (Itgb3) とステージ特異的胚抗原 1 (SSEA1) を両方発現する細胞分画にほぼすべての PGCLCs が濃縮されていることを FACS 解析により明らかにした。遺伝子発現解析の結果、レポーター遺伝子をもつ BVSC-ES 細胞から単離された Blimp1-mVenus 陽性の PGCLCs とレポーター遺伝子を持たない ES 細胞から単離された Itgb3 陽性/SSEA1 陽性細胞はほぼ同等の遺伝子発現パターンをもつことが明らかとなった。

この知見をもとに胎仔 (雄) の繊維芽細胞由来の iPS 細胞 (20D-17) から PGCLCs を誘導したのちに、Itgb3 陽性/SSEA1 陽性細胞の分画を単離し、W/W^v マウスの精巣の精細管内に移植した。その結果、iPS 細胞から分化誘導した PGCLC 由来の精子の形成が認められ、得られた精子を顕微授精により卵子に導入したところ、受精卵が得られた。これらの受精卵は仮親の卵管への移植により新生仔にまで発生した²⁷⁾。これらのことは Itgb3, SSEA1 は機能的な PGCLCs を単離するための十分な細胞表面抗原となること、および本分化誘導系は iPS 細胞にも適用が可能であることを示している。

6. PGCLCs の分化誘導培養系を用いた生殖細胞研究の新展開

(1) 生殖細胞系列が分岐する分子メカニズムに迫る

PGCLCs の分化誘導系の確立により、胚あたり数百個しかないエピブラストや 50 個程度しかない分化初期の PGCs と同等の細胞を 10^6 個程度調整することが可能となった。このことは遺伝学的な解析に依存してきた現状を打破して、技術的には生化学的な手法などにより PGCs の分化メカニズムを解明することを可能にした。また培養の開始点が ES/iPS 細胞であるために、遺伝子改変が容易であり、遺伝子欠損による解析を迅速に行えることや誘導的強制発現系による遺伝子機能の解明も飛躍的に進むことが期待される。冒頭で述べたシグナル分子 Smad1 や Smad5, 転写因子 Blimp1 や Prdm14 の標的遺伝子については今後 ChIP 解析などで明らかとなってくるであろう。実際に我々は Smad1 を標的として ChIP 解析を行った結果、Smad1 は Blimp1 や Prdm14 の発現制御領域には直接結合しないことから、BMP4 のシグナルはこれらの転写因子の発現には 2 次的に関わっていることが示唆されている³²⁾。一方、誘導的強制発現系を用いた実験系により、Prdm14 のみを EpiLCs に発現させると機能的な PGCLCs に分化することが明らかとなった³³⁾。このことにより Prdm14 は PGCLCs の分化に十分な役割を持つことが証明され、今後の研究において Prdm14 を中心とした機能解析により PGC 分化の遺伝子ネットワークが明らかになると考えられる。

(2) 全能性を規定するエピゲノムの実態に迫る

上述したように PGCs は特徴的なエピゲノム修飾をもつが、その生物学的意義は明らかではない。さらには特にヒストン修飾に関してはこれまでのところ免疫染色による観察が主な情報源であり、実際にヒストン修飾が PGCs のゲノムのどのような位置に付いているかは不明である。これには各ヒストン修飾に対して特異的な抗体により ChIP を行う必要がある。分化誘導系により得られた十分な数の PGCLCs を使用することにより詳細なエピゲノムマップが描かれれば、生殖細胞系列の全能性を理解するための貴重なデータとなると考えられる。

(3) iPS 細胞を用いた不妊症の病態解明

突然変異による配偶子欠損を呈する動物については、その系統を維持することが困難であり十分な解析が行われない。PGCLCs の分化誘導系では iPS 細胞から機能的な生殖細胞系列を分化させることが可能なため、突然変異体から iPS 細胞を樹立することにより系統の遺伝情報の維持と生殖細胞系列での詳細な解析が可能となる。このことは機能的に未知の遺伝子の同定につながると考えられ、将来的にヒトの不妊原因の同定などにも大きく貢献すると考えられる。

(4) ヒト生殖細胞系列への応用

マウス ES/iPS 細胞から機能的な PGCLCs を分化誘導する方法はヒトへ応用できる可能性をもつ。ヒト ES/iPS 細胞から生殖細胞系列を分化させることが可能となれば、ヒト生殖細胞の発生・分化のメカニズムの解明にもつながり、配偶子の欠損に起因する不妊症の原因究明にも貢献する。無論、倫理的・法的な問題や安全性の確認など、まだまだ慎重な議論をすることが前提だが、技術的な側面からヒトへの応用における問題を議論すると、マウスとヒトの ES/iPS 細胞では性質の相違があること、ヒト PGCs の分化様式が未解明であること、体外で作製された生殖細胞系列の機能的評価が困難であること、などがあげられる。マウスとヒトの ES/iPS 細胞では性質の相違については、最近になってヒト ES/iPS 細胞の性質がマウスの ES/iPS 細胞のものに近くなる培養法が次々に報告されている^{34)~36)}。ヒト PGCs の分化様式や機能的評価などについてはサルなどの類縁の動物などを用いることにより徐々に様々なことが明らかにされるであろう。マウスでの研究が発端になって、このような応用研究が発展していくことを期待する。

参 考 文 献

- 1) Hayashi K, de Sousa Lopes SM and Surani MA : Germ cell specification in mice. *Science* 316 : 394-396, 2007
- 2) Sasaki H and Matsui Y : Epigenetic events in mammalian germ-cell development : reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 9 : 129-140, 2008
- 3] Lawson KA and Hage WJ : Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found. Symp.* 182 : 68-84; discussion 84-91, 1994
- 4] Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP and Hogan BL : Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 13 : 424-436, 1999
- 5) Hayashi K, Kobayashi T, Umino T, Goitsuka R, Matsui Y and Kitamura D : SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast. *Mech. Dev.* 118 : 99-109, 2002
- 6) Chang H and Matzuk MM : Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech. Dev.* 104 : 61-67, 2001
- 7) Aubin J, Davy A and Soriano P : In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways : impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev.* 18 : 1482-1494, 2004
- 8) Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovskiy A, Saitou M and Surani MA : Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436 : 207-213, 2005
- 9) Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K and Saitou M : Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev.* 22 : 1617-1635, 2008
- 10) Turner CA, Jr., Mack DH and Davis MM : Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77 : 297-306, 1994
- 11) Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG and Calame K : Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19 : 607-620, 2003
- 12) Kallies A, Hawkins ED, Belz GT, Metcalf D, Hommel M, Corcoran LM and Hodgkin PD and Nutt SL : Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat Immunol* 7 : 466-474, 2006
- 13) Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M, Szabolcs M, Herron A, Magnusdottir E and Calame K : Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol* 7 : 457-465, 2006
- 14) Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, Vrana J, Jones K, Grotewold L and Smith A : Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450 : 1230-1234, 2007
- 15) Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, Yamanaka K, Ohinata Y and Saitou M : Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat. Genet.* 40 : 1016-1022, 2008
- 16) Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I and Smith A : Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138 : 722-737, 2009
- 17) Yamaji M, Ueda J, Hayashi K, Ohta H, Yabuta Y, Kurimoto K, Nakato R, Yamada Y, Shirahige K and Saitou M : PRDM14 ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse

- embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 12 : 368–382, 2013
- 18) Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, Popp C, Thienpont B, Dean W and Reik W : The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol. Cell* 48 : 849–862, 2012
 - 19) Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M and Matsui Y : Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.* 278 : 440–458, 2005
 - 20)** Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, Boiani M and Scholer HR : Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300 : 1251–1256, 2003
 - 21) Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R and Noce T : Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 : 11457–11462, 2003
 - 22) Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K and Daley GQ : Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427 : 148–154, 2004
 - 23) Lacham-Kaplan O, Chy H and Trounson A : Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* 24 : 266–273, 2006
 - 24) Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann IE, Elliott DJ, Okpanyi V, Zechner U, Haaf T, Meinhardt A and Engel W : In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 11 : 125–132, 2006
 - 25) Hayashi K, Lopes SM, Tang F and Surani MA : Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* 3 : 391–401, 2008
 - 26) Hayashi K and Surani MA : Self-renewing epiblast stem cells exhibit continual delineation of germ cells with epigenetic reprogramming in vitro. *Development* 136 : 3549–3556, 2009
 - 27)** Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S and Saitou M : Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146 : 519–532, 2011
 - 28) Chuma S, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Hosokawa M, Nakatsuji N, Ogura A and Shinohara T : Spermatogenesis from epiblast and primordial germ cells following transplantation into postnatal mouse testis. *Development* 132 : 117–122, 2005
 - 29) Hashimoto K, Noguchi M and Nakatsuji N : Mouse offspring derived from fetal ovaries or reagggregates which were cultured and transplanted into adult females. *Dev Growth & Differ* 34 : 233–238, 1992
 - 30) Matoba S and Ogura A : Generation of functional oocytes and spermatids from fetal primordial germ cells after ectopic transplantation in adult mice. *Biol. Reprod.* 84 : 631–638, 2011
 - 31)** Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H and Saitou M : Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 338 : 971–975, 2012
 - 32) Aramaki S, Hayashi K, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Kato Y, Shirahige K and Saitou M : A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell* 27 : 516–529, 2013
 - 33) Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y and Saitou M : Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature* : 2013
 - 34) Chan YS, Goke J, Ng JH, Lu X, Gonzales KA, Tan CP, Tng WQ, Hong ZZ, Lim YS and Ng HH : Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell* 13 : 663–675, 2013
 - 35) Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N and Hanna JH : Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* : 2013
 - 36) Takashima Y, Guo G, Loos R, Nichols J, Ficz G, Krueger F, Oxley D, Santos F, Clarke J, Mansfield W, Reik W, Bertone P and Smith A : Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human. *Cell* 158 : 1254–1269, 2014

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です。)