

始原生殖細胞の試験管内再構成系とその応用： エピゲノムリプログラミング機構の解明に向けて

栗本 一基, 齋藤 通紀

京都大学大学院医学系研究科機能微細形態学

はじめに

生殖細胞は世代を越えた生命の継承を担う細胞種であり、次世代への遺伝情報の正確な伝達、減数分裂によるゲノムの多様性、胚発生のすべてを滞りなく行うための全発生能の（再）獲得などの特性を持つ。始原生殖細胞（primordial germ cells; PGCs）は胚発生時にのみ出現する生殖細胞の起源であり、全発生能の再獲得や次世代へのゲノム情報の伝達を実現するため、ゲノムに付加された後成的情報を初期化・刷新すると考えられている（エピゲノムリプログラミング）。PGCsは胚発生の初期において一時的に現れる少数の細胞であり、形態的にも体細胞との判別が容易ではないために、分子生物学的、生化学的、細胞生物学的なアプローチは、長年にわたり困難であった。近年、単一細胞発現プロファイルの解析、主要因子の遺伝学的解析、機能的なPGCsの試験管内再構成系の開発により、PGCs形成機構の理解が飛躍的に進展した。本稿では、これらの研究進展の経緯を、最近の知見を含め概説したい。

始原生殖細胞の形成過程とその細胞生物学的特性

生殖細胞の起源である始原生殖細胞（primordial germ cells; PGCs）は、胚発生の初期に出現する。哺乳類におけるPGCsの研究は、主としてマウスをモデル動物として行われてきた。マウスの胚は、発生5日ごろに、胚組織のすべてを構築するべく運命づけられた一層の多能性の上皮葉組織 epiblast を形成し、発生6日ごろに原腸陥入を開始する（図1）。Epiblastは上皮間葉転換を起こして中胚葉・内胚葉へと分化し、胚体および胚体外組織を形成する三胚葉を形成する。PGCsは三胚葉のいずれにも属さない細胞系譜として、原腸陥入において体細胞

系から運命を分かち、

古典的研究により、PGCsは発生7.5日ごろに、原腸の後部、胚体外中胚葉の尿膜基底底部において、アルカリフォスファターゼ陽性細胞として同定された [1]。細胞の色素標識による系譜追跡や、移植などの発生生物学的実験によって、PGCsがepiblastの近位（マウスのepiblastは特徴的なコップ状構造をしており、前後・背腹・左右に加え、遠位・近位軸が存在する）に由来することが示された [2, 3]。また遺伝学的な解析により、epiblastに発現する液性因子WNT3と胚体外中胚葉に発現する液性因子BMP4が必須であることが知られている [4, 5]。単一細胞遺伝子発現解析により、初期のPGCsを特異的に発現する遺伝子 *stella* (*Pgc7/Dppa3*) と *fragilis* が同定され、PGCsが特異的にマークされるようになった [6]。さらに、転写制御因子 *Blimp1* が、それまでPGCs形成が始まると考えられていたよりも明らかに早い発生6.25日ごろに、epiblast最後部のわずか数個の細胞において *Bmp4* 依存的に発現を開始することが示された [7]。 *Blimp1* をノックアウトすると正常なPGCsは全く形成されなくなり、PGCsの運命決定に必須な特異的な内在因子として同定された。また、 *Blimp1* と *stella* の制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスが開発され、PGCsを容易に可視化することが可能となって研究が促進された [8]。

PGCsが形成される時期のepiblast後部は、まさに原腸陥入を進行しつつあって、 *T* (*Brachyury*)、 *Hox* 遺伝子群をはじめとする転写制御因子が体軸に沿った体細胞のパターン形成を行うべく順序よく発現していく。ゲノムワイドな単一細胞発現プロファイルの解析等により、最初期のPGCsが中胚葉誘導の強い影響下において、これら中胚葉関連因子群を一過的に発現することが明らかになった [9, 10]。転写制御因子 *Blimp1* を強く発現する細胞だけが、中胚葉化を抑制し、PGCs特有の発現プログラムを獲得する。さらに、 *Blimp1* 強陽性細胞においては新規DNAメチル化酵素群 (*Dnmt3a*, *Dnmt3b*) やメチル化の維持に関わる因子 (*Uhrf1/Np95*) の発現が著しく低下し、後述するゲノムワイドなDNAの脱メ

連絡先：栗本一基, 京都大学大学院医学系研究科機能微細形態学

〒606-8501 京都市左京区吉田牛ノ宮町

TEL : 075-753-4337

FAX : 075-751-7286

E-mail : kurimoto@anat2.med.kyoto-u.ac.jp

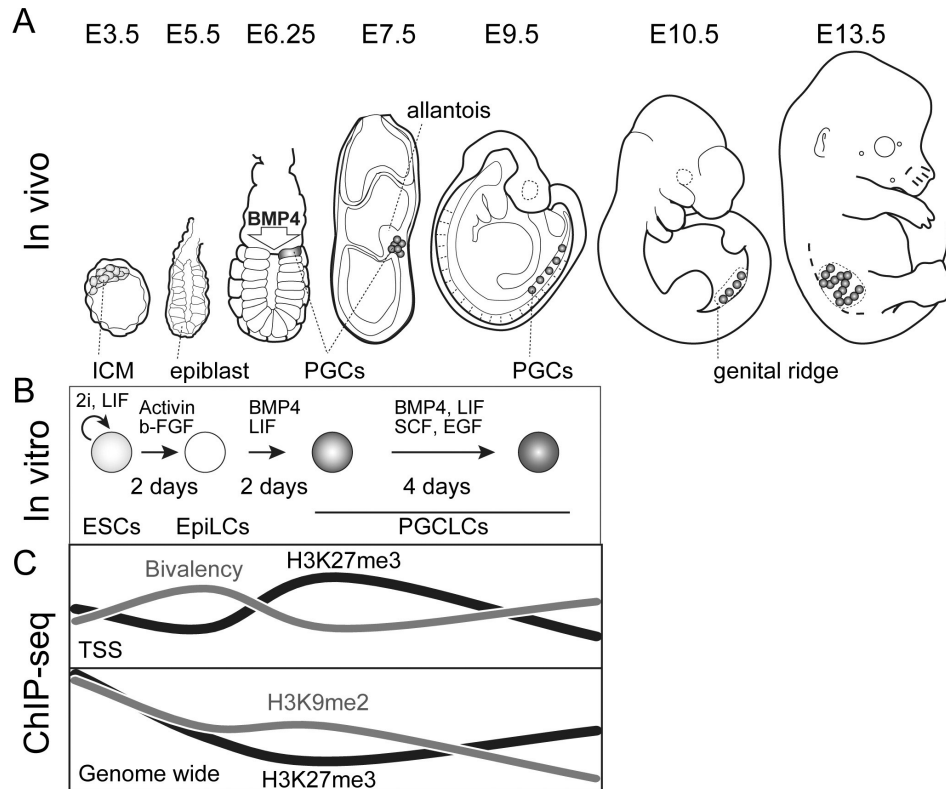


図1 マウス胚発生とPGCLCs誘導系
 (A) マウス胚発生模式図. inner cell mass (ICM), epiblast, primordial germ cells (PGCs) を示す.
 (B) 試験管内PGCs再構成系. ICMに対応するESCs, epiblastに対応するEpiLCs, PGCsに対応するPGCLCsと, それぞれの細胞の誘導に用いられるサイトカインや化合物を示す.
 (C) PGCLCsを用いたエピゲノム解析の概要.

チル化に寄与すると考えられる. *Blimp1* 遺伝子を破壊すると, 本来 PGCs になるように運命づけられた細胞においても中胚葉化が抑制されず, 周囲の体細胞と区別できない発現プロファイルを示すようになってしまう.

PGCs は, *Blimp1* によって体細胞化を抑制しながら, 尿膜基底部に数十個の細胞からなるクラスターを形成し, 特異的な遺伝子群の発現を獲得する. その後, 将来の生殖巣に向かって移動するべく1つひとつ遊離し, 後腸上皮の中にもぐりこんでいく. 興味深いことに, この時期の PGCs は, *Oct3/4* や *Nanog* など, 胚性幹細胞 (Embryonic stem cells; ESCs) や多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSCs) 等の多能性幹細胞で重要な働きをする転写因子群を高発現する [9, 10]. 一方, ESCs や iPSCs を胚盤胞に注入すると, 三胚葉のすべてに由来する細胞種に分化することができるが, PGCs はどの細胞組織にも寄与することができない. ところが, 胚発生時に生殖巣以外の部位に到達した PGCs は各胚葉由来の細胞が無秩序に混在する奇形腫の原因となり, さらに奇形腫からは, 多能性幹細胞 Embryonic Carcinoma cells (EC cells) を単離することができる [11, 12]. ま

た, PGCs を適当な条件下で培養すると ESCs や iPSCs と同様の多能性幹細胞 (embryonic germ cells; EG cells) へと「脱分化」させることができる [13]. さらに多能性幹細胞は, 精巣由来の雄性生殖細胞系列の幹細胞 Germ line stem cells (GS cells) からも樹立することができる [14]. これらの事実は, PGCs を含む生殖細胞系列が, 潜在的に多能性を保持し続け雌雄配偶子の接合とともに全発生能を発揮するための基盤となっていることを示唆する. これは「潜在的多能性」と呼ばれており, PGCs はその形成過程の初期においてこの特性を獲得する.

この時期の PGCs は, インプリント領域やトランスポゾンを含む, 全ゲノムにわたる DNA のメチル化を低下させる [15-17]. また, 転写抑制に関わるヒストン修飾 H3K27me3 (ポリコームによる転写抑制を反映する) と H3K9me2 (G9A/GLP による転写抑制を反映する) のレベルが短期間の内に激しく変動する. すなわち, それぞれのヒストン修飾に対する抗体を用いて免疫染色すると, 周囲の体細胞に比べて H3K9me2 が著しく減少するのに対し, H3K27me3 のレベルは増加する [18]. これ

らの後成的修飾の変動はエピゲノムリプログラミングと呼ばれる。

潜在的多能性の（再）獲得とエピゲノムリプログラミングは、全発生能を保持しつつ、次世代に継承するゲノムを正しく初期化するために重要な特性であると考えられている。遺伝学的解析や単一細胞発現解析によって、エピゲノムリプログラミングや潜在的多能性の再獲得に主要な役割を果たす転写因子 *Prdm 14* が同定された [19]。 *Prdm 14* は PGCs 形成に必須であり、 *Blimp 1* とほぼ同時期に PGCs 特異的に発現する。また、 *Prdm 14* は胚盤胞内部細胞塊 (inner cell mass; ICM) や、そこから樹立される ESCs にも発現しており、ポリコームと協働して Fgf シグナルと DNA メチル化酵素を抑制することによって、多能性細胞のナイーブな状態 (naïve pluripotency) を保つ [20]。

後腸に移動した PGCs は細胞周期をほぼ停止し [21]、背側腸間膜を通過して発生 10.5 日ごろに、形成されつつある生殖巣に移動する。そこで細胞周期の停止が解除され、細胞数を増加しつつ DNA のメチル化レベルをさらに低下させ、雌雄それぞれの生殖細胞として分化していく。

PGCs の試験管内再構成系の確立

PGCs は胚発生にのみ、一過的に出現する少数の細胞であるため、可能な生化学的・分子生物学的解析は限定されていた。このため、PGCs 形成機構の詳細な解析に用いることができる、機能的な PGCs を誘導する培養系の開発が待たれていた。大日向らは、マウス胚から単離した epiblast を浮遊培養して BMP4 をはじめとするサイトカインで刺激することにより、高い効率で PGCs 様の細胞を誘導し、その細胞を不妊マウス新生仔の精巣に移植すると機能的な精子形成に寄与することを示した [5]。

その後、林らは 2011 年に、PGCs の分化過程が胚盤胞内部細胞塊 (inner cell mass; ICM) から epiblast を介して行われることに注目し、まず ESCs や iPSCs を Activin A と bFGF の存在下で平面培養することによって、epiblast に著しく類似した遺伝子発現プロファイルを示す細胞 epiblast like cells (EpiLCs) を誘導することに成功した [22]。PGCs の蛍光レポーター (*Blimp 1* および *stella*) をもつ EpiLCs を、BMP4 をはじめとするサイトカイン存在下で浮遊培養すると、epiblast からの誘導と同様の高い効率で蛍光タンパク質を強く発現する PGCs 様の細胞が観察された (PGC-like cells; PGCLCs)。

PGCLCs は、胚体内の PGCs と同様に、まず中胚葉関

連因子群が一時的に高発現し、ついでそれらが抑制され、多能性関連因子群の再獲得、エピゲノムリプログラミング (DNA メチル化の低下、H3K27me3 の亢進、H3K9me2 の低下) と続く発生過程をたどった。PGCLCs の遺伝子発現をゲノムワイドに解析すると、発生 9 日目における胚体内の PGCs によく類似したプロファイルを示すことが明らかになった。さらに、誘導した PGCLCs を単離して不妊マウス新生仔の精巣に移植すると、未分化な多能性細胞に由来するテラトーマを形成することなく、機能的な精子形成に寄与した。このことは、PGCLCs が遺伝子発現、エピゲノム、機能のいずれの側面から見てもまさしく試験管内で再構成された PGCs に対応する細胞であり、その誘導過程もまた、PGCs のそれによく対応づけられることを示している。また、この研究により EpiLCs が epiblast に相当する培養細胞であることも示されたといえる。PGCLCs を誘導する EpiLCs の能力は、ESCs から誘導してから 2 日目に最も高くなり、その後は失われていく。この事実も、epiblast が胚体内に一過的に現れる細胞であることとよく一致している。さらに 2012 年には、メスマウス由来の PGCLCs を、メス生殖隆起の体細胞と混合して細胞塊を形成し、卵巣被膜化に移植することにより、機能的な卵母細胞へと分化させられることが示された [23]。この一連の研究により、多能性幹細胞からの PGCs 再構成系が確立され、初期 PGCs 形成機構の詳細な解明への道が拓かれた。

転写因子による PGCs の再構成

PGCs 試験管内再構成系を用いた、生殖系列決定機構の解明において、まず重要と考えられたのは PGCs 形成に十分な内在性因子の同定であった。マウスの遺伝学的研究から、PGCs 形成に必須であることが示された 3 つの転写因子 [*Blimp 1*, *Prdm 14*, *Tfap 2c (Ap 2γ)*] を、EpiLCs に強制発現させると、ほぼすべての細胞が PGCLCs に分化した (transcription factor-induced PGCLCs: TF-PGCLCs) [24]。この細胞を精巣に移植すると正常な精子形成に寄与し、健全な個体が得られた。ところが遺伝子発現を詳細に解析すると、胚体内の PGCs で観察される中胚葉プログラムの一時的な活性化が、TF-PGCLCs では認められないことが明らかになった。このことは、TF-PGCLCs が中胚葉を経ずに EpiLCs から直接誘導されていることを示しており、それでは一体なぜ、PGCs が一時的にでも中胚葉プログラムの活性化を経なければならないのか、という新たな疑問を惹起した。また、これらの転写因子群を ESCs に直接強制発

現しても TF-PGCLCs は誘導されず、PGCs の誘導には EpiLCs や epiblast に特有のコンピテンスが重要であることが示された。

興味深いことに、*Prdm 14* のみを EpiLCs に強制発現させた場合でも機能的な TF-PGCLCs が誘導され、3つの転写因子すべての同時発現とほぼ同等の遺伝子発現変化を示した。詳細な発現解析によって *Prdm 14* が PGCs 特異的な遺伝子群や多能性関連因子群の発現誘導、DNAメチル化酵素の発現抑制を行っていることが示唆された。このことは PGCs 形成過程における *Prdm 14* の中心的役割を強く示唆している。また、ESCs における *Prdm 14* の機能との類似性は興味深い。この研究によって機能的に十分な転写因子群が同定されたので、PGCs 形成における遺伝子始制御機構の更なる解明が期待される。

PGCs 形成過程における中胚葉誘導の意義

PGCs が誘導されるためには、胚体外からの BMP4 シグナルの前に、epiblast での WNT3 シグナルが必要であり、これが生殖細胞誘導のコンピテンス獲得に重要であると考えられた。*Wnt 3* ノックアウト胚に由来する試験管内誘導系において、培養液に WNT3 を加えると失われたコンピテンスが回復することが示された [25]。さらに WNT3 を加えるタイミングを BMP4 と同時にしても PGCLCs が誘導されることが示され、EpiLCs の形成自体には WNT3 が必要ではないことが明らかになった。さらなる解析によって、EpiLCs において、WNT3 によって誘導される多くの中胚葉関連転写因子群が同定された。その中でも、中胚葉誘導に重要な働きをする、古典的によく知られた転写因子 *T* (*Brachyury*) が、PGCs の分化に必要であることが明らかになった。*Wnt 3* ノックアウト EpiLCs に *T* を強制発現すると、BMP4 のシグナルなしに *Blimp 1* や *Prdm 14* の発現が効率よく誘導された。クロマチン免疫沈降と次世代シーケンスの組み合わせ (ChIP-Seq) により、*T* が *Blimp 1* と *Prdm 14* の近傍のゲノム領域に結合すること、さらにこれらの *T* 結合部位が転写を活性化する機能をもつことが示された。このことは、中胚葉因子である *T* が WNT3 シグナルの下流にあって、PGCs を誘導する転写制御因子群の最上流に位置することを示唆している。

EpiLC に *T* を強制発現すれば、WNT3 や BMP4 を加えることなく PGCs プログラムを開始することができる。しかしながら WNT3 が *T* の発現を誘導する一方で、BMP4 なしには PGCLCs は誘導されない。BMP4 の役割とは何なのであろうか？ 興味深いことに、*Wnt 3* ノッ

クアウト細胞を WNT3 に曝露してから *T* を強制発現させると、WNT3 への曝露時間が長ければ長いほど、*Blimp 1* と *Prdm 14* の発現誘導が阻害された。すなわち、WNT3 は *T* の発現を誘導するが、WNT3 によって誘導されるその他の体細胞プログラムは PGCs の誘導に対して抑制的に働くと考えられる。このため BMP4 は、WNT3 シグナルの作用を制御し、PGCs プログラムが誘導されるための許容状態を作り出しているのではないかと考えられる。このことは胚体において、PGCs が BMP4 産生部位の最も近傍で、すなわち最も強い BMP4 シグナルの存在下で形成されることともよく一致する。

PGCLCs におけるクロマチン動態の解明

蛍光免疫染色や Western blot により、PGCs がその形成過程の初期から大規模なエピゲノム変動を示すことが示されてきた。われわれは、ゲノムのどの部位がその制御の対象となっているのかを解明するために、転写活性化に関連するヒストン修飾 (H3K4me3 と H3K27ac)、転写抑制に関わる修飾 (H3K9me2 と H3K27me3)、および転写制御因子 BLIMP1 と *T* について ChIP-seq を行い、ESCs から EpiLCs を介して PGCLCs が誘導される過程を定量的に解析した [26]。その結果、この過程におけるヒストン修飾パターンの大規模な再編成が明らかになり、特に H3K27me3 は、全ゲノムにわたる基底レベルの変動に、特定の遺伝子周辺での修飾レベルが重ね合わさった複雑な動態を示した (図 1)。遺伝子周辺の相対的な H3K27me3 レベルは、EpiLCs で最も低くなり、この細胞の「プライムされた多能性状態 (primed pluripotent state)」を反映することが示唆された。中胚葉誘導の開始とともに、形態形成等に関連する遺伝子群の周辺で H3K27me3 レベルが顕著に増加し、PGCLCs ではその傾向がさらに増強された。

H3K4me3 は遺伝子のプロモーター付近に局在して H3K27me3 と均衡をとるように分布し、両者の修飾レベルは対数逆相関を示す。多くの発生関連遺伝子群は、多能性幹細胞や後期の PGCs において、H3K4me3 と H3K27me3 の両方が一定レベル以上で共存する二価状態 (bivalent state) にある。このことは、これらの遺伝子を転写活性化と抑制の平衡状態に保ち、適切な発生タイミングで発現を開始するために重要な機構なのではないか、すなわち、(潜在的) 多能性の基盤なのではないかと考えられている。EpiLCs では多数の遺伝子が二価状態にあり、次いで中胚葉誘導とともに、一部の遺伝子から H3K4me3 が失われる。その後、PGCLCs の誘導において、

H3K27me3とともに H3K4me3レベルが再び増加し、多くの遺伝子が新たに二価状態を取るようになる。すなわち、PGCLCsにおける発生関連遺伝子群は、高レベルの H3K27me3に代表される強い抑制状態を取りつつ、一定レベルの H3K4me3をも獲得し独特の均衡状態を形成しているといえる。

これと同時に、H3K9me2は、EpiLCsからのPGCLCs誘導過程においてほぼ一定のペースで減少し続けた。H3K9me2は、核ラミナとゲノムの相互作用ドメイン(Lamina associated domains; LADs)において高いレベルを示すことが知られている。PGCLCsではLADsからもH3K9me2が失われ、同時に核周辺部における4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 強陽性のヘテロクロマチン領域の減少が観察された。このことはPGCLCsがエピゲノムリプログラミングに伴い、核の構造をも変化させていくことを示唆している。

転写因子TとBLIMP1の結合部位の解析から、Tが、初期中胚葉関連因子群とPGCs決定因子群(*Blimp1*および*Prdm14*)の周辺に、H3K27acをリクルートして転写を活性化すること、次いでBLIMP1が、より広範な発生関連遺伝子群を直接の標的にして、体細胞プログラムを抑制することが示唆された。BLIMP1の結合を追うようにして、周辺にH3K27me3が広がり、BLIMP1によるポリコームを介した発現抑制や、全ゲノムにわたるH3K27me3増加への関与が示唆される。

ゲノムワイドなDNAメチル化レベルの低下は、主要なエピゲノムリプログラミングの1つである。初期胚や、発生9.5日以降のPGCsにおけるゲノムDNAのメチル化パターンの動態は、Bisulfite sequencing (DNAを亜硫酸水素ナトリウムで処理することによって、メチル化されていないシトシンをウラシルに変換してからシークエンス解析する手法)を用いて、詳細に解析されてきた[17, 27-31]。これらの研究により、ゲノムワイドなDNA脱メチル化機構として、DNAの複製に依存した受動的なメカニズムが有力視されている。また発生9.5日のPGCsにおいて、すでに相当なDNAの脱メチル化が起きており、その後さらに、受動的な機構による脱メチル化が進行することが強く示唆されている。しかしながら、発生9.5日以前のPGCsにおけるDNAのメチル化動態は未解明であり、この時期のPGCsが増殖をほぼ停止していることから、その脱メチル化機構は興味深い。試験管内培養系を用いた詳細な解析が待たれている。

ヒトPGC (LCs) の誘導とその形成過程の解明に向けて

ヒトPGCsの形成機構は、現在までほとんど分かっていない。古典的な記述は、Fussによる形態学的解析で、発生3週目の終わりに卵黄囊背側壁の内胚葉にPGCsが同定された[32]。その後の解析により、卵黄囊背側壁から後腸、腸間膜を経て生殖巣に至る過程が示された[33, 34]。PGCsは周囲の体細胞より大きく、淡明な細胞質と著明な核小体等の形態的特徴や、過ヨウ素酸-シッフ(Periodic acid-Schiff; PAS)染色、アルカリフォスファターゼ活性により同定された[35]。

マウスにおけるPGCsの決定機構は、特徴的なコップ状のepiblastの構造とBMP4の供給源となる胚体外外胚葉に依拠している(図1)。ところが、ヒトと含めた霊長類ではepiblastは扁平な胚盤を形成し、胚体外外胚葉に相当する構造をもたない(図2)。このため、ヒトにおいては、マウスとは異なるシグナル伝達機構がPGCsを決定しているのではないかと考えられる。

最近になって複数のグループから、ヒトの多能性幹細胞から、BMP4を含めたサイトカインの刺激によって、マウスの初期PGCs関連遺伝子群を発現し、生殖巣におけるヒトPGCsと一定の類似性を示す遺伝子発現パターンを示す細胞の誘導が報告された[36, 37]。これらの細胞はhuman PGC-like cells(hPGCLCs)と名付けられ、その誘導に内胚葉因子*SOX17*が必要十分な役割を果たすこと、BLIMP1が内胚葉を含む体細胞遺伝子を抑制すること、*PRDM14*が必ずしも必要ではないことなどが報告されている。興味深いことに、hPGCLCsの誘導法は多様であり、すでに3種の誘導法—多能性の「基底状態(ground state)」にあるとされるヒトES細胞(hESCs)[38]から直接誘導する方法、その細胞からマウスEpiLCs

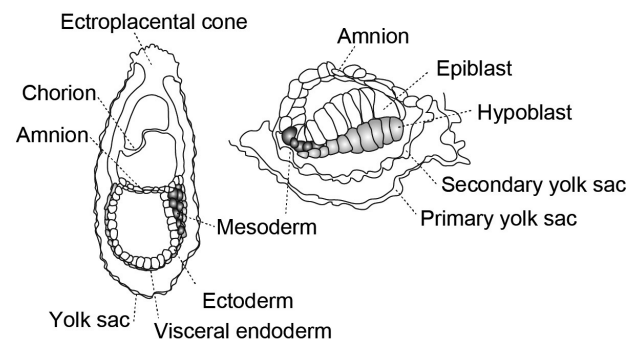


図2 マウスと霊長類の原腸胚の比較
マウス原腸胚(発生7.0日)[40]とアカゲザル原腸胚(発生14日)[41]を示す。マウス胚が特徴的なカップ状のepiblastをもつのに対し、ヒトを含む霊長類ではepiblastは扁平な二層性の胚盤の上層を形成する。

と同様の条件で前駆細胞を誘導する方法，原条または中胚葉様の細胞を含む前駆細胞を経由する方法一が存在している。また，標準的な培養法によって維持されたヒト hESCs からの，直接の誘導効率は著しく低く，hPGCLCs へのコンピテンスには基底状態での維持が重要であるようだ [36]。はたしてこれら hPGCLCs が同じ細胞であるのか，ヒト PGCs に相当する細胞であるのか，またどの発生過程に相当するのか，ヒト多能性幹細胞からの誘導は胚体内のどの発生過程に対応づけられるのか等の興味は尽きず，今後の研究の発展が期待される。また，試験管内で誘導されたヒト生殖細胞の厳密な機能検証は事実上不可能であるため，試験管内での hPGCLCs の解析に加えて，ヒト以外の霊長類における生殖系列形成機構の基礎的研究が必要不可欠であると考えられる。最近，次世代シーケンサーを用いた単一細胞発現解析技術が改善され，高効率かつ信頼性の高い，ゲノムワイドな定量が可能となった [39]。この手法をはじめとして，マウスを用いた研究で培われてきた知見や技術等が，霊長類の生殖細胞研究を切り開いていくと期待される。

おわりに

PGCs 形成機構の研究は，数々の遺伝学的解析，胚体内 PGCs への直接的アプローチを経て，試験管内での培養法が確立されるに至り，急速な進展を遂げつつある。将来的には，臨床応用への展開も視野に入る可能性があるが，倫理的・技術的問題の慎重な議論が必要であろう。ヒト PGCLCs の誘導と，霊長類胚における PGCs 形成機構，そのエピゲノムリプログラミング機構の解明は，今後の中心的課題になっていくであろう。

引用文献

- Ginsburg M, Snow MH, McLaren A (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110 (2), 521-528.
- Lawson KA, Hage WJ (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182, 68-84.
- Tam PP, Zhou SX (1996) The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol* 178 (1), 124-132.
- Lawson KA, et al (1999) Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13 (4), 424-436.
- Ohinata Y, et al (2009) A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 137 (3), 571-584.
- Saitou M, Barton SC, Surani MA (2002) A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418 (6895), 293-300.
- Ohinata Y, et al (2005) Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436 (7048), 207-213.
- Ohinata Y, et al (2008) A comprehensive, non-invasive visualization of primordial germ cell development in mice by the Blimp1-mVenus and stella-ECFP double transgenic reporter. *Reproduction*.
- Kurimoto K, et al (2008) Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev* 22 (12), 1617-1635.
- Yabuta Y, et al (2006) Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod* 75 (5), 705-716.
- Mintz B, Illmensee K (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 (9), 3585-3589.
- Stevens LC (1973) A new inbred subline of mice (129-terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *J Natl Cancer Inst* 50 (1), 235-242.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL (1992) Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.
- Kanatsu-Shinohara M, et al (2004) Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119 (7), 1001-1012.
- Monk M, Boubelik M, Lehnert S (1987) Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 99 (3), 371-382.
- Kafri T, et al (1992) Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 6 (5), 705-714.
- Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K (2012) Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* 139 (1), 15-31.
- Seki Y, et al (2005) Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol* 278 (2), 440-458.
- Yamaji M, et al (2008) Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet* 40 (8), 1016-1022.
- Yamaji M, et al (2013) PRDM14 Ensures Naive Pluripotency through Dual Regulation of Signaling and Epigenetic Pathways in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 1-15.
- Seki Y, et al (2007) Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* 134 (14), 2627-2638.
- Hayashi K, et al (2011) Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146 (4), 519-532.
- Hayashi K, et al (2012) Offspring from oocytes derived

- from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 338 (6109), 971-975.
24. Nakaki F, et al (2013) Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature* 501 (7466), 222-226.
 25. Aramaki S, et al (2013) A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell* 27 (5), 516-529.
 26. Kurimoto K, et al (2015) Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 16 (5), 517-532.
 27. Kagiwada S, et al (2013) Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *Embo J* 32 (3), 340-353.
 28. Seisenberger S, et al (2012) The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell* 48 (6), 849-862.
 29. Arand J, et al (2015) Selective impairment of methylation maintenance is the major cause of DNA methylation reprogramming in the early embryo. *Epigenetics Chromatin* 8 (1), 1.
 30. Smith ZD, et al (2012) A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 484 (7394), 339-344.
 31. Inoue A, Zhang Y (2011) Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* 334 (6053), 194.
 32. Fuss A (1911) Über extraregionare Geschlechtszellen bei einem menschlichen Embryo von 4 Wochen. *Anat Am* 39, 407-409.
 33. Politzer G (1928) Über einen menschlichen Embryo mit 18 Ursegmentenpaaren. *Z Anat EntwGesch* 87, 766-780.
 34. Witschi E (1948) Migration of germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contr Embryol, Carnegie Inst.*, 209, 67-80.
 35. McKay D, et al (1953) Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec* 17, 201-219.
 36. Irie N, et al (2015) SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 160 (1-2), 253-268.
 37. Sugawa F, et al (2015) Human primordial germ cell commitment in vitro associates with a unique PRDM14 expression profile. *EMBO J* 34 (8), 1009-1024.
 38. Gafni O, et al (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504 (7479), 282-286.
 39. Nakamura T, et al (2015) SC3-seq: a method for highly parallel and quantitative measurement of single-cell gene expression. *Nucleic Acids Res* 43 (9), e60.
 40. Kaufman MH (1992) *The Atlas of Mouse Development*. Revised edition ed. London, Academic Press.
 41. Luetkett WP (1978) Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *Am J Anat* 152 (1), 59-97.