

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：羅能文博士

Advisor : Neng-Wen Lo, Ph. D

家兔始基生殖細胞體外再程式化與分化能力之研究

In vitro reprogramming and differentiation
potential of rabbit primordial germ cells

研究生：張永璇

Graduate Student : Yung-Hsuan Chang

中華民國一百零四年一月

January, 2015

Department of Animal Science and Biotechnology
Tunghai University

Master Thesis

Advisor : Neng-Wen Lo, Ph. D

In vitro reprogramming and differentiation
potential of rabbit primordial germ cells

Graduate Student : Yung-Hsuan Chang

January, 2015

東海大學碩士班研究生

論文口試委員審定書

畜產與生物科技學系 張永琰(學號 G98610028) 君所
提之論文：

家兔始基生殖細胞體外再程式化與分化能力之研究，
經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文指導教授 羅能文 (簽章)

畜產與生物科技學系主任 羅能文 (簽章)

考試委員 朱志成 (簽章)

羅能文 (簽章)

杜清富 (簽章)

陳建宏 (簽章)

_____ (簽章)

中華民國 104 年 1 月 8 日

致謝

首先感謝兩位指導教授 羅能文老師與朱志成老師這幾年來的指導和照顧。兩位老師提供的環境讓我無論在科學研究、邏輯思考、處事態度、抗壓性以及個性的成熟上都大幅地躍進，我想這躍進的幅度的確是在其他實驗室得不到的，這一點著實令我感謝；也感謝建宏學長在這兩三年內對我的指導和關心，以及諸多實驗上的實質幫助，讓我知道自己在實驗室並沒有想像中那麼孤獨，這一點讓我由衷感激；同時感謝杜清富博士，感謝杜博願意不辭辛勞來到東海當我的口委，又如此仔細地為我修改論文與提出建議，我知道這不是每一個研究生都有幸碰到的學習機會。學生對於兩位指導教授、建宏學長與杜博如此費心斧正此論文，由衷表達感謝與敬佩。魔鬼藏在細節中，諸多細節上的錯誤必須勞煩老師們指正，我著實感到慚愧。

必須特別感謝的是數以百計在我手上逝去的生命，我不斷說服自己這些生命的犧牲是為了科學研究，而沒有參雜其他自私又現實的原因。每年普渡我都很認真持香鞠躬，雖然罪孽不會因此一筆勾銷，但至少希望這樣能稍稍表達我的抱歉和無奈。

在實驗室的頭兩年，十分感謝盈之學姊嚴格指導我試驗所需的重要技術和諸多身為研究生該守的規矩與基本的能力；還有亞嵐、亞振、采君、欣萍、榮卿幾位學長姐大方地教會我其他技術和各種實驗室的運作細節，讓我能往後的日子裡獨立撐下去；也感謝得吉學長的關心與鼓勵。很慚愧的是，曾經學長姐們教給我的那些實驗室傳統、規矩和精神，已無法往後接棒，我奉之為圭臬的準則一再被無視與鄙夷，這很讓人心痛與不解。人事已非的今天，我常常在想，是何時、何事...抑或何人讓我所熟悉而懷念的 RBL303 不復存在？身處如此的環境，讓我在最後一年的每一天都十分痛苦。人與人的相處逐漸讓我畏懼，似乎在實驗室聽到的每一句話裡頭都有更深的涵義與未知的目的，"我做錯了什麼?"是最常讓我失眠的問題....而更讓我害怕的是：難道自己也是促使這一切發生的推手之一？答案，我不敢想。

所幸在這段難熬的日子裡還是有幾個人不斷給與我支持與鼓勵。首先是婉琦與勳中，謝謝這兩個人接下超折磨人的助理工作，勳中甚至是這整個研究所生涯中唯一真正跳海幫我進行試驗到半夜的人；而蕭老師帶著我認識中國醫這個陌生的環境，還介紹打工的機會讓我也過過當"張老師"的乾癮。這兩個人付出的關心仍持續至今，實在令我感激；還有王世休和張汁開這兩個損友多年來的相挺，講個謝謝就好，說其他的會噁心；感謝東海的肌肉棒子學弟韓成志免費教我如何健康的鍛鍊身體，沒有他幫我連絡東海的各項事情，不知道每個月報帳會開多少天窗；熊熊想起庭宇，必須謝謝這位明明可以去台大卻腦袋跳針來到 303 的學弟，感謝你才一年級時就義無反顧扛起助理大任並且給予我支援—我們親眼看到有人對"付出"是多麼的避之唯恐不及，未來的日子希望你能堅強、我想有時魚與熊掌是可以兼得的。

在這段逐漸黑暗的日子裡，無論遭受再大的挫折與傷害，仍然有一個讓我一想到就滿心歡喜的人、一個當我心裡懷著各種極度挫折、失望與煩躁的情緒而想放棄時，一看到她就忽然覺得我還能撐下去的人—佳佩，一個我深愛又感激的女人。實驗順利時她和我一樣開心；遇到挫折時她給我鼓勵；遭遇背叛時她撫平我的憤怒；滿心悲傷時她默默陪我難過；最重要的是，在我這段長到匪夷所思的求學歲月中，她從來沒有催促我的畢業，多年來她是唯一沒有問過"你什麼時候畢業"的人，只有我知道這是多大的一種鼓勵與付出！她對我的信心和耐心—一種連我對自己都沒有的信心和耐心，是除了父母的期望以外，唯一支持我不放棄的原因。親愛的佳佩，感謝妳對我付出的愛、歲月與支持，謝謝妳在黑暗中如此堅強地牽著我往前走；套句蝙蝠俠電影裡的經典台詞："The night is darkest just before the dawn. And I promise you, the dawn is coming"如今黎明來臨，該是換我牽著妳往前走的時候了。

最後要感謝兩位我一輩子也無以回報的恩人，他們無償又無限的付出關愛，支持著我的學費與生活支出，為我解憂聽我訴苦，忍受我的無禮和不孝，他們是我的父母—兩個我每次看到他們的白髮就滿心慚愧而只能嘴上打哈哈掩飾心情的人。我摯愛的爹娘：長久以來我都不能在家陪伴你們，其實有諸多的思念和愧疚都埋藏在我心底深處，告訴著我不要放棄。你們的恩情我根本無以回報，僅將這本論文和感謝獻給最深愛的你們。

寫這篇致謝花了整整兩夜，藉這個機會細細回想這段求學過程的點點滴滴，然後我感覺又學到了些什麼。所謂師父領進門，修行在個人；其實生命中所遇到的每一個人與每一件事都是領我們進門的師父，有機會磨練修養是福氣，都該感謝。碩士之路難行，終就也走到了盡頭；而修行之路遙遙，未來還如此的長遠，我不敢奢望事事順心，只求能持續進步、能帶給自己與所愛的人安樂，那也就夠了。

張永琰 謹誌於
東海大學畜產與生物科技學系
繁殖生理實驗室

摘要

始基生殖細胞 (primordial germ cells, PGC) 是生殖前驅細胞。在體外, PGC 能夠再程式化為胚源生殖細胞 (embryonic germ cells, EGCs)。本研究為了瞭解家兔 PGCs 在早期發育階段胚胎體內的遷移過程, 首先(試驗一)觀察不同發育天數之家兔胚胎 (fetuses) 生殖脊與性腺相關構造之形態, 作為後續試驗與相關研究之基礎。結果指出, 在 9.5 dpc 前之胚胎生殖脊 (genital ridges) 其形態無法清晰被分辨與分離, 反之, 同一發育時期小鼠胚胎生殖脊形態已具基本的輪廓。11.5 dpc 是可辨識家兔胚胎生殖脊與中腎 (mesonephros) 聯合組織發育的最早時間點, 而 13.5 dpc 的兔生殖脊發育形態則與 11.5 dpc 的小鼠生殖脊形態相似。為期建立體外之 EGCs, 試驗二乃自 12.5 dpc 之兔胚胎分離 PGC 培養於兔胚幹細胞 (rabbit embryonic stem cells, rESCs) 培養液、添加 MEK 與 GSK3 抑制劑之 mouse EGC 培養液、mTeSR™ 培養液或 rabbit EGC 培養液等處理組; 同時也測試最佳之抑制劑與生長因子的添加濃度。結果指出, 家兔 EGC 只有與小鼠飼養層細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 共培養以及添加 LIF (1,000 U/mL)、bFGF (20 ng/mL)、forskolin (10 μ M) 與 ROCK inhibitor Y-27632 (10 ng/mL) 之 rabbit EGC 培養液中才能被繼代與表現多能性標記蛋白 Oct-4 與生殖細胞專一標記蛋白 Vasa。為探求 PGC 分化為生殖細胞的潛能, 試驗三以 12.5 dpc 之 PGC 與生殖脊體細胞共培養於含有 BMP4 (500 ng/mL)、BMP8a (500 ng/mL)、SCF (100 ng/mL)、EGF (50 ng/mL) 與 10% 之豬濾泡液 (porcine follicle fluid, pFF) 之誘導環境中, 結果發現 PGC 與生殖脊體細胞能夠形成直徑小於 100 μ m 的初級細胞聚集體 (cell aggregates, CA) 並表現 Oct-4 與 VASA。持續培養 14 天後 CA 可成長至直徑超過 100 μ m 且能夠表現減數分裂專一蛋白標記 Scp3, 並在培養至 30 天時表現卵子專一標記蛋白 Gdf9, 此時期的 Gdf9 螢光表現模式與兔濾泡之 Gdf9 螢光表現相似。本研究證明自 12.5 dpc 兔胚胎中所分離的 PGC 可形成類 EGC 並保持多能性標記的表現。此外, 當 12.5 dpc 之 PGC 與生殖脊體細胞共培養時, 可被誘導

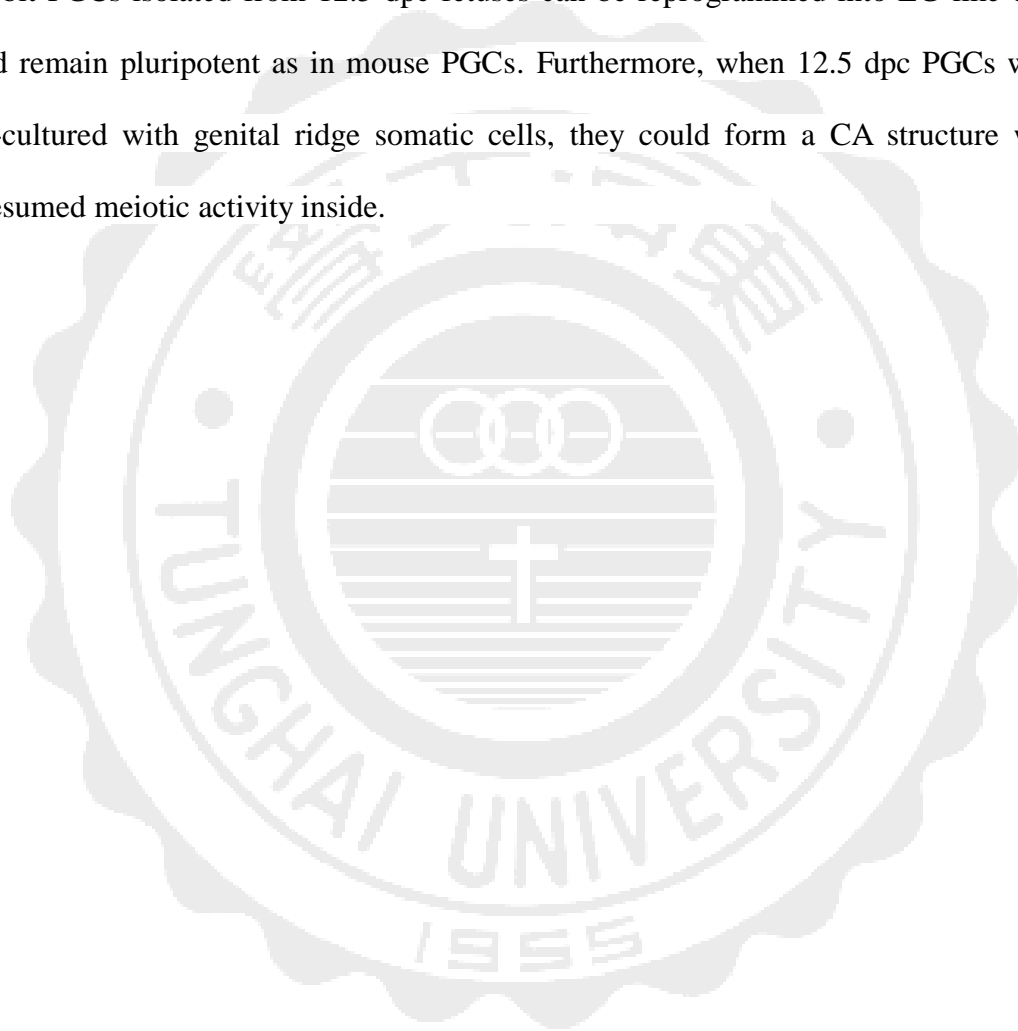
朝向雌性生殖細胞分化並進入減數分裂。



Abstract

Primordial germ cells (PGCs) starting as germline precursor cells can give rise to mature germ cells *in vivo* via a cascade of differentiation processes. They can also be reprogrammed *in vitro* into pluripotent stem cells, i.e., embryonic germ cells (EGCs). To understand the rabbit PGC migration process in early developmental stages, we anatomized New Zealand White rabbit fetuses at different days of development. Before 9.5 dpc, PGCs in the rabbit fetus were hardly isolatable due to the undistinguishable structure of genital ridge, whereas at the same time point the mouse fetus already has a basic exterior shape of a fetus. The first distinguishable rabbit mesonephros-associated genital ridges appeared at 11.5 dpc. The morphology of rabbit genital ridges at 13.5 dpc resembles that of the mouse at 11.5 dpc. These observations are likely to provide a distinct timeline of rabbit germ cell migration helpful for the understanding of embryonic gonad physiology and technical separation of rabbit PGCs or genital ridges. We therefore isolated rabbit PGCs from the 12.5 dpc fetus and compared several culture media including rESC medium, mouse EGC medium with MEK and GSK3 inhibitors, mTeSR™ medium and rabbit EGC medium. Different concentrations of inhibitors or growth factors were also tested. The rabbit EGCs can be long-term co-cultured with mouse embryonic fibroblast (MEF) cells for several passages only in rabbit EGC medium with the presence of LIF (1,000 U/mL), bFGF (20 ng/mL), forskolin (10 μM) and ROCK inhibitor Y-27632 (10 ng/mL). These EG-like cells expressed pluripotency marker Oct-4, and germ cell marker Vasa as shown by the immunocytochemical (ICC) staining at an undifferentiated state. The *in vitro* differentiation abilities of rabbit PGC were also confirmed. We collected 12.5 dpc PGCs and co-cultured them with somatic cells from genital ridges in medium with BMP4 (500 ng/mL), BMP8a (500 ng/mL), SCF (100 ng/mL), EGF (50 ng/mL) and 10% porcine follicle fluid (pFF). The results showed these two kinds of cells

could coexist and form primary cell aggregates (CA) which were less than 100 μm in diameter and expressed Oct-4 and VASA by ICC staining. After being cultured for 14 days, the CA could be grown over 100 μm in diameter and expressed the meiosis specific marker Scp3 and oocyte specific marker Gdf9 at Day 30. The Gdf9 expression pattern was similar to that of rabbit follicles. This study demonstrates that rabbit PGCs isolated from 12.5 dpc fetuses can be reprogrammed into EG-like cells and remain pluripotent as in mouse PGCs. Furthermore, when 12.5 dpc PGCs were co-cultured with genital ridge somatic cells, they could form a CA structure with presumed meiotic activity inside.

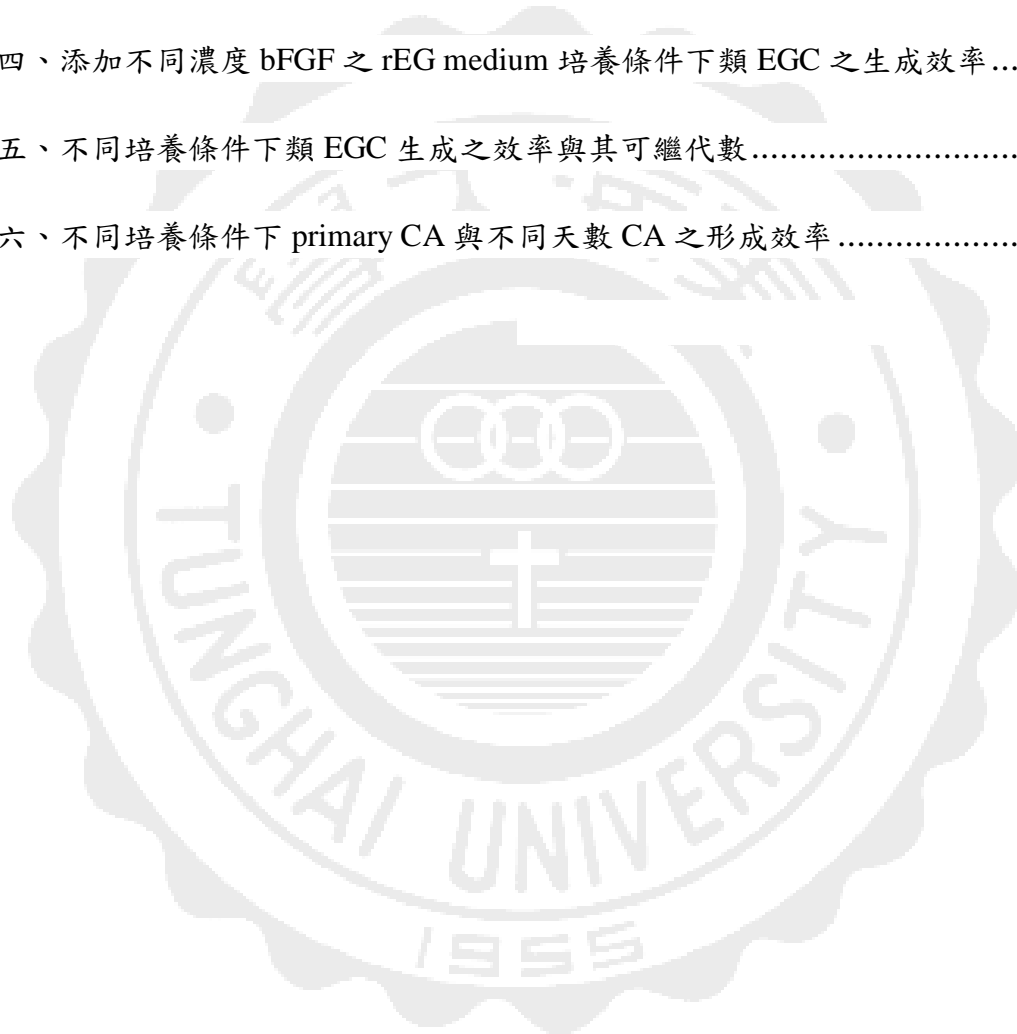


目次

文獻檢討	1
前言	2
一、始基生殖細胞的細胞生理特性	3
(一) 小鼠 PGC 於胚胎內之遷徙過程與特性	3
(二) 小鼠與家兔 PGC 於胚胎內遷徙時程與特性之比較	4
二、始基生殖細胞轉形為胚源生殖細胞之能力	5
(一) PGC 與 EGC 之特性	5
(二) 影響建立 EGC 之內源性與外源性因素	6
1. PGC 分離時間影響其再程式化能力	6
2. 纖維母細胞生長因子 2 (FGF2) 能有效促使 EGC 形成	7
3. 毛喉素 (Forskolin) 能幫助 PGC 存活、增殖與再程式化	7
4. GSK3 β 與 MEK 路徑抑制劑幫助 EGC 自我更新與抑制分化	8
三、體外分化產製雌性生殖細胞	9
(一) 體外產製小鼠卵母細胞	12
1. 骨形成蛋白 4(BMP4) 具有刺激生殖細胞分化之能力	14
2. 幹細胞因子(SCF)誘導濾泡發育	15
研究試驗	23
試驗一、家兔胚胎與生殖脊之發育時程	24
前言	24
材料與方法	26
結果	29
討論	30
試驗二、紐西蘭白兔 PGC 之分離與繼代培養為 EGC 之研究	41
前言	41
材料與方法	42
結果	49
討論	51
試驗三、定向分化家兔 PGC 為雌性生殖細胞	61
前言	61
材料與方法	62
結果	68
討論	70
結論	84

表次

表一、自不同發育階段之家兔胚胎分離 PGCs 數量變化	37
表二、添加不同濃度 GSK-3 抑制劑之 2i 培養條件下類 EGC 生成之效率	53
表三、添加 2 μ M/mL GSK-3 抑制劑與不同濃度 MEK 抑制劑之 2i 培養條件下類 EGC 生成之效率	54
表四、添加不同濃度 bFGF 之 rEG medium 培養條件下類 EGC 之生成效率	55
表五、不同培養條件下類 EGC 生成之效率與其可繼代數	56
表六、不同培養條件下 primary CA 與不同天數 CA 之形成效率	79



圖次

圖一、經由體外分化與體內移植技術產製小鼠成熟卵母細胞流程圖	17
圖二、BMP-Smad 1/5/8 路徑誘導始基生殖細胞、多能幹細胞與始基濾泡分化示意圖。	18
圖三、顆粒細胞經由 BMP4 與 SCF 活化始基濾泡之路徑圖。	20
圖四、家兔胚胎之發育過程 (9.5 - 14.5 dpc)。	33
圖五、自 9.5 - 14.5 dpc 家兔胚胎分離生殖脊之發育。	34
圖六、家兔胚胎 (13.5 dpc 與 14.5 dpc) 生殖脊與中腎之構造(HE 染色)。	36
圖七、小鼠、人類與家兔 PGC 發育與遷徙時程之比較。	39
圖八、家兔類 EGC 細胞群落初代培養於不同培養環境 (5 天) 之形態。	57
圖九、家兔類 EGC 細胞於 rEG medium 繼代培養至第三代之細胞群落形態。	59
圖十、於 rEG medium 培養之家兔 EGC-like 細胞群落經免疫細胞染色與鹼性磷酸酶之分析顯示其表現多能性細胞以及生殖細胞標記蛋白。	60
圖十一、定向分化家兔 PGC 為雌性生殖細胞之步驟.....	67
圖十二、家兔 PGC 與生殖脊體細胞在不同培養條件下貼盤培養 1.5 天所得之細胞聚合體(cell aggregates, CA)。	73
圖十三、家兔 PGC 與生殖脊體細胞在不同培養條件下懸浮培養 1.5 天所得之細胞聚合體(cell aggregates, CA)。	75
圖十四、家兔 PGC 與生殖脊體細胞在添加 pFF 之培養環境下以懸浮及貼盤培養至第 10 天所得 CA 形態之比較。	77
圖十五、家兔 PGC 形成之細胞聚合體 (CA*) 在添加 pFF 之環境下貼盤培養 (14 天) 後其生殖細胞標記蛋白之表現。	81

圖十六、家兔 PGC 形成之細胞聚合體 (CA*) 在添加 pFF 之培養環境下貼盤培養 (30 天) 後其生殖細胞標記蛋白之表現。82





前言

現代社會生活環境與型態日趨開放且複雜，晚婚或生育年齡延後等現象使得不育症有逐漸上升的趨勢，故不育症領域之治療應用與生殖生理學相關之研究便越趨重要。動物生殖生理學的研究與試驗需要大量動物樣本，導致大量實驗動物被犧牲與研究成本居高不下，而欲大量取得特定發育時間之胚胎 (fetuses) 與生殖細胞樣本更為不易，進而影響研究成果，故建立體外分化產製生殖細胞之系統已成為十分重要之研究課題。

多能幹細胞 (pluripotent stem cell, PSC) 滿足以下兩個條件：一、細胞具有正常的染色體組成並可無限期地培養於實驗室。二、經誘導後可分化成個體中的任何細胞。上述之特點使得 PSC 被大量應用於胚胎早期發育、再生醫學以及生殖醫學方面之研究。由於不孕症病患逐年增加，生殖醫學之研究顯得更為重要，近年來除了體外受精、冷凍精液保存與顯微操作技術更加精進之外，以 PSC 作為材料，供作人工配子 (artificial gamete) 分化研究之來源已發端。目前於哺乳類動物中可分離出數種 PSC，例如：1. 胚胎幹細胞 (embryonic stem cell, ESC)，係分離自埋植前囊胚之內細胞群 (inner cell mass, ICM)；2. 胚胎生殖細胞 (embryonic germ cell, EGC)，係分離自生殖脊 (genital ridge) 之始基生殖細胞 (primordial germ cell, PGC)。3. 胚胎癌細胞 (embryonal carcinoma cell, ECC)，係分離自胚胎睪丸癌細胞或 PGC (Donovan and De Miguel, 2003)。

近年來小鼠胚幹細胞 (mouse embryonic stem cells, mESCs) 研究漸趨成熟，也逐漸有報告證實其在體外分化方面的應用潛力，例如：Shiraki *et al.* 於 2008 年成功使 ESC 受誘導產製內胚層 (endoderm) 細胞與胰島前驅細胞 (pancreatic progenitors) (Shiraki *et al.*, 2008)，Banerjee *et al.* 於 2011 年誘導小鼠 ESC 分化產生能夠分泌胰島素的類胰島細胞 (Banerjee *et al.*, 2011)，以及諸多體外誘導 mESCs 產製不同組織之特化神經細胞的學術研究與應用改良等 (Bibel *et al.*, 2007; Eiraku *et al.*, 2008; Gaspard *et al.*, 2008; Bertacchi *et al.*, 2013)。更甚者，人類 ESC

也成為目前極熱門之體外分化研究目標。但在生殖生理領域 ESC 仍無法在人為控制條件下進行體外分化得到成熟生殖細胞。目前 ESCs 於生殖細胞方面的分化研究已進展至經由特定誘導物作用後使其體外分化得到始基生殖細胞 (primordial germ cell, PGC)，並能持續培養至類配子前趨細胞 (能夠表現早期減數分裂專一標記物) 階段。除了 Hübner *et al.* 於 2003 年指出 ESC 可直接經由長期誘導培養分化產製卵子外 (Hübner *et al.*, 2003)，大多數研究團隊在嘗試經由幹細胞體外產製生殖細胞時，皆選擇先經過 PGC 的誘導分化階段再進行進一步的培養，顯示 PGC 對於體外配子分化研究之重要性。

小鼠 EGC 的建立與穩定的長期培養環境在 2010 年被確立，人類 EGC 的建立也已成功，EGC 同時具有 PSC 和生殖細胞之專一標記表現，也能經由類胚體 (embryoid body, EB) 形式進行多能分化，顯示其在體外分化產製生殖細胞方面也極具研究價值。

本文旨在探討 PGC 體外形成 EGC 之系統建立與如何定向誘導分化產製生殖前驅細胞，以期未來能夠確立利用幹細胞體外定向誘導雄性生殖細胞產生的分化系統。

一、始基生殖細胞的細胞生理特性

(一) 小鼠 PGC 於胚胎內之遷徙過程與特性

始基生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) 屬於生殖幹細胞 (germ stem cell, GSC)。以小鼠為例，受精卵在體內著床並形成囊胚後可發育出內細胞群 (inner cell mass, ICM)，之後由 ICM 所分化產生之上胚層 (epiblast) 在受精後第 6 天 (day post coitum, dpc) 受到骨形成蛋白 4 (bone morphogenetic protein, BMP4) 誘導 (Ginsburg *et al.*, 1990; Lawson and Hage, 1994; Saitou, 2009) 分化出 PGC 前驅細

胞並於 6.5 dpc 遷移至原線 (primitive streak)。PGC 前軀細胞受到 BMP4 之下游訊號因子 Blimp1 (B-Lymphocyte-induced maturation protein 1)、Fragilis (interferon induced transmembrane protein) 及 Stella 影響停止增生並開始進行特化。至 7.25 dpc, 胚內大約已產生 40 個成熟 PGC, 呈現有鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 的表現 (Ginsburg *et al.*, 1990; Saitou *et al.*, 2002; Hayashi *et al.* 2011)。其後, PGC 於 7.5 dpc 遷移至胚外內胚層 (extraembryonic endoderm), 8.5 dpc 時 PGC 受到 Nano3 協助再度進行遷移, 引導其遷移的作用來自於遷移路徑中體細胞組織分泌的環境因子, 諸如: 纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor, FGF)、轉化生長因子 (transforming growth factor, TGF)、基質細胞衍生因子 1 (stromal-cell-derived factor-1, SDF-1) 與 c-kit。PGC 經由遷移過程所接觸到的細胞間之吸引與排斥作用力向目標組織移動, 然而詳細的牽引機制目前仍未有明確的定論 (Mauduit *et al.*, 1999; Dores *et al.*, 2012)。PGC 遷移路線由原線經過卵黃囊 (yolk sac) 進入尿囊膜 (allantois) 後再移動至中腸 (midgut) 與後腸 (hindgut) (Ginsburg *et al.*, 1990; De Felici *et al.*, 1992; Santos and Lehmann, 2004; Molyneaux and Wylie, 2004; Tres *et al.*, 2004; Hara *et al.*, 2009), 最後於 10.5 dpc 抵達未分化之性腺—此未分化之性腺位於胚胎背部內側, 與中腎 (mesonephros) 緊連, 稱為生殖脊 (genital ridge), PGC 抵達生殖脊後便停止遷移並繼續增殖。小鼠 PGC 在遷移與停駐於生殖脊時皆需依靠 c-kit 維持細胞存活與增生 (Mauduit *et al.*, 1999); 細胞增生速率則依靠 mvh (mouse vasa homolog) 維持 (Tanaka *et al.*, 2000), mvh 會持續表現至後減數分裂時期 (Toyooka *et al.*, 2000)。PGC 在生殖脊中停留至 13.5 dpc 時, 細胞數量可增殖至兩萬五千顆並開始進行生殖細胞的分化 (Ginsburg *et al.*, 1990; Molyneaux and Wylie, 2004; Santos and Lehmann, 2004; Tres *et al.*, 2004)。

(二) 小鼠與家兔 PGC 於胚胎內遷徙時程與特性之比較

相較於小鼠 PGC 之研究，研究人員以家兔作為研究動物之模式所獲得之成果與文獻相對稀少。由於家兔生殖系統發育初期之速度與小鼠不同，其 PGC 遷移的期程自然也就有別於小鼠。最早嘗試追蹤家兔體內 PGC 之發育的相關研究始於 2000 年的 Schäfer-Haas 與 Viebahn，他們利用 PG-2 單株抗體，有效且專一的追蹤辨識 PGC 之粒線體，因此可確實地追蹤早期發育階段時 PGC 遷移的狀態(Schäfer-Haas and Viebahn., 2000.)。他們的結果指出，具有 PG-2 抗體反應的 PGC 或 PGC 前驅細胞最早可在 7.0 dpc 於家兔原線被追蹤到（小鼠 PGC 前驅細胞最早則可於 6.0 dpc 以 AP 染色於冷凍切片檢體中被追蹤到），只是抗體結合訊號顯得非常微弱。PGC 於 8.0 dpc 遷移至接近卵黃囊上皮細胞與臟壁中胚層（*splanchnopleuric mesoderm*）區域。由 9.5 dpc 家兔胚胎所分離之 PGC 仍具有 AP 表現，顯示其可能仍具細胞多能性（Kakegawa *et al.*, 2008）。然而 9.5 dpc 之後的家兔 PGC 遷移與生殖脊發育過程至今仍沒有更新的研究報告發表。

二、始基生殖細胞轉形為胚源生殖細胞之能力

（一）PGC 與 EGC 之特性

在體外，PGC 無法以單細胞形態被長期培養且無法形成細胞群落與 EB，亦不具有產生嵌合體之能力(Donovan, 1994)。但在適當誘導物影響下可進行兩種表現模式：藉由基因外修飾（epigenetic modification）使特定 DNA 去甲基化（demethylation）而再程式化（reprogram）成為同時具有多能性以及生殖細胞基因表現的PSC—EGC(embryonic germ cell, EGC)(Matsui *et al.*, 1992; Resnick *et al.*, 1992; Messerschmidt *et al.*, 2014)；或是如上文所述分化為生殖細胞。EGC 屬於PSC 故可經類胚體產生外胚層(ectoderm)、中胚層(mesoderm)與內胚層(endoderm)之特有細胞與生殖細胞。許多利用ESC體外分化之研究證實，EB分化產生細胞之訊息調控路徑大致和體內發育之胚胎相同，也有類似的結構與基因表現，故大多數幹細胞分化之應用與研究都將EB形態視為體外分化之必經過程(Weitzer *et al.*,

2006)。相較於ESC之多能性，EGC同時更具備生殖細胞的基因表現特性。比較PGC與EGC之基因表現可知，兩者皆能表現包括*oct-4*、*sox2*、*nanog*、*stella*及*mvh*等基因，而僅表現於EGC之基因為*c-myc*、*stat3*與*klf4* (Labosky *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1994; Durcova-Hills *et al.*, 2008)，理論上在體外分化的應用層面應較廣且極具研究價值。

PGC之體外培養試驗始於1986年，Donovan等人將分離自10.5 dpc之小鼠PGC培養於添加10% FCS、glutamine與抗生素之DMEM培養液及STO飼養層細胞之環境。結果指出PGC能於此培養條件存活6天，但無法產生細胞群落(colony)(Donovan *et al.*, 1986)。1991及1993年之報告指出，在培養環境中添加幹細胞因子(stem cell factor, SCF)及白血球抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)有效幫助PGC增生，但仍無法使其存活超過一周與形成細胞群落(Dolci *et al.*, 1991; Godin and Wylie, 1991; Pesce *et al.*, 1993)。體外培養PGC並使其再程式化為EGC之成功首例於1992年被發表，Donovan *et al.*與Hogan *et al.*兩團隊皆於同年證實，除了LIF與SCF外，於PGC培養環境中添加纖維母細胞生長因子2(basic fibroblast growth factor, bFGF; FGF2)能夠使PGC再程式化形成EGC並建立細胞株(Matsui *et al.*, 1992; Resnick *et al.*, 1992)。

相較於小鼠，25年來以家兔為EGC研究模型之報告僅有2008年由日本學者Kakegawa研究團隊發表一例，由其研究可得知兔PGC之體外培養環境除了MEF飼養層及添加LIF與bFGF外，還需添加20 μ M以上之毛喉素(Forskolin, FK)方能轉變為類EGC形態，此形態之類EGC雖可表現Oct-4、Sox2與SSEA-1且能形成EB，但無法被建立細胞株且無法形成畸胎瘤(teratoma)，顯示此培養環境雖可幫助PGC再程式化，但卻無法支持其多能性與增生能力(Kakegawa *et al.*, 2008)。

(二) 影響建立EGC之內源性與外源性因素

1. PGC分離時間影響其再程式化能力

PGC係一對外在環境極為敏感的細胞種類，在體外不僅無法長時間維持單細胞狀態，且極易受外在環境影響而分化。綜觀諸多PGC研究文獻可發現，若欲形成EGC，則PGC在自體內分離之時間有嚴格的限制範圍，由8.5-11.5 dpc小鼠胚胎

所分離之PGC方能進行再程式化形成EGC，8.5-9.5 dpc之PGC具有最高多能性與性腺遺傳能力（germline transmission）；12.5 dpc分離之PGC再程式化效率會大幅下降；13.5 dpc開始生殖脊則已有明顯分化趨勢，PGC亦已開始進行基因外修飾並開始性別分化階段，此時的PGC便已無法進行再程式化（Matsui *et al.*, 1992；Resnick *et al.*, 1992；Labosky *et al.*, 1994; Hajkova *et al.*, 2002）。

Takegawa *et al.* (2008) 證實9.5 dpc至11.5 dpc分離之家兔PGC皆可形成EGC，但11.5 dpc後之生殖脊發育與PGC是否具有再程式化能力則未被證實 (Takegawa *et al.*, 2008)。

2. 纖維母細胞生長因子 2 (FGF2) 能有效促使 EGC 形成

FGF2是穩定幹細胞培養環境的常見添加物，多數研究團隊都選擇在小鼠、兔與人類ESC培養環境中添加FGF2（Donovan and De Miguel, 2003; Honda *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2010）。FGF蛋白家族包含許多同型異構物（isoform），包括FGF1至FGF23 (Ohta and Itoh., 2014)。不同形式之FGF在PGC中表現時間及位置有所不同。以小鼠為例：小鼠PGC於8.5 dpc開始在細胞質中表現FGF2；11.5 - 12.5 dpc 則同時表現於細胞質與細胞核。

FGF2被認為在小鼠PGC再程式化行成為EGC過程中扮演關鍵角色。研究顯示小鼠PGC被分離後24小時內培養於已含有LIF之培養環境中，再添加FGF2能有效產生EGC細胞群落，反之則無（Durcova-Hills *et al.*, 2006），顯示FGF2對於EGC產生之重要性。

Takegawa *et al.* 於2008年發表的研究報告中指出，於培養液中同時添加LIF與20 ng/mL之FGF2能顯著提升rPGC轉形為rEGC的效率；若單獨添加FGF2則效率下降但仍高於完全不添加FGF2之處理組，顯示FGF2有助於rEGC形成 (Takegawa *et al.*, 2008)。

3. 毛喉素 (Forskolin) 能幫助 PGC 存活、增殖與再程式化

毛喉素 (Forskolin, FK) 係毛喉鞘蕊花 (Coleus forskohii) 之萃取物，能夠刺激Adenylate cyclase催化ATP轉變為cAMP以提高細胞內cAMP之濃度。在細胞

培養液中添加FK，能迅速提高細胞內cAMP之濃度達10倍之多（Seamon *et al.*, 1981）。FK主要被應用於活化心臟及大腦內之adenylate cyclase（Metzger and Lindner., 1981; Seamon *et al.*, 1981）。

刺激PGC內cAMP濃度上升有助於PGC存活與增殖的觀念在1993年被提出，試驗證實在已添加LIF或SCF之PGC培養環境中投入20 μ M的FK可以有效提升PGC數量(Dolci *et al.*, 1993; De Felici *et al.*, 1993)。在培養環境中添加FK以建立小鼠EGC的首例則在1996年被發表，Koshimizu *et al.*的研究報告指出FK能夠延長PGC的體外培養時間，而FK與LIF同時添加則可幫助PGC再程式化形成EGC，若同時添加LIF、FGF2與FK則能更加提高之EGC產率（Koshimizu *et al.*, 1996），然而FK是否能取代bFGF幫助EGC的產生則有待商榷。

FK對於提升建立家兔EGC效率也具有功效，研究顯示，相較於對照組，在含有LIF與bFGF之培養環境中添加20 μ M的FK亦能顯著提高類EGC細胞群落的產生（Kakegawa *et al.*, 2008）。

4. GSK3 β 與MEK(mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK or MEK)路徑抑制劑幫助EGC自我更新與抑制分化

Glycogen synthase kinase-3 β （GSK3 β ）抑制劑CHIR99021與MEK之抑制劑PD0325901被廣泛應用於小鼠ESC的建立，而用於建立小鼠EGC的首例則在2010年由Leitch *et al.*發表。根據Leitch *et al.*研究顯示小鼠與大鼠PGC自體內分離後培養於含有LIF與FGF2之環境下48 h可再程式化形成EGC，其後以CHIR99021與PD0325901替換FGF2，可顯著提高小鼠EGC細胞株之建立效率（Leitch *et al.*, 2010）。

GSK3 β 路徑皆源於Wnt蛋白，Wnt 蛋白家族屬於脂修飾醣蛋白（lipid-modified glycoproteins），此訊息在小鼠胚胎發育過程中具有調節細胞機制之重要作用，例如：形態（morphology）發生、細胞增殖、遷移、組織的結構重塑（structural remodeling）以及自我更新等（Sato *et al.*, 2004; Reya and Clevers, 2005）。

Wnt路徑分為典型與非典型路徑兩種，當Wnt與其受體蛋白Frizzled結合時可活

化典型路徑下游蛋白DVL (Dishevelled)，DVL可以抑制adenomatous polyposis coli (APC)、GSK-3 β 與Axin複合體(此複合體能夠使 β -catenin降解，導致幹細胞分化)。反之，活化的Wnt典型路徑可以保護 β -catenin存在並進入細胞核中驅動*oct4*、*nanog* 與*c-myc*等幹細胞自我更新之靶基因 (target gene)，故添加GSK3 β 抑制劑可以幫助ESC自我更新 (Van Es *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004)。

MEK蛋白可活化下游蛋白ERK，在幹細胞中，ERK能夠抑制*nanog*表現進而導致幹細胞分化 (Hamazaki *et al.*, 2006)。幹細胞內之訊息調控路徑異常複雜，有些外源因子同時具有幫助幹細胞自我更新與促進其分化兩種功能，以MEK/ERK路徑為例：MEK/ERK路徑可由多種外源因子間接或直接活化並導致幹細胞分化，包括FGFs (Lanner and Rossant., 2010)。然而如前文所述，FGF2是建立小鼠EGC不可或缺之添加因子。故在建立小鼠EGC之培養系統中添加MEK抑制劑可以間接抑制FGF2所活化之ERK作用，進而使EGC能夠維持生存並持續保持自我更新。

三、體外分化產製雌性生殖細胞

成熟生殖細胞是極為特化的細胞種類，PGC 與生殖脊在胎兒出生前經過過程繁複的分化與第一次減數分裂後始能形成生殖前驅細胞，而後於胎兒出生後再度進行第二次減數分裂與特化方能產生成熟之生殖細胞，

當 PGC 抵達生殖脊時 (小鼠為 10.5 dpc，詳見上文)，會刺激其所接觸組織開始增生進而形成緊湊條狀構造稱為初始性索 (primitive sex cords)；此時雄性與雌性性腺還無法區別，稱為不可區分性腺 (indifferent gonads)。

小鼠生殖脊於 13.5 dpc 開始性別分化，性別的分化方向取決於 Y 染色體上的 *sry* 基因 (sex-region-Y encoding gene)，帶 XY 染色體之 PGC 在 *sry* 的影響下刺激初始性索產生睪丸決定因子 (testis determining factor, TDF)。

TDF 被分泌後，雄性生殖系統之分化作用即受刺激而啟動—初始性索繼續

特化，並深入到髓質形成睪丸索(testis cords)。sry 亦能刺激賽氏前驅細胞中 Sox9 蛋白表現上升，間接促使睪丸組織的發育 (Dores *et al.*, 2012; Svingen and Koopman, 2013)。XX 型生殖脊則因缺乏 TDF 刺激，性索則會在 Rspo1 和 Wnt4 影響裂解而形成細胞簇(cellular clusters) (Svingen and Koopman, 2013)，PGC 則會經過有絲分裂增生並形成卵母細胞(oogonia)。性索形成的每個細胞簇各包圍一個卵原細胞後繼續發育形成始基濾泡(primordial follicle) (Sanchez and Smitz, 2012)，類似始基濾泡的構造可以體外經由生殖脊之體細胞與 PGC 共同培養重現 (Hayashi *et al.*, 2012)。

大部分之雌性哺乳動物於出生前，卵原細胞便停止增殖並進入第一次減數分裂前期 (meiosis prophase I)，第一次減數分裂前期包含五個過程：細絲期 (leptotene)、偶絲期 (zygotene)、粗絲期 (pachytene)、雙絲期 (diplotene) 與絲球期 (diakinesis)，最後進入核網期 (dictyate)，此時之卵原細胞即稱為初級卵母細胞(primary oocytes) (Sanchez and Smitz, 2012)。初級卵母細胞之染色質散佈於稱為原核泡 (germinal vesicle, GV) 的巨大細胞核中，GV 期之初級卵母細胞會停止減數分裂，細胞週期也停滯於 G0/G1 期，即為第一次減數分裂休止期(first meiotic arrest)。此時期之初級卵母細胞會被前驅顆粒細胞 (pregranulosa cells) 包覆形成一複合體，即為始基濾泡 (primordial follicle)，始基濾泡會在個體進入青春期時再度開始發育 (Edson *et al.*, 2009; Sanchez and Smitz, 2012)。

當出生後之小鼠個體發育至發身 (puberty) 階段，休眠中的始基濾泡會受 BMP4 與 SCF 刺激之 PI3K/AKT 路徑而活化 (Sanchez and Smitz, 2012)，包覆始基濾泡的前驅顆粒細胞也開始增生使濾泡組織變厚，而卵母細胞之透明帶 (zona pellucida, ZP) 亦逐漸呈現，此階段之濾泡稱為初級濾泡(primary follicle)。接下來，持續增殖的前驅顆粒細胞開始特化成為顆粒細胞 (granulosa cells) 並分泌出濾泡液 (follicle fluid)，濾泡液與滲透入的血液會在濾泡中擠出一稱為濾泡

腔(antrum)的小空腔,而卵母細胞也開始表現卵子專一標記蛋白 Gdf9 與 BMP15,此時之濾泡稱為次級濾泡 (secondary follicle)。當次級濾泡中的濾泡腔逐漸擴大時,包覆卵母細胞顆粒細胞則開始分化成冠狀細胞 (corona radiata),而濾泡基膜外之卵巢基質組織發育成內、外鞘膜細胞 (theca cells),此時形成三級濾泡 (tertiary follicle)。

當三級濾泡構造外圍之鞘膜細胞與濾泡基膜內之冠狀細胞接逐漸分化完成時,個體發育也進入性成熟階段,此時由腦下垂體分泌的濾泡刺激荷爾蒙 (follicle stimulating hormone, FSH) 與促黃體素 (luteinizing hormone, LH) 便刺激卵母細胞從第一次減數分裂休止期中活化。活化的卵母細胞首先發生原核泡崩解 (germinal vesicle breakdown, GVBD) 作用,之後染色質開始濃聚,經歷第一次減數分裂中期之前期 (prometaphase I, ProM I)、中期 (metaphase I, MI)、後期 (anaphase I, AI) 與終期 (telophase I, TI),而排出第一極體 (first polar body) 並進入第二次減數分裂之中期 (metaphase II, MII),此一過程稱為核成熟 (nuclear maturation)。核成熟之卵母細胞即稱為次級卵母細胞 (secondary oocytes)。已成熟之次級卵母細胞此時會再度進入減數分裂之休止狀態,即為第二次減數分裂休止期 (second meiotic arrest)。由上述內容可對雌性生殖細胞在體內產生與成熟之複雜過程略窺一二。

現階段已有多項報告指出體外分化產製小鼠 PGC 是可行的,目前日本知名的 Hayashi and Saitou 研究團隊所公開之技術能夠穩定地使小鼠 ESC 或 iPSC 經體外誘導後分化為 PGC,也有其他多篇報告提供了體外分化產製 PGC 的方法 (Hübner *et al.*, 2003; Hayashi K *et al.*, 2011; Toyooka *et al.*, 2003; Geijsen *et al.*, 2004),但卻無一研究者能夠完全以體外誘導方式控制 PGC 分化並獲得成熟的卵子 (Hayashi and Saitou, 2013),目前在體外以人為誘導控制減數分裂仍是一項艱鉅任務。阻礙體外產製生殖細胞的原因有二:首先,配子新生過程複雜且耗時,受誘導之標的細胞必須具備能體外長期培養 (long-term culture) 之能力,但

是 PGC 在體外無法以單細胞形態長期生存且數量稀少；再者，體外誘導多能幹細胞分化屬隨機分化，即便添加定向誘導物仍只有極低比例之細胞能成功產製類 PGC，若欲將分化所得之類 PGC 分離進行更深度體外分化則更添加許多難度 (Geijsen *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008)。第二，成熟配子的產出需要經過兩次減數分裂與減數分裂休止期，如何控制減數分裂的發生與再進行目前仍是研究上的瓶頸，此兩點為體外生殖細胞之研究進度難以突破之主要原因。目前最新的研究報告仍需借助侵入式體內移植技術將人工分化所得之類 PGC 移植入成體睪丸精細管、卵巢皮質層或是腎小體 (kidney corpuscles) 中，才能經由體內環境分化出精細胞 (spermatid) 或源核泡 (germinal vesicle, GV) 期卵子。即便如此，在多能幹細胞體外分化至 PGC 的階段工作中仍有許多重要的發現值得探討。

目前已有多篇與小鼠體外誘導分化產製生殖細胞相關之報告發表，以人類生殖細胞為研究模型的分化研究近年也逐漸出現，唯有以家兔為模型之相關生殖細胞分化研究則完全沒有記錄。故以下將針對目前體外產製小鼠雌性生殖細胞之可行策略與影響因素進行詳述。

(一) 體外產製小鼠卵母細胞

多能幹細胞具有能夠分化產生所有類型細胞之潛能，其中包括生殖細胞。許多研究團隊都試圖對不同種類之多能幹細胞進行體外誘導，期望能經由人為操控在體外獲得生殖細胞。理論上，生殖細胞的體外分化過程為：以多能幹細胞為起始(包括：ESC、EGC 或 iPS cell)經由 EB 形態分化至 PGC 階段，再進一步誘導分化成精源幹細胞 (spermatogonia stem cell, SSC) 或卵源細胞後產出成熟配子。

由幹細胞進行人為誘導產製生殖細胞之產率往往極低，且結果須配合 EB 或幹細胞分化天數進行密集的特性分析，方能確定細胞分化進度，意味往往分化的過程並非能被全程檢視，多數研究報告結論皆是在眾多已分化之受誘導細胞中，

發現生殖細胞或減數分裂標記蛋白或基因的表現，如：Vasa、Scp3、Dazl、ZP1、ZP2、ZP3、Gdf9等。故除了少數研究報告是以PGC為明確分化目標後，再進行深入分化外（Hayashi *et al.*, 2012），大多數誘導分化報告皆是嘗試對幹細胞進行誘導後，發現少量細胞已分化產生前驅生殖細胞之特性或具備減數分裂之表現特性（Geijsen *et al.*, 2004; Nayernia *et al.*, 2006）。

綜合目前已發表之相關報告，可知體外誘導產製雌性配子手段有二：一、直接在ESC培養環境中添加誘導因子使幹細胞聚集分化形成類濾泡組織後產生卵母細胞（Hu'bner *et al.*, 2003）；二、由Hayashi *et al.*於2012年所提出，將由ESC分化所得之PGC與未分化之生殖脊組織細胞共培養，在誘導因子的作用下兩者將會聚集（aggregate）形成類濾泡構造，之後將此組織移植入小鼠卵巢皮質層或是腎小體，以體內環境促其自發分化產生卵母細胞（Hayashi *et al.* 2012）（圖一）。

最新的一項研究指出，濾泡中所含之濾泡液（follicle fluid）內所含成分可能具有體外刺激卵母細胞分化的功效—Yu *et al.*於2014年將人類羊水幹細胞（amniotic fluid stem cells, AFSC）分離並建立細胞株後於培養環境中加5%豬濾泡液（porcine follicular fluid, pFF）（pFF由次級濾泡中蒐集而得），10天後細胞能聚集形成類濾泡組織，15天後發現能表現Oct4、Nanog、Sox2與Zp2等卵子標記蛋白之類卵細胞（oocyte-like cell, OLC）（Yu *et al.*, 2014）。此誘導分化方式目前尚屬新穎，濾泡液中成分複雜，包含多種荷爾蒙與能促進濾泡與卵子發育之因子，究竟是何種因子能於體外誘導卵子新生仍有待研究。

目前無論何種物種，成功於體外分化產製卵母細胞之紀錄極少，故對於能夠有效體外誘導PGC進入雌性分化路徑之因子並無定論。唯一已知最能有效誘導分化產製前驅配子細胞的因子應為BMP4（Hayashi *et al.*, 2012），BMP4大量應用於刺激幹細胞分化形成PGC及誘導分化產置配子細胞的因子，BMP4與SCF在雄性與雌性生殖細胞內以及周遭的輔助細胞如：賽氏細胞（sertoli cells）與顆

粒細胞所引發的訊息傳遞路徑大抵相同，其作用皆在於幫助生殖細胞與周邊組織增殖、存活與分化：

1. 骨形成蛋白 4(BMP4)具有刺激生殖細胞分化之能力

BMP4蛋白源於原腸前期 (pregastrula stage) 至原腸期 (gastrula stage) 間胚外外胚層 (extraembryonic ectoderm)，屬於轉化生長因子 β (transforming factor β , TGF- β) 超級蛋白家族 (Lawson *et al.*, 1999; Toyooka *et al.*, 2003)。BMP 4 在胚外外胚層中扮演調節尿囊 (allantois)，產生PGC前趨細胞與協助PGC存活的功能。

BMPs信號路徑作用廣泛，包括調節胚胎發育、幹細胞自我更新與分化以及協助生殖細胞存活等功能。在小鼠胚胎的早期發育階段，BMP8b與BMP2分別由EXE與VE分泌，BMP8b或BMP2的缺失都會造成小鼠胚胎中無法產生PGC (Hayashi *et al.*, 2007)。在ESC中，BMP4與LIF協同作用可幫助ESC自我更新，但是BMP4卻也能誘導幹細胞啟動分化能力 (Sui *et al.*, 2013)。誘導ESC分化路徑始於BMP4蛋白與跨膜蛋白絲胺酸-蘇胺酸激酶受體I與II型 (serine-threonine kinase receptors, BMPR I, BMPR II) 結合後形成之異源二聚體 (heteromeric complexes)，其後使Smad 1/5/8蛋白磷酸化並與Smad 4形成複合體，Smad 1/5/8-Smad 4複合體可進入核膜調節靶基因進而達到誘導分化的作用 (Pellegrini *et al.*, 2003; Dudley *et al.*, 2007)。bmp4突變之小鼠PGC數量會有減半或是多數喪失的影響；而smad1與smad5突變造也會導致PGC數量大幅下降 (但Smad8缺失卻不會造成影響) (Chang and Mat zuk., 2001; Hayashi *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2006)，顯示BMP-Smad路徑對於特化產生PGC前驅細胞也有舉足輕重的影響。

在體外誘導分化PGC方面，當ESC與能夠分泌BMP4或BMP8b之細胞 (如：STO、trophoblast cells) 共同培養，可發現BMP4與BMP8b具有刺激ESC分化產製PGC的能力 (Hayashi *et al.*, 2011)，且BMP4與BMP8a共同作用能誘導ESC分化進

入類PGC階段 (Hayashi *et al.*, 2012)。反之，當ESC中的BMP4接受器被遮蔽時則ESC無法分化出PGC。此外，ESC受BMP4刺激後，*sohlh2*的表現量會顯著上升 (Ballou *et al.*, 2006)。經BMP4刺激分化所得之類PGC在經過體內移植後能夠進行減數分裂並產製雄性生殖細胞 (Toyooka *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2011)。BMP4的誘導能力不只對ESC有效，對於由ESC體外分化形成之EpiLC也同樣具有誘導其分化為PGC的效果 (Hayashi *et al.* 2011)，顯示只要是多能性幹細胞或生殖前趨細胞，便有受BMP4誘導分化產製PGC的潛能。

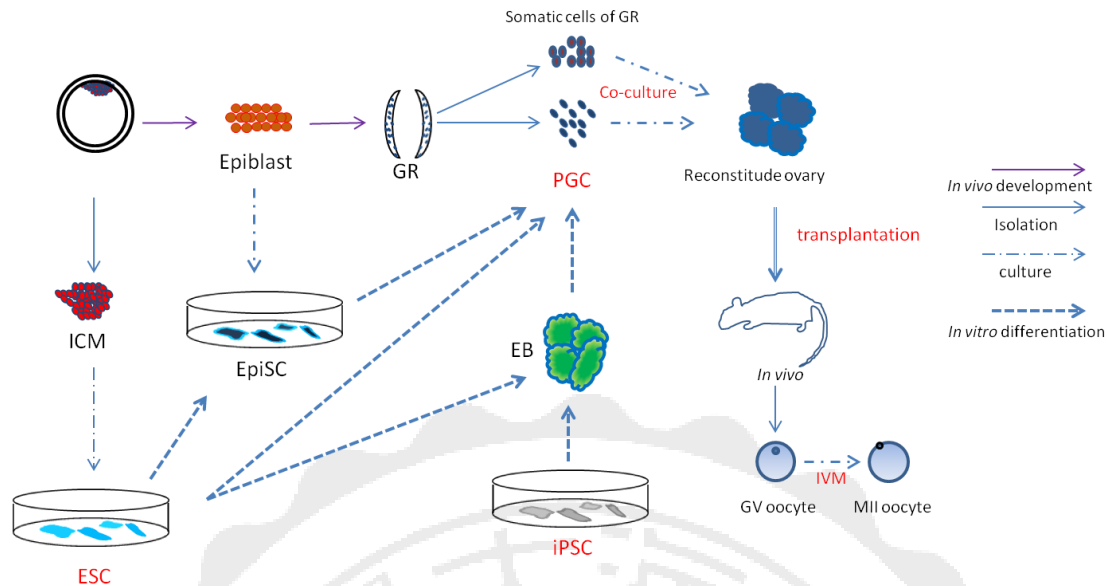
目前已得知在未成熟之大鼠 PGC 中，BMP4-Smad1/5/8 路徑下游因子會誘導 Tcfap2c 蛋白表現，而 Tcfap2c 的存在能抑制 *Hoxa1*、*Hoxb1*、*Sna1* 等體細胞基因以幫助 PGC 往下游生殖細胞進行分化 (Tres *et al.*, 2004)。反之，Tcfap2 缺失會導致幹細胞分化至 EB 後，*Hoxa1*、*Hoxb1* 與 *Sna1* 轉錄蛋白表現大量增強，而 *Stella*、*Nanos3*、*Dazl* 與 *Mvh* 等生殖細胞之標記蛋白的表現則明顯下降 (Weber *et al.*, 2010)。由此可知 BMP4-Smad1/5/8 路徑可經由調控 Tcfap2c 使體細胞基因表現受抑制，進而達到誘導生殖細胞分化的目的。

2. 幹細胞因子(SCF)誘導濾泡發育

BMP4 在濾泡新生的過程中，可由發育中濾泡周遭之基質細胞(stromal cell)分泌並進入卵母細胞與顆粒細胞中 (granulosa cell)，之後啟動 smad1/5/8 路徑間接幫助細胞存活增值。增值的顆粒細胞在原始濾泡中會逐漸包覆卵母細胞並促進濾泡成長 (Nilsson and Skinner., 2003)。BMP4 在體外促進濾泡發育的能力也在 2013 年被證實，添加外源性 BMP4 能夠啟動小鼠始基濾泡中的 *sohlh* (Ding *et al.*, 2013)，*sohlh* 轉錄蛋白的主要功能則在於結合 *c-kit* 的啟動子區域調控 *c-kit* 的表現 (Li *et al.*, 2014)，C-kit 是 SCF 的受體 (Blume-Jensen *et al.*, 2000)，目前已知在雄性生殖系統中，SSC 的表面若有 C-kit 受體接受來自賽氏細胞分泌的 SCF

時，能夠刺激 SSC 內部的 PI3K/AKT 訊號路徑以維持 SSC 的自我更新 (Blume-Jensen *et al.*, 2000)；在雌性分化系統中，SCF 係由顆粒細胞分泌，目前已知可對因 BMP4 路徑而產生 C-kit 表現的始基濾泡進行影響，進而啟動後續之濾泡發育時程：與 SCF 結合之 C-kit 蛋白能夠活化 PI3K，活化的 PI3K 能夠使 AKT 蛋白磷酸化，而磷酸化之 AKT 能夠同時抑制 Foxo3 與磷酸化之 Tsc1-Tsc2 複合體—Foxo3 已知會導致細胞凋亡與細胞週期停止 (Reddy *et al.*, 2005)，而磷酸化的 Tsc1-Tsc2 複合體具有負調節 mTOR 蛋白以抑制濾泡活化的能力 (Adhikari *et al.*, 2010) —故 PI3K/AKT 訊號路徑具有喚醒沉眠狀態之始基濾泡的能力。但是 SCF 是否能夠直接刺激卵母細胞分化則不得而知。此外，C-kit 亦能預防卵子的細胞凋亡 (Ding *et al.*, 2013)。

綜上所述，BMP4 目前是已知在體內與體外對生殖細胞之產生最具影響的因子之一，其誘導生殖細胞之分化能力可以廣泛應用於 PSCs、PGCs，更甚者，BMP 亦能在幫助活化 SSCs 與始基濾泡使其能夠受 SCF (圖二) 影響，故目前體外分化產製生殖細胞的相關研究幾乎都會將 BMP4 當作誘導因子，Hayashi *et al* 近年來的生殖分化研究則是將 BMP4、BMP8b 與 SCF 作為固定使用之分化培養液添加物 (Hayashi *et al.*, 2012；Hayashi and Saitou, 2013)。

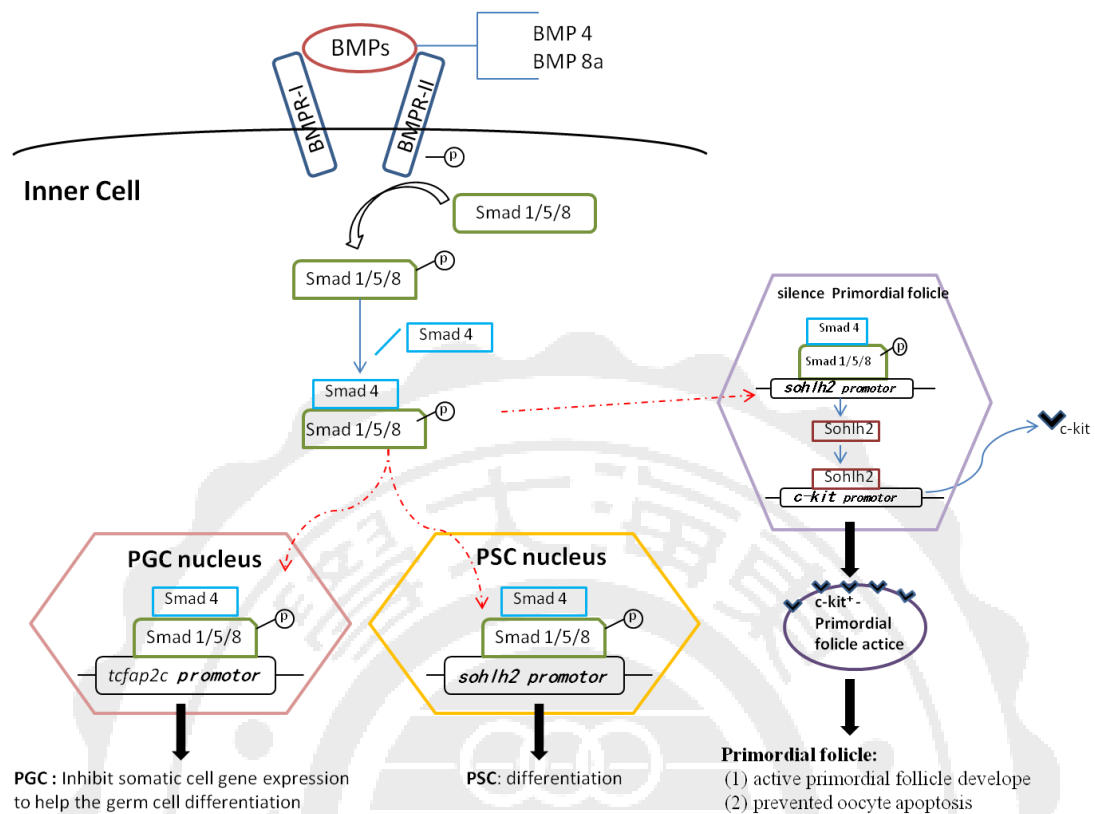


圖一、經由體外分化與體內移植技術產製小鼠成熟卵母細胞流程圖。

目前由 ESC、EpiSC、iPSC 等不同的 PSC 皆可經由 EB 形態，或著直接被誘導分化產生類 PGC。將體外分化所得之 PGC 與生殖脊之體細胞共同體外培養，令其聚集形成重組卵巢組織，再將此組織移植入小鼠體內，借助體內環境可分化產生 GV 期卵母細胞，再經由 IVM 技術使其於體外成熟 (Hayashi *et al.*, 2012)。

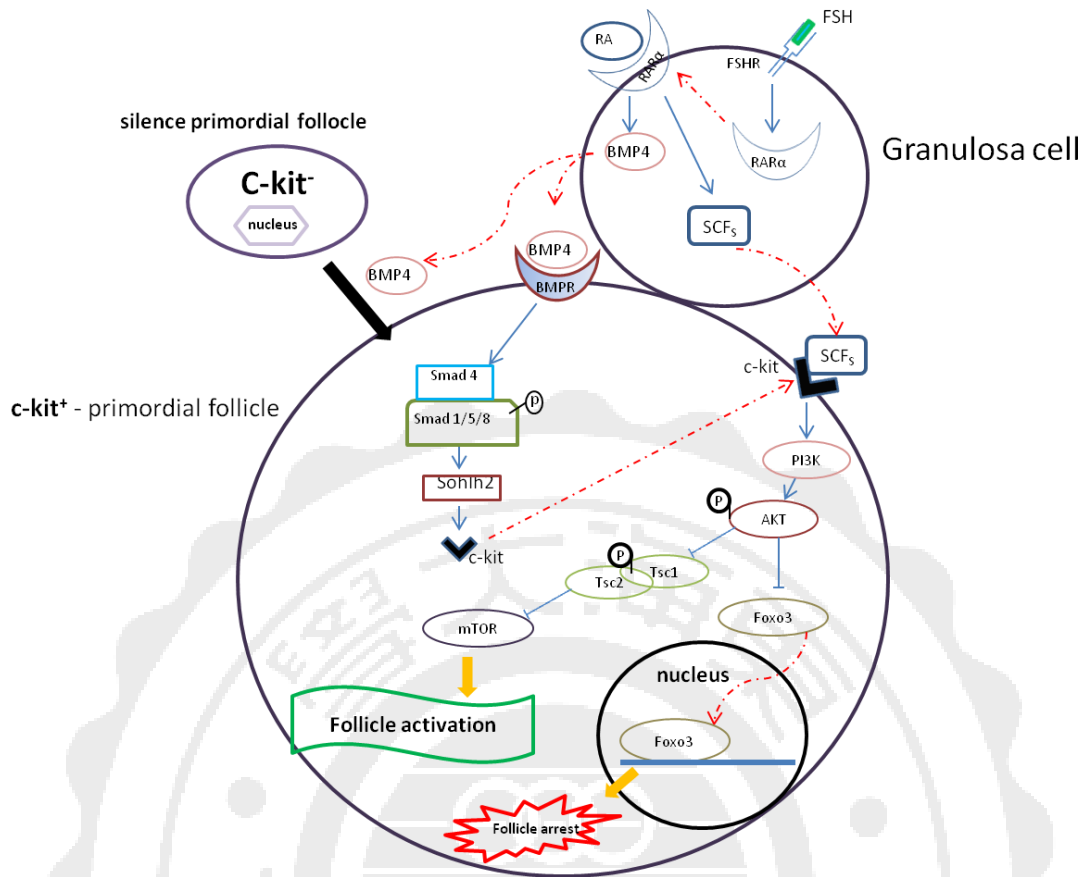
Fig. 1. A schematic overview of the derivation of eggs from pluripotent stem cells.

The PGC-like cells could be induced to differentiate from pluripotent stem cells like ESC, iPSC and EpiSC, this process could go through EB form or not. When the differentiated PGCs were co-cultured with the somatic cells of genital ridge, these cells could aggregate and form a "reconstituted ovary", this aggregated structure could be transplanted into *in vivo* environment for differentiation and produced GV oocyte. After isolation, the GV oocyte could get matured by IVM technique (Hayashi *et al.*, 2012).



圖二、BMP-Smad 1/5/8 路徑誘導始基生殖細胞、多能幹細胞與始基濾泡分化示意圖。圖片說明 BMP 路徑在 PSC、PGC 與始基濾泡中經由磷酸化 Smad 家族蛋白誘導細胞進行分化。此路徑始於 BMP4，BMP8a 蛋白與跨膜蛋白絲胺酸-蘇胺酸激酶受體 I 與 II 型 (serine-threonine kinase receptors, BMPR I, BMPR II) 結合後形成之異源二聚體 (heteromeric complexes)，其後使 Smad 1/5/8 蛋白磷酸化並與 Smad 4 形成複合體，Smad 1/5/8-Smad 4 複合體可進入核膜調節靶基因。在 PGC 與 PSC 中 Smad 1/5/8-Smad 4 複合體能分別調節 *tcfap2c* 與 *sohlh2* 表現以誘導細胞分化；在休眠狀態下的始基濾泡中，Smad 1/5/8-Smad 4 複合體可經由提升 *sohlh2* 表現使細胞分泌 c-kit 蛋白，c-kit 活化的始基濾泡便能由休眠狀態中活化並開始發育以及預防卵子凋亡，是啟動後續生殖細胞分化過程的關鍵因子。

Fig. 2. BMPs-Smad 1/5/8 germ cell differentiation pathway in PGCs 、PSCs and primordial follicles. BMP4, and BMP8a combining with the serine–threonine kinase receptors, BMPR I, BMPR II can form a heteromeric complex. This complex is able to make Smad 1/5/8 proteins phosphorylated and combined with Smad4. Phosphorylated Smad 1/5/8-Smad 4 complex can move through the nuclear membrane and enhanced the target gene expression. In the PGCs and PSCs, Smad 1/5/8-Smad 4 complex can bind with *tcfap2c* and *sohlh2* promotor regions respectively to induce differentiation toward germ cells. In the silence primordial follicle, Smad 1/5/8-Smad 4 complex can inhance the tranlation of c-kit by *sohlh2* regulations. Silent primordial follicles activated by c-kit will start up the development process and prevent oocytes from apoptosis.



圖三、顆粒細胞經由 BMP4 與 SCF 活化始基濾泡之路徑圖。

圖中可見顆粒細胞受到環境中 FSH 刺激分泌視黃酸受體 α (retinoic acid receptor α , RAR α)，RAR α 於細胞表面與 RA 結合後能刺激顆粒細胞分泌 BMP4 與 SCF₅ (soluble SCF) 並釋出細胞外；BMP4 與休眠濾泡上的受體 BMPR 結合後啟動下游路徑使 Smad 1/5/8-Smad 4 複合體經由調節 *sohlh2* 轉錄間接刺激 C-kit 蛋白產生；C-kit 係 SCFs 之受體，在濾泡表面與配體結合後能夠活化下游 PI3K/AKT 路徑，磷酸化的 AKT 能夠同時抑制 Foxo3 蛋白與 Tsc1-Tsc2 複合體。活化的 Foxo3 具有在細胞核中調節細胞週期休止之功能；而活化的 Tsc1-Tsc2 複合體則能抑制 mTOR 蛋白，mTOR 蛋白是領導濾泡發育時程的重要蛋白，故 AKT 抑制 Foxo3 與 Tsc1-Tsc2 複合體能夠間接產生將休眠中之始基濾泡喚醒的功能。

Fig. 3. Granulosa cells stimulate silent follicles via BMP4 and SCF. Granulosa cells stimulated by FSH in the environment can produce the RAR α (retinoic acid

receptor α , RAR α) , then RAR α combined with RA on the membrane would induce BMP4 and SCF_s (SCF soluble) to be released. After being released, BMP4 could combine with the receptor of silent follicles, activate Smad 1/5/8-Smad 4 complex to regulate *sohlh2* expression and downstream protein C-kit. C-kit, a receptor of SCFs, when combined with its ligand on follicle cell surface, would activate downstream PI3K/AKT pathway—phosphorylated AKT inhibits Foxo3 and Tsc1-Tsc2 complex in the silent follicle cells. Activated Foxo3 has the capacity to regulate cell cycle to go into silence in nuclei. Furthermore, phosphorylated Tsc1-Tsc2 complex could inhibit mTOR protein (which the important protein to lead follicle develop). These summarized pathways show that granulosa cells have the capacity to activate silent follicles upon receiving the SCF/PI3K/AKT signals via BMP4/ Smad 1/5/8-Smad 4/C-kit pathway to move into next development stages.

四、研究目的

惟目前建立紐西蘭大白家兔 EGC 之技術仍未成熟，亦無任何有關其分化能力之研究紀錄，本論文旨在探討家兔 PGC 之培養條件，以供建立 EGC 細胞株，並嘗試於體外建立類濾泡組織於體外定向誘導產製雌性生殖細胞。





試驗一、家兔胚胎與生殖脊之發育時程

前言

小鼠在配種後(day post coitum, dpc)第 6 天，早期胚囊一部分上胚葉(epiblast)細胞受骨質形成蛋白 4 (bone morphogenetic protein, BMP4) 誘導 (Ginsburg *et al.*, 1990; Lawson and Hage, 1994; Saitou, 2009) 分化為 PGC 前驅細胞，並於 6.5 dpc 遷移至原線 (primitive streak)。至 7.25 dpc 大約已有 40 個 PGC 並開始表現鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 活性 (Ginsburg *et al.*, 1990; Saitou *et al.*, 2002; Hayashi *et al.* 2011); 其後於 7.5 dpc 遷移至胚外內胚層 (extraembryonic endoderm)。PGC 遷移路線由原線經過卵黃囊 (yolk sac) 進入尿囊膜 (allantois) 後，再移至中腸 (midgut) 與後腸 (hindgut) 區域 (Ginsburg *et al.*, 1990; De Felici *et al.*, 1992; Santos and Lehmann, 2004; Molyneaux and Wylie, 2004; Tres *et al.*, 2004; Hara *et al.*, 2009)，最後於 10.5 dpc 抵達位於胚胎背部內側之未分化性腺或緊連生殖脊 (genital ridge)。當 PGC 抵達生殖脊後便停止遷移而繼續增殖。發育至 11.5 dpc 之小鼠胚胎已增生至 11,000 個 PGC，於 12.5 dpc 其數量最高可達 22,000 個。

家兔早期胚胎發育速度與小鼠不同，PGC 遷徙時程也因此受到影響。最早嘗試追蹤家兔體內 PGC 之研究始於 2000 年，Schäfer-Haas and Viebahn 利用 PG-2 單株抗體辨識早期發育階段 PGC 之遷移過程，結果指出家兔 PGC 最早可在 7.0 dpc 出現於原線被追蹤 (小鼠為 6.0 dpc)，但其抗體反應微弱，而於 8.0 dpc 後遷移至接近卵黃囊上皮細胞與臟壁中胚層 (*splanchnopleuric mesoderm*) 區域。然而，相較於小鼠 PGC 遷徙與發育有關之文獻，家兔 PGC 之研究相對不足，主要原因可能在於飼養實驗用兔所需空間與成本遠高於小鼠，其生活環境之維持與數量繁殖皆需較多人力且難度較高，故雖然家兔極具研究價值，但極少研究團隊選擇其為研究目標。

本試驗在於探討家兔早期胚胎發育之過程，經由比較 9.5 -14.5 dpc 胚胎生殖脊之發育狀況與自其被分離之 PGC 數量，以決定分離兔胚胎 PGC 之最佳時機。

期能使用適當方法完整分離生殖脊，並取得 PGC 供後續相關研究之用。



材料與方法

一、不同發育天數兔胚胎形態之觀察

(一)、胚胎之回收

1. 實驗用家兔來源與飼養管理

本試驗所使用之家兔為購自兔農之性成熟（三月齡）紐西蘭雄性大白兔與性成熟之紐西蘭雌性大白兔（轉讓自歐美生技公司）。飼養期間飲水及飼料採任飼，飼養環境以定時器控制12 h光照、12 h黑暗。飼養管理方式與動物之照護皆依循國立中興大學動物使用與照護委員會（IACUC）之規定進行。

2. 胚胎之取得

配種後之母兔於懷孕後 9.5 天至 14.5 天母兔經二氧化碳窒息犧牲後剖腹取出子宮角並置於不含鈣鎂離子之磷酸緩衝溶液（phosphate-buffered solution, PBS；Gibco No. 21600-015）洗淨，用手術剪刀將子宮角剪開，取出兔胚胎並以眼科手術鑷子將包覆之胎膜剝開，令胚胎裸露並置於 PBS 中洗淨，再以 7% 福馬林(Sigma P6148)固定（組織與胚胎使用 7% 福馬林，固定細胞則使用 7% 福馬林）。

3. 生殖脊之分離

所取得之兔胚胎經 PBS 洗淨後，以刀片切除其前肢以上軀體、後肢與尾部，並使用眼科鑷子去除內臟，脊椎上方發現兩長條形成對組織即生殖脊與中腎。再以眼科鑷子與 31G 注射針頭（BD, BD Ultra-Fine™ II short needle）將其分離後置入 PBS 中洗淨，最後以 7% 福馬林固定。

(二)、胚胎之石蠟切片與 HE 染色

1. 胚胎之取得

如前述一之(一)-2 之步驟

2. 石蠟切片與 HE 染色

由方法一之(一)之2 所得之家兔胚胎以 PBS 清洗一次，加入 7% 福馬林溶液固定 overnight。隔日 PBS 清洗後以石蠟包埋並切片，組織切片以蘇木素伊紅 (Hematoxylin and Eosin, HE) 染色觀察胚胎發育狀態。

(三) 兔 PGC 之培養

1. PGC 之取得與培養

由方法一之(一)-3 取得兔生殖脊與中腎組織後，利用 31G 胰島素注射針頭 (BD, BD Ultra-Fine™ II short needle) 將中腎與生殖脊分離。將生殖脊放入 PBS 中，以針頭尖銳側將生殖脊切成數段，以利 PGC 自生殖脊流出，接著使用微量吸管沖洗生殖脊碎段幫助 PGC 釋出。其後以 40 μm 濾網將大於 40 μm 之組織塊去除，濾液以 2,500 rpm 於 4°C 下離心 3 min，去除上清液加入 PGC 培養液重新細胞懸浮，計算細胞數後至於細胞培養用 4 well (Thermo, 137833) 與 35 \times 10 mm (Corning, 430165) 培養皿中，置入 38°C、5% CO₂ 且相對濕度飽和之培養箱中培養。本試驗培養 PGC 之目的為使其貼盤以供 AP 染色，無須長期培養，故 PGC 無須與 MEF 共培養。

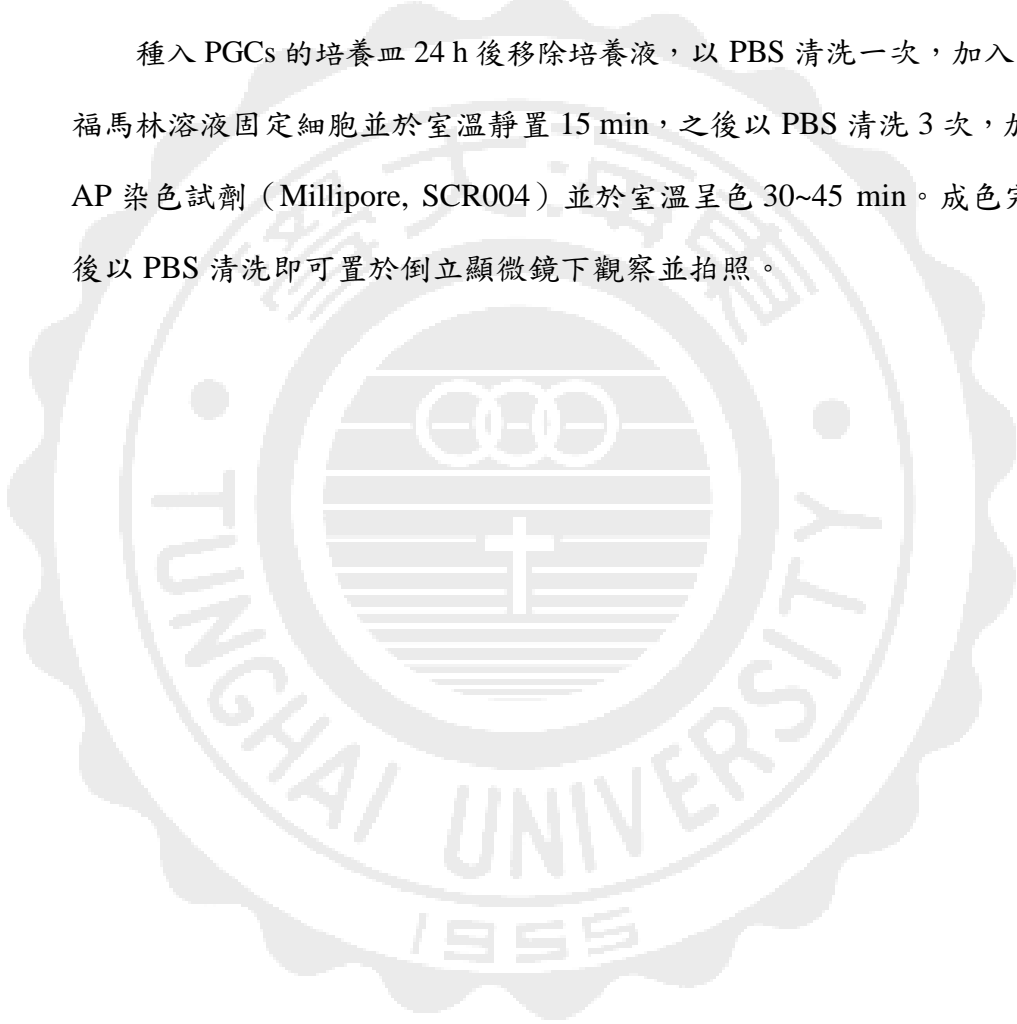
2. PGC 培養液之配製

以市售 DMEM/F12 (Gibco 11320-033) 基礎培養液添加 15% 胎牛血清、2 mM 穀胺醯胺 (glutamine, Sigma G8540)、1% 非必需胺基酸 (non essential amino acid, NEAA; Sigma 7145)、0.1 mM 二乙硫醇

(β -mercaptoethanol; Sigma M7522) 、1,000 U/mL 白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF; CHEMICON ESG1107) 、20 ng/mL FGF2 (basic fibroblast growth factor) 。

3. PGC之鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 染色

種入 PGCs 的培養皿 24 h 後移除培養液，以 PBS 清洗一次，加入 4% 福馬林溶液固定細胞並於室溫靜置 15 min，之後以 PBS 清洗 3 次，加入 AP 染色試劑 (Millipore, SCR004) 並於室溫呈色 30~45 min。成色完成後以 PBS 清洗即可置於倒立顯微鏡下觀察並拍照。



結果

一、9.5-14.5 dpc 家兔胚胎與其生殖脊之發育時程

(1)家兔胚胎自 9.5 dpc 起可於解剖顯微鏡下以 31G 胰島素注射針分離，此時胚胎整體長約 6 mm，成半透明狀，頭頸部位分界不明，可觀察到初期眼睛組織，四肢與臟器皆未成形（圖四 A）。10.5 -11.5 dpc 兔胚胎發育過程之形態可見頭與尾部明顯發育，心臟部位清楚可見，其他內臟構造漸趨複雜並逐漸被體腔包覆。11.5 dpc 時四肢已開始發育（圖四 B、C）。12.5-13.5 dpc 兔胚頸部形狀逐漸明顯，頭部體積明顯增大，內臟逐漸內縮至體內導致不易觀察其發育進度；四肢發育快速，胚胎整體成長速度大幅提升（圖四 D、E）。14.5 dpc 兔胚胎頭部體積已佔整體胚胎的 1/3，明顯可觀察到血管分布狀態與眼睛構造，此時四肢趾頭明顯，內臟以完全包覆入體腔（圖四 F）。

(2)家兔生殖脊於 9.5 dpc 時尚未發育，10.5 dpc 之中腎內已有血液分佈。當胚胎發育至 11.5 dpc 時生殖脊已可被辨識但難以明確與中腎組織區分；至 12.5 -14.5 dpc 之中腎長度明顯縮短（圖四 D、E、F），組織增厚，於 14.5 dpc 時已明顯開始分化。同時期之生殖脊則逐漸拉長，組織增厚，12.5 dpc 至 13.5 dpc 之生殖脊與中腎已可輕易區別與分離，14.5 dpc 之生殖脊組織約增厚至 0.3 mm，但無明顯分化跡象（圖五）。13.5 dpc 與 14.5 dpc 之中腎- 生殖脊相連組織與胚胎其他組織之相對位置，也可從 H&E 染色後之胚胎石蠟切片清楚呈現，但中腎與生殖脊之界線不易從切片中區別（圖六）。

二、自不同發育階段胚胎分離 PGCs 之數量

自 9.5、10.5、11.5 與 12.5 dpc 兔胚胎中所分離的平均 PGCs 數量分別為 0.1×10^4 個、 0.2×10^4 個、 $(0.7 \pm 0.1) \times 10^4$ 個與 $(1.6 \pm 0.1) \times 10^4$ 個，其中以 12.5 dpc 所分離為最多。

討論

目前有關小鼠胚胎之性腺發育、PGC 遷徙過程、生殖相關基因之功能及其在胚胎發育時期之表現階段已有許多的研究 (Wilhelm *et al.*, 2007)。相較家兔生殖系統發生之研究明顯稀少。目前有關家兔性腺發育只有在 14.5 dpc 之後有較多之文獻 (Daniel-Carlier *et al.*, 2013)，而 14.5 dpc 前之兔胚發育與 PGC 遷移之研究只有 Schäfer-Haas and Viebahn 於 2000 年利用 PG-2 單株抗體辨識其於早期發育階段時之遷移過程；其他文獻指出兔 PGC 最早可在 7.0 dpc 於原線發現(小鼠為 6.0 dpc) 但是抗體反應微弱，這些細胞可於 8.0 dpc 後遷移至接近卵黃囊上皮細胞與臟壁中胚層(*splanchnopleuric mesoderm*)區域 (Schäfer-Haas and Viebahn, 2000)。Kakegawa *et al.* (2008)指出家兔胚胎最早於 9.5 dpc 便可從生殖脊中分離出能夠表現 AP 之 PGC。

家兔懷孕期較小鼠者約長 9 天 (30 天 *v.s.* 21 天; Daniel-Carlier *et al.*, 2013)。胚胎成長天數較長可能會影響生殖系統的發育與 PGC 之遷徙的時程。小鼠胚胎最早於 8.5 dpc 即可以手術方式被分離出，且其胚胎輪廓明顯 (Kakegawa *et al.*, 2008)。而 9.5 dpc 前之家兔胚胎則仍不易以手術方式取得，即使勉強自體內分離也難以辨識其形態，由此可知家兔胚胎發育在此時期便已落後小鼠。

為了後續探討研究了解家兔性腺發育與 PGC 遷徙過程，本試驗首先觀察 13.5 與 14.5 dpc 家兔胚胎之發育階段，並以 HE 染色技術確立生殖脊於胚胎中之位置後 (圖六)，進一步研究 9.5-12.5 dpc 家兔生殖脊之發育與 PGC 遷徙時回收之最適階段。Kakegawa *et al.* (2008)之研究報告指出可於 9.5 dpc 之兔胚胎中分離生殖脊並取得 PGC，由此應可推斷家兔生殖脊大約比小鼠提早發育 1 天。然而本試驗觀察 9.5 dpc 之兔胚胎時並未能發現任何明顯成對之類生殖脊或中腎構造 (圖五 A)，而須至 10.5 dpc 之兔胚胎始可觀察到初期之中腎組織 (圖五 B)；遲至 11.5 dpc 時才能在成對之中腎組織間觀察到血液流動現象，故推斷生殖脊可能於此時期方才逐漸發育完整 (圖五 C)。此結果似與 Kakegawa *et al.* 之研究結果

不甚相符，其原因可能在於與家兔性腺發生相關之研究仍屬稀少，*Takegawa et al.* (2008)之研究報告中亦未提及兔生殖脊之發育過程，可能其團隊對於辨識生殖脊之方法與定義與本試驗並不相同，故造成雙方研究結果有所差異。

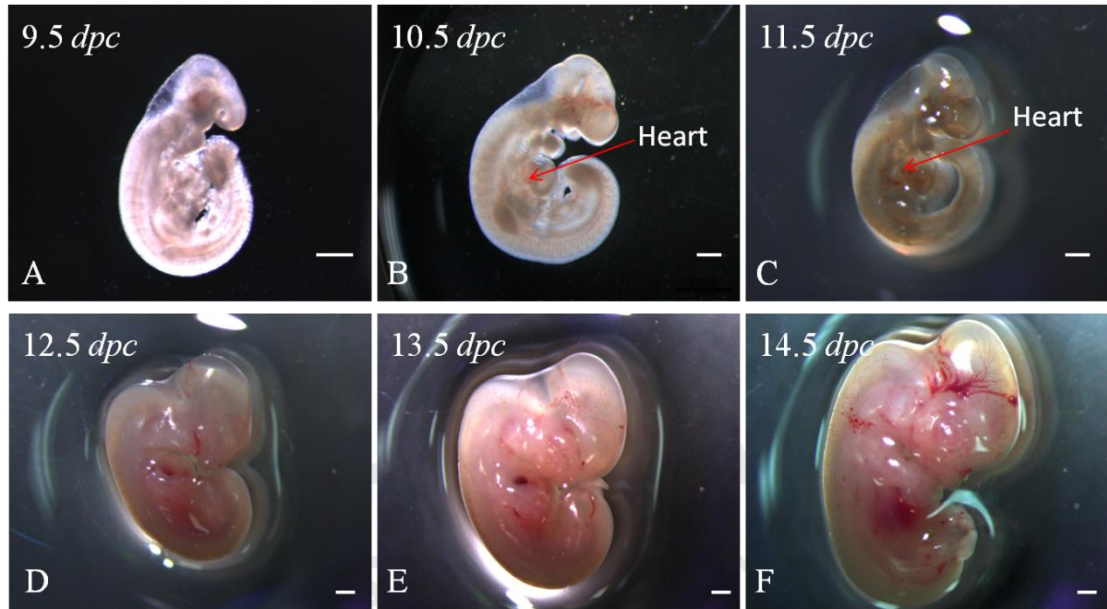
由前人研究可知小鼠 PGC 在適當體外環境中培養，可被再程式化形成具備分化多能性之 EGC。小鼠 PGC 於 13.5 dpc 時的總細胞數量可達到最高量（約 22,000 至 25,000 個）。若以細胞數為依據，則 13.5 dpc 之鼠胚胎應該最適於進行分離供培養為 EGC 培養。然而大部分之研究報告卻採用 8.5 dpc 鼠胚胎進行 PGC 之分離 (*Durcova-Hills et al.*, 2000; *Horii et al.*, 2003; *Leitch et al.*, 2010)，乃因 PGC 轉變為 EGC 之效率會隨鼠胚日齡增加而下降，來自 11.5 dpc 以上之鼠胚其 PGC 經培養後不易形成 EGC，可能因此時期之 PGC 即將或已進入性別分化階段，細胞內部開始進行基因外修飾，故較不受外源因子影響 (*Hajkova et al.*, 2002)。

同樣的，家兔 PGC 應於 9.5 dpc 自體內分離，然而家兔懷孕胎數與小鼠相差懸殊，本試驗經多次嘗試後發現雖可自 9.5 dpc 兔胚胎中分離取得 PGC，但是平均每胎只得 1×10^3 個細胞，數量極少，難以提供後續試驗之需。而自 10.5-12.5 dpc 中分離 PGC 之平均數量（表一），發現 12.5 dpc 之母胎平均每個胚胎含有 $(1.6 \pm 0.1) \times 10^4$ 個 PGC，所分離之 PGC 亦能表現 AP，顯示其尚未或未完全分化；此時期生殖脊形態明顯、易於分離（圖五 D），若至 13.5 dpc 之 PGC 可能已具有開始性別分化之風險。

圖七為小鼠、人類與家兔 PGC 在尚未進行性別分化前，於胚胎中之遷徙過程。圖中可見小鼠 PGC 從卵黃囊遷移至尿囊膜約需一天時間，而小鼠生殖脊約於 10.5 dpc 開始發育，PGC 也在此時開始遷入並停留，直至 13.5 dpc 開始性別分化。而由本試驗結果可知家兔生殖脊最早則於 11.5 dpc 開始發育，性腺發育在此時期即已落後小鼠。家兔生殖脊於 12.5 dpc 時已可被辨識，並持續發育至 14.5 dpc 時仍與中腎相連而外觀尚未明顯分化（圖五 D-F）。本試驗結果顯示 12.5 dpc 之

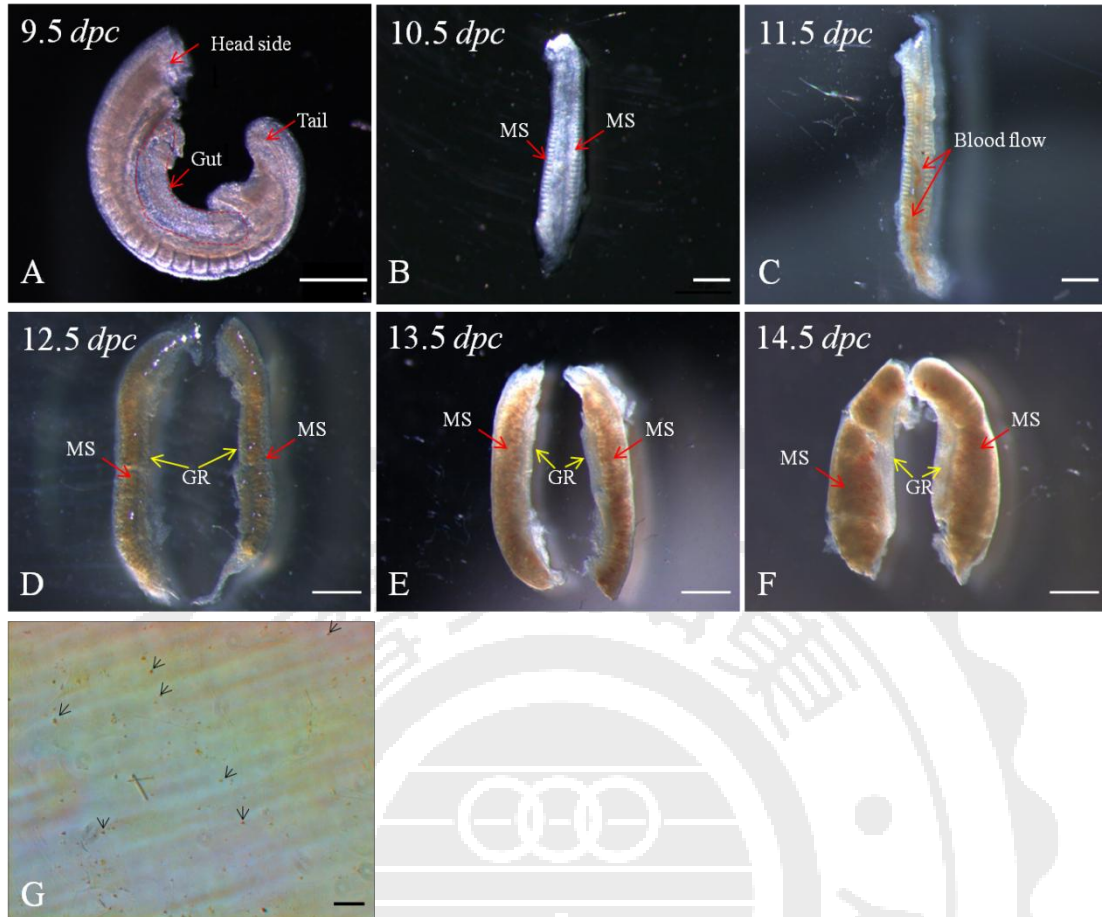
兔胚胎為用於分離 PGC 之最佳時機。遂決定後續試驗所需之兔 PGC 皆由 12.5 dpc 之生殖脊分離。





圖四、家兔胚胎之發育過程 (9.5 - 14.5 dpc)。 (A, B, C) 觀察 9.5 -11.5 dpc 之家兔胚胎形態，此時期胚胎可見明顯體節 (somite)，頭頸部仍有薄膜相連，四肢與心臟以外之臟器皆尚未明顯發育。(D, E, F) 胚胎發育進入 12.5 - 14.5 dpc 時期，頭與頸部逐漸成形，四肢與內臟開始發育，胚胎體形成長迅速。Scale bar = 1 mm。

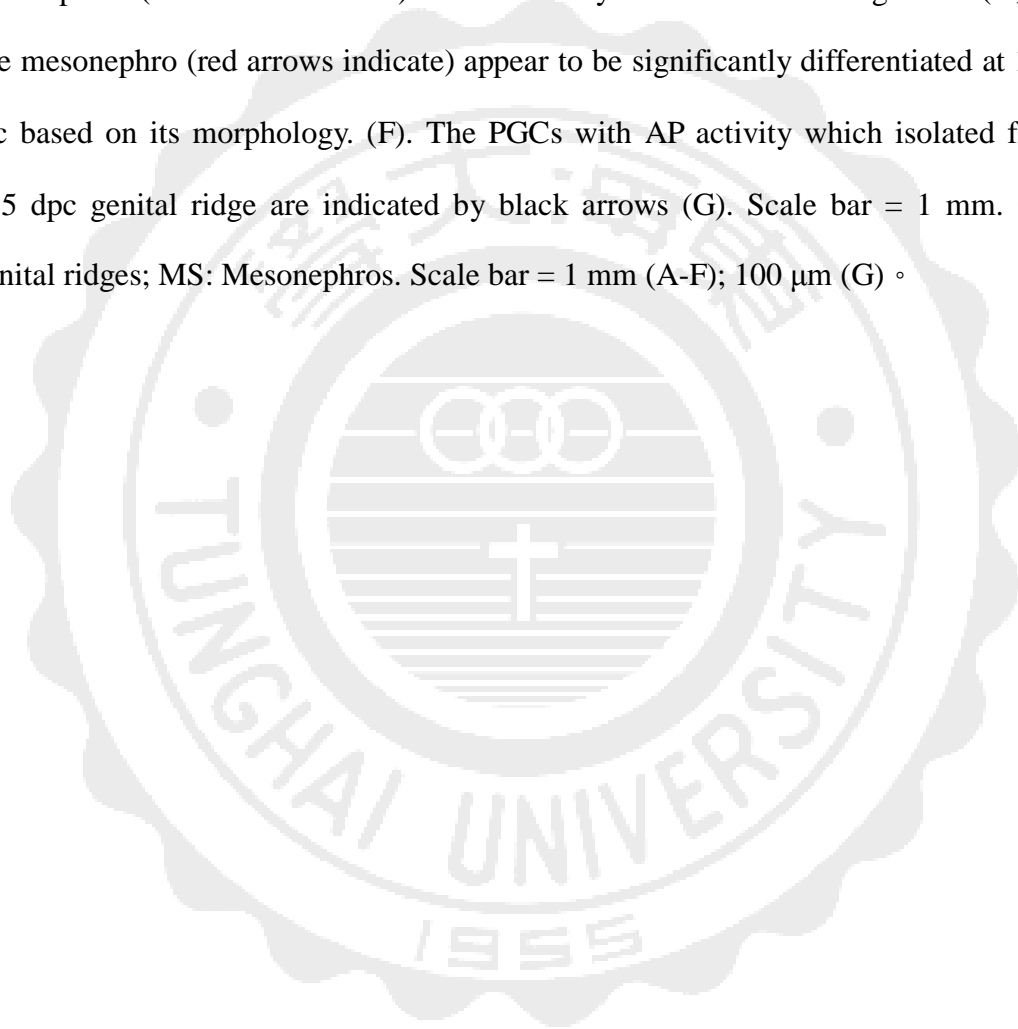
Fig. 4. Morphological characteristics and development of New Zealand White rabbit fetuses during 9.5 and 14.5 dpc. (A, B, and C) During 9.5 to 11.5 dpc, the somites of fetuses can be clearly observed, and the head and neck are completely associated. By this stage, it is hard to observe significant changes in most of the organs except for limbs and the heart at this stage.. From 12.5 to 14.5 dpc (D, E, and F), the head, neck and the limbs are formed gradually, and the whole fetuses grow quickly when PGCs could be efficient by isolated. Scale bar = 1 mm.

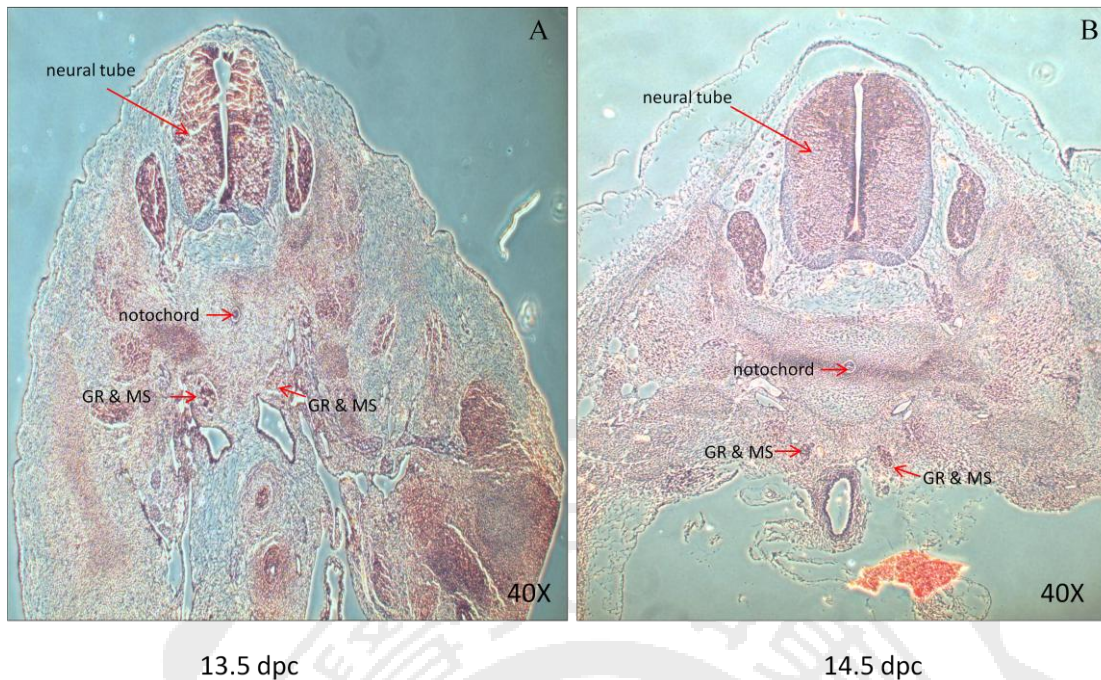


圖五、自 9.5 - 14.5 dpc 家兔胚胎分離生殖脊之發育。(A) 胚胎經移除頸部以上軀體、臟器後之構造。家兔生殖脊於 9.5 dpc 尚未明顯發育，紅色虛線標示出 gut 組織部位。(B) 10.5 dpc 之胚胎已有成對中腎組織出現，但尚未能清楚辨視其生殖脊位置(箭頭標示處)。(C) 至 11.5 dpc 已可見成對中腎組織間之血液流動(箭頭標示處)，此時生殖脊已逐漸發育成形 (D, E) 12.5 dpc 至 13.5 dpc 之中腎(紅色箭頭標示處)與生殖脊(黃色箭頭標示處)形狀則清晰可見。(F) 至 14.5 dpc 胚胎之中腎(紅色箭頭標示處)已明顯分化，生殖脊(黃色箭頭標示處)已可清楚辨識。(G) 自 12.5 dpc 之生殖脊分離所得 PGC，具有 AP 活性之表現(黑色箭頭所示)。Scale bar = 1 mm (A-F) ;100 μm (G)。GR: Genital ridges ; MS: Mesonephros。

Fig. 5. Development morphology of New Zealand White rabbit genital ridges

from 9.5 to 14.5 dpc. The genital ridges are not clearly observed in 9.5 dpc rabbit fetuses, red dashed line indicates the gut tissue (A). At 10.5 dpc, the paired mesonephros but not genital ridge could be easily observed (red arrows indicate) (B). In the two mesonephro tissues, blood flow being observable (red arrows indicate) (C). Between 12.5 dpc and 13.5 dpc, the genital ridge (yellow arrows indicate) and mesonephros (red arrows indicate) could be easily observed and distinguished (D, E). The mesonephro (red arrows indicate) appear to be significantly differentiated at 14.5 dpc based on its morphology. (F). The PGCs with AP activity which isolated from 12.5 dpc genital ridge are indicated by black arrows (G). Scale bar = 1 mm. GR: Genital ridges; MS: Mesonephros. Scale bar = 1 mm (A-F); 100 μ m (G) ◦





圖六、家兔胚胎(13.5 dpc 與 14.5 dpc)生殖脊與中腎之構造(HE 染色)。13.5 dpc (A) 與 14.5 dpc (B) 之胚胎經 HE 染色之組織切片顯示明確之生殖脊、中腎與其他組織之相對位置(紅色箭頭所示)。GR: genital ridge; MS: mesonephros.

Fig. 6. Histological structure of the genital ridge and mesonephros in New Zealand White rabbit fetuses during 13.5 and 14.5 dpc. The paraffin sections of 13.5 dpc (A) and 14.5 dpc (B) rabbit fetuses were prepared HE stained, the genital ridges associated with mesonephro and the related tissues could be identified (indicated by red arrows). GR: genital ridge, MS: mesonephros.

表一、自不同發育階段之家兔胚胎分離 PGCs 之數量變化

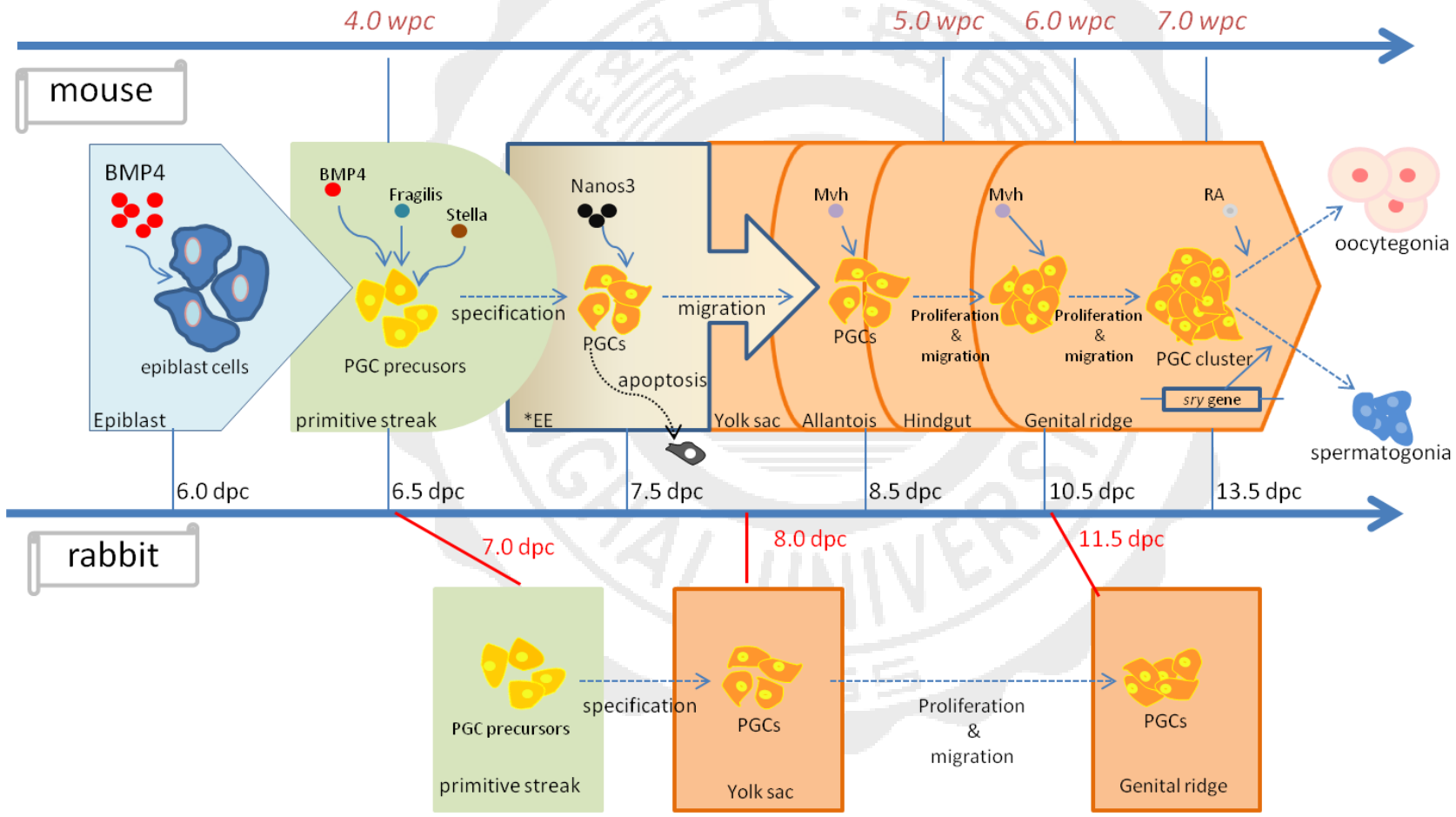
Table. 1. The total numbers of rabbit PGCs isolated from various days of fetuses post coitus (dpc).

Days post coitus (dpc)	No. of fetuses	Total No. of PGCs ($\times 10^4$)	Average No. of PGCs per fetus ($\times 10^4$)
9.5	18	2.4 ± 0.5	0.1 ± 0
10.5	15	3.4 ± 0.3	0.2 ± 0
11.5	19	13.2 ± 1.8	0.7 ± 0.1
12.5	20	32 ± 6.7	1.6 ± 0.1

human

mouse

rabbit



圖七、小鼠、人類與家兔 PGC 發育與遷徙時程之比較。

小鼠與家兔於配種後 6.0 天 (6.0 dpc) 至 13.5 天 (13.5 dpc) 與人類胚胎受精後 4.0 周 (4.0 wpc) 至 7.0 周 (7.0 wpc) 其 PGC 發育過程之比較。小鼠胚胎發育至 6.0 dpc 時，上胚葉細胞受 BMP4 刺激產生 PGC 前驅細胞，其後於 6.5 dpc 時受 BMP4、Fragilis 與 Stella 影響而特化成為 PGC。小鼠 PGC 於 7.5 dpc 開始進行遷移與增殖，並於 10.5 dpc 抵達生殖脊，並持續增殖至 13.5 dpc，此時未完成遷移至生殖脊之 PGCs 開始進入細胞凋亡的階段。目前已知兔 PGC 前驅細胞最早出現於 7.0 dpc 胚胎之原線 (Schäfer-Haas and Viebahn., 2000)，於 8.0 dpc 進入卵黃囊開始特化並朝向生殖脊遷移。人類 PGC 則於 4.0 wpc 可於原線被觀察到，5.0 wpc 時已遷移至後腸組織中並進行特化，而於 6.0 wpc 抵達生殖脊並持續增殖，至 7.0 wpc 開始進行性別分化。(EE: extraembryonic endoderm, GR: genital ridge.) (Ginsburg *et al.*, 1990; De Felici *et al.*, 1992; Lawson and Hage, 1994; Tanaka *et al.*, 2000; Saitou *et al.*, 2002; Molyneaux and Wylie, 2004; Tres *et al.*, 2004; Santos and Lehmann, 2004; Hara *et al.*, 2009; Saitou, 2009; Hayashi *et al.* 2011)

Fig. 7. Chronological schemes of PGC migration and proliferation in mouse, New Zealand White rabbit, and human fetuses. The mouse PGC precursors are differentiated from the epiblast in the 6.0 dpc fetus when induced by a series of stimulation triggered by BMP4. Under the initial induction of BMP4, and then by Fragilis and Stella, PGC precursors begin to specify into mature PGCs at 6.5 dpc and migrate to the genital ridge through extraembryonic endoderm (EE), yolk sac, and then hind gut between 7.5 to 10.5 dpc. PGCs stay put and keep proliferating in the genital ridge during 10.5 to 13.5 dpc. In rabbits, PGCs were identified at EE at 7.0 dpc, and start specification in the yolk sac at 8.0 dpc. After specification, these cells migrate to the genital ridge, where they keep proliferating and waiting for sexual differentiation until 12.5 dpc. PGCs can be identified from the primitive streak at 4.0

wpc. They migrate through the hind gut at 5.0 wpc, arrived the genital ridge around 6.0 wpc, and then reside in the indifferentiate gonads and continue proliferating by 7.0 wpc, after which the gonads starts off the sexual differentiation. (EE: extraembryonic endoderm, GR: genital ridge) (Ginsburg *et al.*, 1990; De Felici *et al.*, 1992; Lawson and Hage, 1994; Tanaka *et al.*, 2000; Saitou *et al.*, 2002; Molyneaux and Wylie, 2004; Tres *et al.*, 2004; Santos and Lehmann, 2004; Hara *et al.*, 2009; Saitou, 2009; Hayashi *et al.* 2011)



試驗二、紐西蘭白兔 PGC 之分離與繼代培養為 EGC 之研究

前言

小鼠 PGC 在含有 LIF、bFGF、FK 之培養環境下可再程式化形成 EGC，且能在含有 MEK 抑制劑與 GSK3 β 抑制劑之培養環境中被分株培養為細胞株 (Leitch *et al.*, 2010)。家兔 PGC 再程式化形成類 EGC 之能力也已在 2008 年被證實 (Kakegawa *et al.*, 2008)，但至今仍沒有成功建立家兔 EGC 之相關研究。

PGC 與 EGC 之差異主要在於分化多能性、體外生存能力與外觀之差別：PGC 僅具備單一分化能力，且極易在體外環境受外在因子影響而產生分化。PGC 形態為圓形之單顆細胞，無法於體外長期存活且無法形成細胞群落與類胚體，將其注射入發育中之囊胚亦無法產生嵌合體 (Donovan, 1994)。然而，若將 PGC 培養於含有 LIF、bFGF、FK 之培養環境中，可抑制 PGC 分化且有機會轉變形成具多能性之 EGC。比較 PGC 與 EGC 基因表現之異同，可發現兩者共同表現之基因包括 *oct-4*、*sox2*、*nanog*、*stella* 及 *myh* 等，而僅表現於 EGC 之基因為 *c-myc*、*stat3* 與 *klf4* (Labosky *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1994; Durcova-Hills *et al.*, 2008)。

本試驗基於試驗一之結果使用分離自 12.5 dpc 之家兔 PGC，參考 Kakegawa *et al.* 於 2008 年發表之研究報告，於培養液中添加 FK 與 LIF 幫助 PGC 再程式化形成 EGC 並維持分化多能性 (Kakegawa *et al.*, 2008)。本試驗測試多種培養液配方，包括於 2i 培養系統中測試添加不同濃度之 MEK 抑制劑與 GSK3 β 抑制劑、市售 mTeSR™ medium 培養系統與使用 KSR 代替 FBS 之無血清培養系統，嘗試找出能成功建立家兔 EGC 之培養環境。

材料與方法

一、PGC之分離與培養

(一) PGC之回收

1. 家兔之來源及飼養管理

同試驗一，飼養管理方式與動物之照護皆依循國立中興大學動物使用與照護委員會 (IACUC) 之規定進行。

2. PGC之體外培養

由試驗一方法一之 (三) -1 回收之PGCs，計算細胞數後以3000個細胞/well之密度置於細胞培養用4-well培養皿中，於38°C、5 % CO₂且相對濕度飽和之培養箱中培養。接種細胞的培養皿於48 h後更換培養液，之後每天更換一半的培養液以保持培養環境中富含足夠之生長因子。

(二) 家兔EGC之建立與培養

1. 飼養層細胞之製備：

(1) MEF之製備

本試驗皆使用小鼠胎源纖維母細胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEF) 作為飼養層細胞。取12.5 dpc之ICR品系小鼠胚胎，置入DPBS中將血洗淨，去除胚胎之外膜、頭部、尾部、四肢、內臟、脊椎與任何含血之組織。其後以DPBS清洗3次去除血液殘留。將1-3個胚胎置入1.5 mL eppendorf，以細剪剪碎後加入0.5 mL之0.05% trypsin-EDTA作用7 min，

再移入15 mL離心管並加入2.5 mL trypsin-EDTA於37 °C下作用8 min，之後添加2.5 mL細胞培養液，並以吸管吸放數次均質之，將細胞液移入15 mL離心管，再加入6 mL細胞培養液懸浮之。懸浮細胞以1,000 rpm轉速離心3 min，移除上層液，加入10 mL細胞培養液並重新懸浮之，靜置5 min使較大細胞團塊沉澱。取上層液加入細胞培養皿中培養於37 °C，5% CO₂，飽和相對濕度之培養箱中。隔天觀察細胞生長情形，細胞型態不佳或是生長速度太慢之細胞株予以淘汰。健康的細胞株培養至盤面80%面積時將其冷凍備用。

(2) 飼養層細胞之培養

將培養皿內細胞數約佔整盤底面積80%之飼養層細胞以0.05% Trypsin-EDTA溶液打散成單細胞狀態後，加入MEF培養液與細胞充分混合，其後以2,500 rpm (1190 xg) 離心5 min後移除上清液，加入MEF培養液使細胞均勻懸浮。視試驗需求將細胞懸浮液以適當比例分盤，並置於37 °C、5% CO₂且相對濕度飽和之培養箱中培養，每兩天更換培養液。當細胞數增殖至培養皿底面積80%滿時選擇予以繼代培養、為製作飼養層細胞而抑制其細胞活性或冷凍保存。

(3) 飼養層細胞之冷凍與解凍

a. 冷凍：

將欲冷凍之飼養層細胞以0.05% trypsin-EDTA溶液處理至單細胞狀態，加入與trypsin-EDTA等體積之細胞培養液使其與細胞混和均勻以中止trypsin-EDTA作用，並以3,000 rpm 轉速離心5 min後移除上清液，加入1 mL之細胞冷凍液，計算細胞數後置入冷凍管中。

b. 冷凍保存方法:

將冷凍管置於冷凍保存盒中，放置於-80°C 冰箱 overnight，再移入液態氮桶以-196 °C 長期保存。

c. 解凍:

將冷凍管從保存之液態氮桶中取出，手持冷凍管蓋使其於37°C 水浴槽中回溫避免細胞污染。回溫後將細胞移入15 mL 離心管中，加入與細胞冷凍液同體積之細胞培養液並均勻混和，並以2,500 rpm (1190 xg) 轉速離心5 min 後移除上清液，加入細胞培養液使之均勻懸浮，再將細胞液移至培養皿，並置於37°C、5% CO₂且相對濕度飽和之培養箱中培養，細胞培養液每兩天更換一次。當細胞數增殖至培養皿底面積80% 滿時選擇予以繼代培養、為製作飼養層細胞抑制其細胞活性或冷凍保存。

(4) 飼養層細胞之分裂活性抑制

當MEF細胞數增殖至占滿培養皿底面積80-90% 時將培養液移除，加入10 µg/mL mitomycin-C (Sigma M0503) 培養液後於移置培養箱中靜置3 h，其後移除mitomycin-C 培養液，以PBS 清洗三次，加入0.05% trypsin-EDTA 溶液處理至單細胞狀態，加入與trypsin-EDTA 等體積之細胞培養液使其與細胞混和均勻以中止trypsin-EDTA 作用，並以3,000 rpm 轉速離心5 min 後移除上清液，加入細胞培養液使之均勻懸浮。之後將細胞懸浮液加入經過0.1% gelatin (Sigma, G1890) 處理之培養皿中，細胞密度為 1.4×10^5 cells/cm²，並置於37°C、5% CO₂且相對濕度飽和之培養箱中培養待用。置入PGC 前須先更換培養液為PGC 培養液 (PGCM)。

(5) Mitomycin-C培養液之配製

飼養層細胞培養液添加10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mitomycin-C後於 -20°C 儲存。

(6) 細胞冷凍液

10%二甲基亞楓 (dimethyl sulfoxide, DMSO ; Sigma, D5879) 與90%胎牛血清 (FBS, Biological Industries Cat. 04-100-1A) 充分混和後避光立即使用。

2. 培養液之配製

(1) DMEM基礎培養液

以市售DMEM (Sigma, D7777) 為基礎培養液，添加3.7 g/L NaHCO_3 (Sigma, S5761) 及1% ABAM (Gibco, No.15240-062) ，校正其pH值 (pH 7.2-7.4) 與滲透壓 (mOsm: 320 ± 10) 並過濾除菌後於 4°C 儲存備用。

(2) 飼養層細胞培養液 (MEF medium) 之配製

以DMEM基礎培養液添加10% 胎牛血清後於 4°C 儲存。

(3) 兔胚幹細胞培養液(rESC medium)之配製

以市售DMEM/F12 (Gibco, 11320-033) 基礎培養液添加15% 胎牛血清、2 mM 穀胺醯胺 (glutamine; Sigma, G8540) 、1% 非必需胺基酸 (non essential amino acid, NEAA; Sigma, 7145) 、0.1 mM 二乙硫醇 (β -mercaptoethanol; Sigma, M7522) 、1,000 U/mL

白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF; CHEMICON, ESG1107) 、20 ng/mL FGF2及10 μ M FK (Sigma, F6886)

(4) 市售mTeSR™培養液 (mTeSR™ medium) 之配製

以市售mTeSR™培養液 (STEMCELL, 05850) 添加15%胎牛血清、1,000 U/mL LIF及10 μ M FK

(5) 雙抑制劑培養液 (2i medium) 之配製

本培養條件旨在探討於培養環境中添加GSK3抑制劑 (inhibitor)與MEK抑制物對於建立rEG細胞株是否有效。此試驗以rESC medium為基礎測試多種不同濃度之2i條件: 0.5 μ M/mL GSKi +1 μ M/mL MEKi、1 μ M/mL GSKi +1 μ M/mL MEKi、2 μ M/mL GSKi +1 μ M/mL MEKi、4 μ M/mL GSKi +1 μ M/mL MEKi、2 μ M/mL GSKi+0.5 μ M/mL MEKi、2 μ M/mL GSKi+1 μ M/mL MEKi與2 μ M/mL GSKi+2 μ M/mL MEKi。

(6) EGC培養液 (rEG medium) 之配製

本培養條件以人造血清替代物(knockout serum replacement, KSR; Gibco 10828-028)取代rESC medium中的FBS、添加10 ng/mL ROCK inhibitor抑制細胞凋亡，並測試添加5 ng/mL、10 ng/mL與20 ng/mL bFGF對於建立rEG細胞株之影響。

3. EGC之培養與繼代

PGCs從胚胎中分離後與MEF飼養層細胞共培養 (飼養層細胞密度為 1.4×10^4 cells/cm²)，共培養後48 h更換一半培養液，之後每天更換一半，

並每日觀察其細胞變化。共培養後第7日將類EGC群落以尖端熔鈍之玻璃針挑起，以PBS清洗並使用玻璃針將類EG細胞群落分切成細胞團塊，再與新鮮MEF飼養層細胞共培養培養於37°C、5% CO₂且相對濕度飽和環境。

4. 類EGC產率之計算

兔PGCs經培養7天後，統計類EGC colony之數量並計算其產率。產率計算之公式如下：

$$\frac{\text{未分化colony產生數量}}{\text{所有colony產生數量}} \times 100\% = \text{類EGC產率}$$

二、EGCs特性分析

1. 鹼性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP）染色

同方法一之（三）-3。

2. 免疫細胞染色（immunocytochemical staining, ICC）

利用免疫細胞染色鑑定類EGC所表現之特定抗原。以4% paraformaldehyde（Sigma P6148）溶液固定欲染色之兔類EGC，以PBS清洗後加入0.3% Triton（Sigma X100）作用30 min，其後以PBS清洗後加入blocking buffer（2% 脫脂奶粉溶於PBS中）作用1 h，之後以PBST（0.05% Tween-20, Amersham Life Science 20650溶於PBS中）清洗，接著加入第一抗體—稀釋500倍之抗Oct-4（Santa Cruz SC8628）、稀釋250倍之抗Vasa（Bioby orb8815）於室溫作用1 h或放置冰箱over night，第一抗體作用時間完畢後以PBST清洗三次，若第一抗體未conjugate Cy5或FITC等螢光端，則加入結合螢光酵素之

第二抗體 (goat anti-mouse IgG)，靜置於室溫下1 h使之與第一抗體結合，之後以PBST清洗之並加入DAPI染劑 (Sigma, D9564) 染細胞核之DNA，最後於螢光顯微鏡下觀察並拍照。詳細步驟如下。

- (1) 將細胞以PBS清洗後以4% paraformaldehyde固定，室溫靜置1 h。
- (2) 以PBS將paraformaldehyde清洗掉。
- (3) 0.3% Triton作用30 min。
- (4) PBS清洗15 min，重複三次。
- (5) 加入blocking buffer (2% 脫脂奶粉溶於PBS中)，室溫靜置1h。
- (6) 以含有0.05% 之Tween-20之PBS (PBST) 清洗15 min，重複三次。
- (7) 加入第一抗體 (以blocking solution稀釋)，靜置於4°C下隔夜。
- (8) PBST清洗15 min，重複三次。
- (9) 加入第二抗體 (以blocking solution稀釋)，室溫避光靜置1 h。
- (10) 加入溶於PBST中之1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI溶液，避光靜置15 min。
- (11) PBST清洗15 min，重複兩次。
- (12) 置於螢光顯微鏡下觀察。

三、統計分析

所有數據資料根據ANOVA分析，利用SAS Version 9 (SAS Institute, Cary NC, USA) 之GLM模式與Tukey test測定其結果之顯著性。百分率之數據資料於ANOVA分析前轉換成arcsine。所有試驗之顯著性檢定以 $P < 0.05$ 為標準。

結果

一、比較不同成分培養液幫助家兔 PGCs 轉形為 EGCs 之效率

(1) 試驗結果指出，分離自 12.5 dpc 兔胚胎之 PGCs 培養於 MEF 飼養層細胞上 (MEF 種植密度為 $0.7 \times 10^4 / \text{cm}^2$)，當培養液為 rESC medium，即使添加 FK 與 LIF 仍無法使 PGCs 順利再程式化至 EGCs 狀態藉由觀察細胞外觀發現 rESC medium 培養環境中的 PGC 無法順利再程式化，在培養第三天即分化且持續培養至第五天仍維持分化狀態(圖八)。

(2) 使用培養液為添加 FK 與 LIF 之市售 mTeSR™1 medium 時，PGC 培養至第三天可形成接近圓形之細胞群落，能夠持續培養至第五天但維持不生長與不分化之休止狀態(圖八)。

(3) 將 PGC 培養於同樣添加 LIF、FK 與不同濃度之 GSKi (0.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{M}/\text{mL}$) 與 MEKi (0.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 與 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$) 之 2i medium 培養環境中，比較 EGC 形成效率，實驗結果顯示 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 之 MEKi 與 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 之 GSKi 為維持類 EGC 多能性之最佳濃度，但是 2i medium 環境中之類 EGC 仍無法順利繼代。

(4) 將 PGC 培養於添加 LIF、FK 與不同濃度 bFGF (5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL)，並以人造血清 KSR 取代 FBS 之無血清系統—rEG medium 中時，PGC 能夠再程式化並且維持未分化之類 EGC 狀態。數據統計顯示，相較於添加 5 ng/mL bFGF 之對照組，當 bFGF 濃度提升至 10 ng/mL 之濃度時，類 EGC 產生效率由 0% 顯著提升至 8.33%；比較 10 ng/mL 與 20 ng/mL 濃度處理組則沒有顯著差異 (8.33% 與 10.16%)，但是添加 20 ng/mL bFGF 之處理組產生之類 EGC 能夠被繼代培養 3 代後分化 (表三)。

二、類 EGC 之特性分析

(1) 以AP染色法與免疫細胞染色 (immunocytochemical staining, ICC) 檢驗於rEG medium中繼代培養至第二代之類EGC，結果指出其具有AP、多能性專一蛋白Oct4與生殖細胞專一蛋白Vasa表現 (圖九)。



討論

由於目前與家兔 EGC 相關之研究仍十分稀少，本試驗除了參考 Kakegawa *et al.* (2008)所發表之研究外，亦嘗試以 rESC 之培養條件為基礎進行測試。結果顯示 rESC medium 與市售 mTeSR™1 medium 中即使添加 FK 與 LIF 仍無法使 PGC 順利再程式化至 EGC 狀態，或是再程式化不完全導致細胞在短時間內便分化(表五)。觀察細胞群落形態 (morphology) 得知，rESC medium 培養環境中的 PGC 無法順利再程式化，在培養第三天即分化且持續培養至第五天仍維持分化狀態 (圖七 A、A')；而市售 mTeSR™1 medium 培養環境下的 PGC 培養至第三天可形成接近圓形之細胞群落，能夠持續培養至第五天但維持不生長與外觀無明顯變化之休止狀態 (圖七 C、C')。觀察由兩種不同培養環境所產生之細胞型態可知，培養環境的變化除了會影響 EGC 之生長外，對於 PGC 再程式化的階段也具有明顯的差異。

目前已證實 LIF、FK 為幫助小鼠 EGC 形成之必要因子，而在培養環境中添加 GSKi 與 MEKi 之 2i 系統是唯一能穩定且長期培養小鼠 EGC 超過 30 代之培養環境 (Leitch *et al.*, 2010)。本試驗以家兔為試驗對象前曾以小鼠做為前試驗之動物模型，成功以添加 1 μ M MEK inhibitor 與 3 μ M GSK3 inhibitor 之 2i medium 培養環境建立小鼠 EGC 細胞株，但是相同之培養環境卻會造成家兔 EGC 死亡。故重新測試 2i 濃度後發現，1 μ M/mL 之 MEKi 與 2 μ M/mL 之 GSKi 為維持類 EGC 生存之最佳濃度 (表二、三)，在其它濃度之 2i 環境中產生之類 EGC 皆在短時間內分化或死亡。在 1 μ M/mL 之 MEKi 與 2 μ M/mL 之 GSKi 環境中培養之 PGC 能在培養 3 天後產生細胞群落 (圖八、B)，持續培養至第五天產生之類 EGC 細胞群落，可見其中心部分表面光滑，但邊緣皆出現凹陷，顯示其已開始分化 (圖八、B')。此類 EGC 細胞群落在初代培養時即無法被酵素處理至單細胞狀態，必須以玻璃針物理切割方式繼代，且在繼代後細胞群落即死亡。截至今日，以家兔為研究對象之 PGC 研究仍十分稀少，並沒有任何以 2i 環境建立兔 EGC 之案例出現。2i 系統能夠成功

應用於家兔ESC細胞株之建立，卻無法建立家兔EGC細胞株之原因，是在於培養環境仍不完善，或是其實2i對於家兔PGC再程式化有負面影響，還需要許多與家兔PGC之細胞內訊息路徑之研究才能證實。

Kakegawa *et al.* (2008)曾提出以添加1000U LIF、20 ng/mL bFGF與20 μ M FK之環境體外培養兔PGC，能夠幫助PGC再程式化為類EGC，但無法長期繼代。本試驗參考Kakegawa *et al.*之研究，在添加LIF、FK、20 ng/mL bFGF與KSR之rEG medium產生之EGC經分析後顯示，具表現AP之能力及Oct4與Vasa之螢光表現等特性（圖十）。此狀態之EGC細胞群落雖可成長，且能被trypin或trpLE等酵素處理至單細胞狀態繼代，但繼代後最多存活三代即分化。Durcova-Hills *et al.* (2006)指出，再程式化不完全之細胞在繼代後便無法生長。以此為依據可判斷此培養環境雖能使PGC轉形為類EGC狀態使其產生多能性，但是再程式化仍不完全。

兔PGC轉形為EGC之再程式化為一複雜過程，EGC之形成乃來自單個PGC或是PGC細胞簇(cluster)目前不得而知，又或如何使每顆PGC皆能完全再程式化也是必須克服之難題。本試驗提出之培養環境無法維持EGC長期繼代培養，顯示此培養環境仍須調整，或許參考iPSC之形成方式，以基因轉殖方式使PGC再程式化會是可行的方法。

表二、添加不同濃度 GSK-3 抑制劑之 2i 培養條件下類 EGC 生成之效率。

Table. 2. Comparison of forming efficiency of the undifferentiated EG cell-like colonies between 2i medium supplemented with different GSK inhibitor concentrations.

2i medium (n=4)	No. of total colonies per replicate	No. of undifferentiated-state colony, n (%)	No. of the colony which can be subcultured
0.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ GSKi + 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ MEKi	10.6 ± 0.9	0(0) ^a	0
1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ GSKi + 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ MEKi	8.8 ± 0.5	0(0) ^a	0
2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ GSKi + 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ MEKi	6.3 ± 0.6	2(8.33) ^b	0

(1) The no. of reprogrammed colonies per replicate and undifferentiated colonies were counted at the 4th day of primary culture.

(2) Tukey's test was performed, $p < 0.05$.

表三、添加 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ GSK-3 抑制劑與不同濃度 MEK 抑制劑之 2i 培養條件下類 EGC 生成之效率。

Table. 3. Comparison of forming efficiency of the undifferentiated EG cell-like colonies between 2i medium supplemented with 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ GSK3 GSK inhibitor and different concentrations of MEK inhibitor.

2i medium (n=3)	No. of total colonies per replicate	No. of undifferentiated-state colony, n (%)	No. of the colony which can be subcultured
0.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ MEKi + 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ GSKi	7.3 \pm 2.1	1(5.3) ^a	0
1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ MEKi + 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ GSKi	5.7 \pm 1.5	1(5.9) ^a	0
2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ MEKi + 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ GSKi	2.7 \pm 1.2	0(0) ^b	0

(1) The no. of reprogrammed colonies per replicate and undifferentiated colonies were counted at the 4th day of primary culture.

(2) Tukey's test was performed, $p < 0.05$.

表四、添加不同濃度 bFGF 之 rEG medium 培養條件下類 EGC 之生成效率。

Table. 4. Comparison of the forming efficiency of undifferentiated EG cell-like colonies between rabbit EG cell medium supplemented with different concentrations of bFGF.

rEG medium (n=3)	No. of total colonies per replicate	No. of undifferentiated-state colony, n (%)	No. of the colony which can be subcultured
5 ng/ml bFGF	12.8 ± 1.5	0(0) ^a	0
10 ng/ml bFGF	12.0 ± 0.8	4(8.33) ^b	0
20 ng/ml bFGF	14.8 ± 0.9	6(10.16) ^b	3
40 ng/ml bFGF	8 ± 2.6	1(4.34)	0

(1) The no. of reprogrammed colonies per replicate and undifferentiated colonies were counted at the 4th day of primary culture.

(2) Tukey's test was performed, $p < 0.05$.

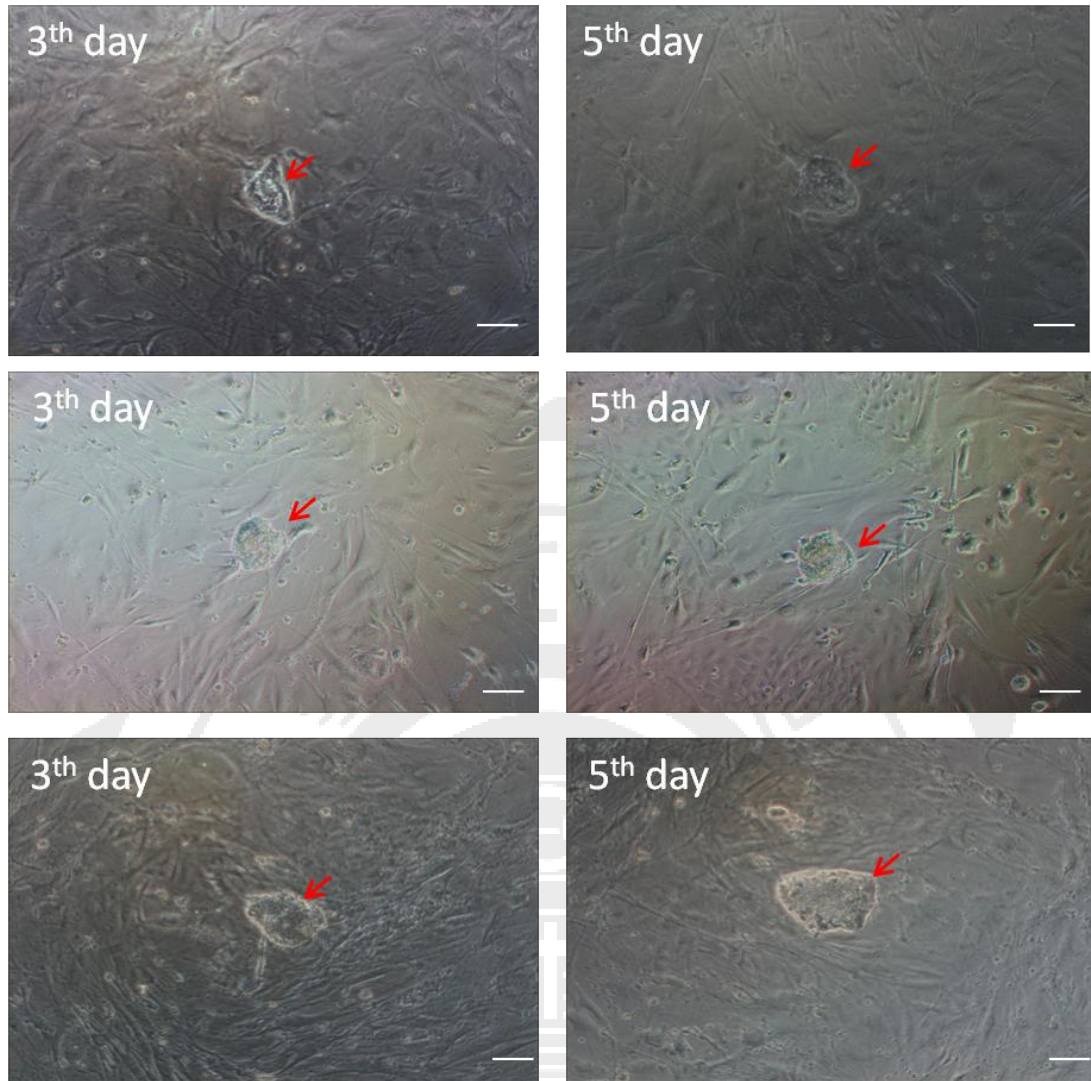
表五、不同培養條件下類 EGC 生成之效率與其可繼代數。

Table. 5. Comparison of the forming efficiency of EG-like colonies grown under different medium conditions.

Medium condition (n=4)	No. of total colonies per replicate	No. of undifferentiated-state colony, n (%)	No. of the colony which can be subcultured
rESC medium	12.3 ± 1.0	0(0) ^a	0
mTeSR TM 1 medium	8.3 ± 0.5	0(0) ^a	0
2i medium (2 μM/mL GSKi + 1 μM/mL MEKi)	6.3 ± 0.6	2 (8.33) ^b	0
EG medium (with 20 ng/mL bFGF)	14.8 ± 0.9	6 (10.16) ^b	3

(1) The no. of reprogrammed colonies per replicate and undifferentiated-state colonies were counted at the 4th day of primary culture.

(2) Tukey's test was performed, $p < 0.05$.

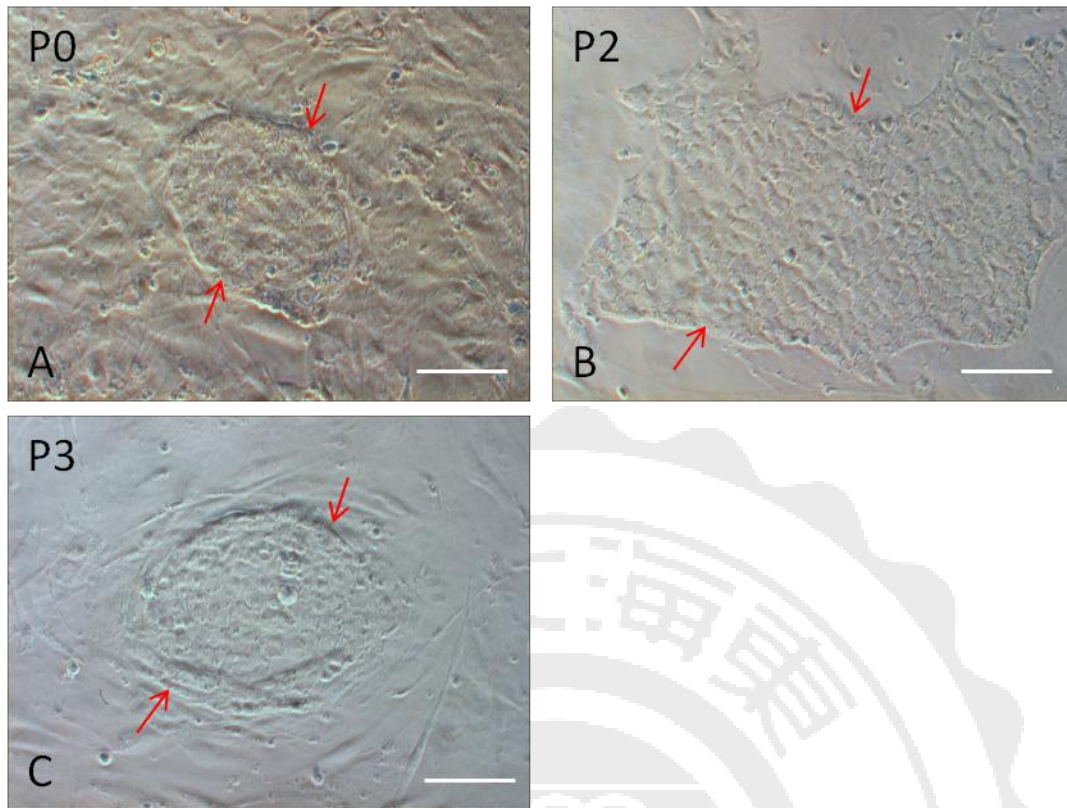


圖八、家兔類 EGC 細胞群落初代培養於不同培養環境（5 天）之形態。12.5 dpc 家兔 PGCs 分離後分別於 rESC medium 中培養 3 天所得之細胞群落（A）與培養至第 5 天之細胞群落形態（A'）皆明顯分化；於 2i medium 中培養 3 天所得之細胞群落（B）與培養 5 天所得之細胞群落（B'）形態比較體積有明顯成長，但無法繼代培養；於市售 MTser1 medium 中培養 3 天所得之細胞群落（C）與培養至第 5 天之細胞群落（C'）比較，雖然無明顯分化跡象但細胞群落體積並無成長且無法繼代培養。Scale bar = 100 μm 。

Fig. 8. The morphologies of rabbit EGC-like colonies in primary culture under different culture conditions. The cell colony morphologies of rabbit PGCs isolated

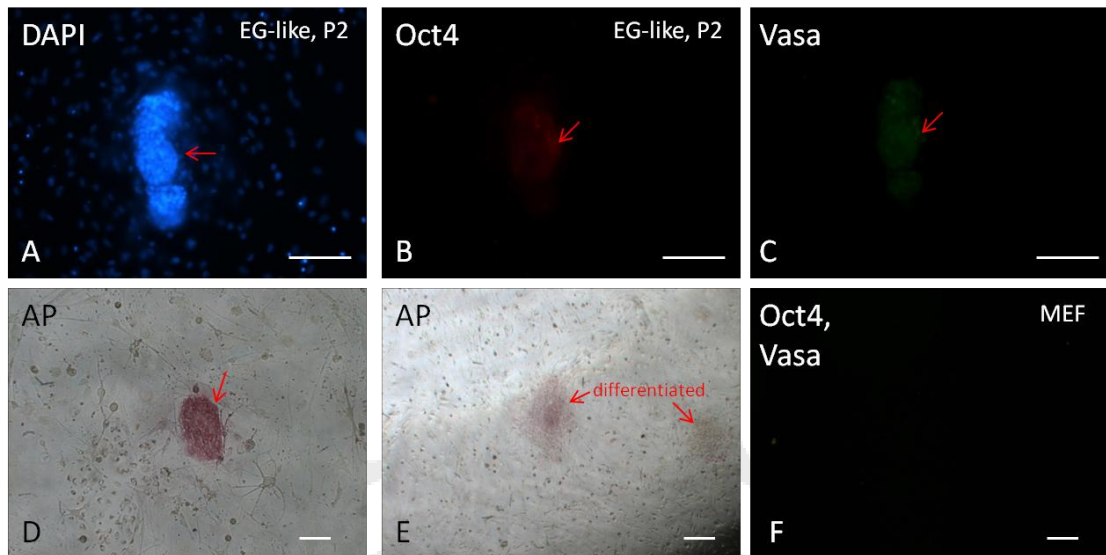
at 12.5 dpc and cultured in the rEGC medium for 3 days (A) and 5 days (A'). The colonies were cultured in 2i medium treatment group for 3 days (B) and 5 days (B'). They could develop but could hardly be subcultured. The colonies in the commercial MTser1 medium treatment group for 3 days (C) and 5 days (C'). They were not significantly differentiated based on their morphology but the colonies would not continue to develop and could not be subcultured. Scale bar = 100 μm .





圖九、家兔類 EGC 細胞於 rEG medium 繼代培養至第三代之細胞群落形態。12.5 dpc 家兔 PGCs 分離後於 rEG medium 中培養至第三天可形成類 EGC 細胞群落(A)，並可繼代培養至第三代，B 為 P2 之細胞群落形態，C 為 P3 之細胞群落，P3 後 EGC-like 即分化。Scale bar = 100 μm 。

Fig. 9. The morphology of rabbit EGC-like colonies in rEG medium condition grown to passage 3. The rabbit PGCs could be reprogrammed into EGC-like form in rEG medium condition on the 3rd day after being isolated at 12.5 dpc (A). The cell morphology was also confirmed at passage 2 (B) and started to differentiate at passage 3 (C). Scale bar = 100 μm .



圖十、於 rEG medium 培養之家兔 EGC-like 細胞群落經免疫細胞染色與鹼性磷酸酶之分析顯示其表現多能性細胞以及生殖細胞標記蛋白。經 ICC 染色分析顯示 12.5 dpc 家兔 PGCs 分離後於 rEG medium 中培養至第三天可形成類 EGC 細胞群落，繼代培養至第二代並以 ICC 檢測顯示其具 Oct-4 (B) 與 Vasa (C) 表現，並以 DAPI 染檢細胞核 (A)。此類 EGC 細胞群落經 AP 染色顯示其具有鹼性磷酸酶表現 (D)，E 為已分化細胞之對照組。Scale bar = 100 μ m。

Fig. 10. Expressions of the germ cell and pluripotency stem cell specific markers of EGC-like colonies derived from rEG medium conditions as examined by ICC and alkaline phosphatase (AP) staining. The 12.5 dpc PGCs formed EGC-like colonies at passage 2 have positive expressions of EGC specific marker Oct-4 (B), Vasa (C) by ICC analysis. DNA was counterstained with DAPI (A). The cells were also examined for AP activity (D). The differentiated colony served as a negative control (E).

試驗三、定向分化家兔 PGC 為雌性生殖細胞

前言

PGC 駐留於生殖脊至 13.5dpc 後，可刺激其所接觸之周邊組織開始增生進而形成緊密之索狀構造稱為初始性索 (primitive sex cords)；此時雄性與雌性性腺還無法區別，稱為未分化性腺 (indifferent gonads)。性別分化方向取決於 Y 染色體上的 *sry* (sex-region-Y encoded gene) 基因。*sry* 負責性索中睪丸決定因子 (testis determining factor, TDF) 的產生。TDF 由性索分泌後，即啟動性腺趨向雄性生殖系統之方向分化。相較於雄性生殖系統，缺乏 TDF 刺激的性索則會在 *Rspo1* 和 *Wnt4* 影響下發育成為雌性生殖系統 (Svingen and Koopman., 2013)，此時 PGC 經有絲分裂增生而形成始基卵原細胞 (oogonia)。

濾泡的發育始於始基濾泡 (primordial follicle)，含有初級卵母細胞 (primary oocyte) 但尚無濾泡腔，稱為腔前濾泡 (pre-antral follicle)。其後發育濾泡受 GDF 與 FSH 等因子影響發育為初級濾泡 (primary follicle)。大部分之雌性哺乳動物於出生前，始基卵原細胞即停止增生而進入減數分裂，此時之卵原細胞即轉變為初級卵母細胞 (primary oocytes)，初級卵母細胞歷經第一次減數分裂前期，包括細絲期 (leptotene)、偶絲期 (zygotene)、粗絲期 (pachytene)、雙絲期 (diplotene) 與絲球期 (diakinesis)，最後進入核網期 (dictyate)；此時卵母細胞之染色質散佈於一巨大之細胞核中，謂之為原核泡 (germinal vesicle, GV)，並進第一次減數分裂休止期 (first meiotic arrest)。

Hayashi *et al.* (2012) 利用由小鼠 ESC 誘導分化所得之 PGC 與分離所得之生殖脊體細胞共培養後所得之細胞聚集體，再進行體內移植，經由體內環境之協助，已可成功分化產生卵母細胞。然而，目前仍無成功誘導家兔 ESCs 或 PGCs 為生殖細胞之報告。故本試驗目的在於誘導家兔 PGCs 轉變為雌性生殖細胞或其前驅細胞。

材料與方法

一、PGC之分離與誘導分化

試驗步驟如圖十一。

(一) PGC與生殖脊體細胞之回收

基於試驗一之結果，本試驗之PGCs與生殖脊體細胞之取得皆來自12.5 dpc之家兔胚胎。

1. 實驗家兔之來源與飼養管理

同試驗一，家兔之飼養管理皆遵循國立中興大學IACUC之規範。

2. PGC之取得

同於試驗一取得生殖脊與中腎組織後，利用31G注射針頭（BD, BD Ultra-Fine™ II short needle）將中腎與生殖脊分離。分離之生殖脊置入含有1% BSA之PBS中，以針尖將生殖脊切成數段使PGC自生殖脊內流出，再使用微量吸管沖洗生殖脊片段以利PGC釋出。其後以濾網（poresize: 40 μm ）將大組織塊濾除後保留，濾液於4°C下離心3 min（2,500 rpm；1190 xg），去除上清液加入PGC誘導分化培養液，計算細胞數後以1000 細胞/well之密度置入經Polyacrylamide（PA; SIGMA, 92560）預處理組織培養用U型底之96孔盤與細胞培養用平底96孔盤，培養於38°C、5% CO₂與飽和相對濕度之培養箱中。

3. 生殖脊體細胞之取得

於前述方法（一）之2中過濾後保留之兔生殖脊組織以PBS清洗，置

入15 mL離心管中並加入0.05% trypsin-EDTA溶液，靜置於38°C、5 % CO₂與飽和相對濕度之培養箱中5-10 min，使生殖脊組織碎塊成為單細胞狀態。其後加入MEF medium並充分混合均勻以中止酵素作用，經離心5 min後移除上清液（2,500 rpm；1190 xg），再加入誘導PGC分化之培養液與細胞混合均勻，計算細胞數（約 1.8×10^4 個）並置入96孔盤中與方法（一）之2所得之PGC於38°C、5 % CO₂與飽和相對濕度之培養箱中共培養，共培養時使用之生殖脊體細胞數量約為PGC的6倍。48 h後更換培養液，之後每天僅更換一半的培養液以保持培養環境中含足夠之誘導分化與營養因子。

（二）卵巢與濾泡之回收

3月齡之未懷孕母兔經二氧化碳窒息犧牲後，剖腹取出卵巢以含3% ABAM之PBS清洗。將洗淨之卵巢置於解剖顯微鏡下以手術剪刀剪成數段使濾泡露出，並以刀片將包含濾泡之卵巢組織切下，仔細清除濾泡周邊黏附之卵巢組織，以含3% ABAM之PBS清洗並置入1.5 mL之 eppendorf vial 中，之後置入7% paraformaldehyde（Sigma P6148）福馬林溶液固定並存放於4°C 冰箱中，預備進行ICC染色分析。

（三）豬濾泡液之收集

本試驗使用之女豬卵巢係由台中市肉品市場股份有限公司提供。豬隻經燙毛屠宰後，以手術剪刀剪取外觀正常、含濾泡大小皆約為3-7 mm 之卵巢，置於37-39°C含1% 盤尼西林（penicillin）之市售生理食鹽水（0.9% NaCl, w/v, 南光）沖洗3-5次去除血水與外來汙染物，清洗乾淨之卵巢盡快運送回實驗室置於39°C 水域槽中保存，其後以接有18號針頭之15 mL注射筒，吸取卵巢表面各濾泡內之濾泡液集中於15 mL離心管中。收集完成之濾泡液以3000 rpm（1710 xg）離心6 min，其上清液再以3000 rpm離心3

min，最後取上清液先以0.44 μm 細胞過濾膜過濾，再以0.22 μm 細胞過濾膜過濾以確保濾泡液中不含細胞與其它污染物，之後以1.5 mL為單位分裝儲存於-20°C冰箱中。

(四) 體外誘導分化母兔類濾泡組織

1. 培養皿之製備

(1) 貼盤培養用之培養皿

貼盤培養使用 96 孔 (96-well) 平底細胞培養盤，欲接種細胞的 well 加入 100 μL 0.05% PA，搖晃均勻後移除 PA，並將培養皿置入培養箱備用。

(2) 懸浮培養用培養皿

懸浮培養使用組織培養用 U 型底 petri96 孔盤欲種入細胞的 well 加入 100 μL 0.5% PA，搖晃均勻，後將培養皿置於 38 °C 培養箱 15 min 後，移除 PA 並將培養皿置於培養箱備用。

2. 培養液之配製

(1) 誘導分化培養液 (induce differentiation medium, IDM) 之配置

a. 對照組

以市售 DMEM/F12 培養液 (Gibco 11330-057) 為基礎培養液 (basal medium)，添加 15% KSR、2 mM 穀胺醯胺 (glutamine, Sigma G8540)、1% 非必需胺基酸 (non essential amino acid, NEAA; Sigma 7145)、0.1 mM 二乙硫醇 (β -mercaptoethanol; Sigma M7522)、500 ng/mL BMP4 (R&D

systems) 、500 ng/mL BMP8a (; R&D systems) 、100 ng/mL SCF (R&D systems) 與 50 ng/mL 上皮細胞生長因子 (epidermal growth factor, EGF; R&D systems) ，配製如下：

Component	Control		Treatment 1	
	Volume (mL)	Percentage (%)	Volume (mL)	Percentage (%)
DMEMF/F12(α -MEM)	6.875	68.75	5.875	58.75
KSR	1.5	15	1.5	15
glutamin	0.2	2	0.2	2
NEAA	0.2	2	0.2	2
β -ME	0.1	1	0.1	1
BMP4	0.5	5	0.5	5
BMP8a	0.5	5	0.5	5
SCF	0.1	1	0.1	1
EGF	0.025	0.25	0.025	0.25
pFF			1	10
Total volume	10 mL		10 mL	

b. 處理組一

在對照組培養液中額外添加 10% 豬濾泡液 (porcine follicular fluid, pFF; DMEMF/F12 with 10% pFF) 。

c. 處理組二

將對照組培養液之 DMEM/F12 培養液置換為市售 α -MEM 培養

液 (Gibco 12571-071)，其它組成皆與對照組相同 (α -MEM without pFF)。

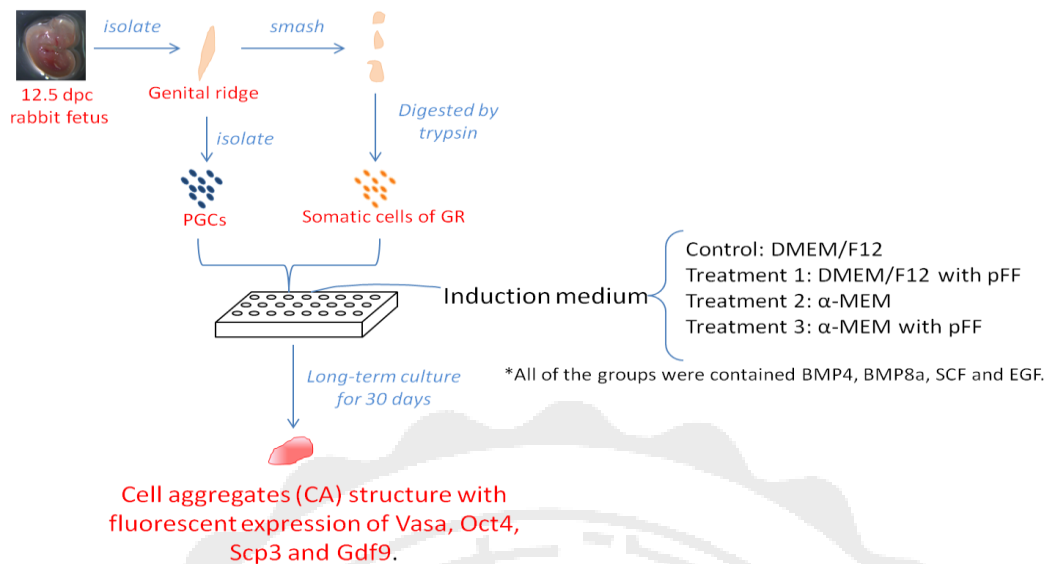
d. 處理組三

將對照組培養液之 DMEM/F12 培養液置換為市售 α -MEM 培養液，並額外添加 10% pFF (DMEM/F12 with 10% pFF)。

(五) 兔類濾泡組織特性分析

1. 免疫細胞染色法 (immunocytochemical staining, ICC)

操作步驟同試驗二之 2。本試驗第一抗體 (primary antibody) 使用稀釋 500 倍之 anti Oct-4 (Santa Cruz SC8628)、稀釋 250 倍之 anti Vasa (Bioby orb8815)、稀釋 250 倍之 anti Scp3 (Bioby orb9769) 與稀釋 250 倍之 anti Gdf9 (Bioby orb122672)，第二抗體則使用山羊抗小鼠 (goat anti-mouse) 之 IgG。



圖十一、定向分化家兔 PGC 為雌性生殖細胞之步驟

- (1) 自 12.5 dpc 之家兔胚胎分離生殖脊
- (2) 以刀片將生殖脊切成數段以利 PGCs 釋出
- (3) 回收 PGCs 後以 trypsin 將生殖脊片段碎塊成單細胞狀態
- (4) 將 PGCs 與生殖脊體細胞以約 1:6 之數量比例置入培養盤中共培養
- (5) PGCs 與生殖脊體細胞凝聚形成 CA 後持續長期培養
- (6) 以 ICC 染色法檢視 CA 之生殖細胞、減數分裂與卵子專一標記蛋白

Fig.11. The procedure for the induced differentiation of female germ cells from rabbit PGCs.

- (1) Isolate the genital ridges from 12.5 dpc rabbit fetuses.
- (2) Flash the genital ridges to help PGCs release.
- (3) Collect the PGCs and digest the genital ridges tissues into single cells by trypsin
- (4) Co-culture the PGCs and somatic cells of genital ridge (cell number ratio: PGC: somatic cells = 1:6).
- (5) Keep long-term culture after the CAs were formed.
- (6) Observe the fluorescent expression of the specific marker of germ cells, meiosis, and oocyte by ICC.

結果

一、貼盤與懸浮共培養兔 PGC 與生殖脊體細胞之誘導分化效果

當 PGC 與分離自生殖脊之體細胞以單細胞狀態共同培養於誘導分化培養液時，無論貼盤或懸浮培養方式都具有自發性聚集 (aggregation) 而生成細胞聚集體 (cell aggregates, CAs) 的特性 (圖十二、圖十三)。貼盤對照組之 CA 直徑約 70 μm (圖十二 A)，而處理組所產生之 CA 直徑皆能超過 100 μm (圖十二 B、C、D)；當基底培養液為 DMEM/F12 時，添加 pFF 能使 CA 結構較為緊密且邊緣形狀明顯 (圖十二 C)。

未添加 pFF 之懸浮對照組 (圖十三 A) 與處理二 (圖十三 B) 中參雜許多雜質細胞聚集於 CA 周遭；此現象在添加 pFF 之處理一 (圖十三 C) 與處理三 (圖十三 D) 中並未被觀察到。由圖十三可發現懸浮培養產生之 CA 具互相融合之傾向 (圖十三 B、D)，於初期產生之 CAs 即易在一天後融合為一大型結構且體積將會持續增加至約 400 μm ，此時將不再產生新的 CA 結構 (圖十四 A、C)。

二、豬濾泡液 (porcine follicle fluid, pFF) 與不同基礎培養液對誘導生殖細胞分化效果之比較

(1) 未添加 pFF 之對照組與所有處理組皆能於培養 1.5 天後自發性產生大小不等之 CAs，且在培養至第 3 天時皆可成長至直徑大於 100 μm 之構造。比較不同處理組間 CA 之形成效率，顯示處理組一與處理組三在培養第 1.5 天時分別產生 18 與 56 個 primary CAs (<100 μm)，第四天則可生成 47 與 61 個直徑大於 100 μm 之 CAs；而未添加 pFF 之對照組與處理組二在培養第 1.5 天時分別能產生 13 與 18 個 primary CAs，但在第四天時能成長至直徑大於 100 μm 之 CA 數量分別為 1 與 4 個，顯著低於添加 pFF 之處理組。(表六，

p<0.05)。

(2)未添加 pFF 之對照組與處理組三在培養至第 10 天時便無法再觀察到 CA。而添加 pFF 的處理中，以 DMEM/F12 medium (處理一) 的 CA 數量顯著多於處理組三(α -MEM medium with pFF; 表六)，且其細胞聚集之結構較為緻密，形狀較統一(接近圓形)，邊緣較為完整而無零散細胞散落(圖十四 B)。處理組三所形成的 CA 在培養十天後形狀傾向不規則且數量開始下降(圖十四 D、表六)。

三、誘導家兔 PGC 分化為類雌性生殖細胞之 ICC 染色分析

受 pFF 誘導產生之貼盤 CA 經長期培養至第 14 天與第 30 天時，以 ICC 檢測其細胞特性、減數分裂與卵子專一標記蛋白表現。結果顯示培養至 14 天時生殖細胞專一標記蛋白 Vasa 與 Oct4 皆表現明顯螢光(圖十五 A'、A"); 減數分裂期之聯會蛋白 Scp3 螢光表現也可被觀察到(圖十五 B'); 但是卵子專一標記蛋白 Gdf9 之螢光表現則十分微弱以至難以觀察(圖十五 B")。而培養至 30 天之 ICC 檢測結果指出 Gdf9 有明顯螢光表現(圖十六 A')，與家兔濾泡之 Gdf9 的螢光表現(圖十六 B、B') 相比較，兩者螢光表現模式類似(圖十六 A'、B')，但將表現 Gdf9 之 CA (Day 30) 切開卻無法於其中發現任何單一完整卵子之結構。

討論

Hayashi *et al.* (2012)將誘導小鼠 ESC 分化所得 PGC-like cells 與生殖脊體細胞共培養於含有 500 ng/mL BMP4、500 ng/mL BMP8a、100 ng/mL SCF 與 50 ng/mL EGF 之環境中，可誘導兩種細胞聚合形成一凝聚體稱為重組卵巢 (reconstituted ovaries)；將此細胞聚合體移植入免疫缺陷小鼠的卵巢皮層下經過 32 天再取出，發現該重組卵巢能在體內環境中持續成長且其所包覆之 PGC-like cells 已分化產生 GV 期之卵子。另外，在 Hübner *et al.* (2003)誘導小鼠 ESCs 分化成為雌性生殖細胞的過程中，單一 ESCs 也會先聚集形成類似濾泡結構之凝聚體，其中則包覆生殖前驅細胞，此細胞會在類濾泡組織中持續分化成為卵母細胞。

本試驗參考上述研究內容，將 12.5 dpc 之 PGC 自生殖脊分離後，物理粉碎生殖脊組織並以 trypsin 處理至單細胞狀態，其後將兩者共同培養 30 天，分別測試以 DMEM/F12 或 α -MEM 作為基底培養液配合懸浮培養與貼盤培養兩種方式，對於體外分化產製雌性生殖細胞之能力比較，所有培養環境皆含有 500 ng/mL BMP4、500 ng/mL BMP8a、100 ng/mL SCF 與 50 ng/mL EGF。

家兔 PGC 與生殖脊體細胞共同培養之結果與 Hayashi *et al.* (2012)之研究相似，無論貼盤與懸浮培養，兩種細胞都能在體外聚集形成 CA。但此誘導系統中的所產生之 CA 體積較小，且在培養超過七天後結構將逐漸解體，且不再有細胞貼盤。由此可見含有 BMP4、BMP8a、SCF 與 EGF 之環境雖能誘導 CA 產生，卻無法維持其生長。CA 結構的潰散意味 PGC 在體外將失去類性腺組織或器官的支持，此情況下 PGC 死亡則為必然的結果。

參考 Hayashi *et al.* 近年與誘導幹細胞分化形成生殖細胞相關之研究，可發現雖然其團隊能夠穩定控制小鼠 ESCs 或 iPSCs 分化形成 PGCs，卻仍須仰賴體內環境才能順利使 PGC 持續向配子方向分化(Hayashi *et al.* 2011; 2012; 2013b)，由此可以推斷添加 BMP4、BMP8a、SCF 與 EGF 之誘導環境雖能誘導幹細胞體外

分化形成 PGC 並產生類似濾泡或卵巢之結構，卻不具有幫助此結構持續成長與誘導內部 PGC 持續分化之能力。

Yu *et al.* (2014)指出在培養人類羊水幹細胞(human amniotic fluid stem cells, hAFSCs)的環境中添加豬濾泡液(porcine follicle fluid, pFF)，能夠誘導 hAFSCs 聚合並分化成類濾泡組織。持續於體外培養此組織能夠使其體外成熟並排出類卵子細胞(oocyte-like cells)，此結果暗示 pFF 中可能含有某種能夠幫助 CA 結構持續成長的關鍵因子。

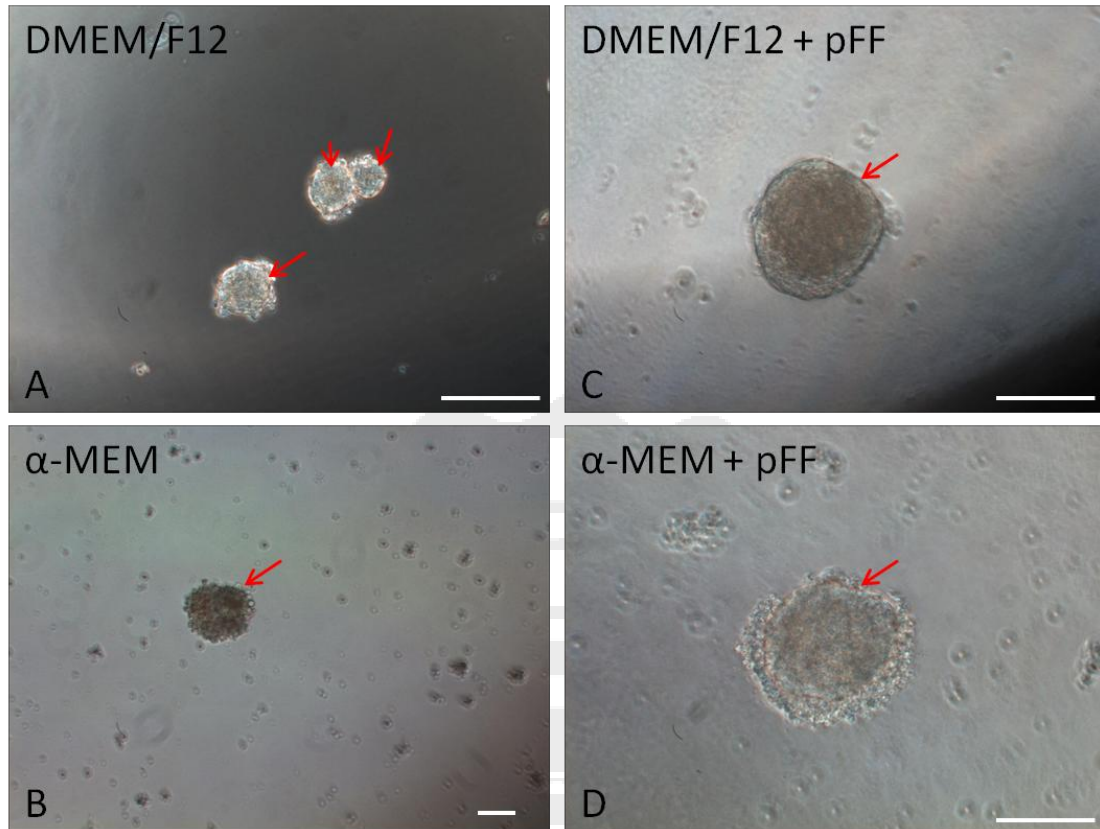
參考 Yu *et al.* (2014)之研究，本試驗嘗試於培養液中添加 pFF 以維持 CA 生存環境。試驗結果顯示，在貼盤培養處理組中，pFF 對於誘導家兔 PGC 分化也具有正面效果：添加 pFF 之處理組所產生之 CA 具有較緊密且接近圓形之結構，且能長期培養至少 30 天；由表六可知以 DMEM/F12 為基底培養液時，培養至第 10 天時 CA 之產生效率，顯著高於 α -MEM 處理組(400% vs. 78%)，顯示 DMEM/F12 添加 pFF 是較適合 CA 成長之環境。

在添加 pFF 之 DMEM/F12 培養環境中長期培養的 CA，可在培養至 14 天時表現 PGC 標記蛋白 Vasa 與 Oct4，顯示 CA 結構中的確存有兔 PGC 且此培養環境配合 CA 之組織結構能夠幫助 PGC 於體外長期存活。小鼠 PGC 的研究自 1954 年(Chiquoine, 1954)開始至今，普遍被認為無法以單細胞形態被長時間培養且無法形成細胞群落與 EB(Donovan, 1994)；即便是小鼠 EGC 也需要 2i 培養系統才能形成細胞株(Leitch *et al.*, 2010)。綜上所述，除非有體內環境或擬器官(organoid)支持，否則 PGC 不應能長時間存活於體外。然而本試驗在未使用幫助 PGC 存活之培養系統的情況下觀察到家兔 PGC 能在 CA 結構中長期存活超過兩周，由此因可初步推斷兔 PGC 與生殖脊體細胞體外聚合分化而成之 CA 已具有組織等級之功能。

在 Hübner *et al.* (2003)之研究中指出，當 ESCs 聚集形成類濾泡組織後約 26 天可分化產生類卵細胞(oocyte-like cells)；由 Hayashi *et al.* 於 (2012 與 2013a)

提出誘導幹細胞分化為卵子方法指出，小鼠 PGC 與生殖脊體細胞聚合而成之重組卵巢在移植入體內環境後，約需 34 天才能分化產生卵母細胞。本試驗中受 pFF 刺激所生長之 CA 於體外培養至 30 天時以 ICC 染色檢測可見減數分裂標記蛋白 Scp3 與卵子標記蛋白 Gdf9 之螢光表現（圖十五）；觀察 CA 組織之 Gdf9 螢光表現與家兔濾泡之 Gdf9 螢光表現相似（圖十六），而解剖家兔濾泡後發現表現 Gdf9 螢光之部位即為卵子所在位置。參考 Hübner *et al.* (2003)與 Hayashi *et al.*(2012)之研究，由分化所需時間、ICC 檢測結果與解剖家兔濾泡之結果三項因素推斷，此時期之 CA 組織中可能已發生雌性生殖細胞之分化。

pFF 對於誘導產生雌性細胞之效果顯著，但是實際誘導機制卻仍未明。目前濾泡液主要應用於卵子的體外成熟，用於誘導生殖細胞分化的研究仍然稀少，雖然初步的試驗可明顯觀察到其對於生殖細胞之誘導分化能力，但是關鍵影響分化的因子究竟是濾泡液中何種成分？以及使用不同物種之濾泡液是否在長期應用方面有不良的影響？諸多疑點還有待長期且詳細的研究方能解答。



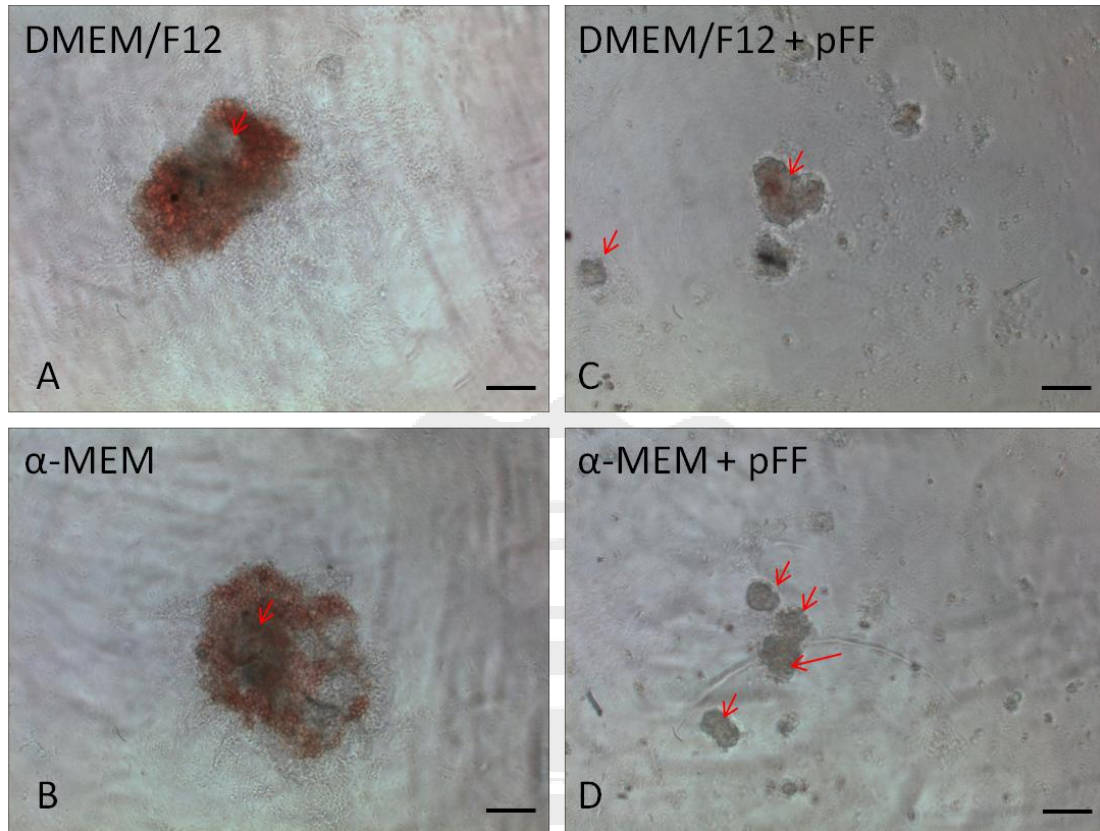
圖十二、家兔 PGC 與生殖脊體細胞在不同培養條件下貼盤培養 1.5 天所得之細胞聚合體 (cell aggregates, CA)。對照組 (A) 與處理二 (B) 為未添加 pFF 之貼盤培養環境下所得之 CA (箭頭所示)。處理一 (C) 與處理三 (D) 為添加豬濾泡液 (procine follicle fluid, pFF) 之培養環境下所得之 CA (箭頭所示)。對照組之 CA 直徑約 70 μm ，而處理組所產生之 CA 直徑皆能超過 100 μm ；當基底培養液為 DMEM/F12 時，添加 pFF 能使 CA 結構較為緊密且邊緣形狀明顯 (C)。Scale bar = 100 μm 。

Fig. 11. The morphology of Day 1.5 cell aggregates (CA) formed in various adherent culture conditions. As shown in (A) are the primary CAs formed in control group, and in (B) are the CAs grown in the Treatment #2. Both the control and Treatment #2 were the adherent culture conditions without porcine follicle fluid (pFF) under different basal mediums. (C) shows the CAs formed in Treatment #1, and (D) shows the Treatment #3, in which both Treatment #1 and #3 were the adherent culture conditions with pFF under different basal mediums. Different basal medium

conditions with or without pFF incur significantly different morphology of CAs.

Scale bar = 100 μm .



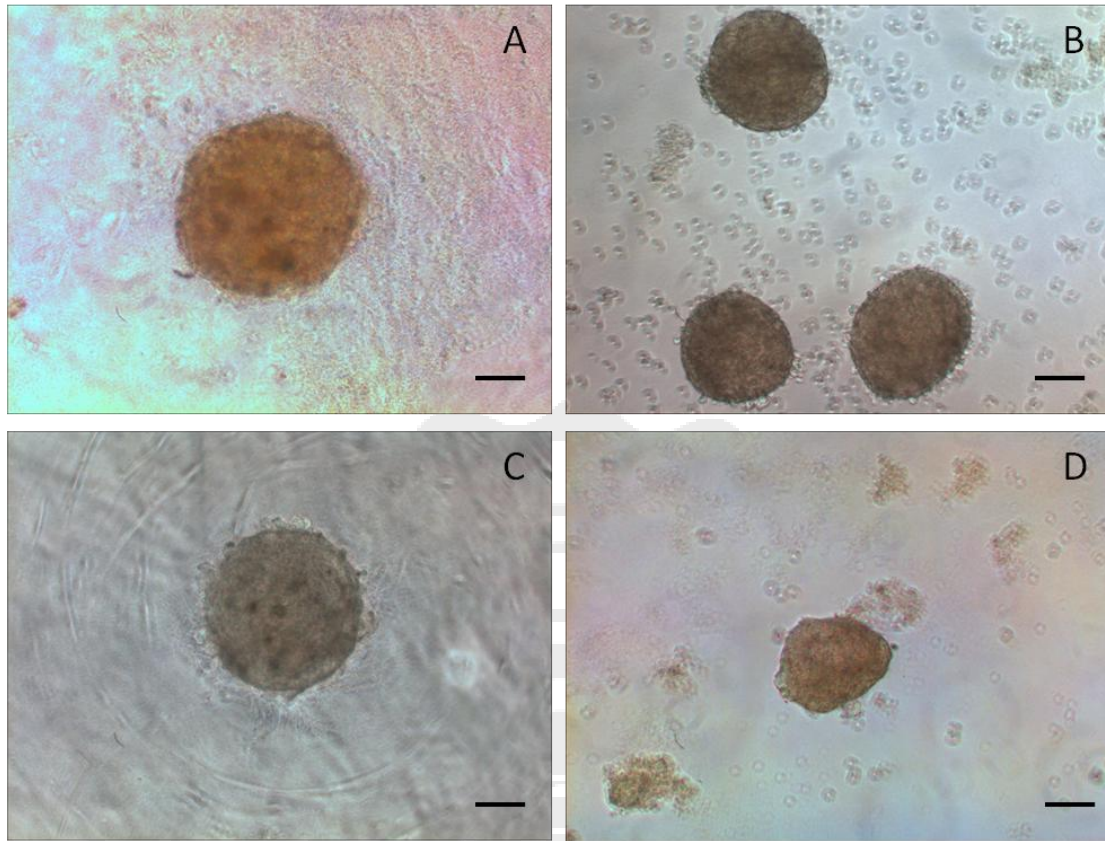


圖十三、家兔 PGC 與生殖脊體細胞在不同培養條件下懸浮培養 1.5 天所得之細胞聚合體(cell aggregates, CA)。Control 組(A)與處理二 (C) 為未添加 pFF 之培養環境，此環境中有許多不明細胞會與 CA 參雜聚合，但仍能辨識其球狀構造(箭頭所示)。處理一 (B) 與處理三 (D) 為添加豬濾泡液 (procine follicle fluid, pFF) 之培養環境下所得之 CA(箭頭所示)，在懸浮培養狀態下之 CA 皆會逐漸聚集形成一大型結構，難以觀察添加 pFF 與否對所得之 CA 形態之影響。Scale bar = 100 μm 。

Fig. 12. The morphology of Day 1.5 cell aggregates (CA) formed in various suspension culture conditions. Shown in (A) are the primary CAs formed in control group, and in (B) are those in the Treatment #2. Both the control and Treatment #2 were the suspension culture condition without porcine follicle fluid (pFF) under different basal mediums. Shown in (C) are the CAs formed in Treatment #1, and in (D) are those grown in the Treatment #3. Both Treatment #1 and #3 were the suspension

culture conditions with pFF under different basal mediums. Different basal medium conditions with or without pFF incur significantly different morphology of CAs. Scale bar = 100 μm .





圖十四、家兔 PGC 與生殖脊體細胞在添加 pFF 之培養環境下以懸浮及貼盤培養至第 10 天所得 CA 形態之比較。懸浮培養於處理一 (A) 與處理三 (C) 中之細胞聚集體於外觀上相似。貼盤培養於處理一 (B) 之細胞聚集體外觀較為緊實，與處理三 (D) 中之細胞聚集體相比體積也較大。不同培養方式於同樣的培養液相較，懸浮培養之細胞聚集體可生長至直徑 400 μm ，但是貼盤培養之細胞聚集體只能維持於直徑 200 μm 至 250 μm 之間。Scale bar = 100 μm 。*CA 係由家兔 PGC 與生殖脊體細胞共培養所得之細胞聚合體。

Fig. 13. Comparison of the CA morphologies grown either in suspension or adherent culture conditions in the presence of pFF after 10 day culture. The suspension culture-CAs morphologies were not much different under Treatments #1 (A) and #3 (C). Adherent culture-CAs in Treatment #1 (B) were larger than those in Treatment #3 (D), and the cell aggregate density was also higher. Under same culture condition, suspension-CAs could develop into a 400 μm sphere, but adherent-CAs only grow into

spheres of 200 μm to 250 μm in diameter. Scale bar = 100 μm .



表六、不同培養條件下 primary CA 與不同天數 CA 之形成效率。

Table. 6. Comparison of primary CA with the forming efficiency of CA under different culture conditions.

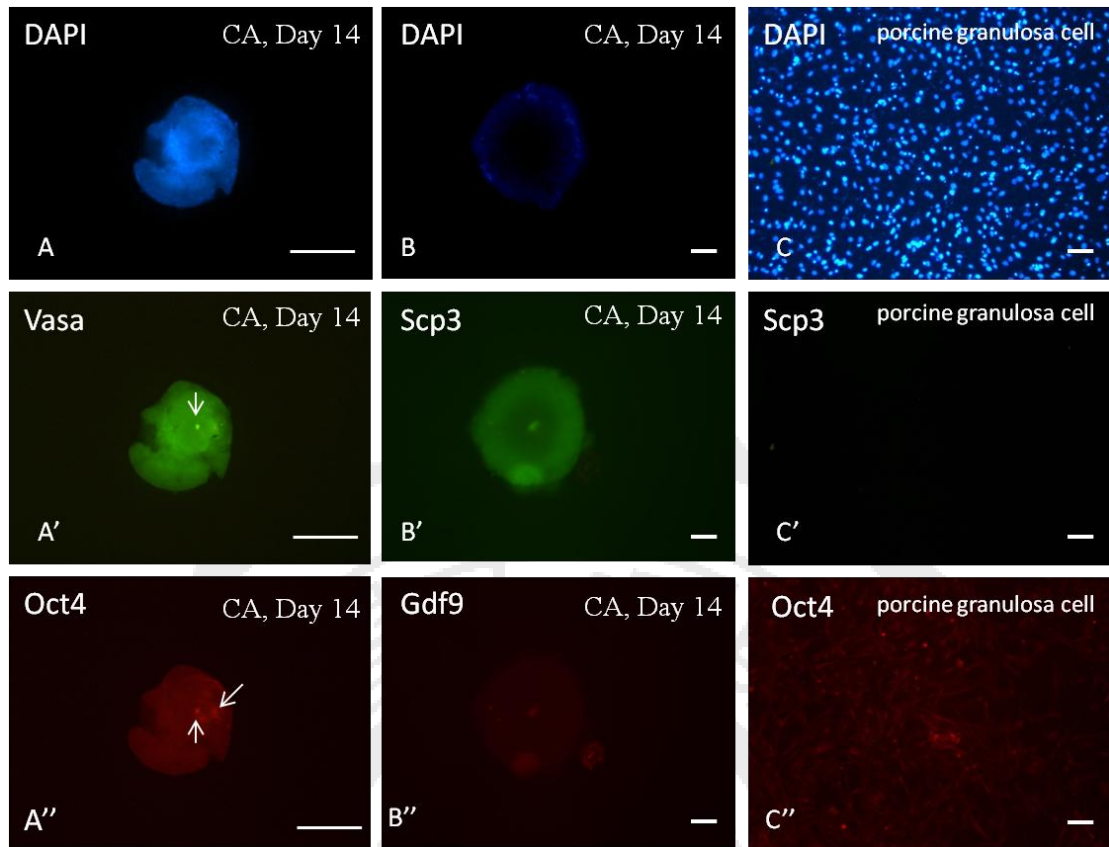
	Primary CA ⁽¹⁾ no. at Day 1	CA ⁽²⁾ no. at			CA forming efficiency %		
		Day 3	Day 4	Day 10	Day 3	Day 4	Day 10
	Control (DMEM/F12)	13 ^b	1 ^b	1 ^{ab}	0 ^{ab}	7.7	7.7
Treatment 1 (DMDM/F12+pFF)	18 ^b	4 ^b	47 ^b	72 ^a	22.2	261.1	400
Treatment 2 (α -MEM)	18 ^b	4 ^b	3 ^{ab}	0 ^{ab}	22.2	166.7	0
Treatment 3 (α -MEM+pFF)	56 ^a	16 ^a	61 ^a	44 ^b	28.6	108.9	78.6

(1) Primary CA means the small CAs (<100 μ m) formed at the first day after culture.

(2) Only the CAs greater than 100 μm were recorded.

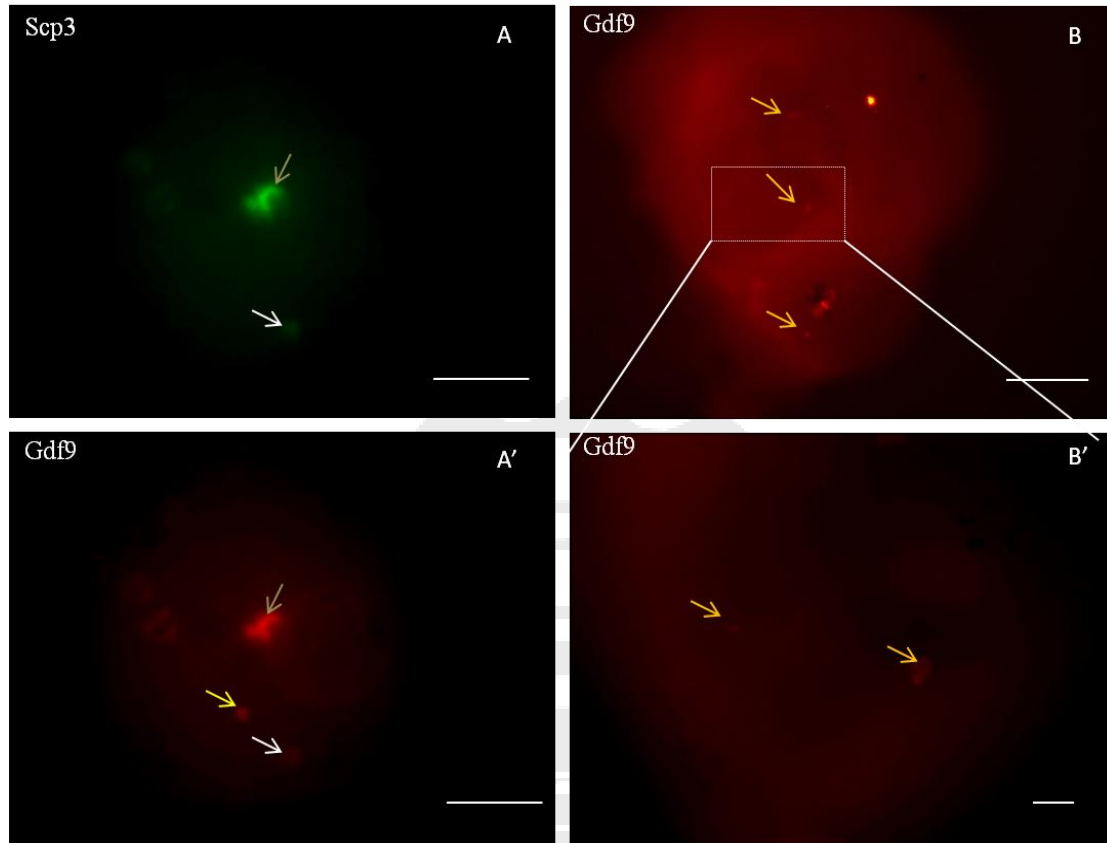
(3) Tukey's test was performed, $p < 0.05$.





圖十五、家兔 PGC 形成之細胞聚合體 (CA*) 在添加 pFF 之環境下貼盤培養 (14 天) 後其生殖細胞標記蛋白之表現。處理一中的 CA 貼盤培養至第 14 天，可表現生殖細胞標記蛋白 Vasa 與 Oct4 (A', A'')、減數分裂標記蛋白 Scp3 (B')。卵子標記蛋白 Gdf9 表現則難以被觀察 (B'')。以豬顆粒細胞 (porcine granulosa cell) 作為 Scp3 之 negative 對照組與 Oct4 之 positive 對照組 (C, C'')。所有細胞皆以 DAPI 檢視其細胞核。Scale bar = 100 μ m。*CA 係由家兔 PGC 與生殖脊體細胞共培養所得之細胞聚合體。

Fig. 14. Expressions of germ cell, meiosis, and oocyte specific markers in rabbit PGC derived aggregates (CAs, Day 14) by adherent culture condition. Expressions of germ cell specific marker Vasa (A') and Oct4 (A''), meiosis specific marker Scp3 (B'), and oocyte specific marker Gdf9 (B'') in CAs derived from adherent- Treatment #1 condition after 14 days were examined by ICC. (C') the negative control of Scp3 in porcine granulosa cell, and (C'') the positive control of Oct4 in the same cells. DNA was used to counterstain with DAPI (A, B and C). Scale bar = 100 μ m.



圖十六、家兔 PGC 形成之細胞聚合體 (CA*) 在添加 pFF 之培養環境下貼盤培養 (30 天) 後其生殖細胞標記蛋白之表現。處理一中的 CA 貼盤培養至第 30 天，以免疫螢光染色法可檢視其減數分裂標記蛋白 Scp3 與卵子標記蛋白 Gdf9 之表現。白色箭頭表示 Scp3 與 Gdf9 表現相吻合處，黃色箭頭表示只有 Gdf9 表現處 (A, A')。由 4 月齡母兔分離取得之兔濾泡組織也以 ICC 檢視其卵子標記蛋白 Gdf9 之表現 (B, B')。比較 CA 與兔濾泡兩者之 Gdf9 表現模式，發現極為相似 (A', B')。*CA 係由家兔 PGC 與生殖脊體細胞共培養所得之細胞聚合體。Scale bar = 100 μm (A, A', B') ; 200 μm (B)。

Fig. 15. Expressions of germ cell, meiosis, and oocyte specific markers in rabbit PGC derived aggregates (CAs, Day 30) by adherent culture condition. Expressions of meiosis specific marker Scp3 (A) and oocyte specific marker Gdf9 (A') in CAs derived from adherent- Treatment #1 condition after 30 days was examined by double staining of ICC. White arrow indicates the same expression position of Scp3 and Gdf9 in the same CA, and the yellow arrow indicates the expression position specific only to Gdf9. The

follicle tissue were also examined the Gdf9 expression by ICC which were collected from 4 month-old female New Zealand white rabbit (B). The fluorescence expression mode of Gdf9 in CA was similar to that of rabbit follicle (A' and B'). Scale bar = 100 μm (A, A', B'); 200 μm (B) ◦



結論

由以上試驗顯示，家兔胚胎的發育時程略遲於小鼠，而 12.5 dpc 之胚胎為最適合自生殖脊分離 PGC 之時機。將所分離的 PGC 培養於含有 LIF、FK、ROCK inhibitor 與 bFGF2 之無血清環境中，可使其轉形為類 EGC 且可持續繼代培養三代。若將 12.5 dpc 之 PGC 與生殖脊體細胞以貼盤方式體外培養於含有 BMP4、BMP8a、SCF、EGF 以及 pFF 環境中，可誘導其形成類濾泡細胞聚合體，此聚合體可長期培養至少 30 天，並表現減數分裂(Scp3)與卵子特定蛋白標記(Gdf9)。推論其中部分細胞可能已進入減數分裂，或已啟動雌性生殖細胞的體外分化過程。

本研究對於家兔 PGCs 再程式化以及分化能力已有初步之探索，並可從中窺見其在生殖學領域中之研究潛能。在兔 EGCs 之研究方面，若能搭配基因轉殖技術，仿效 iPSC 之誘導形成的方式應用於 PGCs 上，或許能促使其完全再程式化；而在生殖細胞之誘導分化研究方面，若能將 CA 移植入適當之體內環境，或許便能持續誘導其內部之生殖細胞分化或進行減數分裂，如此便能更接近定向誘導分化生殖細胞之研究目標。

參考文獻

Ballow, D., M. L. Meistrich., M. Matzuk and A. Rajkovic. 2006. *Sohlh1* is essential for spermatogonial differentiation. *Dev Biol.* 294:161-167.

Chiquoine, A. D. 1954. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec.* 118:135-146.

Daniel-Carlier, N., E. Harscoët., D. Thépot., A. Auguste., E. Pailhoux., and G. Jolivet. 2013. Gonad differentiation in the rabbit: evidence of species-specific features. *PLoS One* 8:e60451.

De Felici, M., S. Dolci and M. Pesce. 1992. Cellular and molecular aspects of mouse primordial germ cell migration and proliferation in culture. *Int J Dev Biol.* 36: 205-213.

Ding V., L. Ling, S. Natarajan, M. Yap, S. Cool and A. Choo. 2010. FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3beta signaling. *J Cell Physiol* 225: 417-428.

Messerschmidt, D. M., B. B. Knowles and D. Solter. 2014. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 28:812-828.

Dolci, S., D. E. Williams, M. K. Ernst, J. L. Resnick, C. I. Brannan, L. F. Lock, S. D. Lyman, H. S. Boswell and P. J. Donovan. 1991. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 352: 809-811.

Donovan, P. J. 1994. Growth factor regulation of mouse primordial germ cell

development. *Curr. Top Dev Biol.* 29: 189-225.

Donovan, P. J. and M. P. De Miguel . 2003. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 13: 463-471.

Donovan, P. J., D. Stott, L. A. Cairns, J. Heasman and C. C. Wylie. 1986. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44: 831-838.

Dores, C., W. Alpaugh., and I. Dobrinsk. 2012. From in vitro culture to in vivo models to study testis development and spermatogenesis. *Cell Tissue Res.* 349: 691-702.

Drusenheimer., A. Dev., G. Wulf., I. E. Ehrmann., D. J. Elliott., V. Okpanyi., U. Zechner., T. Haaf., A. Meinhardt., and W. Engel. 2006. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell.* 1: 125-132.

Dudley, B. M., C. Runyan., Y. Takeuchi., K. Schaible and K. Molyneaux. 2007. BMP signaling regulates PGC numbers and motility in organ culture. *Mech Dev.* 124:68-77.

Durcova-Hills, G., F. Tang, G. Doody, R. Tooze and M. A. Surani. 2008. Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. *PLoS One.* 3:e35.

Durcova-Hills, G., I. R. Adams, S. C. Barton, M. A. Surani and A. McLaren. 2006. The role of exogenous fibroblast growth factor-2 on the reprogramming of primordial germ cells into pluripotent stem cells. *Stem Cells* 24: 1441-1449.

Edson, M. A., A. K. Nagaraja and M. M. Matzuk. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev.* 6: 624-712.

Geijsen, N., M. Horoschak., K. Kim, J. Gribnau, K. Eggan and G. Q. Daley. 2004. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature.* 427:148-154.

Ginsburg, M., M. H. Snow and A. McLaren. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development.* 110: 521-528.

Godin, I., R. Deed, J. Cooke, K. Zsebo, M. Dexter and C. C. Wylie. 1991. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 352: 807-809.

Hajkova, P., S. Erhardt, N. Lane, T. Haaf and O. El-Maarri. 2002. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev.* 117: 15-23.

Hamazaki, T., S. M. Kehoe, T. Nakano and N. Terada. 2006. The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 26: 7539-7549.

Hara, K., M. Kanai-Azuma, M. Uemura, H. Shitara, C. Taya, H. H., Kawakami, N. Tsunekawa, M. Kurohmaru and Y. Kanai. 2009. Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis. *Dev Biol.* 330: 427-439.

Hayashi, K., and M. Saitou. 2013a. Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. *Methods Mol Biol.* 1074:175-183.

Hayashi, K., and M. Saitou. 2013b. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 8: 1513-1524.

Hayashi, K., H. Ohta, K. Kurimoto, S. Aramaki and M. Saitou. 2011. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146: 519-532.

Hayashi, K., S. Ogushi., K. Kurimoto., S. Shimamoto., H. Ohta and M. Saitou. 2012. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 338:971-975.

Honda, A., M. Hirose, M. Hatori, S. Matoba, H. Miyoshi, K. Inoue and A. Ogura. 2010. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J Biol Chem.* 41: 31362-31369.

Hübner, K., G. Fuhrmann., L. K. Christenson., J. Kehler., R. Reinbold., R. De La Fuente., J. Wood., J. F. 3rd. Strauss JF., M. Boiani and H. R. Schöler. 2003. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300:1251-1256.

Kakegawa, R., T. Teramura., T. Takehara., M. Anzai., T. Mitani., K. Matsumoto., K. Saeki., N. Sagawa., K. Fukuda and Y. Hosoi. 2008. Isolation and culture of rabbit primordial germ cells. *J Reprod Dev.* 54:352-357.

Koshimizu, U., T. Taga, M. Watanabe, M. Saito, Y. Shirayoshi, T. Kishimoto and N. Nakatsuji. 1996. Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells in vitro and derivation of embryonic germ (EG) cells. *Development* 122: 1235-1242.

Labosky, P. A., D. P. Barlow and B. L. Hogan, 1994. Embryonic germ cell lines and

their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Foundation Symposium* 182: 157-168; discussion 168-178.

Lanner, F. and J. Rossant. 2010. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* 20: 3351-3360.

Lawson, K. A., and W. L. Hage. 1994. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp.* 182: 68-84.

Leitch, H. G., K. Blair, W. Mansfield, H. Ayetey, P. Humphreys, J. Nichols, M. A. Surani and A. Smith. 2010. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development* 137: 2279-2287.

Levenstein M., T. Ludwig, R. Xu, R. Llanas, K. VanDenHeuvel-Kramer, D. Manning and J. Thomson. 2006. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24: 568-574.

Mauduit, C., S. Hamamah and M. Benahmed. 1999. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update.* 5:535-545.

Metzger, H., and E. Lindner. 1981. The positive inotropic-acting forskolin, a potent adenylate cyclase activator. *Arzneimittelforschung* 31: 1248-1250.

Molyneaux, K., and C. Wylie. 2004. Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol.* 48: 537-544.

Moon, R. T., B. Bowerman, M. Boutros and N. Perrimon. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through β -catenin. *Science* 296: 1644-1646.

Nayernia, K., M. Li, and W. Enger. 2004. Spermatogonial stem cells. *Methods Mol Biol.* 253: 105-20.

Pellegrini, M., P. Grimaldi., P. Rossi., R. Geremia and S. Dolci. 2003. Developmental expression of BMP4/ALK3/SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: a potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. *J Cell Sci.* 116:3363-3372.

Pesce, M., M. G. Farrace, M. Piacentini, S, Dolci and M. De Felici. 1993. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 118: 1089-1094.

Resnick, J. L., L. S. Bixler, L. Cheng and P. J. Donovan. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359: 550-551.

Reya, T. and H. Clevers. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 7035: 843-850.

Saitou, M. 2009. Germ cell specification in mice. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19: 386-395.

Saitou, M., S. C. Barton and M. A. Surani. 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418: 293-300.

Sánchez, F., and J. Smitz. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 12: 1896-1912.

Santos, A. C and R. Lehmann. 2004. Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr. Biol.* 14: 578-589.

Sato, N., L. Meijer, L. Skaltsounis, P. Greengard and A. H. Brivanlou. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through

activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* 10: 55-63.

Schäfer-Haas, S., and C. Viebahn. 2000 The term cell epitope PG-2 is expressed in primordial germ cells and in hypoblast cells of the gastrulating rabbit embryo. *Anat Embryol (Berl)*. 202: 13-23.

Seamon, K. B., W. Padgett and J. W. Daly. 1981. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78: 3363-3367.

Stewart, C. L., I. Gadi and H. Bhatt. 1994. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol* 161: 626-628.

Sui, L., L. Bouwens and J. K. Mfopou. Signaling pathways during maintenance and definitive endoderm differentiation of embryonic stem cells. 2013. *Int J Dev Biol*. 57:1-12.

Svingen, T and P. Koopman. 2013. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev*. 27:2409-2426.

Tanaka, S. S., Toyooka, R. Akasu, Y. Katoh-Fukui, Y. Nakahara, R. Suzuki, M. Yokoyama and T. Noce. 2000. The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes Dev*. 14: 841-853.

Toyooka, Y., N. Tsunekawa, R. Akasu, and T. Noce. 2003. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:11457-62.

Tres. L. L., C. Rosselot and A. L. Kierszenbaum. 2004. Primordial germ cells : what does it take to be alive? *Mol Reprod Dev.* 68:1-4.

Van Es, J. H., N. Barker and H. Clevers. 2003. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 13: 28-33.

Weber. S., D. Eckert., D. Nettersheim., A. J. Gillis., S. Schäfer., P. Kuckenber., J. Ehlermann., U. Werling., K. Biermann., L. H. Looijenga and H. Schorle. 2010. Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance. *Biol Reprod.* 82:214-213.

Wei, W., T. Qing, X. Ye, H. Liu, D. Zhang, W. Yang and H. Deng. 2008. Primordial germ cell specification from embryonic stem cells. *PLoS One* 3: e4013.

Weitzer, G. 2006. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies: An in vitro model of eutherian pregastrulation development and early gastrulation. *Handb Exp Pharmacol.* 174: 21–51.

Wilhelm, D., S. Palmer., and P. Koopman. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 87:1-28.

Woei Ng K., T. Speicher, C. Dombrowski, T. Helledie, L. Haupt, V. Nurcombe and S. Cool. 2007. Osteogenic differentiation of murine embryonic stem cells is mediated by fibroblast growth factor receptors. *Stem Cells Dev* 16: 305-318.

Xu R., R. Peck, D. Li, X. Feng, T. Ludwig and J. Thomson. 2005. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2: 185–190.

Yu, X., N. Wang, R. Qiang, Q. Wan , M. Qin, S. Chen, and H. Wang. 2014. Human amniotic fluid stem cells possess the potential to differentiate into primordial follicle oocytes in vitro. *Biol Reprod.* 4: 73. doi: 10.1095/biolreprod.

