

## 남성생식줄기세포의 임상적 이용

포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

이 동 료

### Clinical Application of Male Germ-Line Stem Cells

Dong Ryul Lee

Fertility Center of CHA General Hospital, CHA Research Institute Pochon CHA University  
College of Medicine, Seoul, 135-081, Korea

서론:

#### 남성생식줄기세포와 정원줄기세포

생쥐의 경우는 임신 11일과 12일경, 인간의 경우에는 약 6주차에 난황막에서 유래된 원시생식세포(primordial germ cells, PGC)가 원시생식선(genital ridge)으로 이동하여 원시생식소를 형성하게 된다. 원시생식소에 도달한 원시생식세포는 gonocyte로 바뀌고, 다시 계속적인 분열을 통해 그 수를 증가시키면서 생식줄기세포(germ-line stem cells, GSCs)를 형성하게 된다. 포유류 암컷은 종에 따라 그 시기가 약간의 차이를 보이지만 생식줄기세포가 일괄적으로 감수분열에 진입하여 제1차난모세포 전기상태로 폐경기까지 유지된다. 이에 반해 수컷은 생식소 내 세정관의 기저부로 이동하여 평생 동안 생식줄기세포로서 존재하며 자가증식(self-renewal)을 통해 그 수를 유지하고, 사춘기 이후 그 중 일부가 분화과정을 통해 남성생식세포를 생산하게 된다.<sup>1,2</sup> 과거에는 포유동물에서 이 생식줄기세포들이 고환 내에서만 발견되었기 때문에 주로 정원줄기세포(spermatogonial stem cells 또는 type A-spermatogonia)라고 하였다. 그러나 하등무척추동물에서는 암컷에게서도 이와 유사한 세포가 존재하고, 최근에는 포유류 암컷에서 이들의 존재가능성이 제기되어 그 명칭을 남성생식줄기세포로 하는 경향이 있다.<sup>3,4</sup>

남성생식줄기세포는 일반적인 줄기세포와 유사하게 자가재생능력과 정자세포로의 분화능력을 동시에 가지고 있으며, 이러한 특징 때문에 세포의 증식과 분화기작을 연구할 수 있는 매우 훌륭한 시스템으로 여겨져 왔다.<sup>1</sup> 그러나 고환 내에 아주 극소수(1/3000~4000개)가 존재하며, 최근까지 이들의 증식과 분화는 체외에서 재현이 어려웠기 때문에 많은 부분으로 그 적용을 넓히는 데는 어려움이 있었다.<sup>5</sup> 하지만 최근 들어 배아와 성체줄기세포의 중요성이 주목 받기 시작하면서, 남성생식줄기세포는 생식연구와 불임치료분야 뿐 만 아니라 난치병치료를 위한 새로운 세포치료제의 자원으로서 그 가능성이 제시되고 있다. 그러므로 본 논문에서는 실험동물과 인간의 남성생식줄기세포에 관한 연구를 정리하고, 이를 이용한 기초연구, 산업, 임상치료에의 적용가능성을 제시하고자 한다.

#### 이식과 치환을 이용한 남성생식줄기세포의 이용가능성

생식줄기세포의 연구는 그 중요성에 비해 현재까지 연구가 많이 진행되어 있지 않다. 이는 전술한 바와 같이 정소 내에 생식줄기세포의 수가 극소수로 존재하여 분리하기가 매우 어려웠기 때문이며, 무엇보다도 이를 체외에서 증식, 배양하는 기술이 확립되지 못했기 때문이다. 불과 몇 년 전 까지만 해도

생식줄기세포를 체외에서 1주일 이상 그 특성을 유지하며 배양하는 것이 매우 어려웠다.<sup>6</sup> 하지만 이러한 약점을 극복하면서 생식줄기세포의 증식과 분화 능력을 확인하는 데는 미국의 Brinster 교수에 의해 도입된 생식세포의 정소 내 치환기법 (germ cell transplantation)이 매우 중요한 역할을 담당했다.<sup>7,8</sup> 연구자들은 Lac-Z와 같은 특정형질을 가지고 있는 생쥐의 남성생식줄기세포를 분리하여 연구에 사용하였다. 남성생식줄기세포의 회수율을 올리기 위해 잠류고환 (cryptorchidism)을 유도하거나, integrin- $\alpha_6$ , - $\beta_1$ 과 같은 생식줄기세포의 특이표면항체로 tagging 한 후 유세포분석기를 이용하여 분리하였다.<sup>9</sup> 또한 이들 생식줄기세포의 치환을 위해 W locus의 genetic mutation에 의해 정소 내 생식세포가 존재하지 않거나, alkylating agent인 busulfan을 처리하여 생식줄기세포를 없앤 수용체 생쥐의 정소를 이용하였고 세정관 내에 이식한 후 정자형성과정의 재현을 관찰하였다.<sup>10</sup> 특히 형질전환된 생식줄기세포의 치환을 통해 생산된 생식세포에서 형질전환된 산자의 생산은 이 기술의 새로운 형질전환동물의 생산방법으로서의 가치성을 부각시켰다.<sup>11</sup>

남성생식줄기세포의 동종간 치환방법은 설치류 모델 뿐 만 아니라 영장류 모델에서도 성공을 거두어 임상적 사용의 가능성을 제시하였다.<sup>12,13</sup> 더군다나 일련의 연구자들은 흰쥐와 햄스터, 토끼, 개, 돼지, 소, 영장류 등에서 얻은 생식줄기세포를 생쥐와 같은 타종의 정소에 치환하여 정자형성과정을 재현하고 보다 효과적인 임상적 치료의 수단으로 개발하려는 연구를 진행하였다. 그 결과 흰쥐나 햄스터와 같이 유연관계가 가까운 종에서는 정자형성과정이 재현되었으나,<sup>14,15</sup> 종간 유연관계가 먼 다른 동물에서는 세정관 내에 생식세포의 군집만 형성하였고 정자형성과정의 재현에는 실패하였다.<sup>16,17</sup> 하지만 이상의 결과는 생식줄기세포의 치환방법을 이용한 연구가 정자형성과정의 이해에 많은 도움을 주었으며, 특히 종간 유연관계가 가까운 종에서는 Sertoli cell이 타종의 생식줄기세포의 증식과 분화를 지원할 수 있다는 사실을 이해하는데 도움을 주었다.

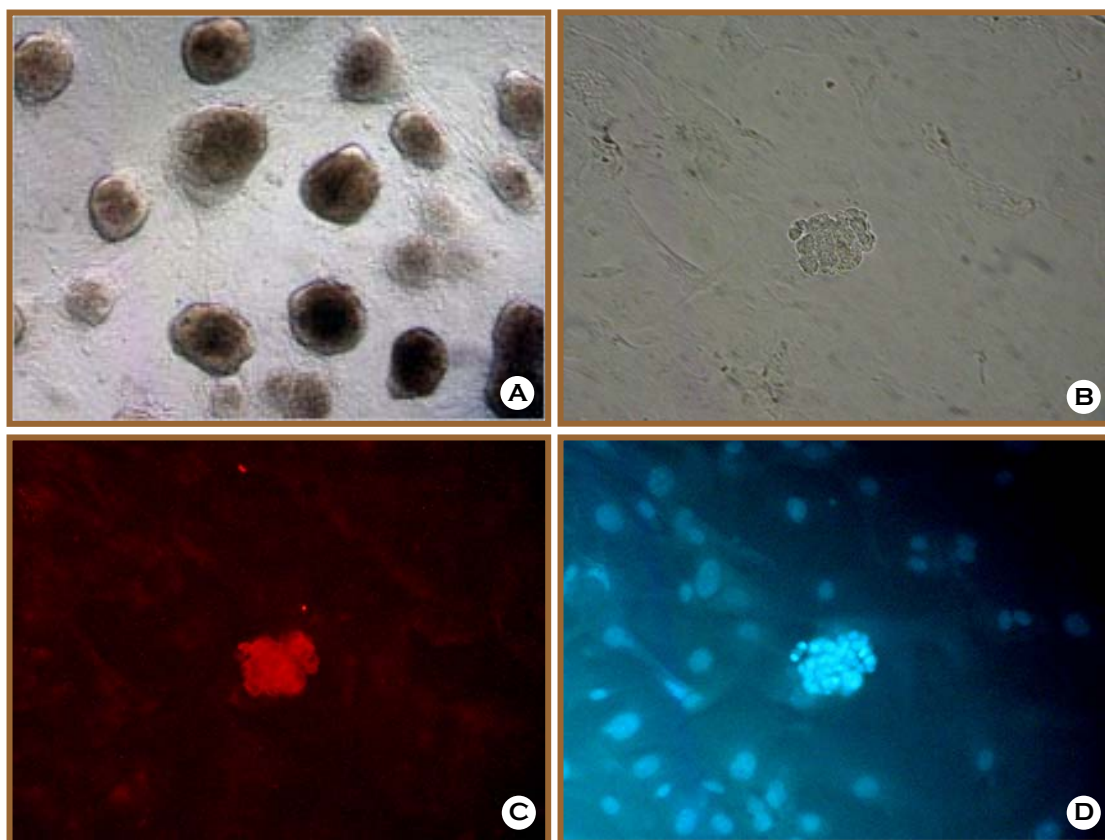
2002년 Dobrinski 교수팀은 신생 생쥐와 돼지, 염소로부터 얻은 정소조각을 거세한 면역결핍 생쥐의 등쪽 피하에 이식한 후 2~4주 후에 회수하였을 때

이식한 정소조각이 성장하고, 성숙된 정자를 생산할 수 있다는 결과를 발표하였다.<sup>18</sup> 또한 생산된 정자는 생쥐난자에 주입되었을 때 감수분열을 재개하고 전핵을 형성할 능력을 가진다는 사실을 발견했다. 이 방법은 임상적인 이용에는 여러 가지 제한점이 있으나, 편리성과 종간의 유연관계에 관계없이 이용할 수 있다는 장점이 있어, 특히 멸종희귀종의 종보전 등에 이용할 수 있는 방법으로 현재에도 많은 연구가 진행되고 있다.

### 실험동물 남성생식줄기세포의 배양 및 분화

불과 수년전까지만 해도 남성생식줄기세포의 체외 증식은 거의 불가능한 것으로 알려져 왔고, 연구는 대부분 이러한 생식줄기세포의 분화에 초점이 맞추어져 있었다.<sup>19</sup> 그러나 정소 내의 남성생식줄기세포의 수는 전술한 바와 같이 매우 적기 때문에 이를 이용한 임상적 적용에는 어려운 점이 많았다. 신생동물의 정소 내부 세정관 내에는 주로 생식줄기세포와 미성숙 서르토리 세포 (Sertoli cell)만이 존재하여 효소처리와 분리과정의 도입으로 고순도의 남성생식줄기세포를 회수할 수 있다. Izadyar 등은 배양액과 혈청의 농도, 배양온도의 조절을 통해 1주일 이상 생식줄기세포의 증식을 유지할 수 있었다.<sup>20</sup>

생식줄기세포는 정소 내에서 줄기세포로서 높은 텔로메라아제 활성도 (telomerase activity)를 유지하고 거의 평생동안 자가재생을 통해 그 수를 유지하나, 생식세포로 분화를 하면서 이 활성도를 잃는다. 일부의 연구자들은 이러한 사실에 기인하여 생식줄기세포를 분리하고 telomerase catalytic component (TERT)를 그들의 유전자에 삽입하여 불사화시키는 연구를 진행하였다.<sup>21</sup> 이렇게 불사화된 생식줄기세포는 체외배양 중에 생식줄기세포의 특징을 유지하면서 1년 이상 계속적으로 증식하였고, 생식세포로의 분화를 유도하는 stem cell factor (SCF)를 처리하여 체외에서 원형정세포까지 분화에 성공하였다. 하지만 이러한 유전자변형을 통해 만들어진 생식줄기세포는 체외배양이 용이해서 생식세포 연구의 모델로서의 사용에 장점을 가지나, 체외뿐만 아니라 체내에서도 동일한 특성을 가지는 진정한 줄기세포로

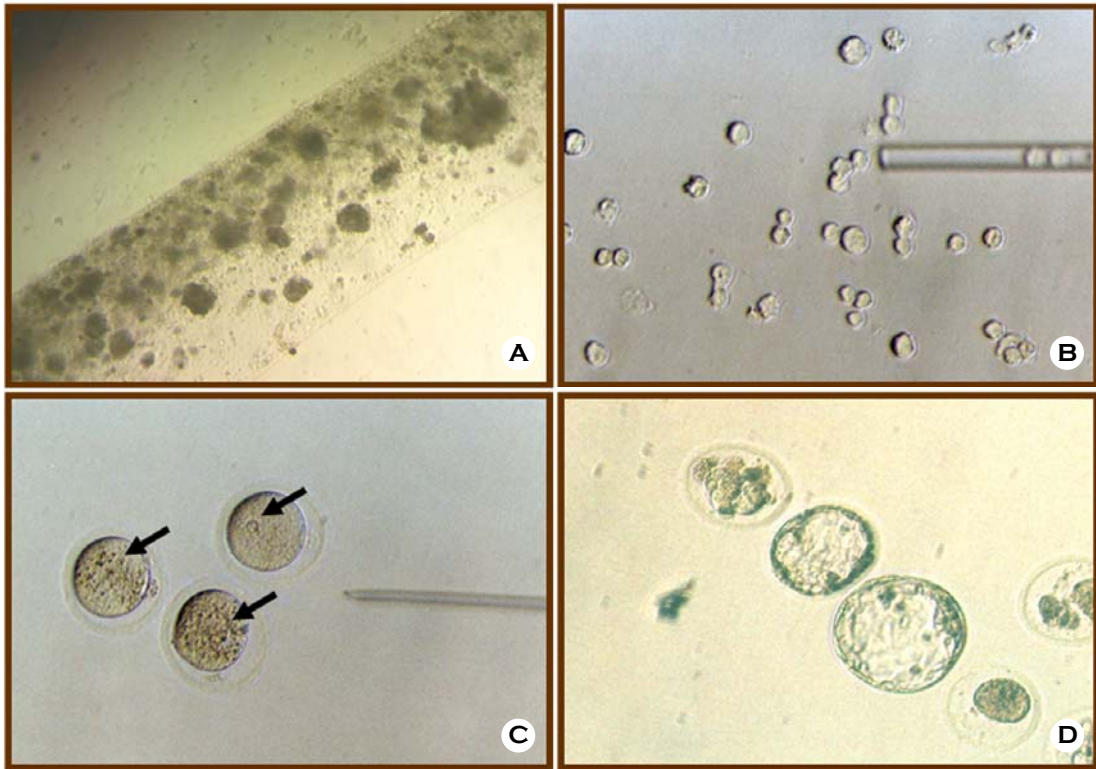


**Figure 1.** 생쥐 남성생식줄기세포의 체외배양. **A)** 신생 또는 성체 생쥐의 정소를 효소처리 하여 개개로 분리한 후 0.1% 젤라틴이 코팅된 배양접시에서 2~4주간 배양한 그림. 생식줄기세포의 콜로니가 생성됨. **B)** 1~2주 간격으로 트립신을 처리하여 콜로니를 계대배양함. **C)** 생식줄기세포의 마아커를 이용한 특성화인. **D)** DAPI 염색.

의 특성을 가지는지에 관한 추가의 연구가 필요하다. 그리고 유전자변형 생식줄기세포를 이용하여 생식세포를 생산하는 것은 임상적 이용에 많은 제약을 가지게 될 것이다.

최근 연구에 의하면 남성생식줄기세포의 증식에는 여러 가지 요인들이 필요하지만, 그 중에서도 *glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)*가 필수적인 것으로 알려져 있다. 일본 교토대학의 Kanatsu-Shinohara 등은 분리된 생쥐의 남성생식줄기세포를 GDNF와 *epidermal growth factor*, *fibroblast growth factor*, *leukemia inhibitory factor* 등이 들어있는 배양액에서 *mouse embryonic fibroblast cells*과 공배양을 통해 5개월 이상 ( $10^{14}$ 배 이상)의 증식배양에 성공하였다.<sup>22</sup> 또한 이 증식과정에서 얻은 생식줄기세포의 군집을 생식세포가 존재하지 않은 생쥐의 정소

내에 이식하였을 때 생식세포는 재생되었고, 이를 이용한 개체의 생산이 가능 하였다. 이들 연구자들에 의해 개발된 남성생식줄기세포의 장기간 체외배양법은 포유동물에서는 최초의 성공이며, 생식세포의 발생과정 연구의 중요한 모델이 될 뿐만 아니라 형질전환동물의 생산이나 불임치료의 새로운 장을 연 획기적인 연구가 되었다. 이후 생식줄기세포의 체외배양에 관한 연구는 타 연구자에 의해서도 재현되었고,<sup>23</sup> 흰쥐에서도 성공을 거두었다.<sup>24</sup> 초기의 연구에서는 특정형질을 가진 생쥐나 신생 생쥐에서만 가능하였으나, 최근에는 성체 생쥐에서도 변형된 배양방법을 통해 생식세포로 분화가 가능한 생식줄기세포의 분리와 증식이 가능해졌다 (Figure 1, 2).<sup>25</sup> 또한 많은 연구자들에 의해 보다 효율적인 생식줄기세포의 분리와 증식을 위한 생식줄기세포의 특이 마



**Figure 2.** 체외에서 분리 증식된 생쥐 남성생식줄기세포의 분화를 통한 생식세포의 생산 및 수정능력 확인. **A)** Alginate-hydrogel을 이용한 3차원 배양을 통한 남성생식줄기세포의 분화배양. **B)** 4~6주간 배양 후 회수한 생식세포. 형태학적 특징을 이용하여 원형정세포를 회수함. **C)** 회수된 원형정세포를 생쥐난자에 주입하여 수정을 유도함. 원형정세포 주입과 난자 활성화에 의해 형성된 전핵 (화살표). **D)** 5일간 배양 후 원형정세포가 주입된 난자에서 유래된 포배기 배아.

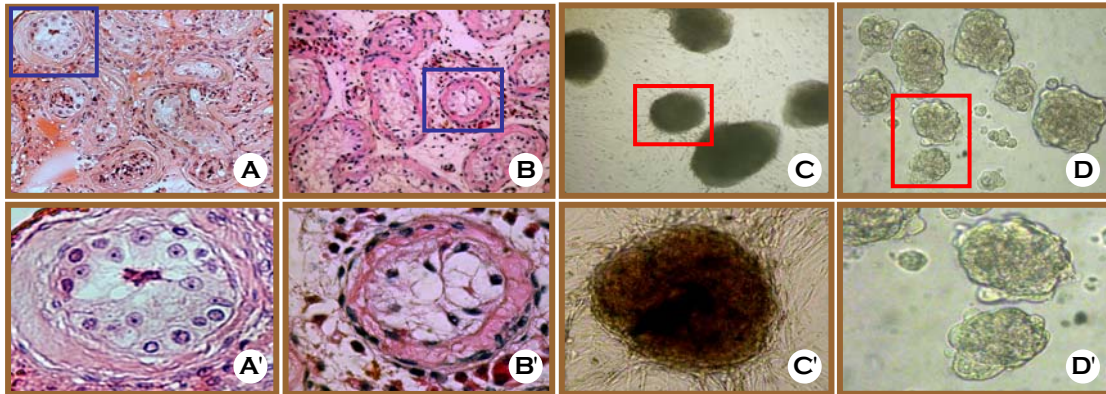
아커의 개발과 증식인자에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.<sup>26</sup>

### 인간 남성생식줄기세포의 배양과 분화

남성생식줄기세포는 생후 수일 내에 인간의 정소 내 세정관의 기저부에 자리를 잡게 되며 평생 동안 자가재생을 통해 그 수를 유지하고, 일부가 분화를 통해 생식세포를 형성한다. 사춘기 이후에는 정소 내에 여러 단계의 생식세포와 체세포가 존재해서 상대적으로 그 수는 매우 적다. 따라서 신생 생쥐를 이용하는 실험동물과는 달리 인간에게서는 이러한 생식줄기세포의 분리와 증식배양은 매우 어렵다.

1992년 Palermo 등에 의해 최초로 성공한 세포질 내 정자직접주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)의 도입은 많은 남성불임환자에게 임신의 가능

성을 열어주었다.<sup>27</sup> 특히 이 전까지는 치료가 불가능했던 무정자증환자에게도 정소생검 (testicular biopsy) 또는 정소 내 정자채취술 (testicular sperm extraction, TESE)을 이용해 정자의 채취가 가능하다면 시험관 아기시술을 통해 수정과 임신이 가능하게 되었다. 정소 내 정자형성과정에 장애가 있거나 부전으로 비폐색성 무정자증환자로 진단된 경우에도 국소적으로 일어나는 정자형성을 찾아낼 수 있다면 세포질 내 정자직접주입술을 통해 임신이 가능하게 되었다. 따라서 보다 적극적으로 정소 내에 정자를 찾으려는 공격적인 정소 내 정자채취술이 시행되고 있다. 또한 Lee 등의 연구에 의하면 정자를 찾지 못한 정자형성정지증 (maturation arrest)과 정자형성부전증 (Sertoli cell only syndrome)으로 진단된 비폐색성 무정자증환자의 100%와 약 30%에서 생식줄기세포 또는 정원세포 특이유전자가 발현한다.<sup>28</sup> 이러한 연



**Figure 3.** 인간생식줄기세포유사세포의 분리 및 체외배양. **A)** 비폐색성 무정자증환자의 정소조직. 세정관내에 국부적으로 생식세포 존재. **B)** 비폐색성 무정자증환자의 정소조직. 세정관내에 생식세포가 존재하지 않음. **C)** 정소조직을 효소처리 하여 개개로 분리한 후 0.1% 젤라틴이 코팅된 배양접시에서 3~4주간 배양한 그림. 생식줄기세포의 콜로니가 생성됨. **D)** 1~2주 간격으로 트립신을 처리하여 콜로니를 계대배양함. **A'-D')** 확대 그림.

구 결과는 일부의 비폐색성 무정자증환자의 정소내에 생식줄기세포의 존재가능성을 알려준다.

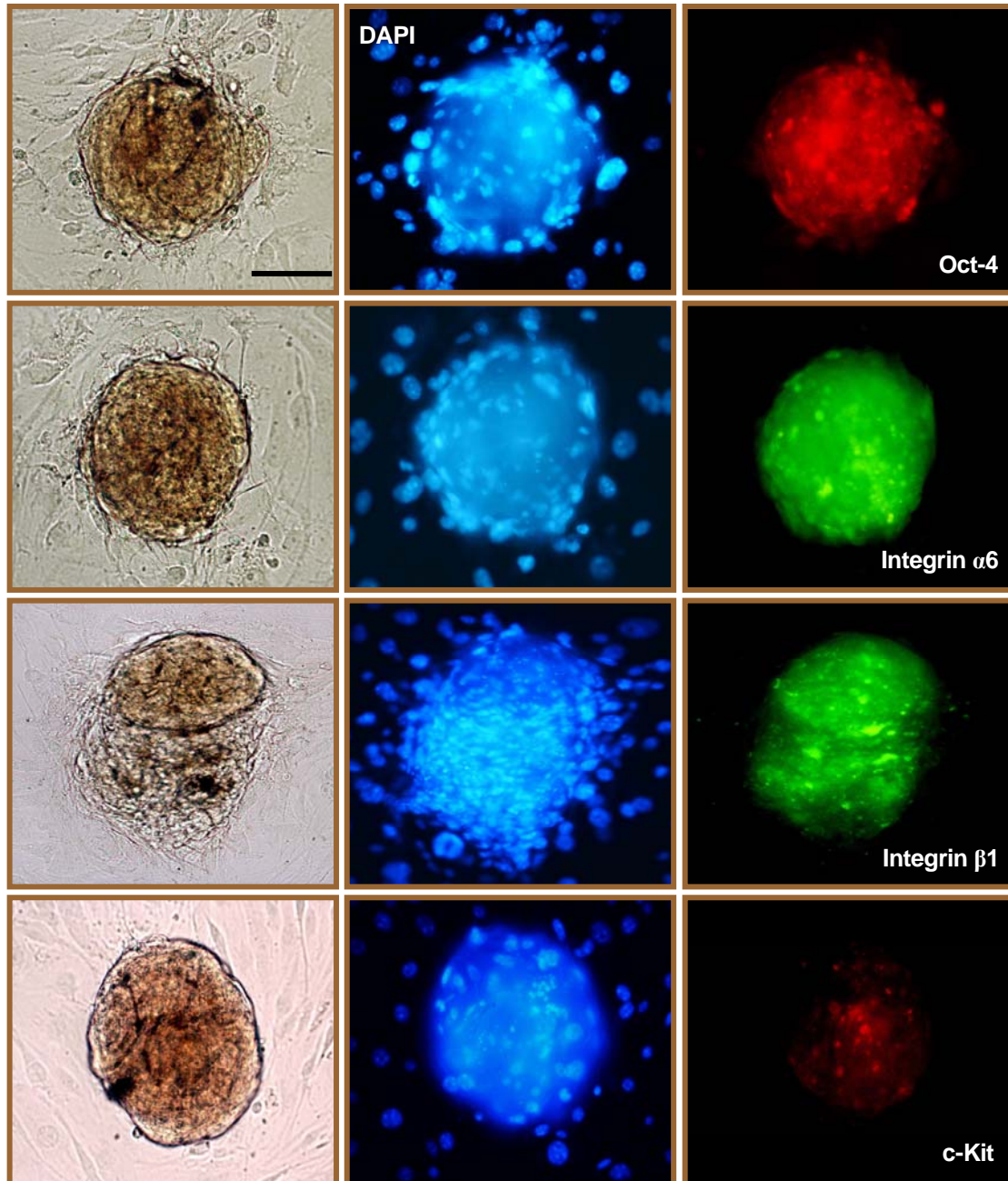
본 연구진은 정자를 찾을 수 없어 폐기되는 정소조직을 임상윤리위원회의 승인하에 이용하여 남성생식줄기세포를 분리하는 연구를 수행하였다. 2명 모두의 정자형성정지증 환자 11명 중 4명의 정자형성부전증 환자에서 생식줄기세포의 분리에 성공하였고, 각종 마아커를 이용하여 특성분석을 완료하여 확인하였다 (Figure 3, 4). 이를 체외에서 약 5회의 계대배양을 통해 증식을 유도하였고, 그 중 일부에서 체외분화를 시도하여 원형정세포의 생산에 성공하였으며, 그들이 생식줄기세포의 특성을 가지고 있는 것을 확인하였다.<sup>29</sup> 그러나 많은 생식줄기세포의 특성을 확인하였음에도 불구하고, 그들의 지속적인 자가재생능력을 확인하지 못했기 때문에 생식줄기세포유사세포 (germ-line stem cell-like cells)로 기술되었으나, 인간을 대상으로 한 최초의 연구결과로 인정 받았다. 그러나 이러한 연구의 보다 적극적인 임상적용을 위해서는 생쥐와 같은 실험동물에서의 연구와 유사하게 자가재생능력을 유지할 수 있는 적절한 배양방법의 개발이 절실한 실정이다.

### 전분화능 남성생식줄기세포

1998년 Thomson 등에 의해 인간의 배아줄기세포

주가 확립되면서 국내외적으로 줄기세포에 관한 연구가 집중되고 있다.<sup>30</sup> 이와 비슷한 시기에 유산된 태아의 원시생식세포로부터 배아줄기세포와 유사한 특성을 가진 인간 배아생식줄기세포주 (embryonic germ cells, EG)가 확립되면서 생식세포 또한 전분화능 (pluripotency)을 가진 세포를 만들 수 있는 것을 확인하였다.<sup>31</sup> 그러나 인간 배아생식줄기세포주는 인간 배아줄기세포에 비해 자가재생능력이 약간 부족하며, 그 배양이 훨씬 어렵고, 유산태아의 생식세포를 이용한다는 윤리적인 문제 때문에 더 이상의 많은 연구가 진행되지 않고 있다.

최초로 남성생식줄기세포의 장기간 배양법을 개발한 Shinohara 교수팀은 신생 생쥐의 정소로부터 분리한 생식줄기세포의 배양과정에서 배아줄기세포와 유사한 형태를 가진 또 다른 세포군을 발견하였다. 이들을 배아줄기세포를 배양하는 환경에서 배양하여 증식시킨 후, 다른 생쥐의 정소 세정관 내에 치환하였을 때 테라토마 (teratoma)를 형성하는 것을 관찰하였다. 또한 이 세포는 배아줄기세포와 유사한 특성 등을 발현하며, 생쥐 포배기배아에 이식하였을 때 배아의 구성원이 되어 키메라를 형성한다는 결과를 얻어 전분화능력을 가진다는 사실을 확인하였다.<sup>32</sup> 또한 특정형질 (Stra8)이 전환된 성체 생쥐의 정소로부터 이들 형질을 이용하여 순수하게 분리된 생식줄기세포로부터 4개의 배아줄기세포와 유사한



**Figure 4.** 체외에서 분리 증식된 비폐색성 무정자증 환자의 정소로부터 배양한 남성생식줄기세포 콜로니의 특성확인.

세포주를 확립하였다. 이들도 역시 생식줄기세포보다는 배아줄기세포와 유사하였고, 3배엽성의 세포로 분화가 가능한 전분화능을 가졌다.<sup>33</sup>

생식줄기세포와 전분화능 생식줄기세포 (multi-

potent germ-line stem cells, mGS)의 차이점과 이들의 체내환경에서의 존재여부에 관해서는 아직도 논란이 많다. 실제로 이들의 자가 재생능력은 매우 유사하지만 체내환경에 주입되었을 때는 각각이 전혀 다

른 운명을 가진 세포로 분화를 한다. 또한 그들간에는 어떤 기작에 의해서 형질이 조절되고 결정되는가에 관한 연구는 아직 진행되고 있지 못하다. 또한 전분화능 생식줄기세포의 분리는 아직도 제한된 연구자에 의해서만 성공하였고 그 효율은 성공한 두 연구자간에도 많은 차이가 있다. 현재까지는 생식줄기세포의 순수분리도가 높을 경우에 분리의 효율이 높을 것으로 여겨지고 있는 실정이다.<sup>34</sup>

### 남성생식줄기세포의 임상적 이용

남성생식줄기세포의 분리와 증식, 분화에 관한 연구는 실험동물에서 시작하였고, 그 적용을 넓혀 가축 등 대동물에서 주로 진행되어 왔다. 따라서 주로 정자형성과정의 기초연구와 형질전환동물 생산, 가축의 품종개량을 대상으로 연구를 진행하였다. 인간의 경우 생식세포의 특성상 타 동물로의 치환이나 유전자변형이 용이하지 않아 연구에 어려움이 많고, 특히 연구재료의 확보에 어려운 점이 있었다. 하지만 최근에는 과거에 비해 생식줄기세포 배양방법이 대단히 발전하였고, 특히 생식줄기세포의 특성에 관한 많은 연구가 진행되어 임상에 적용이 보다 용이할 것으로 여겨진다. 또한 보조생식술의 발전으로 건강한 생식세포의 생산이 가능하다면 남성불임치료에 많은 기여를 할 것으로 사료된다.<sup>28</sup>

최근 들어 난치병의 치료나 재생의학의 큰 주류로 주목을 받고 있는 줄기세포는 크게 배아줄기세포와 성체줄기세포로 나뉜다. 성체줄기세포에 비해 그 증식이 용이하고 보다 넓은 전분화능을 가진 배아줄기세포의 이용을 위해서는 크게 두 가지 문제를 해결해야 할 것이다. 첫째로 세포치료에 사용을 위해서는 세포분화의 조절뿐만 아니라 면역체계의 억제 또는 파괴가 필요하다. 체세포 배아복제를 이용한 배아줄기세포의 생산은 이러한 문제점을 해결해 줄 수 있으나 현재까지는 그 효율이 너무나 저조하여 임상적 적용이 어려운 상황이다. 또 다른 점은 배아줄기세포의 생산을 위해서 배아를 희생시켜야 한다는 윤리적인 문제점을 해결하여야 한다. 하지만 여러모로 배아줄기세포와 유사한 특징을 가지고 있는 전분화능 생식줄기세포의 생산은 이러한 두 가지 문제를 근본적으로 해결할 수 있는 장점을 가지고 있

다. 아직은 특정형질을 가진 특정 품종의 실험동물에서만 용이한 이러한 기술은 여러 연구자들의 계속되는 연구에 의해서 극복이 가능할 것으로 여겨지고 가까운 미래에 인간에서도 좋은 결과로 다가올 것으로 사료된다.

## 결 론

실험동물에서 시작된 생식줄기세포와 전분화능 생식줄기세포의 연구는 아직도 실험동물수준에 국한되어 있지만 최근 들어 여러 연구자들에 의해 인간을 대상으로 한 영역으로 넓혀지고 있다. 배양환경의 단순화와 발전을 통해 인간의 남성 생식줄기세포와 전분화능 생식줄기세포의 분리와 증식, 분화방법의 확립은 남성불임의 치료뿐만 아니라 생식능력을 보존해야 할 항암치료를 앞둔 남성 암환자에게 매우 유용한 기술이 될 것이다. 또한 이 기술은 줄기세포를 이용하게 될 많은 난치병의 치료와 재생의학의 발전에 기여할 것으로 사료된다.

### 사사

This work was supported by a grant from the National R&D Program (2006-04127) of the Ministry of Science & Technology, Republic of Korea and the Korea Science and Engineering Foundation,.

## 참 고 문 헌

1. Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 11287-9.
2. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. Mol Cell Endocrinol 2000; 163: 3-9.
3. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature 2004; 428: 145-50.
4. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. Cell 2005; 122:

- 303-15.
5. Telgelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; 290: 193-200.
  6. Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296: 2174-6.
  7. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11303-7.
  8. Brinster RL, Zimmerman JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11298-302.
  9. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5504-9.
  10. Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 1997; 41: 111-22.
  11. Kanatsu-Shinohara M, Ogura A, Ikegami M, Inoue K, Ogonuki N, Tashiro K, et al. Adenovirus-mediated gene delivery and in vitro microinsemination produce offspring from infertile male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1383-8.
  12. Schlatt S, Rosielsen G, Weinbauer GF, Rolf C, Brook PF, Nieschlag E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod* 1998; 14: 144-50.
  13. Schlatt S, von Schonfeldt V, Schepers AG. Male germ cell transplantation: An experimental approach with a clinical perspective. *Brit Med Bull* 2000; 56: 577-87.
  14. Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in the mouse testis. *Nature* 1996; 381: 418-21.
  15. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 60: 515-21.
  16. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 61: 1331-9.
  17. Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testis. *Biol Reprod* 2001; 64: 1409-16.
  18. Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Scholer H, Dobrinski I, Schlatt S. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 2002; 418: 778-81.
  19. Lee DR, Kaproth TK, Parks JE. In vitro production of haploid germ cells from fresh or frozenthawed testicular cells of neonatal bulls. *Biol Reprod* 2001; 65: 873-8.
  20. Izadyar F, den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, de Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine Type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod* 2003; 68: 272-81.
  21. Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, et al. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 2002; 297: 392-5.
  22. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69: 612-6.
  23. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 16489-94.
  24. Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 14302-7.
  25. Kim KS, Yang YH, Lim JJ, Kim SK, Yoon TK, Cha KY, et al. Establishment of Male Germ Line Stem Cells (GSCs) from Neonatal and Adult Mice and In Vitro Differentiation to Haploid Germ Cells. *J Microbiol Biotechnol* 2006; 16(9): 1347-54.
  26. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. CD9



- is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod* 2004; 70: 70-5.
27. Palermo G, Joris H, Devoroev P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
  28. Lee JH, Lee DR, Yoon SJ, Chai YG, Roh SI, Yoon HS. Expression of DAZ (deleted in azoospermia), DAZL1 (DAZ-like) and protamine-2 in testis and its application for diagnosis of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 827-34.
  29. Lee DR, Kim KS, Yang YH, Oh HS, Lee SH, Chung TG, et al. Isolation of Male Germ Stem Cell-Like Cells from Testis Tissue of Non-Obstructive Azoospermic Patients and Differentiation into Haploid Male Germ Cells in Vitro. *Hum Reprod* 2006; 21(2): 471-6.
  30. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
  31. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13726-31
  32. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119: 1001-12.
  33. Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel Ralf, Lee JH, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440: 1199-203.
  34. Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. The germ of pluripotency. *Nature Biotechnol* 2006; 24: 663-4.
-