

## Folliculogenesis and Ovarian Stem Cells

이 경 아

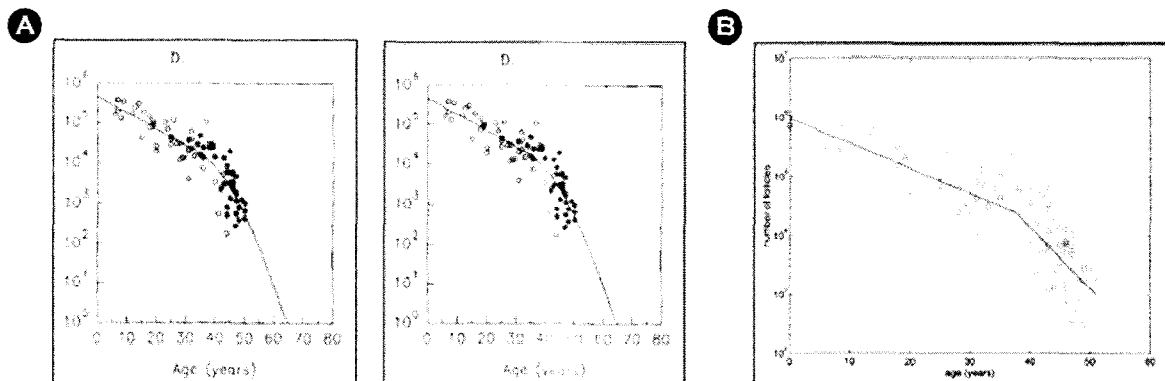
포천 중문의대 생명과학전문대학원

### Central Dogma in Reproductive Biology

포유류의 난소에서 여성의 생식세포인 난자가 형성되는 과정은 남성의 정소에서 정자가 생성되는 과정과는 다른 조절기전으로 이루어진다. 남성의 경우에는 spermatogonia가 평생 존재하여 80세가 넘는 나이까지도 계속 정자를 만들어낼 수 있는 반면에, 여성은 태어날 때에 정해진 숫자의 생식세포를 갖고 태어난다. 이때 난자는 10~15개의 pre-granulosa cells로 둘러싸여 제 1 감수분열에 정지해 있는 원시난포 (primordial follicles)의 상태로 존재하며, 이렇게 한번 운명이 정해진 이후 난자는 더 이상 분열하지도, 새롭게 만들어지지도 않는다는 명제는 지난 50여 년간 여성생식생리학 분야의 도그마로 자리 잡아 왔다.

이렇게 정해진 숫자의 원시난포로부터 사춘기 이후 한 달에 20~30개의 난포가 선택적으로 다시 성장을 재개하여 그 중의 한 개만이 dominant follicle로 자라 배란에 성공하게 되고, 나머지의 난포는 대부분 apoptosis에 의해 퇴화하게 된다. 따라서 여성의 가임기간 동안 사용되는 난포는 400~500여 개가 되며, 그 나머지 선택되지 않은 원시난포는 대부분 apoptosis에 의한 atresia 과정으로 퇴화하며, 난소 안에 있는 모든 난포가 사용되면 난포의 고갈로 인한 폐경이 오게 된다는 것이 여성의 폐경에 대한 기전으로 받아들여지고 있던 명제였다.<sup>2,3</sup>

실제로 조직학적인 방법을 이용하여 난소 안의 난포의 개수를 세는 방법과 수학적 증명법을 이용하여 난소 내 난포는 나이가 들어갈수록 그 숫자가 줄어들고, 나이에 비례하여 보았을 때 382세를 기준으로 급격하게 그 숫자가 줄어든다는 것을 여러 학자들이 보고한 바 있다 (Figure 1).<sup>4-7</sup>



**Figure 1. A.** Counts of non-growing follicles (right) and early growing follicles (left) in relation to subject's age. Open circles, Block's data. Solid circles, Gougeon group's data.<sup>5</sup> **B.** Observed total follicle counts.<sup>6</sup>

### The Dogma is Challenged

여성생식세포의 생성 (oogenesis)과 난포발달 (folliculogenesis)에 대하여 postnatal oogenesis가 일어난다고 하는

주장은 1917년 이후 시작되었으나, 1951년 Zuckerman의 확실한 논박에 의해서 그 이후 학계에서는 모든 주장을 잠재우고 지금의 도그마가 받아들여지고 있었다.<sup>8,9</sup> 그러나 지난 2004년, 2005년 Harvard Medical School의 Johnathan Tilly 그룹이 Nature와 Cell에 연이어 두 개의 논문을 발표함으로써 이 도그마에 전면으로 도전하는 ovarian stem cells의 개념을 다시 대두시키게 되었고,<sup>10,11</sup> 그 이후 지난 2~3년간 다시 한 번 이 도그마에 대한 활발한 찬반의 논쟁을 통하여 재조명이 진행되고 있다.

2004년 Tilly 그룹의 Nature 논문은 어른이 된 포유류의 난소에서 oogenesis는 계속된다는 개념을 다시 부각시킨 연구결과로서, 이들은 이 논문에서 생쥐의 난소 표면에 germline stem cells이 있으며 이것이 성체의 난소에서 새로운 난자를 만드는 공급원이 된다고 주장하였다.<sup>10</sup> 이들은 죽어가는 난포와 살아있는 난포의 숫자를 세는 방법을 이용하여 비교한 결과, 성체의 난소에서 과립세포에 싸여있지 않고 단독으로 존재하면서 분열하는 germ lineage의 세포를 발견한 점, 또한 이 세포들이 감수분열 초기에 발현하는 단백질인 synaptonemal complex protein 3 (scp3)를 발현한다는 점, 그리고 wild-type 난소의 절반을 GFP 발현하는 동물의 난소에 접합하는 chimerical 난소를 만들었을 때 GFP를 발현하는 난자와 주변 wild-type 과립세포로 이루어진 새로운 난포의 형성을 관찰하였다는 결과 등을 관찰하였기에, 성체의 난소에도 germline stem cells이 있다고 주장하였다.

바로 다음해인 2005년 연이어 같은 그룹에서 발표한 Cell 논문에서는 자신들이 주장한 germline stem cell의 progenitor를 밝히고자 하였으며, 놀랍게도 bone marrow transplantation (BMT)을 통해 새로운 난자와 이를 중심으로 난포가 형성된다고 발표하였다.<sup>11</sup>

Tilly 그룹의 주장이 이루어지기 이전까지의 postnatal oogenesis에 대한 논쟁을 주도하고 잠재웠던 주요 논문을 정리해 보면 아래 Table 1과 같이 요약해볼 수 있겠다.

**Table 1.** Critical articles about postnatal oogenesis

Authors	Years	Main Findings
Kingery (12)	1917	Primitive ova degenerates then definite ova replace it (mouse)
Arai (13)	1920	Definite ova arise from proliferation of ovarian surface epithelium (rat)
Simkins (14)	1932	Definite ova arise from differentiation of somatic cells (human)
<b>Zuckerman (8)</b>	<b>1951</b>	Showed that the body of evidence supporting the concept of postnatal oogenesis was unsound, and that it is more likely that oogenesis ceases prior to or just after birth. This notion became the <b>central dogma of mammalian female reproductive biology</b>
Peters et al. (15)	1962	Using delayed autoradiography after injection of tritiated thymidine showed that the premeiotic S phase leading to the formation of oocytes in the mouse only takes place during a limited prenatal period and that these oocytes remain in the adult ovary
<b>Johnson et al. (10)</b>	<b>2004</b>	<b>Germline stem cells (GSCs) are located within the ovarian epithelium and supply the adult mouse ovary with new oocytes</b>
<b>Johnson et al. (11)</b>	<b>2005</b>	<b>GSCs are present in the circulation by BMT and supply the adult mouse ovary with new oocytes</b>
Lee et al. (16)	2007	BMT rescued long-term fertility in chemotherapy treated females, but all offspring were derived from the recipient germline. Cell tracking showed that donor-derived oocytes were generated in ovaries of recipients after BMT, and two lines of evidence dispelled the claim that these oocytes are misidentified immune cells

최근 이 두 개의 논문이 발표된 후 여성생식세포의 생성과 난포형성은 이미 태어나기 전에 모두 결정되어 태어난다는 기존의 도그마와 그에 반하여 ovarian stem cells이 존재하여 postnatal ovary에서도 새로운 난자와 난포형성이 가능하다는 가설에 대하여 찬반의 많은 논문들이 발표되고 있는데, 이들을 정리해 보면 Table 2와 같다.

Table 2. Pros and Cons regarding ovarian stem cells

Authors	Years		Main Findings
Spradling (17)	2004	Pros	"This important finding seems destined to greatly enhance our understanding of mammalian oogenesis and of its precipitous decline during adulthood."
Kerr et al. (18)	2006		In mouse ovaries from 7~100 days of age, the mean number of primordial follicles are not significantly depleted (suggesting some degree of follicle renewal in postnatal and adult mouse ovaries)
Oktay & Oktem (19)	2007		Regeneration of oocytes after chemotherapy: connecting the evidence from mouse to human
Bazer (20)	2004	Inter	"In either case, strong science is challenging conventional wisdom so that what we define as "truth" is based on the strongest possible evidence."
Feng et al. (21)	2006		Although the full function of these ES-derived germ cells and gametes remains to be demonstrated, these findings give new hope for infertility therapy and novel approaches in regenerative medicine.
Kayisli & Seli (22)	2006		The findings of Johnson et al. strongly suggest the generation of oocytes from stem cells in the adult mouse. Criticism by prominent investigators in the field has been voiced but not yet adequately supported by experimental evidence. Crucially, independent confirmation of those findings is also lacking. If proven to occur in human, de novo oocyte formation from stem cells would have significant implications for fertility preservation.
Albertini (23)	2004	Cons	It is imperative that data bearing directly on the existence of ovarian stem cells be collected and that the potential significance of this work not be taken lightly by reproductive biologists in general and those fascinated by the biology of stem cells.
Gosden (24)	2004		'Men who are orthodox when they are young are in danger of being middle-aged all their lives' (Walter Lippmann)
Greenfeld & Flaws (9)	2004		Central premises should be re-examined and challenged on a periodic basis to ensure that they continue to remain robust. Johnson et al. have performed a service to the field of ovarian biology by prompting re-examination of the "central dogma" of the primordial follicle pool that has shaped our understanding of ovarian function since 1951. However, the central dogma has withstood the test of time in that it has remained consonant with nearly every empirical observation concerning ovarian follicular dynamics in the past 50 years.
Telfer (25)	2004		"If the dogma is to be debunked and a new one accepted, at least in the mouse, it is sure to be challenged and tested, as should all dogma. This is the way of science and scientists."
Telfer et al. (26)	2005		On the basis of the evidence so far, we find their conclusions from their mouse model not proven and extrapolation of the data to humans premature. Moreover, we are concerned that their hypothesis is less reconcilable with pure reason and human biology than conventional theory.
Hutt & Albertini (27)	2006		Evidence from a number of lab collectively raise concerns over the validity of the ovarian stem cell mechanism for follicle replenishment as originally proposed by Johnson et al. However, recent reports on fertility restoration in humans are promising and warrant further study as hopes for novel fertility techniques are legitimized and the prospect that germline regeneration, while unlikely to occur in mice, may have some basis in primates.
Eggan et al. (28)	2006		Used parabiotic mice to show that ovulated oocytes do not come from circulating stem cells
Bristol-Gould et al. (7)	2006		Showed that follicle numbers gradually decline in the ovary with age and used mathematical modeling to determine that de novo follicle production is not required to support fertility
Sottile (29)	2007		This paper examines the evidence leading to the current debate and considers the implications of such findings for the field of bone marrow transplantation.

## Scientific Debates

2004년 Telfer는 다음과 같은 말로 이 논쟁의 시작을 경고했었다. "If the dogma is to be debunked and a new one accepted, at least in the mouse, it is sure to be challenged and tested, as should all dogma. This is the way of science and scientists".<sup>25</sup> 또한 같은 해 Bazer는 "In either case, strong science is challenging conventional wisdom so that what we define as "truth" is based on the strongest possible evidence" 라고 말하기도 했다.<sup>20</sup> 결국, 어떤 주장이 진실로 받아들여지기 위해서는 누구라도 그것을 받아들일 수 있는 확실한 과학적 증거를 보이면 될 것이다.

그런 점에서, Tilly 그룹의 주장은 몇 가지 확실치 못한 문제점을 내포하고 있다.<sup>9,23,26,27</sup> 먼저 apoptosis에 의해 죽어가는 난포와 건강한 난포의 숫자를 측정하는 조직학적인 방법은 매우 주관적이라는 점이다. 더군다나, 이들이 사용한 follicle atresia criteria는 일반적으로 받아들여지고 있는 방법 즉, 성장을 재개한 난포의 과립세포의 apoptosis를 관찰하는 것과는 달리 primordial, primary, preantral stage 난포 모두에서 그 안에 있는 난자의 형상 (convoluted, condensed, fragmented)만을 기준으로 삼았다는 것이다. 또한 formalin 고정법을 사용한 조직학적 방법만으로 건강한 것과 atretic한 것을 결정한 이들의 분류법에 문제점이 다분히 있을 것으로 많은 학자들이 우려함을 표현하였다.<sup>9,30</sup> 또, 이들은 proliferating germ lineage 세로가 난소표면에 있다는 사실을 prophase I 이전에 발현하는 유전자 (Sp3, Spo11, Dmc1)의 존재를 RT-PCR로 측정하여 보고하였는데, 성체의 난소에서 이들의 발현을 관찰할 수 없었다는 보고가 이미 발표되어 있기도 하다.<sup>31,32</sup>

또 의문점을 갖게 되는 것은 이들이 사용한 busulphan의 효과가 mitotic germ cell에만 영향을 미치고, primordial follicles에는 영향이 없을 것이라는 이 약제의 기능에 대한 가정과 마지막으로 이들이 제작하여 관찰한 chimeric ovary의 결과인데, GFP-발현 난자와 WT 과립세포로 이루어진 난포가 몇 개나 만들어진 것인지, 또 그 반대의 경우 (WT 난자주변에 GFP 발현 과립세포로 이루어진 난포)에 대한 가능성이 배제되었다는 점 등이 2004년 논문의 결과에 대해 여러 가지 의문을 품게 하는 문제들이다. Byskov 등은 BrdU를 주입하고 Tilly 그룹과 같은 criteria를 가지고 난포를 측정하려는 시도를 통해 동일한 결론을 얻지 못하였다고 보고한 바 있다.<sup>30</sup>

2004년 첫 논문에서 germline stem cells이 생쥐 난소의 surface epithelium에 존재하고 평생 active 하다고 주장하였던 이들은 그러나 거센 반론 때문이었는지, 2005년 논문에서는 스스로 자신들의 첫 논문에서의 주장을 번복하고, 이 germline stem cells의 근원은 extraovarian source일 것으로 가정하고 실험한 결과, doxorubicin으로 난포를 파괴한 생쥐의 성체 난소에서 몇 백 개의 새로운 난자를 24시간 안에 생성해 내었다고 주장하였다. 그리고 이들은 형태학적으로 보나, germ-cell-, oocyte-specific markers를 발현하고 있으며, 난포를 형성, 그 안에 위치하는 것을 확인하였기에 bone marrow transplantation으로부터 germline stem cells이 공급원으로, 성체의 난소에서도 난자가 만들어진다고 주장하였다.<sup>11</sup>

이 결과는 정상적으로 발생하는 생쥐의 난소에서 mitotic germ cell이 meiosis를 거쳐diplotene stage에 멈추고 난포를 형성하는 일련의 과정이 적어도 1주일이 걸리는 것에 비하면 놀랍게 빠른 속도다. 이미 in vitro에서 stem cells로부터 난자를 만들어내고,<sup>33</sup> 정자를 만들어 내었던 결과<sup>34</sup>가 보고된 것으로 미루어, bone marrow로부터 germline stem cells이 만들어질 수 있다는 사실은 가능할 수 있을 것이라고 받아들인다고 하더라도, 이와 같은 기전이 실제로 정상적인 난소에서도 난자를 생성하는 기전으로 일어나고 있는가 하는 것은 아직 증거를 제시하지 못하고 있다. 앞으로 이들 germline stem cells을 분리해 내고, 그 성장을 규명하고, 이들의 발생학적인 잠재능력을 증명해 보여야 할 것이다.

2006년 Gosden을 중심으로 두 번째 논문에 대한 실험적 검증노력이 시도되었다.<sup>28</sup> 이들은 일반적인 상태와 상해를 입은 상태에서 circulating bone marrow 세포가 배란하는 난자를 만들어 내는지를 확인하기 위하여 parabiotic mouse model system을 이용한 transplantation 실험을 진행하였다. 그 결과, 이들은 bone marrow 세포나,

일반적인 어떤 circulating 세포도 성숙하여 배란하는 난자를 만드는데 기여하지 못한다는 결론을 얻었다.<sup>28</sup>

위의 실험적인 의문점을 차치하고라도, 만약 bone marrow transplantation을 통해 ovarian stem cells이 공급되고 이로써 postnatal oogenesis가 일어난다고 가정할 때, 여전히 몇 가지 해답을 찾을 수 없는 질문도 남는다. 만약 이와 같은 기전이 존재하고 있다면 왜 chemotherapy를 끝낸 젊은 여성들은 일반적으로 다시 난소기능을 회복하지 못하는 것일까? 만약 새로운 난자가 계속 만들어진다면, 35세 이후의 엄마에서 유전학적인 이상이 증가한다는 일은 어떻게 설명할 수 있을까? 이와 같은 기전이 있다면 모든 여성이 겪고 있는 폐경은 어떻게 설명할 수 있는가? Ovarian stem cells이 있어 필요할 때 새롭게 난포를 만들 수 있다면, 왜 수 백만 개의 원시난포가 존재하며 왜 그것들은 그렇게 그냥 죽어가는 것일까?

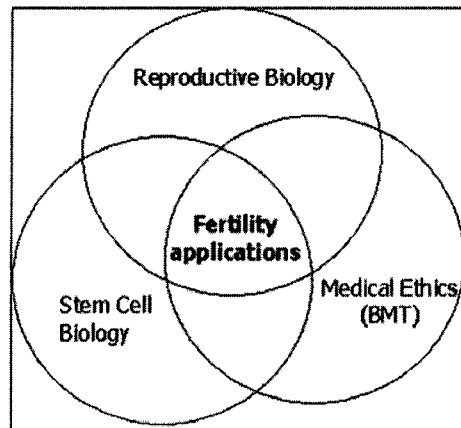
### One More Addition

그런데, 가장 최근에 Journal of Clinical Oncology에 발표된 그들의 세 번째 논문에서는 이들은 BMT 이후에 비록 적은 수이긴 하지만 donor BM-derived 난자가 있음을 cell-tracking 실험을 통하여 확인할 수 있었음에도 불구하고, 태어난 생쥐들은 donor-origin이 아니라 recipient-origin이었다고 보고하였다.<sup>16</sup> 그러나 저자들은 비록 직접적으로 증명할 수는 없으나, 이 결과는 BMT가 chemotherapy로부터 난자를 보호한다든지 혹은 recipient의 oogenesis를 새롭게 시작하게 함으로 long-term fertility를 회복시킨 것은 아니고, 일단은 chemotherapy로 손상되어 버린 oogenesis를 BMT가 reactivating 시킨 것으로 해석하였다. 이들은 BMT-reversible manner 라고 표현하였고, oogenesis의 cell cycle arrest와 같은 세포의 성상을 변화시킨다든지 하는 직접적인 효과일 수도 있고, 혹은 supporting microenvironments (niches)를 변화시키는 간접적인 효과일 수도 있을 것으로 추론하였다. 또한, transplant된 세포에 의해 분비되는 인자들이나, 혹은 실제적으로 transplant된 체세포들에 의해 chemotherapy로 손상된 난소가 회복된 것으로 추론하기도 하였다. 이 결과는 이제까지 아주 극소수의 여성에서지만, 암 치료를 받은 젊은 여성에서 BMT 결과 fertility가 회복되었던 결과 보고들과 비교해 보았을 때, chemotherapy로 손상된 ovarian stroma 혹은 niche가 BMT를 통해 회복되는 것이 아닐까 추측하였다.<sup>19</sup>

### Potentials but Considerations

1992년, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 방법으로 첫 아기가 탄생하면서 그 방법의 과감성으로 인해 많은 찬반과 우려의 목소리가 있었음에도 불구하고 이제는 ICSI가 남성불임의 치료에 획기적인 기여를 하고 있는 사실을 돌아보건대,<sup>35</sup> 만약 사람에서도 ovarian stem cell이 있어 새로운 난자를 만들 수 있다면 젊은 나이에 조기 폐경이나 chemotherapy 등으로 fertility를 잃을 경우와 같이 현재로서는 해결방법이 없는 여성불임의 마지막 허들도 넘을 수 있게 됨으로써 많은 여성들에게 희망을 줄 수 있게 될 것이다. 그러나 아직 생쥐에서의 본 연구결과에 대한 과학적 증거가 확실치 못하고, 이와 같은 상황에서 이 결과를 임상에 접목하기는 더더욱 성급하고 위험스러운 일이 아닐 수 없다. 따라서 이 가설이 갖고 있는 매력과 그 잠재적 의미를 생각할 때, Tilly 그룹의 관찰결과에 대한 조금 더 확실하고 명료한 과학적 증거가 이루어져야 할 것이며 또한 다른 연구자들에 의한 재현성도 검증됨 후에야 여성의 불임치료에 접목할 수 있음을 이야기 해야 할 것이다.

그러나 만약 Tilly 그룹의 주장대로 이 가설이 사람의 난소에서 사실이라면, bone marrow donation을 받아 transplantation을 했을 경우에 일어날 수 있는 문제에 대하여 생각해 보아야 할 것이다. 그들의 주장대로라면, 공여자의 bone marrow로부터 난자가 생성되고, 이 난자가 결국 수여자의 아기로 태어날 수 있는 가능성이 있다고 생각할 때 야기되는 윤리적인 문제에 대한 논의가 야기될 것이며, 이에 대한 의학적, 사회 윤리학적 타당성 검토가 반드시 필요할 것이다 (Figure 2).



**Figure 2.** Concerns in application of bone marrow transplantation for cancer treatment in young women on the basis of hypothesis of ovarian stem cells that originate from bone marrow.

이제까지 50여 년간 학계의 거의 모든 연구자가 받아들이고 있는 도그마를 흔들고 있는 주장만큼, Tilly 그룹은 조금 더 신중하게 실험결과를 해석하고 학계에 발표했어야 할 의무가 있다고 생각된다. 저자들의 세계의 논문으로부터 일치되지 못한 채, 새롭게 새롭게만 제시된 결과와 주장은 앞으로 찬반의 입장을 떠나, 진실여부를 밝히려는 학계의 노력이 반드시 기울여져야 할 것이다. 또한 저자들이 주장하고 있는 ovarian stem cells의 존재와 그 원천이 BMT라고 하는 사실에 대해서는, 그 사실여부에 따라 앞으로 파급될 임상의학에의 접목 등을 고려하여 더더욱 신중하게 진실여부가 밝혀져야 할 것이다. 누구나 동의하고, 누구나 재현할 수 있는 실험방법과 결과를 통한 정확한 과학적 입증이 이루어 질 때에만 진실로 받아들여질 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21: 200-14.
2. Gosden RG, Laing SC, Felicio LS, Nelson JF, Finch CE. Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod* 1983; 28: 255-60.
3. McClellan KA, Gosden RG, Taketo T. Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Dev Biol* 2003; 258: 334-48.
4. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 7: 1342-6.
5. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994; 50: 653-63.
6. Faddy MJ. Follicle dynamics during ovarian ageing. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 43-8.
7. Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, et al. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol* 2006; 298: 149-54.
8. Zuckerman S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* 1951; 6: 63-109.
9. Greenfeld C, Flaws JA. Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. *Bio Essays* 2004; 26: 829-32.
10. 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. Erratum in: *Nature* 2004; 430: 1062.
11. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in

- bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005; 122: 303-15.
12. Kingery HM. Oogenesis in the white mouse. *J Morphol* 1917; 30: 261-315.
  13. Arai H. On the postnatal development of the ovary (Albino rat), with especial reference to the number of ova. *Am J Anat* 1920; 27: 405-62.
  14. Simkins CS. Development of the human ovary from birth to sexual maturity. *Am J Anat* 1932; 51: 465-505.
  15. Peters H, Levy E, Crone M. DNA synthesis in oocytes of mouse embryos. *Nature* 1962; 196: 915-6.
  16. Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, et al. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3198-204.
  17. Spradling AC. Stem cells: more like a man. *Nature* 2004; 428: 133-4.
  18. Kerr JB, Duckett R, Myers M, et al. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction* 2006; 132: 95-109.
  19. Oktay K, Oktem O. Regeneration of oocytes after chemotherapy: connecting the evidence from mouse to human. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3185-7.
  20. Bazer FW. Strong science challenges conventional wisdom: new perspectives on ovarian biology. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 28.
  21. Feng HL, Han YB, Hershlag A, Yang H. New hope for infertility therapy: fabricating gametes from stem cells. *Arch Androl* 2006; 52: 233-8.
  22. Kayisli UA, Seli E. Stem cells and fertility: what does the future hold? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18: 338-43.
  23. Albertini DF. Micromanagement of the ovarian follicle reserve do stem cells play into the ledger? *Reproduction* 2004; 127: 513-4.
  24. Gosden RG. Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? *Human Reprod Update* 2004; 10: 193-5.
  25. Telfer EE. Germline stem cells in the postnatal mammalian ovary: a phenomenon of prosimian primates and mice? *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 24.
  26. Telfer EE, Gosden RG, Byskov AG, et al. On regenerating the ovary and generating controversy. *Cell* 2005; 122: 821-2.
  27. Hutt KJ, Albertini DF. Clinical applications and limitations of current ovarian stem cell research: a review. *J Exp Clin Assist Reprod* 2006; 3: 6.
  28. Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* 2006; 441: 1109-14.
  29. Sottile V. Bone marrow as a source of stem cells and germ cells? Perspectives for transplantation. *Cell Tissue Res* 2007; 328: 1-5.
  30. Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY. Eggs forever? *Differentiation* 2005; 73: 438-46.
  31. Hodges CA, LeMaire-Adkins R, Hunt PA. Coordinating the segregation of sister chromatids during the first meiotic division: evidence for sexual dimorphism. *J Cell Sci* 2001; 114: 2417-26.
  32. Keeney S, Baudat F, Angeles M, et al. A mouse homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* meiotic recombination DNA transesterase Spo11p. *Genomics* 1999; 61: 170-82.
  33. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300: 1251-6.
  34. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem

cells. *Nature* 2004; 427: 148-54.

35. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.