

## 배아줄기세포의 인슐린 분비세포로의 유도 분화에 대한 연구

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실<sup>1</sup>, 산부인과<sup>2</sup>  
미즈메디병원 의과학연구소<sup>3</sup>

성지혜<sup>1</sup> · 임천규<sup>1</sup> · 최혜원<sup>1</sup> · 이형송<sup>1</sup> · 신현상<sup>1</sup> · 전진현<sup>1\*</sup> · 윤현수<sup>3</sup> · 궁미경<sup>2</sup>

### Induced Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin Secreting Cells

Ji Hye Sung<sup>1</sup>, Chun Kyu Lim<sup>1</sup>, Hye Won Choi<sup>1</sup>, Hyoung Song Lee<sup>1</sup>, Hyeonsang Shin<sup>1</sup>,  
Jin Hyun Jun<sup>1\*</sup>, Hyun Soo Yoon<sup>3</sup>, Mi Kyoung Koong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Reproductive Biology & Infertility <sup>2</sup>Department of Ob/Gyn  
Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea  
<sup>3</sup>MizMedi Hospital, Medical Research Center, Seoul, Korea

**Objective:** Embryonic stem (ES) cells could be differentiated into the specific cell types by alternation of culture condition and modification of gene expression. This study was performed to evaluate the differentiation protocol for mouse and human ES cells to insulin secreting cells.

**Methods:** Undifferentiated mouse (JH-1) and human (Miz-hES1) ES cells were cultured on STO feeder layer, and embryoid bodies (EBs) were formed by suspension culture. For the differentiation, EBs were cultured by sequential system with three stage protocol. The differentiating ES cells were collected and marker gene expressions were analyzed by semi-quantitative RT-PCR in each stage. Amount of secreted insulin levels in culture media of human ES cells were measured by human insulin specific RIA kit.

**Results:** During the differentiation process of human ES cells, GATA-4,  $\alpha$ -fetoprotein, glucose transporter-2 and Ngn-3 expression were increased whereas Oct-4 was decreased progressively. Insulin and albumin mRNAs were expressed from stage II in mouse ES cells and from stage III in human ES cells. We detected 3.0~7.9  $\mu$ U/ml secretion of insulin from differentiated human ES cells by in vitro culture for 36 days.

**Conclusion:** The sequential culture system could induce the differentiation of mouse and human ES cells into insulin secreting cells. This is the first report of differentiation of human ES cells into insulin secreting cells by in vitro culture with serum and insulin free medium.

**Key Words:** Embryonic stem cell, Insulin secreting cell, Differentiation, Sequential system, Serum and insulin free medium

초기 포배기 배아의 미분화된 내세포피에서 유  
래한 배아줄기세포에 관한 연구는 Evans와 Kaufman

(1981)에 의해 생쥐 배아줄기세포주의 확립이 보고  
되면서 많은 연구들이 시행되어 왔다.<sup>1</sup> 또한, 인간

주관책임자: 전진현, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실  
Tel: (02) 2000-7590, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: junjh55@hanmail.net

\*본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어 연구개발 사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (SC12022)으로 수행되었습니다.

에서의 체외수정 및 배아이식술 (*in vitro fertilization and embryo transfer*) 분야에 대한 많은 연구가 진행됨에 따라 Thomson 등 (1998)에 의해 최초로 인간의 배아줄기세포주 (*human embryonic stem cell line*)가 확립되었고, Shambloott 등 (1998)에 의해 인간 배아생식세포주 (*human embryonic germ cell line*)의 확립이 보고되었다.<sup>23</sup> 그 후 국내·외의 여러 연구진에 의해 인간 배아줄기세포주가 확립되었음이 보고되었다.<sup>45</sup>

이러한 배아줄기세포로부터 유도 분화된 특정 세포들은 질환 모델 동물에 이식되어 그 세포들의 생체 내 생리학적 기능이 검증되었다. 그 예로, 척수 손상에 따른 운동장애의 개선, myelin 생성의 증가 및 증상 호전, 혈당량 조절을 통한 당뇨병의 개선, dopaminergic 신경세포의 이식을 통한 파킨슨병의 치료 등이 보고됨으로써 이를 이용한 세포치료의 높은 가능성을 시사해주고 있다.<sup>6~9</sup>

인간에서 나타나는 여러 가지 질병들 중에서 당뇨병은 성인의 5~10%에서 나타나는 흔한 질환으로 그 빈도가 점차 증가하여 전 세계적으로 2000년에는 1300만 명이, 2005년에는 3000만 명이 이환될 것으로 추정되고 있다. 당뇨병은 두 가지 형태로 존재하는데 인슐린 의존형 (*insulin-dependent type, IDDM, type 1*) 과 인슐린 비의존형 (*non-insulin-dependent type, NIDDM, type 2*)이 있다. 그 중에서 Type 1은 매일 인슐린 주사를 맞아야 하고 많은 합병증, 즉, 신장장애, 망막질환, 신경장애 등을 초래하게 되는데, 이는 췌장의  $\beta$ -세포가 자가면역세포에 의해 파괴되기 때문에 발생하는 것으로 알려지고 있다. 때로는 급성 합병증인 *diabetic ketoacidosis, hypo-* 또는 *hyperglycemia*나, 만성 합병증인 *nephropathy, neuropathy, retinopathy, cardiovascular disease* 등으로 생명을 위협 받게 된다. 당뇨병은 철저한 혈당량 조절과 인슐린의 지속적인 투여가 필요한데, 이는 환자에게 큰 부담이 되며 때로는 조절이 불가능하여 췌장이식이나 췌장의 *islet cell* 이식을 시도하여야 한다. 그러나 이를 위해서는 많은 췌장의 공여가 이루어져야 하고 면역 거부반응, 면역억제에 따르는 합병증, 수술의 위험 등을 수반하게 된다. 따라서 줄기세포를 인슐린 분비세포로 분화시켜 세포치료에 이용하면 많은 당뇨병 환자를 반복적인 인슐린 주사로부터 해방시킬 수 있을 것이다.

Lumelsky 등 (2001)은 생쥐 배아줄기세포를 인슐

린 분비 세포 및 췌도유사세포로 분화시키는데 성공하였고, Assady 등 (2001)은 인간의 배아줄기세포를 췌장  $\beta$ -세포로 분화시켜 인슐린 분비 및 당뇨병 증상 개선이 가능하다고 발표하였다.<sup>10,11</sup> 근래에는 배아줄기세포를 인슐린 분비세포로 분화시키기 위한 분화 인자, 배양 조건, 생체 내 이식 등과 관련된 연구들이 진행되어 그 효율성이 보고되고 있다.<sup>12~17</sup> 이러한 연구들의 궁극적인 목표는 임상적으로 이용 가능한 인슐린 분비세포로의 분화를 유도하고, 이들을 환자에게 이식하는 세포치료를 통해 당뇨병을 극복하는데 있다. 따라서, 본 연구에서는 생쥐 배아줄기세포를 이용하여 단계적 배양법의 효율성을 확인하고, 이러한 배양법을 발전시켜 혈청과 인슐린이 존재하지 않는 배양액을 이용하여 인간 배아줄기세포의 인슐린 분비세포로의 분화를 유도하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 단계적 배양법을 이용한 생쥐 및 인간 배아줄기세포의 분화 유도

일차적으로 생쥐 배아줄기세포를 대상으로 단계적 배양법의 효율성을 확인하였다. 최근에 보고되었던 Lumelsky 등과 Moritoh 등의 생쥐 배아줄기세포의 인슐린 분비 세포로의 유도 분화 방법을 참고하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.<sup>10,16</sup> 계대배양 중인 생쥐 배아줄기세포 (JH-1)를 수확하고, 부유 배양법을 이용하여 미분화 줄기세포에서 배아체 (*embryoid body*)의 형성을 유도하였다. 이를 *insulin, transferrin, sodium selenate, fibronectin* 등이 첨가된 ITSFn 배양액에서 6일 동안 배양하고 (*stage-I*), *nicotinamide, insulin, EGF, FGF* 등이 첨가된 N2 배양액에서 8일 동안 배양하였다 (*stage-II*). 마지막 단계에서는 N2 배양액에 B27 supplement를 첨가하여 22일 동안 배양하였다 (*stage-III*). 각각의 분화 단계에서 세포들을 수확하여, Table 1에 나타낸 인슐린 분비세포로의 분화 관련 유전자에 대한 RT-PCR을 수행하여 분화 특이성을 확인하였다.

### 2. 인슐린이 첨가되지 않는 배양액을 이용한 인간 배아줄기세포의 분화 유도

위에서 기술한 단계적 배양법을 발전시켜 인슐린

**Table 1.** List of marker genes for differentiation of mouse embryonic stem cells

Genes	Sequences	Product sizes
Insulin 1	5'-ccagctataatcagagacca-3' 5'-gtgtagaagaagccacgct-3'	197 bp
Insulin 2	5'-tccgctacaatcaaaacacat-3' 5'-gctggtagtagtggtggtcta-3'	411 bp
Glucagon	5'-actcacagggcacattcacc-3' 5'-ccagtgatgaagtcctg-3'	353 bp
Somatostatin	5'-tcgctgctgctgaggacat-3' 5'-gccaaagtactctgcccattc-3'	232 bp
IAPP	5'-actagctcagcacagcagat-3' 5'-agacaagagagctgcaagt-3'	364 bp
Pdx-1	5'-acatgaacagtggagagca-3' 5'-tcctctgttttctcgggt-3'	451 bp
Pax-4	5'-aatggcgcaggcaagagaa-3' 5'-atgagggaagccacagga-3'	280 bp
Isl-1	5'-agatatggagacatggcgat-3' 5'-acacagcggaaactcagtg-3'	327 bp
Ngn-3	5'-tggcactcagaaacagcga-3' 5'-accagagccagacaggtct-3'	444 bp
Beta-2	5'-cttgccaagaactacatctg-3' 5'-ggagtagggatgaccgggaa-3'	222 bp
Nkx2.2	5'-aacctgcccacgcctcaaa-3' 5'-aggcctaaggcctccagct-3'	220 bp
Glucose transporter-2	5'-cggtaggactgtgctgctg-3' 5'-ctctgaagacgccgaattccat-3'	416 bp
Glucokinase	5'-tggatgacagccagatgg-3' 5'-actctgagcctctgggtg-3'	208 bp
Kir6.2	5'-ggctcctagtgcctgcacca-3' 5'-ccacagccacactgcctgcg-3'	317 bp
PC2	5'-agagattcattgtgtggga-3' 5'-caaaatggactgtgtgcca-3'	215 bp
Oct-4	5'-acctccccatggc-3' 5'-actgatctttgcccttctg-3'	855 bp
GAPDH	5'-accacagtcctgccatcac-3' 5'-tccaccacctgtgtgta-3'	452 bp
$\beta$ -actin	5'-gtatgcctctggtgtacca-3' 5'-cttctgcatcctgtcagca-3'	499 bp

이 존재하지 않는 배양액을 이용하여 인간 배아줄기 세포의 분화를 유도하였다. 계대배양 중인 인간 배아줄기세포 (Miz-hESC1)를 수확하고, 부유 배양법을 이용하여 미분화 줄기세포에서 배아체 (embryoid

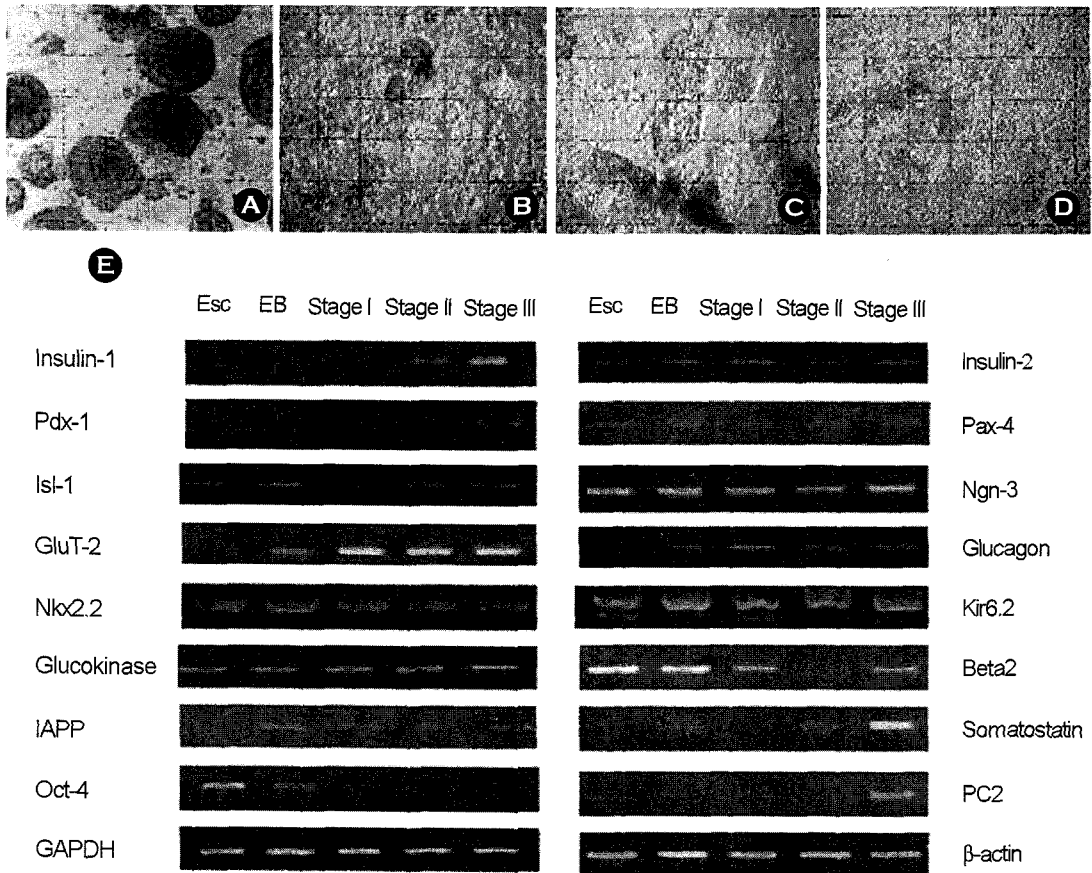
**Table 2.** List of marker genes for differentiation of human embryonic stem cells

Genes	Sequences	Product sizes
Insulin	5'-gccttgtgaaccaacacctg-3' 5'-gttcagtagtctccagctg-3'	261 bp
Pdx-1	5'-ccatgtagaagtctacc-3' 5'-gtcctcctctttccac-3'	262 bp
$\alpha$ -fetoprotein	5'-tgaaaacctcttgaatgcc-3' 5'-tctgtctcatcgtttgcag-3'	492 bp
Glucose transporter-2	5'-aaccagctttttcagacgg-3' 5'-agcactccagcaagagaa-3'	441 bp
Sox-17	5'-agtgacgaccagagccagac-3' 5'-ccttagccacacatgaaa-3'	214 bp
Ngn-3	5'-cccttactctcccagctcc-3' 5'-ccttacccttagcaccaca-3'	176 bp
GATA-4	5'-gacggctactatctgtgcaac-3' 5'-agacatcgactgactgagaac-3'	475 bp
Somatostatin	5'-cccagactccgtcatttct-3' 5'-ccatagccgggtttgagta-3'	205 bp
Glucagon	5'-ctcagtgatctgatcagatgaac-3' 5'-agtccctggcggcaagattcaag-3'	370 bp
Oct-4	5'-cgtgaagctggagaaggagaagctg-3' 5'-aaggccgcagcttacatgttc-3'	244 bp
GAPDH	5'-agccacatcgctcagacacc-3' 5'-gtactcagcggccagcatc-3'	302 bp
$\beta$ -actin	5'-tggcaccacacctctacaatgagc-3' 5'-gcacagcttctcctaagtgcacgc-3'	296 bp

body)의 형성을 유도하였다. 이를 ITSFn 배양액에서 6일 동안 배양하고 (stage-I), N2 배양액 또는 insulin 대신에 IGF-I과 IGF-II를 첨가한 N2-insulin free 배양액에서 각각 8일 동안 배양하였다 (stage-II). 마지막 단계에서는 N2, N2+B27 또는 N2-insulin free, N2+B27-insulin free 등의 배양액에서 각각 22일 동안 배양하였다 (stage-III). 각각의 분화 단계에서 세포들을 수확하여, Table 2에 나타난 유전자들에 대한 RT-PCR을 수행하였다.

### 3. 유도 분화된 세포에서 RIA 방법으로 인슐린 분비량 측정

인간 배아줄기세포에서 최종적으로 유도 분화된 stage-III 세포들에서 실제적인 인슐린 분비 여부를



**Figure 1.** Morphological observation (A~D) and RT-PCR analysis (E) during the differentiation of mouse embryonic stem cells. **A:** EB stage, **B:** Stage-I (TTSFn for 6 days), **C:** Stage-II (N2 for 8 days), **D:** Stage-III (N2 for 22 days), **E:** Gel electrophoresis of RT-PCR products by sequential culture system. GAPDH and  $\beta$ -actin gene were used as internal controls.

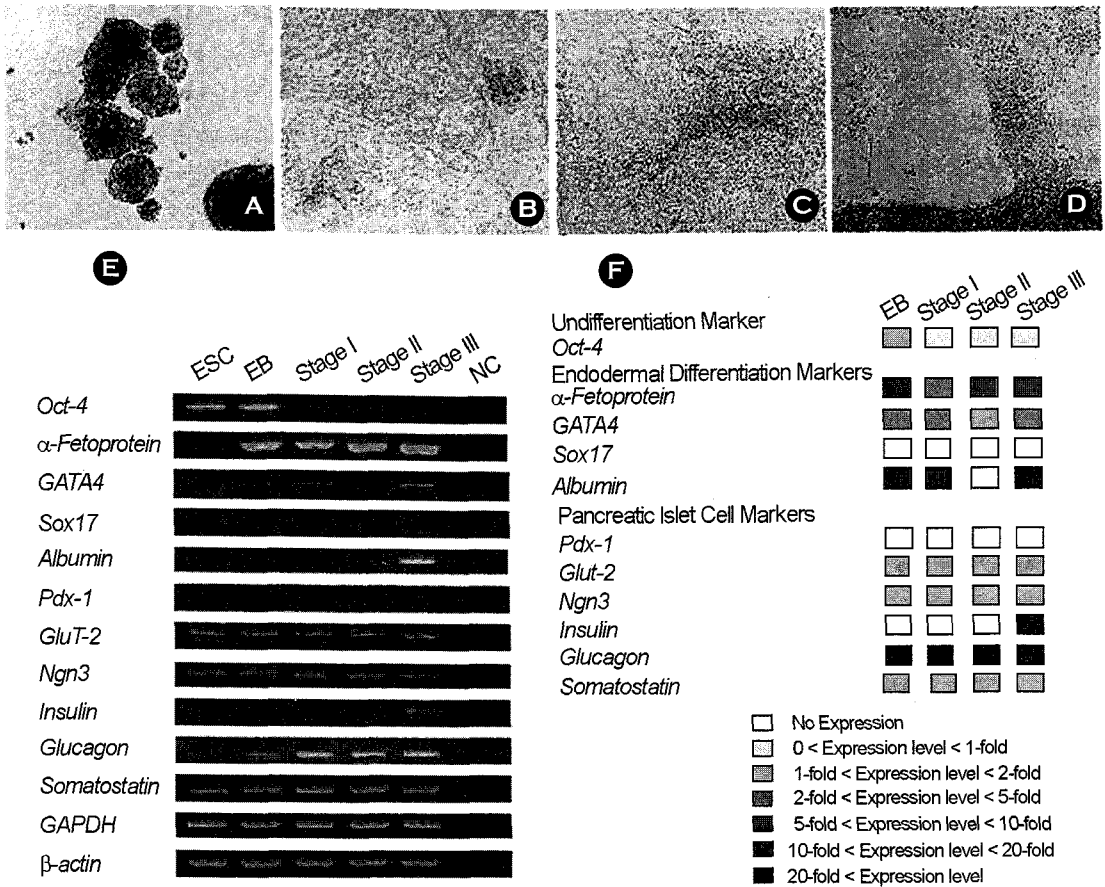
확인하기 위해 인간의 인슐린에 특이적인 RIA kit (Linco Research Inc., USA)를 사용하였다. 유도 분화된 세포를 0.1% bovine serum albumin (BSA)과 5 mM glucose 가 첨가된 Krebs buffer에서 각각 10분 동안 두 번 수세하고, glucose에 대한 반응을 확인하기 위해 5 mM 또는 25 mM glucose가 포함된 Krebs buffer에서 3시간 동안 배양한 후, 배양액을 수확하여 인슐린 농도를 측정하였다. 본 연구에 사용한 RIA kit는 인간의 insulin에 특이적으로 반응하며, 세포를 배양하지 않은 배양액에 첨가한 bovine insulin과는 반응하지 않음 ( $<0.1 \mu\text{U/ml}$ )을 확인하였다. Standard와 quality control sample 그리고 시료에 대한 radio activity를 gamma counter를 이용하여 측정하고 automated data reduction procedure를 사용하여, 시료

내의 human insulin을  $\mu\text{U/ml}$  단위로 계산하였다. 인슐린 분비량에 대한 통계적인 분석은 Kruskal-Wallis ANOVA test와 Dunn's multiple comparison test를 이용하였다. 분석 후 p 값이 0.05보다 작은 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 생쥐 배아줄기세포의 인슐린 분비세포로의 분화 유도

단계적 배양법을 이용하여 생쥐 배아줄기세포의 분화를 유도하였다. 분화과정에서 세포들의 형태적인 변화를 관찰할 수 있었으며 (Figure 1 A-D), 인슐린 분비세포로의 분화 관련 유전자들의 발현 양상



**Figure 2.** Morphological observation (A~D) and RT-PCR analysis (E, F) during the differentiation of human embryonic stem cells. **A:** EB stage, **B:** Stage-I (ITSFn for 6 days), **C:** Stage-II (N2 for 8 days), **D:** Stage-III (N2 for 22 days). **E:** Gel electrophoresis of RT-PCR products by sequential culture system. **F:** Schematic interpretation of the expression pattern of marker genes. Data were calculated by the expression ratio of each group to undifferentiated human embryonic stem cells.

을 RT-PCR 방법으로 확인할 수 있었다 (Figure 1 E). 생쥐 배아줄기세포의 분화과정에서 미분화 관련 유전자인 Oct-4 유전자 발현의 감소를 확인할 수 있었으며, 인슐린 분비세포와 관련이 있는 유전자들의 발현량이 분화가 진행됨에 따라 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, insulin-1, Pdx-1, somatostatin과 PC2 유전자의 발현은 stage-III에서 현저하게 증가하였다.

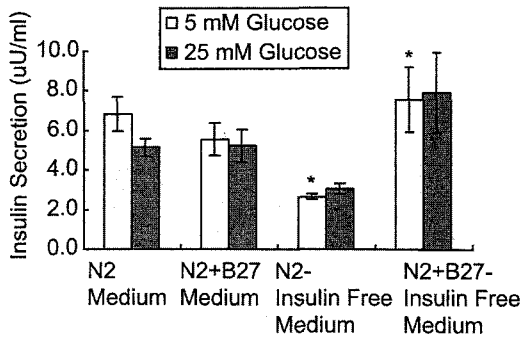
## 2. 인간 배아줄기세포의 인슐린 분비세포로의 분화 유도

단계적 배양법을 이용하여 인간 배아줄기세포의 분화를 유도하였으며, 분화과정에서 다양한 형태의 세포들을 관찰할 수 있었다 (Figure 2 A-D). 인슐린

분비세포로의 분화 과정에서 Oct-4와 같은 미분화 관련 유전자는 발현량이 점차적으로 감소되었으며, GATA-4, alpha fetoprotein, glucose transporter-2, Ngn-3 등과 같은 내배엽성 분화 인자들의 발현이 점차적으로 증가하였다. 또한, albumin과 insulin에 대한 mRNA는 인간 배아줄기세포의 분화과정 stage-III에서 그 발현이 확인되었다 (Figure 2 E). 이러한 유전자들의 발현 양상을 semi-quantitative RT-PCR 방법을 이용하여 정량적으로 분석하였다 (Figure 2 F).

## 3. 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 세포에서의 인슐린 분비량

최종적으로 분화시킨 인간 배아줄기세포 (stage-III)



**Figure 3.** Amount of secreted insulin from differentiated human embryonic stem cells (stage-III). \* $p < 0.05$ .

의 인슐린 분비량은 Figure 3에 나타난 바와 같이 3.0~7.9  $\mu\text{U/ml}$ 으로 측정되었다. 마지막 단계에서의 분화 조건에 따른 인슐린 분비량은 인슐린이 첨가된 N2 배양액과 N2+B27 배양액을 사용한 경우는 비슷하였지만, 인슐린을 첨가하지 않은 N2-insulin free 배양액에서는 5 mM glucose 조건에서  $3.0 \pm 0.2 \mu\text{U/ml}$ 로 N2+B27-insulin free 배양액에서의  $7.9 \pm 2.0 \mu\text{U/ml}$ 에 비해 통계적으로 유의하게 낮게 측정되었다 ( $p < 0.05$ ). 유도 분화된 세포들에서 고농도의 glucose에 의한 인슐린 분비량의 증가는 관찰할 수 없었다.

## 고찰

본 연구에서는 지금까지 보고되었던 배아줄기세포의 인슐린 분비세포로의 유도 분화 방법을 적용하고 발전시켜, 인간 배아줄기세포를 혈청과 insulin이 첨가되지 않은 배양액을 이용하여 인슐린 분비세포로 유도 분화시킬 수 있었다. 이와 같은 단계적 배양법은 인슐린 분비세포뿐만 아니라 다른 종류의 특정 세포로의 유도 분화에도 이용이 가능하리라 생각된다.

이러한 특정 세포로의 유도 분화는 궁극적으로 현재의 치료 방법으로 치유가 어려운 난치병들에 대한 세포치료를 목적으로 진행되고 있다. 본 연구에서 유도 분화시킨 인슐린 분비세포를 이용한 당뇨병 치료 가능성을 확인하기 위해 고농도의 glucose에 대한 반응을 살펴보았으나, 일반적인 췌장의  $\beta$ -세포에서 관찰되는 인슐린 분비의 증가를 확인하지 못하였다. 이는 최근에 보고된 Sipione 등 (2004)의

연구에서와 같이 배아줄기세포로부터 분화된 인슐린 분비세포가 glucose에 반응하지 않음과 유사한 결과를 나타내었다.<sup>18</sup> 따라서, 실제적인 세포치료에 이용하기 위해서는 보다 정교한 분화 유도 과정을 통해 생체 내에서 glucose 농도에 반응하는 인슐린 분비세포로 분화시키는 것이 필수적이다.

그러나 생쥐 배아줄기세포를 이용한 연구에서 인슐린 분비세포의 분화과정에서 중요한 역할을 수행하는 Pax-4 유전자의 과발현을 유도하여 효과적으로 유도 분화가 가능성이 보고되었다.<sup>14</sup> 또한, Moritoh 등 (2003)도 유전자 도입방법을 이용한 Pdx-1의 일시적인 발현 유도를 통해 여러 종류의 췌장세포로 분화시키는데 성공하였다.<sup>16</sup> 최근에는 Nkx6.1 promoter를 이용하여 세포를 선별하고 pancreatic rudiment (embryonic day 17.5)와의 공동배양을 통해 당뇨병 동물 모델시스템에서 세포치료에 성공하였다는 보고가 있었다.<sup>19</sup> 또한, 인간 배아줄기세포를 이용하여 본 연구와 유사한 단계적 배양법과 이로부터 얻어진 cell clusters를 분리한 후 배양하면 보다 효율적으로 인슐린 분비세포를 확보할 수 있음이 보고되었다.<sup>20</sup>

현재까지 여러 연구자들의 보고들을 종합해 보면 인간 배아줄기세포를 이용하여 췌장의  $\beta$ -세포와 같은 생리학적인 특성을 지니는 세포로의 분화에는 아직까지 성공하지 못하였지만, 생쥐 배아줄기세포를 이용한 연구와 최근의 몇몇 연구들에서 배아줄기세포를 이용한 당뇨병에 대한 세포치료 가능성은 계속해서 제시되고 있다. 향후 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화된 인슐린 분비세포에 대한 연구가 지속적으로 수행된다면, 현대 의학으로 치유하기 어려운 당뇨병 환자에게 새로운 희망을 줄 수 있는 세포치료제 개발이 가능할 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. Evans MJ, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential stem cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 151-6.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.

3. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 113-8.
4. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404.
5. Park JH, Kim SJ, Oh EJ, Moon SY, Roh SI, Kim CG, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod* 2003; 69: 2007-14.
6. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999; 5: 1410-2.
7. Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science* 1999; 285: 754-6.
8. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycaemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-62.
9. Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, Ratliff J, Isaacson O. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol* 1998; 149: 28-41.
10. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; 292: 1389-94.
11. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki K, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50: 1691-7.
12. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16105-10.
13. Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 2002; 143: 3152-61.
14. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus A. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 998-1003.
15. Houard N, Rousseau GG, Lemaigre FP. HNF-6-independent differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 2003; 46: 378-85.
16. Moritoh Y, Yamato E, Tasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J. Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* 2003; 52: 1163-8.
17. Kim D, Gu Y, Ishii M, Fujimiyama M, Qi M, Nakamura N, et al. In vivo functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell. *Pancreas* 2003; 27: 34-41.
18. Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Korbitt GS, Bleackley RC. Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia* 2004; 47: 499-508.
19. Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 2004; 47: 1442-51.
20. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells* 2004; 22: 265-74.