

인간배아줄기세포를 이용한 췌장세포의 유도 분화 및 당뇨병의 세포치료

김슬기 · 심중현 · 우동훈 · 김종훈[†]

고려대학교 생명과학대학 생명공학부 줄기세포연구실

Directed Differentiation of Pancreatic Islets from Human Embryonic Stem Cells and Cell Therapy of Diabetes Mellitus

Suel-Kee Kim, Joong-Hyun Shim, Dong-Hun Woo and Jong-Hoon Kim[†]

Laboratory of Stem Cell Biology, Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-Dong, Seongbuk-Gu, Seoul 136-713, Korea

ABSTRACT : Replacement of insulin-producing cells represents an almost ideal treatment for patients with diabetes mellitus type 1. Transplantation of pancreatic islets of Langerhans is limited by the lack of donor organs. Therefore, generation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells represents an attractive alternative. The present review summarizes the current knowledge on the differentiation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells and their application to the cell therapy for treating diabetes mellitus.

Key words : Human embryonic stem cells, Pancreatic β cells, Differentiation, Diabetes mellitus, Cell therapy.

요 약 : 최근 제 1형 당뇨병을 치료하기 위하여 인슐린-분비성 세포를 이식하는 세포대체요법이 새로운 치료법으로서 주목받고 있다. 그럼에도 불구하고 췌장세포 이식술은 이식원의 절대적인 부족으로 인해 광범위한 시행이 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 무한증식과 전분화능을 보유하는 배아줄기세포는 이식할 β -세포의 부족을 해결할 수 있는 잠재적 세포공급원이 될 수 있을 것으로 기대된다. 본 종설에서는 인간배아줄기세포로부터 췌장 β -세포로의 유도분화방법에 관한 최근 동향을 살펴보고, 당뇨병 치료에 세포 이식술을 적용함에 있어 고려해야할 문제점 및 극복방안들을 소개하고자 한다.

서 론

대표적인 내분비 질환의 일종인 당뇨병은 발생률이 전 세계 인구의 4~5%에 이를 정도로 많은 대사질환이며, 망막질환, 신장질환, 신경질환, 심혈관질환 등 다양한 증증의 2차 합병증을 유발하고, 완치가 매우 어려워 경제/사회/보건학적으로 많은 문제를 갖는 질환이다. 제1형 당뇨병은 자가 면역 이상에 의해 췌장세포 중 인슐린을 분비하는 β -세포가 파괴되어 유발되는 질환이다. 한편, 당뇨병 환자의 약 90% 이상이 속하는 제2형 당뇨병은 인슐린 비의존성으로, 인슐린에

대한 저항성 및 췌장 세포의 기능 장애에 의해 발병된다. 현재 당뇨병의 치료는 식이, 운동 요법 및 인슐린 주사 등이 일반적으로 시행된다. 그러나 이러한 방법으로는 병세의 악화를 일시적으로 차단할 뿐 췌장 β -세포의 기능을 원상태로 회복시킬 수 없으며, 더욱이 과도한 인슐린 투여는 저혈당증을 유발할 수도 있다. 따라서 당뇨병에 대한 보다 근본적인 치료방법으로써 기능을 상실한 췌장세포를 정상적인 췌장이거나 췌장조직으로 대체하려는 시도가 이루어져 왔으며, 췌장 전체를 이식하는 장기 이식과 함께 성공률이 다소 낮은 편이나 시술이 간편하고, 안전하며 반복시술이 가능한 췌장 β -세포 이식에 대한 연구가 진행되어 왔다 (Pavakis & Khwaja, 2006). 그러나 이러한 췌장 이식술의 가장 큰 문제는 공여 췌장의 절대적인 부족이다. 따라서 뇌사자 등의 공여자로부터 얻는 췌장을 대체하기 위한 새로운 췌장 공급원을 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 대상으로 동

본 연구는 고려대학교의 특별연구비 (K0400421) 지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

[†] 교신저자: 서울시 성북구 안암동 5가 1번지, 고려대학교 생명과학대학 생명공학부 줄기세포연구실, (우) 136-713, (전) +82-2-3290-3007, (팩) +82-2-3290-3460, E-mail: jhkim@korea.ac.kr

물 체계, 태아조직으로부터 체계 세포 분리 및 배양, 유전자 조작에 의한 인슐린을 생성하는 세포주 확립, 췌관세포로부터 성체 줄기세포의 분리, 인간 배아줄기세포로부터 체계 β -세포로의 분화 유도 등이 제시되고 있다 (Soria *et al.*, 2001; Serup *et al.*, 2001).

인간 배아줄기세포는 착상 전 배아의 내세포괴를 추출하여 확립된 세포주로서 (Thomson *et al.*, 1998), 적절한 배양 환경에서 오랜 기간 동안 미분화 상태를 유지하며 증식할 수 있고, 정상발생과정과 유사한 과정을 거쳐 인체를 구성하는 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 전능성을 소유한 세포이다. 따라서 이러한 특성은 특정 조직의 사멸 및 손상에 기인하여 유발되는 각종 질환에 대하여 손상된 조직을 재건하기 위한 세포치료에 사용될 가능성을 제시하고 있다. 이러한 가능성은 생쥐 배아줄기세포를 대상으로 수행되어 온 연구 결과들에 의해 지속적으로 제시되어 왔으며, 1988년 인간 배아줄기세포가 최초로 확립된 이후 보다 구체화되어지고 있는 실정이다. 특히 최근 연구들은 인간 배아줄기세포가 신경계 세포 (Carpenter *et al.*, 2001; Reubinoff *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), 심근 세포 (Xu *et al.*, 2002; Mummery *et al.*, 2003), 혈관 내피 세포 (Levenberg *et al.*, 2002), 조혈 모세포 (Kaufman *et al.*, 2001), 간세포 (Lavon *et al.*, 2004), 췌장세포 (Assady *et al.*, 2001), 생식세포 (Kee *et al.*, 2006) 등 다양한 특정 조직으로 분화가 촉진될 수 있음을 증명하고 있으며, 이에 관련된 많은 연구가 세계적으로 진행되고 있는 상황이다. 인간 배아줄기세포로부터 특정 조직으로 분화하는 일련의 과정은 정상발달과정과 매우 유사하게 진행되는 것으로 여겨지고 있다. 따라서 인간 배아줄기세포는 윤리적으로 접근이 불가능한 인간 배아의 초기 발달에 대한 간접적인 연구를 가능케 하며, 각종 조직의 형성에 관여하는 새로운 유전자 및 단백질의 발굴에도 응용될 수 있다.

인간 배아줄기세포의 미분화 특성을 유지하기 위해서는 일반적으로 영양세포층 (feeder layer)과 염기성 섬유아세포 성장인자 (basic fibroblast growth factor, bFGF)의 존재가 필수적인 것으로 알려져 있다. 따라서 인간 배아줄기세포는 이들 두 가지 인자가 존재하지 않는 배양조건에서는 다양한 세포로 자발적인 분화를 개시한다 (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000). 그러나 통제되지 않은 자발적인 분화를 통해서는 단일 종류의 세포로 순도 높은 분화가 이루어질 수 없으며, 따라서 특정세포로의 분화를 촉진하여 원하는 세포를 다량으

로 순도 높게 얻기 위한 능동적인 분화유도기법에 대한 연구가 최근 활발히 이루어지고 있다 (Ponsaerts *et al.*, 2004; Trounson, 2006). 이러한 목적을 달성하기 위하여 일반적으로 고려되고 있는 사항은 (1) 2차원적 단층 배양 및 배아체 형성과 지지체 내에서의 분화 등과 같은 3차원적 배양, (2) 성장인자, 호르몬, 화합물 등과 같은 세포외적 신호의 단독 혹은 조합적 처리, (3) 글루코오스, 아미노산 혹은 산소의 농도 등 배양액 성분의 조절, (4) 혈청 농도의 조절, (5) 특정 세포로의 운명을 결정지을 수 있는 마스터유전자 혹은 원하는 세포의 분리정제를 위한 유전자의 도입, (6) 라미닌, 피브로넥틴, 콜라겐, 비트로넥틴 등의 세포외기질의 선정 등을 들 수 있다.

인간 배아줄기세포로부터의 체계 β -세포의 분화는 당뇨병의 세포 치료를 위한 새로운 체계 공급원으로써의 이용 가능성 때문에 큰 주목을 받고 있음에도 낮은 분화 효율 및 초기 내배엽성 세포들을 효과적으로 추적할 수 있는 적절한 표지인자들의 결여로 인하여 다른 종류의 세포에 비해 분화 유도의 연구 성과가 미비한 편이다. 따라서 본 종설에서는 인간 배아줄기세포로부터 내배엽을 거쳐 기능성 췌장세포로 분화되는 과정에 역할을 담당하는 것으로 알려진 각종 인자들을 살펴보고, 이를 이용하여 최근에 제시된 능동적 분화 유도 기법들을 정리하여 소개하고자 한다. 또한, 인간 배아줄기세포 유래 체계세포의 당뇨병 치료를 위한 이식술로의 응용과 관련된 최근 동향 및 문제점, 극복 방안 등을 제시하고자 한다.

인간 배아줄기세포로부터 췌장내배엽 세포로의 분화

췌장은 초기 발생과정 중 형성된 완전내배엽으로부터 발생된다. 따라서 인간 배아줄기세포로부터 췌장세포로의 분화를 효율적으로 유도하기 위해서는 췌장세포로의 분화에 앞서 완전내배엽으로의 분화를 촉진시키는 것이 필수적으로 선행되어야 한다. 척추동물의 초기 발생과정에서, 내배엽은 외배엽 및 중배엽과 함께 배반포배의 배반엽상층으로부터 분화된다 (Lu *et al.*, 2001; Robb & Tam, 2004). 이 과정, 즉 낭배 형성 과정동안 배반엽상층의 상피세포는 중간엽세포로 전환됨과 동시에 후미 쪽 원시선을 따라 세포층의 내부로 이동하면서 중배엽과 완전내배엽으로 모두 분화될 수 있는 중내배엽을 형성하는 것으로 알려져 있다 (Shook & Keller, 2003; Rodaway & Patient, 2001). 이러한 낭배 형성 과정과

흡사한 과정이 인간 배아줄기세포의 초기 분화과정에서 관찰되어진다. 인간 배아줄기세포의 분화를 억제하기 위하여 공배양하는 영양세포층을 제거한 뒤, 염기성 섬유아세포 성장인자 (bFGF)가 존재하지 않는 배양조건에서 50~100개 정도의 인간 배아줄기세포로 구성된 세포 집합체를 부유 배양할 경우, 구형의 배아체가 형성된다. 이 과정에서 배아체 내에 존재하는 세포들은 정상발생과정과 유사한 방식으로 상호간 분화를 유도하여 내, 중, 외배엽의 삼배엽성 세포로 분화되며, 이와 함께 배아체 표면에는 배아의 내배엽을 형성한다 (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000). 배아체 내에 존재하는 특정 배엽의 형성을 검증하기 위해서는 각 배엽에서 특이적으로 발현되는 유전자 및 단백질 등을 표지인자로 정하여 분석하고 있으나, 현재까지 특정 배엽에서만 배타적으로 나타나는 표지인자는 극히 드문 실정이다. 따라서 다양한 계통의 세포들이 공존하는 분화과정 중에 내배엽성 세포를 구분하기 위해서는 단일 세포 수준에서의 면역형광염색기법이나 RT-PCR, 혹은 웨스턴블롯, 유세포측정법 (flow cytometry) 등의 분석이 요구되어진다.

정상 발생과정 중 내배엽성 세포 및 췌장세포로의 분화에는 Activin 혹은 Nodal과 같은 전이성장인자 β (transforming growth factor β , TGF β), Wnt 성장인자, FGF4, 그리고 레티노산 (retinoic acid)과 같은 인자들이 관여되어 있는 것으로 보인다. *Xenopus laevis* (Gamer & Wright, 1995)와 생쥐 (Tremblay *et al.*, 2000)의 발달과정에서 나타나는 것과 같이, TGF β 신호는 내배엽 발달에 중요한 역할을 하며, 특히 고농도의 TGF β 를 처리한 경우 내배엽으로, 저농도로 처리한 경우 중배엽으로의 분화가 유도되는 것으로 알려져 있다 (Lowe *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2003). 또한, Wnt 수용체가 결여된 생쥐를 이용한 연구를 통하여, Wnt 신호전달과정이 손실된 경우, 원시선의 발달 저하와 함께 후부 내배엽의 형성이 감소된다고 보고된 바 있으며 (Kelly *et al.*, 2004), 레티노산이 결여된 제브라피시 (zebra fish)에서 간과 췌장과 같은 후부 내배엽세포로의 분화가 억제됨을 통해 레티노산이 내배엽의 전후부 패턴을 결정함과 동시에 후부 내배엽으로의 분화를 유도함이 확인되었다 (Stafford & Prince, 2002). 이와 더불어, 낭배기 이후 후부 중배엽에서 발현하는 FGF4는 후부 내배엽의 발달을 증진시켜 췌장 전구세포로의 분화를 촉진시킨다고 알려져 있다 (Wells & Melton, 2000).

인간 배아줄기세포로부터 췌장세포로의 자발적인 분화는

Assady 등 (2001)에 의해 시작되었다. 그러나 분화 수율이 1~3% 미만으로 매우 낮을 뿐 아니라 배양액 내의 글루코스 농도에 반응하여 적절한 양의 인슐린을 분비하지 못하는 한계점이 지적되었다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근에는 앞서 언급한 발생학적 개념을 도입하여 인간 배아줄기세포로부터 췌장의 원기인 내배엽성 세포로의 분화를 우선적으로 촉진시키기 위한 시도가 진행되고 있다. 이 결과, Kubo 등 (2004)은 생쥐 배아줄기세포에 혈청과 TGF β superfamily인 activin A를 처리하여 중내배엽성 세포로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있음을 제시하였으며, Shim 등 (2007)은 중내배엽성 세포로의 분화를 촉진시키기 위하여 혈청을 처리하고, 연이은 완전내배엽성 세포로의 분화에 activin A과 레티노산을 추가적으로 처리하여 췌장 전구세포로의 분화 유도에 성공하였다 (Fig. 1). 또한, D'Amour 등 (2005)은 저농도의 혈청과 고농도의 activin A를 처리하여 Sox17을 발현하는 내배엽성 세포를 80%에 이르는 높은 수율로 분화 유도할 수 있음을 확인하였으며, CXCR4와 같은 화학주성 수용체를 이용하여 내배엽으로 분화시킨 세포를 분리 정제할 수 있음을 보고하였다.

성숙한 췌장 β -세포로의 분화

기능성 췌장 베타세포의 분화와 관련하여 현재까지 학계에 보고된 논문은 대부분 생쥐 배아줄기세포를 대상으로 수행되었으며, 최근 인간 배아줄기세포로부터 췌장세포로의 분화를 시도하는 연구가 이루어지고 있으나 기술적 어려움으로 인해 그 성과가 미비한 실정이다. 생쥐 및 인간배아줄기세포를 이용하여 췌장세포로 분화를 유도하는 실험기법은 신경세포와 췌장세포의 분화과정에 여러 전사조절인자가 서로 공유되어 있는 점과 일부 신경세포에서 인슐린이 합성된다는 점에 착안하여 신경세포 분화 실험기법과 매우 유사한 방법으로 진행되어 왔다. 그러나 이러한 유사점에도 불구하고 인슐린을 발현하는 신경세포는 췌장세포와 비교해 볼 때 명백한 차이점을 나타내며, 가장 중요한 차이점으로는 인슐린 전구체의 생성과 합성 과정, 호르몬에 의한 항상성 유지 등을 들 수 있다. 췌장세포에서 생성되는 인슐린은 혈액 내 글루코스 농도의 항상성을 유지하는 역할을 하는 물질인 반면, 일부 신경세포에서 생성되는 소량의 인슐린은 신경계의 발달에 관여하는 인슐린 유사 성장인자 (insulin-like growth fac-

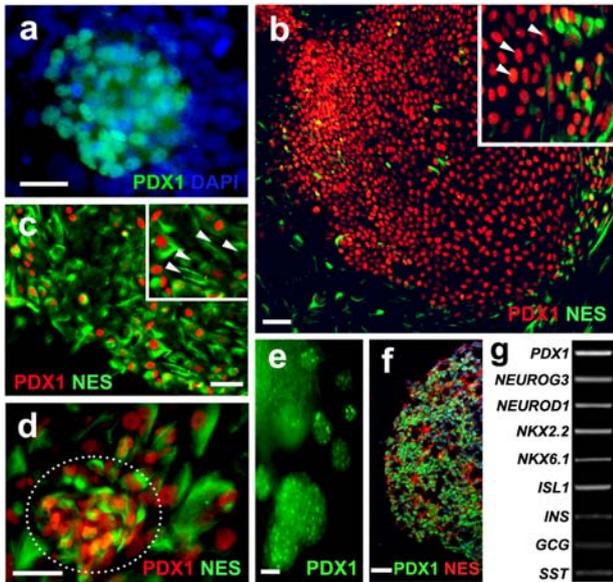


Fig. 1. Production of NES in PDX1+ pancreatic endoderm derived from S/A/RA-treated hEBs. (a) Immunostaining for PDX1 at day 1 of differentiation after EB plating. (b-d) Cells that migrated from hEBs immunostained for PDX1 and NES at day 4 (b, c) and day 8 (d) of differentiation after EB plating. Arrowheads in (b, inset) indicate cells positive for PDX1 and negative for NES. Arrowheads in (c, inset) show cells positive for NES and negative for PDX1. The dotted circle in (d) shows cell clusters that produce both PDX1 and NES after 8 days of EB plating. (e) Formation of spheroids producing PDX1. (f) Cell clusters detached from culture plates immunostained for PDX1 and NES. (g) RT-PCR analysis showing the expression of genes associated with early and late phases of islet differentiation in cell clusters. DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, GCG glucagon, NEUROD1 neurogenic differentiation 1, NEUROG3 neurogenin 3, SST somatostatin, ISL1 islet 1, INS insulin. Scale bars: 25 μ m (a, c, d) and 50 μ m (b, e, f). (adapted from Shim *et al.*, 2007 *Diabetologia* 50:1228-1238).

tor, IGF)와 유사한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Hernandez-Sanchez *et al.*, 2006).

이러한 차이점에도 불구하고 신경세포로 분화시키는 여러 기법들이 췌장 분화를 촉진하기 위하여 적용되었으며, 대표적인 연구 결과로서 Lumelsky 등 (2001)은 생쥐 배아줄기세포로부터 신경 전구세포의 표지인자인 nestin을 발현하는 세포로의 분화를 촉진함으로써 인슐린을 생성하는 세포로의

분화 유도를 최초로 학계에 보고하였다. Nestin은 신경외배엽에서 유래되는 세포의 표지인자로 널리 알려져 있지만, 췌장소도세포 및 췌관 상피세포에서도 발현된다는 보고가 있다 (Zulewski *et al.*, 2001; Abraham *et al.*, 2002). 그러나 Rajagopal 등 (2003)은 분화과정 중 세포 사멸에 의해 죽어가는 세포들이 배양액 내에 구성성분으로서 존재하는 인슐린을 수동적으로 세포질 내에 유입할 수 있음을 증명하였으며, 따라서 인슐린 합성과정에서 생성되는 C-peptide 및 인슐린의 전구체인 프로인슐린의 검출 여부가 세포에 의한 능동적인 인슐린의 합성을 검증하기 위하여 필수조건임을 주장하였다. 이와 함께 세포의 인슐린 합성능력을 판단하는 또 다른 간접적 연구방법으로는 아연 킬레이트 물질인 dithizone (DTZ)을 사용하는 방법이 제시된 바 있다. 췌장 β -세포는 인슐린 분비 과립 내에 아연 이온을 과량 함유하고 있으며, 이 아연 이온은 과립 내에 존재하는 6개의 인슐린 분자와 결합한다. 따라서 아연 이온이 dithizone과 반응하게 되면 연홍색의 빛을 띠게 되며, 이러한 염색법 역시 분화 세포의 기능성을 확인할 수 있는 유용한 방법이다 (Shiroi *et al.*, 2002). 또한, 보다 직접적인 방법으로는 당뇨병이 유발된 실험동물 모델에 분화된 세포를 이식하여 정상 혈당으로의 복귀를 유도할 수 있는 능력을 수 주간 조사하거나, 보다 단기적으로는 글루코스를 인위적으로 체내에 주입한 뒤 혈당이 정상화되는 능력을 수 분 내지는 수 시간동안 확인하는 복강 내 혈당 조절 테스트 (intra peritoneal glucose tolerance test, IPGTT) 등이 있다.

Lumelsky 등이 고안한 분화기법을 근간으로 하여, 많은 연구자들이 세포내 인슐린 함유량을 보다 증가시키고 글루코스 농도에 민감성을 보유하는 능력을 지닌 세포를 분화해 내기 위한 연구를 수행하였다. Hori 등 (2002)은 Lumelsky 등이 보고한 분화방법을 다소 수정하였으며, 보다 성숙한 췌장세포를 분화해 내기 위하여 PI3K (phosphoinositide 3-kinase)의 억제제인 LY294002를 처리함으로써 실험관 내에서 글루코스에 보다 민감하게 반응하여 인슐린을 분비하는 세포를 분화시킴에 성공하였다고 보고하였다. 그러나 이후 Hansson 등 (2004)은 PI3K 억제제에 의해 분화된 세포들이 C-peptide를 생성하지 못하며, 형광 면역염색에 의해 확인되는 인슐린 발현 세포들은 배양액 내에 존재하는 인슐린을 수동적으로 세포내로 유입한 위양성 (false positive) 세포들임을 주장함으로써 다시 논란의 대상이 되었다.

생쥐 배아줄기세포로부터 췌장세포를 분화하기 위한 또 다른 방법으로서 Pdx1 (pancreatic duodenal homeobox 1) 등 정상적인 배아 발생 과정 중 췌도세포의 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자들의 유전자를 과발현시킴으로 췌장 β -세포의 분화를 촉진시킬 수 있다는 연구 결과도 제시되었다 (Miyazaki *et al.*, 2004). Moritoh 등 (2003)은 인슐린 II 프로모터에 의해 β -geo의 발현이 조절되는 유전자를 도입한 생쥐 배아줄기세포로부터 인슐린을 합성하는 세포로의 분화를 시도하였으며, 분화된 세포들이 글루카곤, 소마토스타틴, 췌장폴리펩타이드 (pancreatic polypeptide), p48, 아밀라아제, 그리고 carboxypeptidase A를 포함한 췌장세포의 표지인자를 발현함을 통해 완전 내배엽에서 기원된 췌장세포가 분화되었음을 증명하였다. 이와 더불어 Ku 등 (2004)은 monothioglycerol이 첨가된 무혈청 배양조건에서 activin β B와 nicotinamide, 그리고 exendin-4 (GLP-1 agonist)를 첨가하여 높은 수율의 인슐린 분비세포의 분화를 확인하였으며, exendin-4와 GLP-1에 의한 췌장 세포의 분화 유도는 생쥐와 붉은털 원숭이 배아줄기세포를 이용한 다른 연구에서도 확인되었다 (Lester *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2005).

발생과정 중 췌장의 기관 발생을 유도하는 여러 전사인자들은 분화 초기에 세포의 운명을 결정할 뿐 아니라 분화된 세포의 기능적 특성을 유지시키는 역할을 담당하게 된다. Sox17과 Hnf3 β 은 낭배기 이후 내배엽 세포에서 발현하는 전사인자로서 췌장으로서의 운명을 결정짓는데 필수적인 인자로 알려져 있으며, bHLH의 일종인 Hlx9 역시 췌장의 초기 발달과정에서 발현되어 췌장의 배후엽 발달에 영향을 끼친다고 알려져 있다 (Li *et al.*, 1999). 췌장세포 분화에 널리 사용되는 표지인자인 Pdx1은 인슐린과 Glut2 유전자 발현의 조절뿐만 아니라 성숙한 췌장으로의 분화과정에 필수적인 전사인자이다 (Offield *et al.*, 1996). Pdx1을 발현하는 췌장 전구세포들은 일련의 분화과정을 거쳐 췌장을 구성하는 각종 세포들로 분화되어지며, 특히 인슐린을 분비하는 β -세포로의 분화과정 중에는 Isl-1, neurogenin 3 (Ngn3), Beta2/NeuroD, Pax4, Pax6, Nkx2.2와 같은 전사인자들의 발현이 관찰된다. Isl-1은 발달중인 췌장과 중추신경계에서 발현되는 전사인자로서 췌장세포에서 호르몬을 생성하는 모든 세포들에서 발현함은 물론 췌장 원기의 발생을 유도하고, 췌장 세포와 연결된 중간엽세포에서도 나타나 췌장 원기의 증식을 유도한다. 실제적으로 발달 과정 중 Isl-1 유전자의 발현

이 억제되면 췌장의 내분비선의 발달이 전혀 일어나지 않음도 보고된 바 있다 (Pfaff *et al.*, 1996). 더불어 Notch 신호에 의해 조절되는 Hes 유전자는 췌장 내분비 전구세포로의 운명을 결정하는 주요인자인 Ngn3의 발현을 억제하는 기능을 가지고 있다. Ngn3는 HNF1 α 와 HNF3 β , HNF6와 결합하여 췌장 전구세포를 내분비세포로 분화하도록 유도하는 반면 (Lee *et al.*, 2001), Hes에 의해 Ngn3가 억제될 경우 췌장의 외분비 세포로 분화가 촉진된다. Pax4와 Pax6은 태아의 장상피세포와 성체의 췌장에서 발현되는 것으로 알려져 있으며, Pax4는 인슐린을 분비하는 β -세포와 소마토스타틴을 생산하는 δ -세포 (Sosa-Pineda, 2004), Pax6는 글루카곤을 분비하는 α -세포 (St-Onge *et al.*, 1997)로의 분화에 중요한 역할을 담당한다. 성숙한 내분비세포로의 분화과정 동안 Ngn3의 발현은 점진적으로 감소하며, Pax4, Nkx2.2와 Nkx6.1의 발현이 증가하게 되는데, 특히 췌장전구세포의 표지인자인 Pdx1의 발현은 분화가 지속됨에 따라 감소하게 되지만, 성숙한 췌장 β -세포로 분화되면 다시 높은 수준으로 발현되며, 인슐린과 Glut-2의 발현을 촉진한다 (Soria, 2001).

췌장 발생에 관련된 많은 연구 결과들로부터 activins, TGF β 1, inhibin, 골형성 단백질 (BMPs), Nodal과 같은 전이성장인자 아류 (TGF β -superfamily)와 Wnt3a, FGFs, 레티노산, Notch 신호를 저해하는 γ -secretase 억제제, 글루카곤 유사 펩타이드 (GLPs), exendin-4, 간성장인자 (HGF), 인슐린 유사 성장인자 (IGFs), 혈관 내피 성장인자 (VEGF), Noggin, nicotinamide를 비롯하여 hedgehog 억제제로 알려진 cyclopamine 등 여러 인자들이 배아줄기세포로부터 췌장세포로의 분화를 유도해내기 위한 잠재적인 조절자로서 제시되었다. 따라서 정상 췌장 발생과정 중에 영향을 미치는 것으로 알려진 다양한 인자의 순차적 혹은 조합적 처리를 통하여 인간 배아줄기세포로부터 췌장 β -세포의 분화를 유도하려는 시도가 이루어지고 있으며, 글루코오스를 포함한 배양액 조성물, 산화방지제, 산소분압, 그리고 랑게르한스섬과 유사한 삼차원적 구조 형성을 촉진시키는 배양방법 및 세포의 기질의 선정 등 여러 가지 화학 물리적인 인자들이 고려의 대상이 되고 있다 (Soria, 2001; Roche *et al.*, 2003).

그동안 생쥐 배아줄기세포를 대상으로 췌장 분화 연구가 많은 진전을 이룬 반면 인간 배아줄기세포를 이용하여 췌장 세포로의 성공적인 분화를 제시한 연구 결과는 매우 드문 실정이다. Assady 등 (2001)에 의해 최초로 인간 배아줄기

세포의 자발적 분화를 통한 인슐린-합성 세포의 생성이 보고된 이후, Lumelsky 등 (2001)의 생쥐 배아줄기세포를 대상으로 고안한 기법에 기초를 둔 유도 분화 기법이 Segev 등 (2004)에 의해 인간 배아줄기세포에 적용되었다. 또한, Brolén 등 (2005)은 완전 내배엽성 세포에서 췌장 전구세포 분화를 유도한 후 설치류 태아의 췌장조직과 함께 당뇨병이 유발된 생쥐에 이식하였을 경우, 함께 이식된 설치류 췌장조직에서 분비되는 인자(들)에 의해 인간 배아줄기세포에서 유래된 췌장 전구세포가 성숙한 췌장 β -세포로 체내에서 분화됨을 보고하였다.

보다 최근에 D'Amour 등 (2006)이 보고한 유도 분화 기법은 답보상태에 있었던 인간 배아줄기세포로부터 췌장세포로의 분화에 큰 활력소가 되었다. 이 연구자들은 정상 췌장 발달과정을 인간 배아줄기세포의 분화단계에 적용하여 1) Wnt3a와 activin A, 저농도의 혈청을 처리함으로써 인한 완전내배엽성 세포로의 효과적인 분화, 2) 췌장 원기세포와 근접한 중간엽에서 분비되는 FGF10 및 Shh 신호의 길항작용을 유도하는 cycloplamine을 처리함으로써 인한 원시 장세포로의 분화, 3) 레티노산을 추가적으로 처리하여 원시 장세포의 후분화 유도, 4) exendin-4와 γ -secretase 억제제 (DAPT)의 처리를 통한 췌장 전구세포 분화, 5) exendin-4와 HGF, IGF를 처리하여 인슐린 분비성 췌장세포로의 최종 분화로 구성된 유도 분화 기법을 보고하였다. 이 분화 유도 기법을 통하여 약 12% 정도의 수율로 인슐린-합성 세포를 분화해 내는데 성공하였으며, 전자현미경상에서 세포내 인슐린 함유 과립을 확인할 수 있었을 뿐만 아니라 배양약내 글루코스 농도의 변화에 민감성을 나타내어 인슐린을 분비하는 능력을 보유함을 증명하였다. 또한, Shim 등 (2007)은 인간 배아줄기세포를 완전내배엽성 세포로 분화시키기 위해 혈청과 activin A를 순차적으로 처리하고 레티노산을 처리함으로써 췌장 전구세포로의 분화를 유도할 수 있음을 제시하였다. 특히 PDX1을 발현하는 췌장 전구세포를 당뇨병이 유발된 실험동물에 이식한 결과, 췌장세포로의 최종 분화가 생체 내에서 이루어지고 당뇨병의 유발로 증가된 혈당을 정상 혈당치로 복귀시킬 수 있음을 확인하였다 (Fig. 2). 그러나 이러한 연구들은 인간 배아줄기세포로부터 최종적으로 분화된 췌장 β -세포가 아닌 췌장 전구세포를 이식한 뒤 생체 내에서 최종 분화를 이루어 내었으며, 따라서 시험관 내에서 기능성 췌장 β -세포에 이르기까지 추가적으로 성숙시킬 수 있는 분화 유도 기법의 개발이 시급한 실정이다.

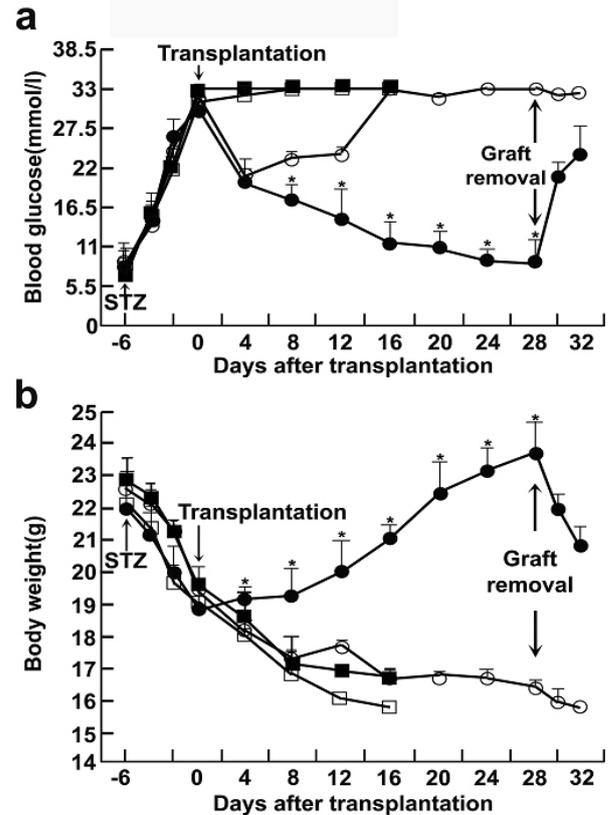


Fig. 2. Changes of blood glucose levels and body weight after transplantation of hESC-derived Pdx1-positive clusters into diabetic mice. Changes of blood glucose levels (a) and body weight (b) in streptozotocin-induced diabetic mice transplanted with cells derived under SF (n=3, closed squares), S/A (n=3, open circles) or S/A/RA conditions (n=6, closed circle), or in sham-operated mice (n=6, open squares). (adapted from Shim *et al.*, 2007 *Diabetologia* 50:1228-1238).

당뇨병의 세포치료제로의 응용

현재까지 인간 배아줄기세포로부터 최종 분화된 췌장 β -세포가 당뇨병 실험동물 모델에 이식된 후 생체 내에 증가된 혈당을 감소시켰다는 보고는 전무한 실정이다. 특히, 인간 배아줄기세포로부터 췌장 β -세포를 성공적으로 분화시킨다고 하더라도 세포 이식술의 성공적인 임상적 이용을 위해서는 많은 극복해야 할 난제가 존재한다.

췌장 β -세포의 분화 과정 중 췌장 전구세포의 선택적 분리 및 증식 방법은 이식할 세포의 대량 확보를 위해 고려해

야 할 부분이다. 인슐린 분비세포의 경우, Ngn3와 Pdx-1 등이 좋은 분화과정 혹은 분화 종료 후 순수분리 정제에 이용될 수 있는 효율적 표지인자 후보로서 제시되고 있다. 순수 분리 정제는 세포 치료제의 안전성 확보 차원에서도 중요하여 배아줄기세포를 이용한 세포치료제 생산에서 우려되는 미분화 배아줄기세포의 잔존에 의한 기형종의 발생 가능성을 감소시킬 수 있다. 따라서 이들 미분화 세포는 면역분리법 등으로 이식전 제거가 필수적이다.

이식된 세포의 성공적 생착 및 기능 유지를 위해서는 혈관 재생을 유도하는 방법 또한 고려해야 한다. 췌도 이식의 경우, 이식 후 췌도의 장기간 생존 및 기능 유지는 췌도 내 혈관 재생의 부족으로 인해 감소하는 것으로 알려졌으며 (Narang *et al.*, 2004), 이는 또한 이식된 췌도의 면역적 파괴를 더욱 가중할 수 있다 (Lukinius *et al.*, 1995). 이식된 세포들로의 원활한 영양공급을 돕고, 저산소에 의한 세포 괴사를 예방하려는 측면에서 주로 혈관 분포가 왕성한 간이나 비장조직 등에 췌도 이식을 시행하지만, 그럼에도 불구하고 이식된 췌도의 내부는 종종 산소 및 영양분 부족에 의해 세포 괴사가 나타나는 것으로 알려졌다. 이러한 문제는 배아줄기세포 유래 췌장 β -세포를 사용하여 이식 시에도 마찬가지로 고려해야 한다. 췌도는 혈관내피 성장인자 (VEGF)와 이의 수용체들을 분비함으로써 주위 조직으로부터 혈관 재생을 부분적으로 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Vasir *et al.*, 2001). 따라서, 이식 후 신속한 혈관 재생을 유도하기 위해 이식할 세포에 VEGF 유전자를 도입하는 방법 (Narang *et al.*, 2004), 세포지지체와 함께 VEGF를 첨가하는 방법, 미세 캡슐화 과정에서 VEGF 단백질을 함께 캡슐화하는 방법 등이 제시되고 있다 (Sigrist *et al.*, 2003).

이식 후 염증 및 자가면역반응에 의한 췌장 β -세포의 파괴, 그리고 핵치환으로 확립된 배아줄기세포가 아닌 경우에 동종 이식에서 수반되는 면역 거부반응 또한 극복해야 한다. 이를 위해 효과적이며 안정적인 면역 억제제 투여 및 면역관용의 유도 방법, 세포 자연사 억제물질 혹은 면역조절유전자들의 도입 등이 제시되고 있으며, 미세 캡슐화를 통해 환자의 면역세포들이 동종 이식된 췌장 β -세포를 공격하는 것을 예방하도록 유도하는 방법들이 제시되고 있다. 이식세포의 미세 캡슐화시 정밀여과막 (microfiltration membrane)의 기공 크기를 0.1~1 μm 로 제작하면 이식한 췌장 β -세포의 항원이 숙주 T 림프구 및 항체에 노출되는 것을 효과적으로 예

방하는 것으로 알려졌으며 (Chaikof, 1999), 이와 동시에 캡슐내의 췌장 β -세포로부터 합성되는 insulin은 정상적으로 분비될 수 있다. 더불어 미세캡슐 제조시 Feridex 혹은 radiopaque alginate를 첨가하여 제작함으로써, 분자영상기법을 통해 이식된 세포들의 실시간 추적이 가능하고 이식후 췌장 β -세포의 정상적인 생착 여부를 절제술 없이 확인 가능하다 (Barnett *et al.*, 2006; Barnett *et al.*, 2007). 이식하려는 부위도 고려되어 정소나 신장 캡슐 아래 부위가 이식세포들의 숙주면역세포들에 의한 파괴를 줄일 수 있는 부위이며, 간문맥을 통한 이식의 경우 미세 캡슐화를 이용한 이식방법에서 많이 고려되는 이식부위이다.

결 론

현재까지 임상에서 세포 치료에 적용될 수 있는 인간 배아줄기세포로부터 췌장 β -세포로의 분화 유도를 위한 최적 프로토콜은 확립되지 않았으며, 누구나 이용할 수 있는 보편화된 효율적 분화 유도 기법이 확립되기 위해서는 극복해야 할 문제점이 많은 실정이다. 배아줄기세포와 배아체의 특성, 그리고 배아줄기세포의 분화과정 중 내배엽과 췌장세포로의 운명 결정에 영향을 미치는 인자들과 이와 관련된 구체적 분화 기전에 대한 더 많은 이해가 필요하다. 많은 분화조절인자들은 세포의 분열, 분화 혹은 세포 자연사를 조절하는 데 있어 다면적인 활성을 나타낸다. 특정 성장인자는 여러 종류의 세포 분화에 동시에 관여할 수 있어, 예를 들어 Wnt의 경우 초기 내배엽 형성에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으나, 외배엽에서 유래되는 망막세포 및 신경세포의 분화에도 관여한다. 따라서 분화 조절인자를 처리할 경우 체외 분화과정 중 특정 시기에 미치는 영향뿐만 아니라 처리농도, 처리기간, 복합처리시의 서로간의 상호작용, 여러 인자의 처리 시 처리 순서 등을 모두 고려하여야 한다. 특정 세포의 분화 과정 중 전구세포의 선택적 분리 및 증식 방법 또한 이식할 세포의 대량 확보를 위해 고려해야 할 부분이며, 이식 전 잔존하는 미분화 배아줄기세포를 제거함으로써 기형종의 발생을 예방하는 방안 또한 고려하여야 한다. 분화 유도방법은 최종적으로 정상적인 성숙과정을 통해 인체 내에서와 동일한 기능을 담당할 수 있는 기능성 세포를 얻을 수 있는 수준으로 확립되어야 하며, 생체 내 이식시 질환을 치료하고 여타 다른 부작용이 없는 수준이 되어야 한다. 이를 위하여 세

포치료제로서 췌장세포를 포함한 다양한 종류의 세포를 획득하기 위하여 이루어지는 분화 유도 연구는, 배아줄기세포의 경우, 반드시 발생학적 사실에 근거하여 수행되어야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF (2002) Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 143:3152-3161.
- Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M (2001) Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50:1691-1697.
- Bai L, Meredith G, Tuch BE (2005) Glucagon-like peptide-1 enhances production of insulin in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *J Endocrinol* 186:343-352.
- Barnett BP, Kraitchman DL, Lauzon C, Magee CA, Walczak P, Gilson WD, Arepally A, Bulte JWM (2006) Radiopaque alginate microcapsules for X-ray visualization and immunoprotection of cellular therapeutics. *Mol. Pharmaceutics* 5:531-538.
- Barnett BP, Arepally A, Karmarkar PV, Qian D, Gilson WD, Walczak P, Howland V, Lawler L, Lauzon C, Stuber M, Kraitchman DL, Bulte JWM (2007) Magnetic resonance-guided, real-time targeted delivery and imaging of magnetocapsules immunoprotecting pancreatic islet cells. *Nat Med* 13:986-991.
- Brolén GK, Heins N, Edsbacke J, Semb H (2005) Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. *Diabetes* 54:2867-2874.
- Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS (2001) Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 172:383-397.
- Chaikof EL (1999) Engineering and material considerations in islet cell transplantation. *Annu Rev Biomed Eng* 1:103-127.
- D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE (2005) Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23:1534-1541.
- D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24:1392-1401.
- Gamer LW, Wright CV (1995) Autonomous endodermal determination in *Xenopus*: regulation of expression of the pancreatic gene *XIHbox8*. *Dev. Biol.* 171:240-251.
- Hansson M, Tonning A, Frandsen U, Petri A, Rajagopal J, Englund MC, Heller RS, Hakansson J, Fleekner J, Skold HN, Melton D, Semb H, Serup P (2004) Artificial insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes* 53:2603-2609.
- Hernandez-Sanchez C, Mansilla A, de la Rosa EJ, de Pablo F (2006) Proinsulin in development: new roles for an ancient prohormone. *Diabetologia* 49:1142-1150.
- Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK (2002) Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16105-16110.
- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6:88-95.
- Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA (2001) Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10716-10721.
- Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RA (2006) Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 15:831-837.

- Kelly OG, Pinson KI, Skarnes WC (2004) The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* 131:2803-2815.
- Ku HT, Zhang N, Kubo A, O'Connor R, Mao M, Keller G, Bromberg JS (2004) Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas *in vitro*. *Stem Cells* 22:1205-1217.
- Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ, Keller G (2004) Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* 131:1651-1662.
- Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N (2004) Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 72:230-238.
- Lee JC, Smith SB, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, Mirmira RG, German MS (2001) Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 50: 928-936.
- Lester LB, Kuo HC, Andrews L, Nauert B, Wolf DP (2004) Directed differentiation of rhesus monkey ES cells into pancreatic cell phenotypes. *Reprod Biol Endocrinol* 16:42.
- Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R. (2002) Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4391-4396.
- Li H, Arber S, Jessell TM, Edlund H (1999) Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet* 23:67-70
- Lowe LA, Yamada S, Kuehn MR (2001) Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* 128:1831-1843.
- Lu CC, Brennan J, Robertson EJ (2001) From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 11:384-392.
- Lukinius A, Jansson L, Korsgren O (1995) Ultrastructural evidence for blood microvessels devoid of an endothelial cell lining in transplanted pancreatic islets. *Am J Pathol* 146:429-435.
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292:1389-1394.
- Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J (2004) Regulated expression of pdx-1 promotes *in vitro* differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* 53:1030-1037.
- Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J (2003) Analysis of insulin-producing cells during *in vitro* differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* 52:1163-1168.
- Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107:2733-2740.
- Narang AS, Cheng K, Henry J, Zhang C, Sabek O, Fraga D, Kotb M, Gaber AO, Mahato RI (2004) Vascular endothelial growth factor gene delivery for revascularization in transplanted human islets. *Pharm Res* 21:15-25.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV (1996) PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122:983-995.
- Pavlakakis M, Khwaja K (2006) Transplantation for type 1 diabetes: whole organ pancreas and islet cells. *Curr Diab Rep* 6:473-478.
- Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, Edlund T, Jessell TM (1996) Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84:309-320.
- Ponsaerts P, van Tendeloo VF, Jorens PG, Berneman ZN, van Bockstaele DR (2004) Current challenges in human embryonic stem cell research: directed differentiation and transplantation tolerance. *J Biol Regul Homeost Agents* 18:347-351.
- Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA (2003) Insulin staining of ES cell progeny from in-

- sulin uptake. *Science* 299:363.
- Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhardt E, Itzik A, Ben-Hur T (2001) Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19:1134-1140.
- Robb L, Tam PP (2004) Gastrula organiser and embryonic patterning in the mouse. *Semin Cell Dev Biol* 15:543-554.
- Roche E, Sepulcre MP, Enseñat-Waser R, Maestre I, Reig JA, Soria B (2003) Bio-engineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells: a review of progress. *Med Biol Eng Comput* 41:384-391.
- Rodaway A, Patient R (2001) Mesendoderm. an ancient germ layer? *Cell* 105:169-172.
- Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J (2004) Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells* 22:265-274.
- Serup P, Madsen OD, Mandrup-Poulsen T (2001) Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *BMJ* 322:29-32.
- Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, Oh CH, McKay R, Kim JH (2007) Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia* 50:1228-1238.
- Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, Takahashi Y (2002) Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* 20:284-292.
- Shook D, Keller R (2003) Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 120:1351-1383.
- Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Braun S, Legeay G, Belloq JP, Pinget M, Kessler L (2003) Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice. *Cell Transplant* 12:627-635.
- Soria B (2001) *In-vitro* differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 68:205-219.
- Soria B, Skoudy A, Martin F (2001) From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 44:407-415.
- Sosa-Pineda B (2004) The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development. *Mol Cells* 18:289-294.
- St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P (1997) Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 387:406-409.
- Stafford D, Prince VE (2002) Retinoic acid signaling is required for a critical early step in zebrafish pancreatic development. *Curr. Biol.* 12:1215-1220.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Tremblay KD, Hoodless PA, Bikoff EK, Robertson EJ (2000) Formation of the definitive endoderm in mouse is a smad2-dependent process. *Development* 127:3079-3090.
- Trounson A (2006) The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev* 27:208-219.
- Vasir B, Jonas JC, Steil GM, Hollister-Lock J, Hasenkamp W, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC (2001) Gene expression of VEGF and its receptors Flk-1/KDR and Flt-1 in cultured and transplanted rat islets. *Transplantation* 71:924-935.
- Vincent SD, Dunn NR, Hayashi S, Norris DP, Robertson EJ (2003) Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes Dev* 17:1646-1662.
- Wells JM, Melton DA (2000) Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 127:1563-1572.
- Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 20:501-508.
- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA

(2001) *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 19:1129-1133.

Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF

(2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes. Diabetes 50:521-533.