

Activin A와 고농도 포도당에 의한 인간 췌관세포의 인슐린분비세포로의 분화

삼성생명과학연구소¹, 중앙대학교 대학원 생물학과², 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 내분비대사내과³

홍승현^{1,2}, 한 철^{1,3}, 김효섭¹, 박미경¹, 이영진¹, 정재훈^{1,3}, 민용기^{1,3}, 이명식^{1,3}, 김광원^{1,3}, 이문규^{1,3}

Activin A and Glucose Derived Human Pancreatic Ductal Cells into Insulin-producing Cells

Seung Hyun Hong^{1,2}, Chul Han^{1,3}, Hyo Sup Kim¹, Mi Kyung Park¹, Young Jin Lee¹,
Jae Hoon Jeong¹, Yong Ki Min^{1,3}, Myung Shik Lee^{1,3}, Kwang Won Kim^{1,3}, Moon Kyu Lee^{1,3}

Samsung Biomedical Research Institute (SBRI)¹; Department of Life Science², College of Natural Sciences, Chungang University; and Division of Endocrinology and Metabolism³, Department of Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine

- Abstract -

Background: Cellular replacement therapy holds promise for the treatment of diabetes mellitus but donor tissue is severely limited. Human postnatal pancreatic ductal cells are a potential source of new beta cells. Therefore, we investigated the potential of human pancreatic ductal cells could be differentiated into endocrine cells that would be capable of secreting insulin in response to glucose.

Methods: Cell fractions enriched with pancreatic ductal cells after human islet isolation were treated with streptozotocin to remove residual beta cells, grown in monolayer culture, changed the media for differentiation in the presence of activin A and glucose, supplemented with 10% FCS. The differentiation markers, insulin secretion and cell proliferation were examined.

Result: No insulin was detectable in cell preparations after 5 days of treatment with streptozotocin. In monolayer culture, 80% of the streptozotocin-treated pancreatic ductal cells expressed cytokeratin-19. Cell cultures with a high proportion of cytokeratin-19 cells had greater plasticity for differentiation into cells with phenotypic and functional markers of beta cells. This property were significantly enhanced by treatment of activin A and glucose. The differentiated human pancreatic ductal cells secreted insulin sensitively responded with high glucose.

Conclusion: Human pancreatic ductal cells are a potential source of new glucose-induced insulin producing cells that may be developed further for clinical use. Therefore, the present data support a possible role for human adult pancreatic ductal cells, following expansion and differentiation, as a source of insulin by transplantation cells to type I diabetes patients. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:44~50, 2007)

Key Words: Activin A, Ductal cell

서 론

당뇨병은 세계적으로 증가하고 있으며 사회가 발전함에 따라 심각한 질병으로 대두되고 있다. 당뇨병의 대부분은 췌장에 있는 췌도세포 내의 인슐린을 분비하는 베타세포의 양적인 감소에 기인한다. 베타세포의 양적 감소로 인해 필요한 인슐린의 양이 부족하게 되어 고혈당증이 지속된다^{1,2)}. 최근 당뇨병을 치료할 목적으로 췌도세포 이식이 광범위하게 연구되고 있는데³⁾ 췌도세포 이식의 경우 시술이 간편하고 시험관 내에서 면역 및 증식에 관한 조절이 가능하며 합병증이 유발되지 않는 장점이 있다⁴⁾. 하지만 이식을 위한 췌도세포의 양은 한정되어 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근 줄기세포의 분화를 이용한 치료가 당뇨병의 새로운 치료법으로서의 가능성을 인정받고 있는데⁵⁾, 췌장간세포 또는 줄기세포가 췌관세포에 존재한다는 사실이 밝혀졌으며 이들 세포들은 내분비 세포로 분화한다고 알려져 있다⁶⁻¹²⁾. 최근 성체 줄기세포인 췌관세포를 분리하여 activin A 또는 betacellulin을 처리하여 가췌도세포 (pseudoislet)로 분화 시키고 이를 당뇨병 동물모델에 이식하여 혈당을 정상화 시키는 연구가 진행되었다¹³⁾. Activin A는 신장, 췌장 및 전립선 등의 조직에서 발현되고 여러 세포들에 작용하여 분화와 발생을 조절하는 것으로 알려져 있다^{14,15)}. 특히 췌장의 아상돌기 형성을 유도하고 췌장 원기세포 내의 PAX4와 neurogenin 3 (Ngn 3)의 발현을 조절하여 외분비 세포의 분화를 억제하고 내분비 세포 분화를 촉진시킨다¹⁶⁾. 본 연구에서는 분리된 췌관세포에 activin A가 췌도세포로의 분화를 자극하는 자극원이 될 가능성이 높은 점에 착안하여

activin A와 인슐린 분비에 결정적인 영향을 미치는 고농도의 포도당을 분화유도 인자로 사용하여 췌관세포의 분화유도하였다. 또한 췌관세포를 인슐린 생성세포로 분화시킴으로써 이식에 필요한 세포의 부족을 해결하기 위한 새로운 이식원으로서의 췌관세포의 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 췌관세포 분리 및 배양

췌장을 collagenase P로 분해하고 ficoll로 농도 구배를 주어 기저층에 모인 세포들을 모아 HBSS로 세척 후 코팅된 T175 플라스크에 나누어 분주하고 10% FBS가 포함된 M199 (Gibco/Invitrogen, Burlington, ON, Canada) 배지에서 배양했다. 24시간 후 부유물을 제거하고 새로운 배지를 공급하였다. 3일 후 cell dissociation kit (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)를 이용해 바닥에 붙은 세포를 탈락시켜 단일 세포로 만들고 섬유모세포와 베타세포를 제거하고 순수한 췌관세포 배양을 위해 3시간 동안 코팅된 플라스크에 전배양시켜 섬유모세포를 제거한 후 부유세포들을 다시 분주하였다. 세포들에 포함되어 있는 잔여 베타세포를 처리하기 위해 5 mM의 streptozotocin (STZ)이 포함된 M199 배지에서 5일 동안 배양하였다. STZ의 활성은 48시간을 넘기지 못하므로 배지는 2일에 한번 교환하였다. mRNA의 발현변화를 관찰하기 위해 세포는 매일 수거하였다.

Table 1. Sequences of Primers Used in RT-PCR

Preproinsulin forward	5'-CATCAAGCACATTGTCC-3'
Preproinsulin reverse	5'-CTGGTTCAAGGGCTTTATTC-3'
Insulin forward	5'-GCAGCCTTTGTGAACCAACA-3'
Insulin Reverse	5'-TCTGCGGTCATCAAATGAGG-3'
IPF-1 forward	5'-CTGCCTTTCCCATGGATGAA-3'
IPF-1 Reverse	5'-CGCTTCTTGTCTCCTCCTTT-3'
Nkx6.1 forward	5'-TCTTCTGGCCCGGGGTGATG-3'
Nkx6.1 Reverse	5'-AGCCGCGTGCTTCTTCCTCC-3'
Pax6 forward	5'-CAAAAGTCCAAGTGCTGGACA-3'
Pax6 Reverse	5'-CCCATCTGTTGCTTTTCGCT-3'
Pax4 forward	5'-AGGAGGACCAGGGACTACCGT-3'
Pax4 Reverse	5'-TTTAGGTGGGGTGTCACTCAG-3'
Ngn3 forward	5'-AGACGACGCGAAGCTCACC-3'
Ngn3 Reverse	5'-AAGCCAGACTGCCTGGGCT-3'
NeuroD/beta2 forward	5'-ATCCCAACCCACCACCAACC-3'
NeuroD/beta2 Reverse	5'-CAGCGGTGCCTGAGAAGATT-3'
Glut2 forward	5'-CAAATCTGACTCCAAAGCTC-3'
Glut2 Reverse	5'-CTGTCTCTTGCAAGATCAGC-3'
Beta-actin forward	5'-AGAGCTATGAGCTGCCTGAC-3'
Beta-actin Reverse	5'-CTGATCCACATCTGCTGGAA-3'

2. Activin A와 포도당에 의한 분화 유도

소량의 섬유모세포와 베타세포를 제거하고 단층 배양된 췌관세포를 인슐린 분비세포로 분화시키기 위해 4 nM activin A와 11 mM 포도당이 포함된 M199 배지에 30일 동안 배양시켰고 대조 세포군은 activin A가 포함 되지 않고 5.5 mM의 포도당이 포함된 M199 배지에서 배양하였다. activin A와 포도당이 포함된 배지는 2일에 한번 교환하였다. 췌관세포의 mRNA의 발현변화를 관찰하기 위해 세포는 3일에 한번씩 수거하였다.

3. 췌관세포의 분화에 대한 관찰

1) RT-PCR

STZ나 4 nM activin A와 11 mM 포도당을 처리 후 췌관세포와 대조세포에서 인슐린 또는 인슐린 분비세포의 표지인자의 발현 변화를 살펴보기 위해 수거한 세포에서 TRIzol (Gibco/Invitrogen)을 이용하여 RNA를 분리하였다. RNA 1 µg을 이용하여 Maxime RT PreMix kit (iNtRON, Seoul, Korea)를 이용하여 cDNA를 준비하고 Table 1에 나온 염기서열을 이용해 PCR (25cycle)을 수행하였다.

2) 면역형광세포염색법

CK19 항체 (DakoCytomation, Carpinteria, CA)와 인슐린 항체 (Dako)를 이용하여 면역형광염색법으로 염색하여 관찰하였다. 2가지의 항체를 동시에 반응시켜 면역형광염색을 하였으며 CK19 항체에 대한 2차 면역형광 항체로는 anti-Guinea pig FITC (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA)를 사용하였고 인슐린 항체에 대한 2차 면역형광 항체로는 anti-mouse texas red (Vector laboratories, Inc)를 사용하였다. DAPI (Vector laboratories, Inc)를 이용하여 핵염색을 함으로써 3가지 면역형광염색을 동시에 시행하였다. 배양된 세포 중 췌관세포와 인슐린분비 세포로 분화된 세포의 분포

를 관찰하였다. 3중 염색된 슬라이드를 형광 현미경 (Olympus optical co. LTD, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

3) 포도당 자극에 대한 인슐린 분비능

포도당 자극에 대한 인슐린 분비 반응을 확인하기 위하여 2시간 동안 기저 3 mM 포도당이 포함된 KRBB에서 전 배양 후, 다시 3 mM, 17 mM의 포도당이 포함된 KRBB에서 2시간 동안 반응시킨 후 KRBB 내의 인슐린 분비량을 인간 인슐린 ELISA kit (Linco Reach, Inc. St. Louis, MO)를 사용하여 측정하였다.

4. 세포증식측정

세포의 증식을 측정하기 위해 3일 동안 배양된 세포의 계수를 측정하여 Schwartz 공식: $DT = [(\ln_2)(t_2 - t_1)] / \ln(v_2/v_1)$ 을 사용하여 Doubling time 을 측정하였고 BrdU incorporation을 측정하기 위해 1시간동안 BrdU (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 10 µM을 배지에 첨가하여 배양 후 면역형광세포염색법을 이용하여 전체 세포 중 BrdU 양성반응을 보인 세포를 관찰하였다.

5. 통계처리

각각의 실험을 3회 이상 반복 후 실험 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였고 각 군간의 비교는 t-test를 이용하여 검정하였으며 P값 0.05 미만인 경우를 통계학적 유의 수준으로 하였다.

결 론

1. 베타세포를 제거한 췌관세포의 배양

단층배양한 세포들에 포함되어 있는 베타세포를 제거하

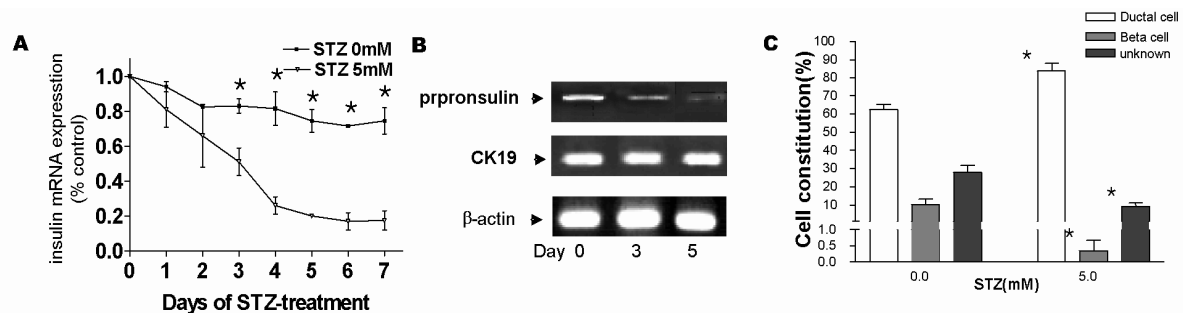


Fig 1. Removal of beta cell from pancreatic ductal cell. A, Reduction of insulin mRNA during STZ treatment (n = 4). Variation of insulin mRNA expression of STZ-treated ductal cell compared with STZ-nontreated ductal cell; B, RT-PCR showing preproinsulin and CK19 mRNA expression in the cells following STZ treatment; C, Cell constitution after STZ treatment.

* $P < 0.05$ vs. STZ nontreated ductal cell.

기 위해 STZ를 5 mM을 처리한 후 RT-PCR을 통해 전전구 인슐린 mRNA의 발현율의 변화를 살펴본 결과 5 mM STZ를 처리하였을 때 전전구인슐린 mRNA 발현이 82% 가량 감소하였고 CK19의 mRNA 발현율은 변화하지 않았다 (Fig. 1A,B). 췌관세포와 베타세포의 비율을 알아보기 위하여 CK19과 인슐린 항체를 사용하여 면역세포형광염색을 수행한 결과 STZ를 처리하지 않은 췌관세포는 9.27%의 베타세포를 포함하고 있었으며, STZ를 처리한 췌관세포는 전체세포 중 단지 0.5% 정도에서만 인슐린의 발현이 관찰되었고 전체 세포의 80% 이상이 췌관세포였다 (Fig. 1C).

2. 췌관세포의 분화

1) 췌관세포의 형태

STZ처리 후 단층 배양된 췌관세포를 인슐린 분비세포로 분화시키기 위해 4 nM activin A와 11 mM 포도당을 30일 동안 처리한 결과 monolayer를 이루고 있던 췌관세포들이 부분적으로 cluster를 형성하는 모습을 관찰하였다 (Fig. 2).

2) 분화표지인자의 변화

4 nM activin A와 11 mM 포도당을 처리하여 췌관세포를 인슐린 생성세포로 분화유도 후 표지인자로서 IPF-1, NKX6.1, PAX6, PAX4, Ngn3, NeuroD/beta2와 인슐린의

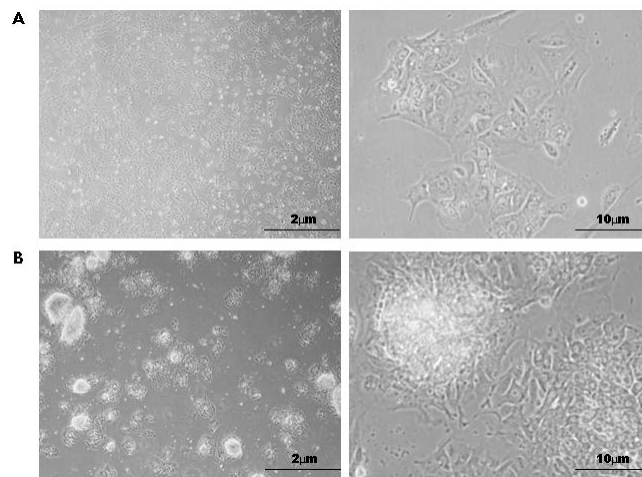


Fig 2. Morphological characteristic of pancreatic ductal cell. A, Complete Monolayer after STZ treatment for 5 days; B, Cluster formation after activin A and glucose treatment for 30 days.

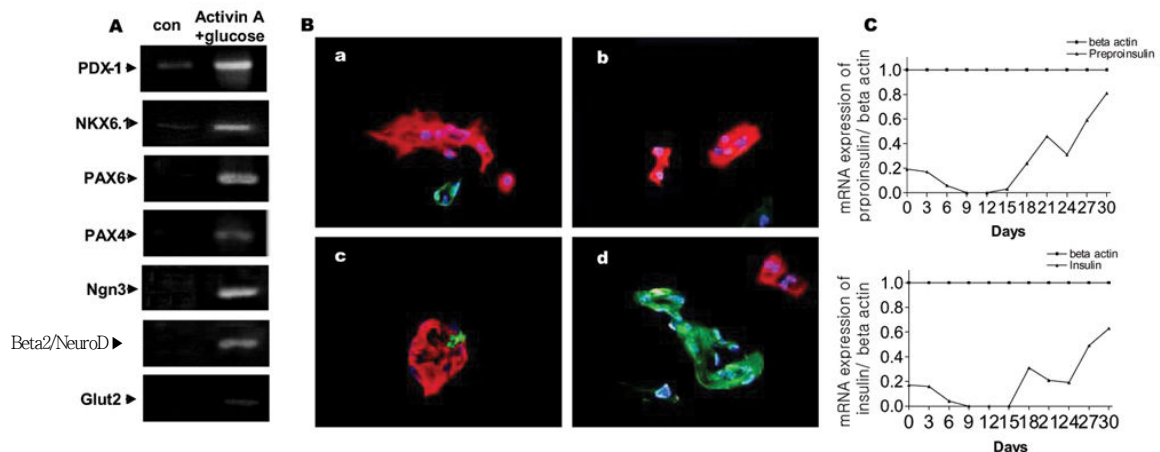


Fig 3. Effect of activin A on the differentiation of ductal cell. A, The mRNA expression of differentiation marker of activin A and glucose treated or nontreated ductal cells for 30 days; B, To characterize the cells of dispersed duct cell, triple immuno-staining with CK19,insulin and DAPI was performed. Duct cells stained with CK19 (red). Beta cells stained with insulin (green) b, STZ treated ductal cell for 5 days. c, Activin A and glucose treated ductal cell for 15 days after STZ treatment. d, Activin A and glucose treated ductal cell for 30 days after STZ treatment; C, The mRNA expression of insulin and preproinsulin during differentiation.

mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 살펴보았다. 그 결과 4 nM activin A와 11 mM 포도당을 처리한 췌관세포는 모든 베타세포의 표지인자들의 발현이 확인되었다. 반면, STZ만을 처리하고 분화유도를 하지 않은 대조세포군에서는 미약한 PDX-1의 발현만이 관찰되었고 다른 전사인자들의 발현은 확인되지 않았다 (Fig. 3A). RT-PCR과 면역형광조직 염색법을 통해 인슐린의 발현변화를 확인한 결과, STZ 처리 후에도 소량의 인슐린 mRNA의 발현이 관찰 되었으나 분화 유도 후 9일 후에는 완전히 사라졌으며 15일 후에는 일부 췌관세포 용기에서 인슐린의 mRNA와 protein이 다시 발현이 관찰되기 시작하여 30일 후에는 cluster를 형성하며 췌관세포가 인슐린 생성 세포로 분화된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B,C).

3) 인슐린 분비

STZ 처리 3일째부터 포도당 자극에 의한 인슐린의 분비는 측정되지 않았다. 4 nM activin A와 11 mM 포도당으로 분화유도 21일 후 기저농도의 포도당 자극에 의한 인슐린 분비는 관찰 되지 않았고 고농도의 포도당자극에 의한 인슐

린 분비만이 관찰되었다. 27일 후 기저인슐린과 포도당 자극에 의한 인슐린 분비가 모두 측정되었으며 유의한 차이를 나타내었다 (Fig. 4)

4) 세포 증식능 변화

STZ를 처리한 췌도세포는 배가시간 (doubling time)이 대조군에 비해 1.2배 증가하였고 분화유도시킨 췌도세포의 BrdU 결합비율은 대조군에 비해 50% 감소하였다. 반면 STZ 처리 후 activin A와 포도당으로 분화 유도시킨 췌관세포군은 세포 증식능이 다소 개선되었으나 대조군과 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 5).

고 찰

우리는 본 연구에서 기증자에게서 공여 받은 췌장으로부터 췌도세포를 분리한 후 남은 세포조각들로부터 췌관세포를 분리해내어 인슐린 분비세포를 분화시킴으로써 당뇨병의 세포 치료법에 있어서 새로운 이식원으로서의 가능성을 연구하였다.

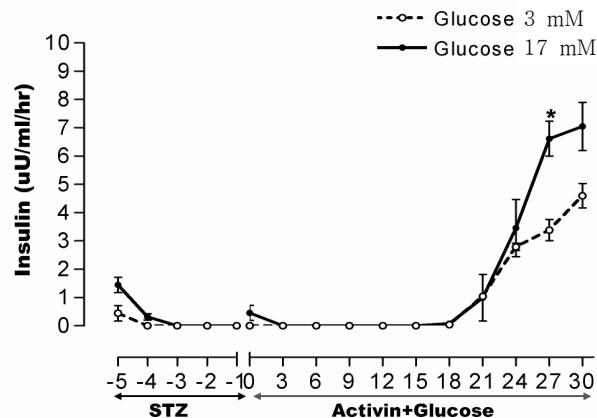


Fig 4. Variation of glucose-induced insulin secretion during differentiation.
* $P < 0.05$ vs. glucose 3 mM.

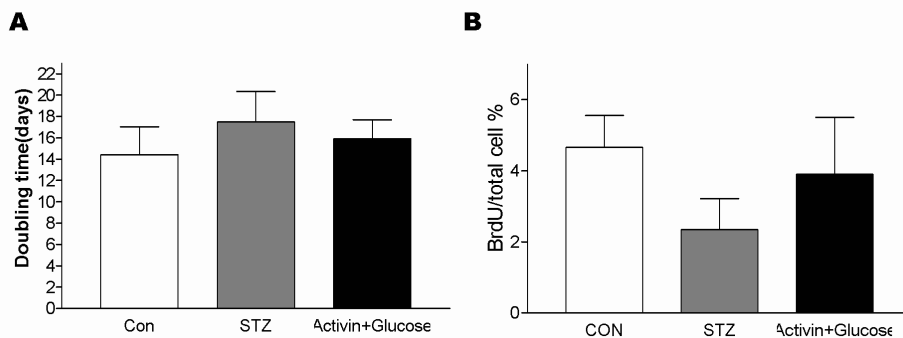


Fig 5. Variation of cell growth during differentiation.
A, Doubling times were calculated using the Schwartz equation; B, The proliferation rates were assayed by the rate of BrdU incorporation.

우리는 두 단계에 걸쳐 순수한 췌관세포를 배양하고 인슐린 생성세포로 분화시키는 방법을 개발하였다. 첫째, 췌도를 분리하고 난 나머지 부분에서 섬유아세포와 베타세포를 제거한 순수한 췌관세포를 배양하고 둘째, Activin A와 포도당을 처리하여 췌관세포에서 인슐린 분비 세포로의 분화를 유도하였다.

본 연구를 위해 사용된 재료는 췌도세포의 분리를 위해 기증된 인간의 췌장이었다. 초기 세포 준비단계에서 췌도를 분리하고 남은 세포조각에는 일정량의 섬유 아세포와 베타 세포가 포함되어 있다. 섬유 아세포는 다른 세포들에 비해 바닥에 붙는 속도와 증식속도가 빠르기 때문에 췌관세포의 장기배양을 위해서는 제거해야한다¹⁷⁾. 췌관세포에서 인슐린 생성세포가 새롭게 분화되었다는 것을 증명하기 위해서는 잔존해 있는 베타세포를 제거하는 것이 중요하다. 그러나 췌장을 분해해서 세포를 준비하는 단계에서 가장 중요한 것은 췌도세포를 분리하는 것이기 때문에 초기 세포준비단계에서 베타세포를 효과적으로 제거하는 방법은 없다. 이에 본 연구에서는 췌도를 분리하고 남은 세포조각들 중 코팅되어 있는 플라스크 바닥에 붙어 자란 세포들을 단일 세포화하여 monolayer를 형성하도록 배양하는 첫 번째 단계에서 섬유아세포가 바닥에 빠르게 붙는 성질을 이용해 췌관세포를 3시간동안 전배양시켜 섬유아세포를 효과적으로 제거한 후 설치류의 베타세포 제거에 효과적인 STZ를 처리하였다. 인간 베타세포는 STZ에 어느 정도 저항성을 가지고 있지만¹⁸⁾, 다른 약제와 조합하여 사용하면 베타세포의 종양을 효과적으로 제거한다^{19,20)}. 본 연구에서는 설치류에는 치명적인 농도의 STZ (5 mM)를 분화유도 전 단계에서 5일 동안 처리하였다. 그 결과 세포 사멸률이 다소 증가하였지만 췌관세포의 성장에는 전혀 영향을 미치지 않았고 대부분의 베타세포가 제거되었다. 남아있는 미량의 베타세포에서 인슐린 mRNA 합성이 관찰되었으나 분화유도 9일 후에는 발현이 완전히 사라졌으며 STZ 처리 후 기능성을 가진 베타세포들이 완전히 제거되어 포도당 자극에 의한 인슐린 분비는 전혀 관찰되지 않았다. STZ를 처리하고 남아있는 세포들에서는 베타세포의 분화를 유도하는 대부분의 전사인자들의 발현이 관찰되지 않았다. 하지만 인슐린과 GLUT2의 발현을 조절한다고 알려져 있는 IPF-1의 발현은 미약하게 관찰되었는데, 이것은 췌관세포에서 스스로 분화가 시작되었기 때문이라고 사료된다. 여기에 activin A와 포도당을 일정기간 처리하면 15일 후에 완전히 사라졌던 인슐린의 발현이 미약하게 나타나기 시작하고 IPF-1을 포함한 분화표지인자들의 강한 발현이 관찰되었다. 하지만 포도당 자극에 의한 인슐린의 분비와 GLUT2의 발현은 인슐린 합성시기보다 늦은 시기에 나타났다. 이는 activin A의 처리에 의해 베타세포의 분화유도 인자들의 발현이 일차적으로 췌관세포를 인슐린 생성세포로 분화시켰지만, 고농도의 포도당에 의한 인슐린

분비기능을 가진 세포로의 후분화는 제한 적으로 일어났음을 암시한다. 이에 향후 좀더 효율적인 인슐린 분비 자극원의 적용시킬 경우 더욱 유의한 결과를 얻을 것으로 예상된다.

본 연구를 통해 인간의 췌관세포를 베타세포나 섬유아세포의 오염 없이 순수하게 배양하는 방법을 확립하였고 activin A와 고농도의 포도당을 처리함으로써 베타세포의 분화에 결정적인 역할을 하는 전사인자들의 발현을 증가시켜 췌관세포를 인슐린 생성 세포로 분화시키는 것에 성공하여 췌도세포를 대신할 새로운 이식원으로서의 이용 가능성을 제시하였다. 현재 췌관세포를 완전한 췌도세포의 형태를 갖춘 세포로의 분화유도를 시행 중이며 향후 이 분화 시스템을 사용하여 임상에 적용하는 것을 목표로 하고 있다.

요 약

연구배경: 췌도세포 이식에 의한 세포치료는 당뇨병의 개선에 효과적이다. 하지만 이식원을 확보하기 위한 기여자의 장기는 한정되어 있다. 췌관세포는 췌도세포를 대신할 새로운 이식원으로서의 잠재성을 가지고 있다. 본 연구에서는 췌관세포가 포도당 자극에 반응하는 인슐린 생성세포로 분화시키는 방법을 연구하였다.

방법: 단층 배양에서 성장한 잔여 베타세포를 제거하기 위하여 STZ를 처리한 후 인슐린 생성세포로의 분화를 유도하기 위하여 activin A와 포도당을 처리하였다. 그 후에 베타세포의 분화표지인자, 인슐린의 생성 및 포도당 자극에 반응하는 인슐린 분비를 관찰하였다.

결과: STZ를 5일 동안 처리한 결과 포도당 자극에 반응하는 베타세포는 완전히 제거되었고 전체 세포 중 80% 이상이 췌관세포였다. activin A와 포도당을 이용한 분화 유도 후, 췌관세포는 고농도의 포도당에 민감하게 반응하여 인슐린을 분비하였다.

결론: 이상의 결과로 췌관세포가 activin A 와 포도당 자극에 의해 인슐린 생성 세포로 분화 가능성을 확인 할 수 있었다. 분화된 췌관세포는 췌도세포를 대체할 새로운 이식원으로서의 사용하기 위해서 췌관세포를 완전한 형태의 췌도세포로 분화시키는 방법을 연구해야 한다.

참 고 문 헌

1. Arias AE, Bendayan M: *Differentiation of pancreatic acinar cells into duct-like cells in vitro. Lab Invest* 69:518-30, 1993
2. De Lisle RC, Logsdon CD: *Pancreatic acinar cells in culture: expression of acinar and ductal antigens in a growthrelated manner. Eur J Cell Biol* 51:64-75,

- 1990
3. Hall PA, Lemoine NR: *Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas. J Pathol* 166:97-103, 1992
4. Soria B, Skoudy A, Martin F: *From stem cells to beta cells: New strategies in cell therapy of diabetes mellitus. Diabetologia* 44:407-15, 2001
5. Zhao M, Amiel SA, Christie MR, Rela M, Heaton N, Huang GC: *Insulin-producing cells derived from human pancreatic non-endocrine cell cultures reverse streptozotocin-induced hyperglycaemia in mice Diabetologia* 48: 2051-61, 2005
- 6 Klein T, Frandsen U, Heller RS, Serup P: *IMPAN Cells: A pancreatic model for differentiation into endocrine cells. Arch Biochem Biophys* 395:259-63, 2001
7. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC: *In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proc Natl Acad Sci USA* 97:7999-8004, 2000
8. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, scharz DA, Peck AB, Cornelius JG: *Reversal of insulin dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. Nat Med* 6:278-82, 2000
9. Soria B, Roche E, Berna G, Quinto TL, Reig JA, Martin F: *Insulin secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes* 49:157-62, 2000
10. Assady S, Maor G, Amit M, Eldor JI, Skorecki KL, Tzukerman M: *Insulin production by human embryonic stem cells. Diabetes* 50:1691-7, 2001
11. 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* 292:1389-94, 2001
12. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW: *Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature* 416:542-5, 2002
13. Ogata T, Park KY, Seno M, Kojima I: *Reversal of streptozotocin-induced hyperglycemia by transplantation of pseudoislets consisting of beta cells derived from ductal cells. Endocr J.* 51:381-6, 2004
- 14 Hemmati-Brivanlou A, Melton DA: *Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in Xenopus. Cell* 77:273-81, 1994
15. Moriya N, Komazaki S, Takahashi S, Yokota C, Asashima M: *In vitro pancreas formation from Xenopus ectoderm treated with activin and retinoic acid. Dev Growth Differ;* 42:593-602, 2000
16. Yamaoka T, Idehara C, Yano M, Matsushita T, Yamada T, Li S, Moritani M, Hata J, Sugino H, Noji S, Itakura M: *Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants. J Clin Invest* 102:294-301, 1998
17. Rabinovitch, A, Blondel, B, Murray, T, Mintz, DH: *Cyclic adenosine-3, 5-monophosphate stimulates islet B cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. J Clin Invest* 66:1065-71, 1980
18. Elsner M, Tiedge M, Lenzen S: *Mechanism underlying resistance of human pancreatic beta cells against toxicity of streptozotocin and alloxan. Diabetologia* 46:1713-4, 2003
19. Kaltsas GA, Mukherjee JJ, Isidori A: *Treatment of advanced neuroendocrine tumours using combination chemotherapy with lomustine and 5-fluorouracil. Clin Endocrinol (Oxf)* 57:169-83, 2002
20. Delaunoy T, Ducreux M, Boige V: *The doxorubicin-streptozotocin combination for the treatment of advanced well-differentiated pancreatic endocrine carcinoma; a judicious option? Eur J Cancer* 40:515-20, 2004