동결-융해된 인간 배반포기배 유래의 배아 간(幹)세포 배양

[1]마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소, [2]건국대학교, [3]마리아 병원

김은영[1], 남화경[1], 이금실[1], 박세영[1], 박은미[1], 윤지연[1], 허영태[1], 조현정[1],
박세필[1], 정길생[2], 임진호[3]

Establishment of Human Embryonic Stem Cells Derived from Frozen-Thawed Blastocysts

Eun Young Kim[1], Hwa Kyung Nam[1], Keum Sil Lee[1], Sae Young Park[1],
Eun Mi Park[1], Ji Yeon Yoon[1], Young Tae Heo[1], Hyun Jung Cho[1],
Sepill Park[1], Kil Saeng Chung[2] and Jin Ho Lim[3]

[1]Maria Infertility Medical Institute/Maria Biotech, Seoul 130-110; [2]College of Animal Husbandry, KonKuk University, Seoul 143-701; [3]Maria Hospital, Seoul 130-110, Korea

Objective: This study was to establish the human embryonic stem (ES) cells derived from frozen-thawed blastocyst stage embryo that were destined to be discarded after five years in routine human IVF-ET program.

Methods: Frozen-thawed and survived human blastocysts were treated by immunosurgery, and recovered ICM cells were cultured onto STO feeder layers and ICM colony was subcultured by mechanical dissociation into clumps. To identify ES cell, alkaline phosphatase staining and expression of Oct4 in replated ICM colonies were examined. Also, to examine the possibility of ES cell differentiation, retinoic acid (RA), basic fibroblast growth factor (b-FGF), nerve growth factor (NGF) were added in culture medium. In addition, to classify the specific cell type, differentiated cells were stained by indirect immunocytochemistry.

Results: One ICM colony recovered from frozen-thawed six blastocysts was subcultured, continuously replated during 40 passage culture duration (about 200 days after immuno-surgery) without differentiation. Subcultured colonies were strong positively stained by

alkaline phophatase. When the expression of Oct4 in cultured ES colony was examined, Oct4b type is more clearly indicated than Oct4a one although there was not detected in embryoid body or differentiated colony. In differentiated cardiomyocytes from ES colony, cells were beaten regularly (60 times/min). In differentiated neuronal cells from ES colony, neurofilament (NF) 200 kDa protein, macrotubule associated protein (MAP) 2 and β-tubulin of specific marker in neurons, glial fibrillary acidic protein (GFAP) of specific marker in astrocytes and galactocelebrocide (GalC) of specific marker in oligodendrocytes were confirmed by indirect immunocytochemistry. Also, muscle cells were detected by indirect immunocytochemistry. In addition, ES colonies can be successfully cryopreserved. Conclusion: Preparations of human ES cells derived from frozen-thawed blastocysts that were destined to be discarded bypass the problem of ethics in fresh embryos. Therefore, elucidating the mechanisms that control differentiation will facilitate the efficient, directed differentiation of ES cells to specific cell types (cardiomyocytes, neurons and muscle cells).

Key words: Frozen-thawed human blastocysts, Inner cell mass (ICM), Embryonic stem (ES) cell, Differentiation

---

연락저자: 김은영, 130-110 서울특별시 동대문구 신설동 103-11, 마리아병원 기초의학연구소
전화: (02) 924-8757, 팩스: (02) 924-9083, E-mail: eykim@mariababy.com
*본 연구는 현재 특허 심의 중임 (특허 출원 번호-10-2000-0050881, 10-2000-0065629)

인간 배아 간(幹)세포 (embryonic stem cell) 의 배양 및 분화 기술은 21세기 가장 핵심적인 생명공학 기술 중의 하나이다. 배아 간세포는 인간의 210여 개의 장기를 구성하는 조직으로 분화할 수 있는 무한한 잠재력을 가진 만능 세포로, 분화가 억제되고 증식만이 가능한 세포를 말한다[1]. 이들은 초기 인간의 배아 연구뿐만 아니라, 신규 성장 인자 및 의약 개발, 질병 치료, 이식 치료학에 널리 이용될 수 있다는 점에서 최근 의료 생명공학 분야에서 활발하게 연구가 진행되고 있는 추세이다[2]. 따라서 이 사업의 핵심 기술은 간세포를 분화되지 않은 상태로 계속 배양할 수 있는 배양 기술, 그리고 필요할 때에는 원하는 조직세포로의 분화를 유도할 수 있는 기술로 나눌 수 있다. 그러나 이 기술은 국외에서도 일부 연구자들만이 성공할 정도로 매우 어렵고 고난도

의 기술을 요하는 것으로 알려져 있다. 본 연구소에서는 인간의 불임 시술과정에서 사용되고 남은 잉여 배아를 5년 이상 동결보존한 뒤 폐기될 처지에 놓인 냉동 잉여 배아로부터 배아 간세포 제작 및 분화의 적정화를 유도하였던 바, 이에 대해 얻어진 연구 결과에 대해서 기술하고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 실험은 인간 시험관 아기-이식 (human IVF-ET) 프로그램으로부터 생산된 여분의 난자를 5년 이상 동결 보관해 두었던, 어쩔 수 없이 폐기될 처지에 놓여 있는 배반포기배 단계의 난자를 환자의 동의를 받고 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 인간 배반포기배의 동결과 융해

인간 배반포기배의 동결은 시험관 아기 프로그램에서 5, 6일에 생산된 난자 (Fig. 1A) 를 20% 인간 난포액이 함유된 용액에서 10분간 노출시킨뒤 5% glycerol과 9% glycerol, 0.2 M sucrose 동결 보호제가 함유된 용액에 각각 10분간 노출하여 straw에 넣어 slow-program 동결기에서 동결한 뒤 액체질소에 보관되었다[3]. 본 실험에 사용된 난자의 융해는 난자 내에 들어있는 동해제를 제거하기 위해 융해된 배반포기배를 단계적으로 5%, 3% 그리고 1% glycerol이 함유된 용액에서 각각 5분간 처리한 뒤 0.2 M sucrose에서 2분간 처리하였으며, 20% 인간 난포액에서 세척하였고, 이 과정에서 살아 남은 난자는 24시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다 (Fig. 1B) (자체 개발된 융해 방법).

2) 항-인간세포 항체의 생산

본 연구를 수행하기 위해 자체 개발된 것으로, 태아로 될 내부세포괴 세포 inner cell mass (ICM) cells만을 회수하기 위해 만들어진 특이 항체이다. 인간세포 유래의 항원은 면역증강제 (RIBI adjuvant, R-700 또는 Freunds adjuvant)와 혼합된 뒤 항체 생산주로서 토끼에 2주 간격으로 4회 주사하여 마지막 주사일로부터 10일 후에 토끼의 심장으로부터 회수된 항체이다.

3) 영양배엽세포로부터 내부세포괴세포를 회수하기 위한 면역절제술

배반포기배는 태아로 자랄 운명인 내부세포괴와 태반으로 자리잡을 영양배엽세포로 구성되어

있다. 본 실험에서 얻고자 하는 시료는 내부세포괴이다. 융해 후 살아남은 배반포기배 (Fig. 1C)는 일차적으로는 난자를 둘러싸고 있는 투명대 (zona pellucida)를 0.25% pronase로 제거시키고, 단백분해효소의 독성을 제거시키기 위해 충분히 배양시킨 뒤 1:20의 항인간세포 항체에 30분간 노출시킴으로써 항원 항체 반응을 유기하고, 여기에 guinea pig complement를 30초간 처리함으로써 영양배엽세포를 괴사시켰다 (Fig. 1D). 이와 같이 처리된 난자에서 미세한 pipette을 이용하여 내부세포괴만을 회수하였고 (Fig. 1E), 회수된 내부세포괴는 STO세포 위에 놓음으로써 공동배양을 실시하였다 (Fig. 1F).

4) STO (mouse embryonic fibroblast) 세포의 준비

배반포기배로부터 회수된 내부세포괴가 체외에서 배아 간세포로서 분화되지 않고 증식만을 하게 하기 위해서는 분화억제와 관련된 여러 인자들을 배양시에 첨가해 주어야만 한다. STO세포는 분화억제인자를 분비하는 세포주로서 일반적으로 배아간세포 제작시에 많이 사용되는 세포이다. 또한 분화 억제인자로서 배양액에 백혈병억제인자 (leukemia inhibitory factor, LIF)를 첨가한다. STO 세포는 ATCC (American Type Culture Collection) 사로부터 구입되었으며, 배양용기에서 2일에 한번씩 계대되어지며, 내부세포괴의 배양에 사용되기 위해서는 mitomycin-C에 2시간 반가량 처리시킨 후 회수된 세포를 소적으로 제작하여 이용되었다.

5) 내부세포괴세포의 배양 및 계대배양

STO세포와 공동배양된 내부세포괴세포는 20% FBS, 1 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acid와 0.1 mM β-mercaptoethanol이 들어 있고 2000 unit의 LIF가 들어 있는 DMEM (Gibco, high glucose 4.5 g/L, no pyruvate)에서 매일 신선하게 배양되었으며, 배양 후 형성된 내부세포괴 덩어리는 새로운 STO 소적으로 옮겨 주었다. 이와 같은 내부세포괴 덩어리는 여러 덩어리로 나누어 대략 7일에 한번 정도 새로운 STO 소적에서 배양하였다 (Fig. 1G-I).

6) 배아 간세포 확인

i) 형태학적 관찰

내부세포괴세포의 발달 양상은 현미경 하에서 매일 관찰되었고, 배아 간세포로의 발달 가능성 평가 기준은 Thomson 등[1]과 Reubinoff 등[2]의 논문에 근거하였다 (Fig. 2A).

ii) Alkaline phosphatase activity 측정

미분화된 간세포의 표식인자로 가장 많이 사용되는 방법으로, 배아 간세포로 추정되는 세포 덩어리는 4% formaldehyde에서 15분 고정시키고 멸균 증류수로 세 번 정도 세정한 뒤 Fast Red TR/Naphthol AS-MX 용액 (Sigma)을 이용하여 15 ~ 30분간 염색하여 그 염색 정도를 관찰하였다 (Fig. 2B). 이 방법 또한 Thomson 등[1]과 Reubinoff 등[2]의 논문에 근거하였다.

iii) Oct4 발현 유무 확인

Oct4는 초기 배아와 생식선 그리고 배아 간세포에서 특징적으로 강하게 발현되는 인자로 alternative splicing form으로 a 와 b 형태가 존재한다. 배아 간세포 colony는 일반적인 처리 방법이 아닌 whole cell extraction[4] 과정을 통해서 RNA를 추출하였고, 이를 이용하여 cDNA를 준비하였다. PCR은 94℃에서 1분, 55℃에서 1분 그리고 72℃에서 1분간씩 35회를 실시하였고, 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 ethidium bromide 염색으로 확인하였으며 image analyzer (Biorad)에서 조사하였다. Oct4에 대한 primer는 Takeda 등[5]의 논문에 근거하여 다음과 같이 준비하였다 (anti sense primer는 Oct4a,b 동일, 5'-CCACATCGGCCTGTGTATAT-3', 그리고 sense primer는 각각 다름, Oct4a: 5'-CTCCTGGAGGGCCAGGAATC-3', Oct4b: 5'-ATGCATGAGTCAGTG
AACAG-3').

7) 배아 간세포로부터 특정세포로의 분화 유도

i) 특정세포로의 분화유도

STO feeder 세포가 없고 LIF가 첨가되지 않는 조건하에서 내부세포괴의 배양에 사용된 기본 배양액 (L-glutamine, non-essential amino acid 와 20% FBS가 들어 있는 DMEM)에 성장인자를 첨가하여 줌으로써 유도하였다. 심근세포로의 분화는 분화 과정 중에 있는 colony에 1 uM의 retinoic acid를 첨가하여 배양하여 유도하였고 (Fig. 5A-C), 신경세포로의 분화를 위해서는 embryoid body나 분화 과정 중에 있는 colony에 1 uM retinoic acid (RA), 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (b-FGF), 100 ng/ml nerve growth factor (NGF)를 단독으로 또는 병용 첨가하여 배양하였다 (Fig. 5D). 또한 근육세포로의 분화는 심근세포 분화 조건에서 확인되었고, 모든 특정세포로의 분화 확인은 1차적으로는 형태학적인 구분에서 이루어졌다.

ii) 면역세포화학적 염색 방법을 통한 분화된 세포의 특성 규명

외형상 특정세포로 분화된 colony는, 신경세포를 확인하기 위해서는 neurofilament (NF) 200 kDa protein (Sigma)과 microtubule assisted protein (MAP) 2 (Sigma) 그리고 β-tubulin (Sigma)에 대한 monoclonal 항체를 (Fig. 5E-G), 신경보조세포를 확인하기 위해서는 glial fibrillary acidic protein (GFAP)과 galactocelebrocide (GalC)에 대한 polyclonal 항체를 (Fig. 5H-J), 그리고 심근세포의 특성을 확인하기 위해서는 muscle actin (Sigma)에 대한 특이성이 있는 monoclonal 항체를 준비하였고 (Fig. 5K-L), 또한 각각의 항체에 대한 반응정도를 확인하기 위해서는 FITC가 붙은 2차 항체를 준비하였다. 염색을 위한 전과정은 4℃에서 실행하였다. 이 방법은 Reubinoff 등[2]의 방법에 근거 하였다.

8) 배아 간세포의 동결보존 및 융해

배아 간세포의 장기간 보존 가능성을 알아보기 위해 동결을 실시하였다. 배아간세포의 동결에 필요한 동결액은 배아 간세포의 배양액에 10% DMSO를 첨가하여 필터한 후 사용하였고, 동결액에 대한 독성을 줄이기 위해서 배아 간세포 colony를 동결액이 들어 있는 동결 튜브에 직접 넣었으며 동결은 -20℃에서 2 시간 놔 두었다가 -70℃에서 보관하였다. 융해시 배아 간세포가 들어 있는 동결 튜브는 36℃ 수조에서 완전히 융해하였으며, 동결 튜브안에 있는 내용물은 배아 간세포 배양액에 넣어 동해제를 제거하였고, 회수된 배아간세포 덩어리는 곧 바로 배양용기에 넣어 그 생존능을 조사하였다 (Fig. 6).

결 과

융해된 총 6개의 인간 배반포기 배아에서 면역절제술에 이용될 수 있는 4개의 배아를 얻는데 성공하였고, 영양배엽세포로부터 성공적으로 분리된 4개의 내부세포괴로부터 2개가 colony를 형성하였으며, 이 2개의 colony는 여러 개로 나누어 재배양을 유도하였고, 그중 1개의 replating된 내부세포괴들은 40회 (면역절제술 후 대략 200일) 계대되는 동안 분화되지 않고 계속 성장되었다 (Table 1). 배아 간세포를 확인하는 방법으로 alkaline phosphatase 염색과 Oct4 발현 유무를 조사하였던 바, alkaline phosphatase 염색의 경우 Fig. 2의 B에서 보는 바와 같이 배아 간세포 colony에서 강하게 염색이 되었으며, 분화된 세포 형태인 embryoid body (Fig. 2C)에서도 일부의 세포가 염색이 되는 것을 확인하였다. 또한, Oct4의 발현 유무의 조사에서 배아 간세포는 Oct4a 보다는 Oct4b가 강하게 발현되는 것을 확인하였으며 (Fig. 3), 또한 Oct4b는 배아 간세포 colony에서는 나타나지만 embryoid body (Fig. 3)나 분화된 colony (Fig. 4)에서는 나타나지 않

았다. 본 실험에서 배아 간세포의 분화는 심근세포, 신경과 신경보조세포 및 근육세포로 유도되었다 (Fig. 5). 분화된 세포의 확인은 일차적으로 형태학적인 구분으로 이루어졌으며, 이차적으로는 각 세포의 특징이 되는 인자로 확인하였다. 심근세포의 경우 규칙적인 심박수 (heart beat, 60회 이상/1분) 로 확인하였다. 신경세포의 경우 면역화학적 세포염색 방법을 통하여 신경세포 특이 인자인 NF200, MAP2와 β-tubulin 염색을 확인하였고, 신경보조세포 astrocyte의 특이 인자인 GFAP와 oligodendrocyte의 특이 인자인 GalC가 확인되었다 (Fig. 5). 근육세포는 muscle specific actin에 대한 항체를 이용하여 면역화학적 세포염색 방법으로 확인되었다. 배아 간세포의 동결보존 가능성은 Fig. 6에서 보여주는 바와 같이 융해 후에도 생존이 가능함을 확인하였다.

고 찰

본 실험은 동결-융해된 인간 배반포기 배아로부터 배아 간세포의 확립이 가능하고 이와같이 확립된 배아 간세포로부터 특정세포로의 분화가 가능함을 나타낸다. 인간 배아 간세포에 대한 연구는 1998년 미국 위스콘신대와 존스홉킨스대 (Thomson 등[1]; Shamblott 등[2]) 에서 각각 인간 배아 간세포의 수립을 보고함으로서, 간세포는 초기 인간 배아 연구를 포함한 의약품의 개발 및 질병 치료 그리고 이식대체요법에 획기적으로 사용될 수 있을 것으로 전망되었다. 그러나 인간 배아를 이용한 배아 간세포의 개발은 배아의 수급사정 및 윤리적인 문제 간세포 제작의 기술적 어려움 때문에 신선 배아만이 이용될 수 밖에 없었으나[1,2], 본 실험에서는 불임시술 후 5년 이상 냉동 보관된 뒤 어쩔수없이 폐기될 처지에 놓여 있는 냉동 잉여배아를 이용하여 배아간세포 제작에 성공하였으며 이를 이용하여 심근세포, 신경과 신경보조세포 및 근육세포로의 분화가능성을 확인하였다. Thomson 등[1] 은 시험관 아기 시술 후 남은 몇 안되는 신선 잉여 배아를 환자의 동의를 받고 사용하여 배아 간세포를 제작하였으며, 그 배아 간세포를 면역 결핍된 마우스에 주입함으로서 외배엽 (신경과 피부세포), 중배엽 (근육조직, 연골조직, 뼈) 및 내배엽 (내장 상피 세포) 으로의 분화 능력을 간접적인 분화유도 방법을 통해 확인하였다. Shamblott 등[6] 은 5주 내지 9주령의 유산된 태아의 원시생식세포에서 분화되지 않은 원시 생식세포를 배양함으로써 간세포를 얻는데 성공하였다. 이후 2000년 Reubinoff 등[2]은 수정 후 6일된 배반포기 배에서 얻어진 배아 간세포가 생체내 및 생체외에서 원하는 특정 조직 세포로의 분화가 가능함을 발표하였으며, 생체내 배양으로는 면역 결핍된 마우스에서 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로의 분화 능력을 간접적으로 확인하였고, 생체외 배양으로는 신경세포로의 분화능력을 직접적인 분화 유도 배양 방법을 통해 확인하였다. 본 실험에서 배아 간세포를 확인하는 방법 중 하나로 Oct4의 발현 유무를 조사 하였던 바 초기 배양 단계에서부터 대략 200여일까지도 배아 간세포에서 발현이 되었음을 확인하였다. 한편

배아 간세포는 자연 발생적 분화 (spontaneous differentiation)의 특성이 강하다[2]. 본 실험에서 배아 간세포를 배양하는 과정에서 배아는 고전적인 모양의 colony, 내외강의 형태를 갖춘 colony, 분화되는 colony등 다양한 양상으로 나타났다. 인위적인 분화 유도는 분화양상으로 가는 일부의 colony를 옮겨서 배양하거나, embryoid body를 이용했다. 일반적으로 embryoid body는 간세포를 혈청이 없는 배양액내에서 부유배양 하였을 때 형성되는 것으로 알려져 있으나 분화되는 세포군에서 과밀도 상태가 될 때 형성되기도 한다. 또한 배아 간세포의 분화유도 연구에 있어서, 적절한 성장인자들을 조합하여 배양액내에 첨가하면 배아 간세포는 특정세포로의 분화 유도가 가능하다[7-10] 고 알려져 있지만, 최근 Shuldiner 등[11]에 의해 밝혀진 바에 따르면 각각의 성장인자가 단일 세포 형태로만의 분화를 유도하지는 않으며 개별 성장인자에 의해서 분화가 유도되더라도 다양한 세포 형태가 나타난다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 특정세포로의 분화를 위해서 각 세포군의 발달에 맞는 성장인자를 첨가하여 비교 조사하였던 바 배양기간이 길어지고 계대배양을 할수록 특정세포로의 특성은 뚜렷해지지만 이 시기에도 여러 세포가 혼합된 형태임을 알 수 있었다. 배아 간세포를 제작하고 분화시켜 세포치료요법에 사용하는 기술은 1998년 이후 그 가능성이 제시되어 전 세계의 많은 연구자들이 같은 실험 결과를 목표로 매진하고 있으나 아직까지는 세포치료요법단계에서 뚜렷한 결과가 없는 과정 중에 있다. 선진국과 비교해 볼 때 우리나라는 생명공학분야가 연륜이나 규모 면에서 취약하지만 기술적 수준이 높아, 배아 간세포 제작 기술의 경우 선진국과 크게 차이가 나지는 않는다. 특히 본 실험실에서 실시한 폐기될 냉동 잉여 배아를 이용하는 배아 간세포의 제작은 신선 배아를 이용하는 경우보다 윤리적인 문제에서 좀 더 자유로울 수 있고 배아 간세포의 무한한 이용 가능성이 긍정적인 평가가 이루어져, 영국 뿐만 아니라 2000년 미국 정부가 냉동 잉여배아의 경우 연방 정부 차원의 연구 지원을 하겠다는 연구 내용이다. 향후 계속된 간세포 분화연구로 다양한 조직으로의 분화가능성을 확인하는 기술만 확보한다면 세포대체요법에 의한 난치병 치료 시장에서 선진국과 대등한 위치를 얻을 것으로 기대된다. 상기에서 언급한 바와 같이 배아 간세포 배양기술이 확립되면 1) 유전자 치료법, 세포 치료법, 조직공학 기술 등 현재 개발되고 있는 다른 기술과 접목되어 의학 기술의 엄청난 시너지 효과를 나타낼 것이며, 이를 통해 의료 기술의 일대 혁명을 유도할 것이다. 2) 지금까지 난치병, 불치병으로 여겨져 왔던 여러 질병의 치료법이 개발되어 사회적으로 삶의 질이 크게 향상될 것이다. 3) 간세포 배양기술은 경제적인 측면에서도 엄청난 파급효과를 줄 것이며 전체 의약시장이 향후 크게 확대될 것으로 예상된다.

참 고 문 헌

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998;282:1145-1147.
2. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nature Biotechnology 2000;18:399-404.
3. Menezo T., Kaufmann RA., Nicollet B. et al. Efficiency of a simplified thawing protocol for human co-cultured blastocysts. Abstract ASRM 52nd Annual Meeting 1996.
4. Daniels R, Hall V, Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. Biology of Reproduction 2000;63:1034-1040.
5. Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosome location, and expression at low levels in adult tissues. Nucleic Acids Research 1992; 20:4613-4620.
6. Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg E, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:13726-13731.
7. Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture Mol cell Biol 1993;13:473-486.
8. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. J Cell Sci 1997;110:1279-1285.
9. Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft FC, Wobus AM. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. FASEB J 1997;11:905-915.
10. Br stle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, Mckay RD. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. Science 1999;285:754-756.
11. Shuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight

growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:11307-11312.

Table 1. Human embryonic stem cells derived from frozen-thawed blastocyst stage embryos

Pts no.	No. of thawed blastocyst	No. of survived blastocyst	No. of immuno-surgery	No. of plated ICM cells	No. of attached ICM cells	No. of colony formed	No. of passage cultured*
2	6	5	4	4	2	2	1

*Culture duration of hES cells: 40 passage (about 200 days)

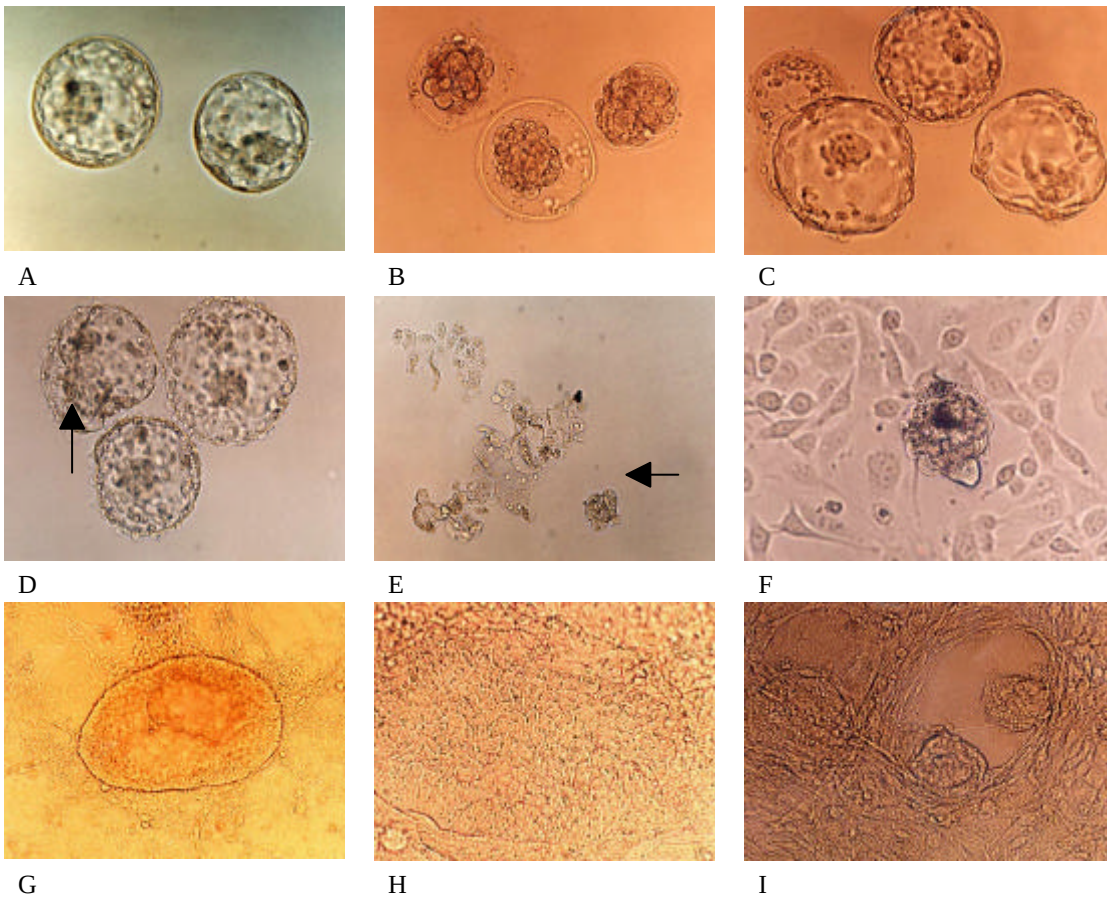

Fig. 1. Frozen-thawed human blastocysts, ICM recovery after immunosurgery and plating onto STO feeder cells. (A) In vitro produced human blastocysts. x 150. (B, C) Frozen-thawed blastocysts. x 150. (D) Bleb formation (arrow) immediately after immunosurgery. x 150. (E) Isolated ICM cell (arrow). x 150. (F) Plating of ICM onto STO cells. x 300. (G) Colony of ES cells. x 40. (H)

Higher magnification of an area of an ES cell colony. x 400. (I) Replated ES cell colony. x 100.

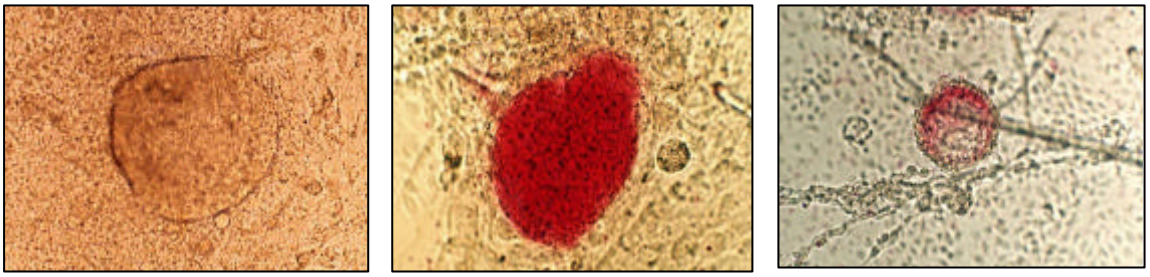

Fig. 2. Alkaline phosphatase activity assay of ES colony and embryoid body (EB). (A) ES colony formation after ICM plating. x 300. (B) Alkaline phosphatase staining of ES colony formation after ICM plating. x 300. (C) Alkaline phosphatase staining of EB. x 300.

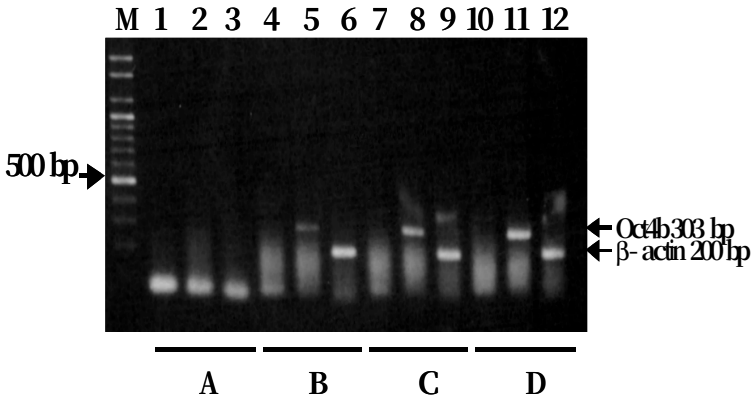

Fig. 3 Comparison of expression of Oct4 in embryoid body (EB) and embryonic stem (ES) colony. A: EB, B-D: ES colony in 8, 15, 30 passage, respectively. M; DNA ladder, 1, 4, 7 and 10 ; Oct4a, 2, 5, 8 and 11 ; Oct4b, 3, 6, 9 and 12 ; β-actin.

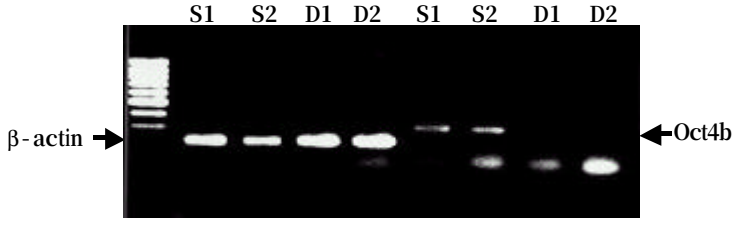

Fig. 4. Comparison of expression of Oct4b in embryonic stem (S) and differentiated stem (D) colony.

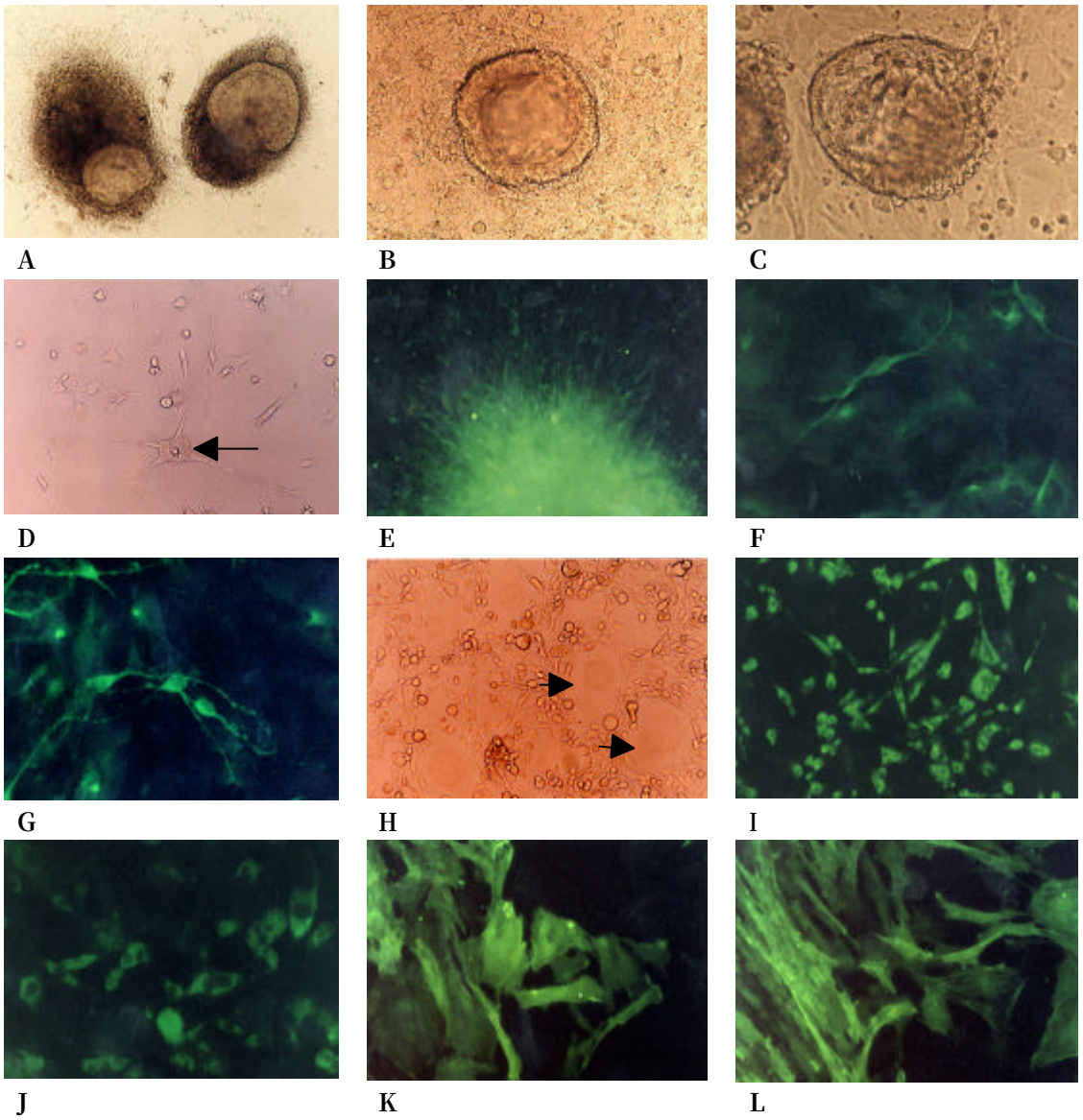

Fig. 5. Differentiated cell types derived from ES cells; Cardiomyocytes (A-C), neuronal cell (D-J) and muscle cells (K-L). A-D and H: Phase contrast micrographpic image. E-G and I-L: Indirect immunofluorescence microscopy of differentiated cells. A: Differentiated ES colony. x 40. B: Cardiomyocyte formation. x60. C: Beating cardiomyocytes. x 100. D: Typical neuron (arrow). x 100. H: Glial cells (arrows). x 100. Neuronal cells stained with anti-neurofilament 200 kDa protein, x 40 (E), anti-microtubule associated protein 2, x 600 (F), and anti-β-tubulin, x 600 (G). Glial cells stained with anti-glial fibrillary acid protein, x 100 (I), anti-galactocelebrocide, x 200 (J). Muscle cells stained with anti-muscle actin, x 400 (K-L).

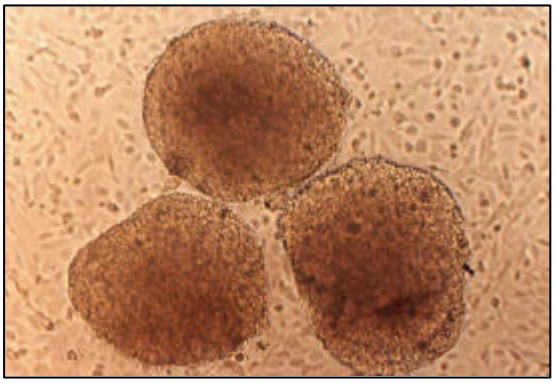

Fig. 6. Frozen-thawed and survived human ES colonies. x 60.