

배아주간세포수립을 위한 Alkaline Phosphatase(AP)의 상이한 발현 양식의 추적

김진희 · 차수경 · 노민경 · 송상진 · 구덕본 · 이훈택 · 정길생
건국대학교 동물자원연구센터

Follow Up Expression Patterns of Alkaline Phosphatase (AP) as a Marker for Establishing Mouse Embryonic Stem (ES) Cells

Kim, J.H., S.K. Cha, M.K. Roh, S.J. Song, D.B. Koo, H.T. Lee and K.S. Chung
Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

The putative totipotency germ cells has a relative abundance of alkaline phosphatases. Thus, histological staining of AP activity offers a new route to isolate totipotent cells and also provides insights into culture systems of these cells. Furthermore, the AP staining technique is simple and fast, requires only the naphthol AS/MS substrate in combination with trapping diazonium salts such as fast red or fast blue. However, our unexpected finding was that AP staining of mouse ES cells were detected in the undifferentiated epiblast-derived cells as well as several types of differentiating cells. This findings are different from results of Talbot et al. (1993) reported usefulness of the AP staining and implies that histological staining of AP may not be useful to determine undifferentiated state or totipotency of ES cells. Thus, we have investigated the patterns of AP expression by RT-PCR in order to identify a marker of undifferentiated ES/primordial germ (PG) cells. In RT-PCR analysis, embryonic (E)-AP was detected only in undifferentiated ES cells, but intestinal(I)-AP was not detected in all of the examined ES and PG cells. In addition, nonspecific (NS)-AP was detected in undifferentiated PG cell from day 7. 5 to 13 of gestation. Histological activity of AP in ES cells was completely suppressed by addition of L-phenylalanine (Phe), L-homoarginine (Har), and L-phenylalanyl-glycylglycine (PheGlyGly) as an inhibitor, but RT-PCR showed the same results as in the absence of an inhibitors. Our findings suggested that expression of E-AP and NS-AP may use as a marker to determine the undifferentiated status in ES and PG cells.

(Key words : mouse, ES, alkaline phosphatase, RT-PCR, expression)

I. 서 론

배아주간세포(embryonic stem cells)는 배반포(blastocyst)의 내부에 존재하는 내부세포괴(inner cell mass) 유래의 미분화된 상태에서 무한히 증식할

수 있는 성질에 의해 Evans와 Kaufman에 의해 최초로 분리되었다(Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). 배아주간세포는 내부세포괴와 거의 동일한 성질을 가지며, 또한 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 전능성(totipotency)과 다능성(pluripotency)을 지니고 있으며 (Robertson, 1987; Andrews et

al., 1987; Doetschman et al., 1988), 수정란의 배반포에 주입함으로써 카이메라 (chimerica) 생쥐를 생산할 수 있다(Robertson et al., 1986; Robertson, 1991; Lallemand and Brulet, 1990; Mann, 1990). 이때, 배아주간세포가 난자 및 정자를 생산하는 원시생식세포(primordial germ cell)로 배분된 경우 카이메라 생쥐를 교배하는 것에 의해 순수한 배아주간세포 유래의 생쥐를 생산할 수 있다(Bradley et al., 1984). 따라서, 이들 배아주간세포를 이용해 새로운 유전형질을 가진 개체를 생산하는 최대의 잇점은 다음과 같다.

1) 배양세포 단계에서 인위적 조작에 의해 외래유전자를 도입해 다수의 세포를 재료로 목적의 유전자를 가진 형질전환동물을 생산할 수 있다(Hanaoka, 1991).

2) 발생치사를 야기하는 유전자의 경우 수정란에 유전자를 주입해 형질전환 동물을 생산할 수 없는 반면, 배아주간세포의 경우 공여란배에 주입후 카이메라 생쥐의 생산에 의해 발생단계에 이상을 가진 유전자의 기능을 조사할 수 있다(Roberson, 1987).

3) 돌연변이를 가진 개체를 인위적으로 생산할 수 있다(Robertson, 1991; Yagi와 Aizawa, 1991).

4) 상동유전자 치환 (homologous recombination) 또는 유전자 표적 (gene targeting)을 행할 수 있다 (Noguchi와 Nakatsuji; Riele et al., 1990; Setoyama, 1991; Yagi와 Aizawa, 1991).

이 같은 방법에 의해 목적으로 하는 유전자를 염색체상에서 파괴(loss function) 혹은 획득(gain function)함으로써, 또는 발현조절 부위를 치환함으로써 인위적 조절에 의한 특이목적 가진 새로운 형질을 생산할 수 있다. 또한, 이들 배아주간세포는 웅성 및 자성유래의 ES가 수립되어 있으며(Mann et al., 1990), 기존의 보고와는 달리 ES단독으로 태아로의 발생가능성이 보고되어(Nagy et al., 1990)있다.

배아주간세포는 형질전환 동물을 생산하는 여러 방법중 가장 정밀하게 유전자를 추적할 수 있는 장점에도 불구하고, 시험관내에서 쉽게 분화하여 전능성 및 다능성을 상실하는 것으로 알려져 있다(Roberson, 1987). 이 같은 문제점을 해결하기 위한 연구의 일환으로 미분화 표식인자인 SSEA (Solter et al, 1978), C4F9(Tokonaga and Imai, 1994), AP(Hahnel et al., 1990)등이 개발되어 있지만, 이들 표식인자 역시

미분화된 세포는 물론 분화 중이거나 또는 분화된 세포에서도 폭넓게 염색되는 것으로 알려져 있다(Koopman and Cotton, 1984; Pease et al., 1990; Smith and Hooper, 1983). 또한, 이들 표식인자의 가장 큰 문제점은 비록 이들 표식인자에 의해 미분화된 다능성의 세포는 식별 가능하다고 하더라도 전능성을 가진 세포를 구별할 수 없는 한계성을 가진다.

따라서, 본 연구는 미분화 ES/PG세포의 표식인자로서 가장 일반적으로 사용되고 있는 AP types을 식별함으로써 보다 정밀하게 미분화 및 전능성을 가진 ES세포를 선별하기 위하여 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. Feeder layer준비

STO세포주(ATCC사) 혹은 태아섬유아세포는 DMEM에 10% FBS를 첨가한 배지에서 배양되었으며, 이들 세포가 confluent에 달한 경우, 신선한 배지에 mitomycin C (Sigma)을 10 μ g/ml 농도를 첨가하여 2~3시간 배양함으로써 성장을 불활성화시켰다. 이들 불활성화된 세포는 0.05% trypsin(Difco)과 1mM EDTA을 함유한 Dubellcco's PBS(Ca²⁺과 Mg²⁺ free, pH 7.4)를 사용하여 해리하였다. 원심분리후 해리용배지를 Roberston(1987)에 의해 묘사된 ES 배지로 교환한 후, 0.1% gelatin (Swine skin type I, Sigma)이 처리된 조직배양기에 3~4 \times 10⁵/ml 농도로 seeding하였다. 단 태아섬유아세포를 feeder layer로 사용한 경우 STO 세포에 비해 농도인 5 \times 10⁵의 농도로 seeding한 후 수시간 혹은 하루 밤 경과후 feeder layer로 사용하였다.

2. 내부세포괴의 분리 및 ES 세포의 확립

회수된 배반포는 ES배지에서 4일간 배양한 후, 내부세포괴만을 취하여 trypsin/EDTA용액으로 5분 정도 전처리한 다음 심하게 pipping함으로써 수십 개의 작은 세포로 해리하였다. 이들 해리된 세포는 24 well의 feeder layer상에 plating함으로써 여러 형태의 colony가 관찰될 때까지 배양하였다. 이들 유래의 세포중 비교적 작은 크기의 세포로, 세포질에 비해 큰 핵을 가지며 세포 경계면이 분명하지 않은 colony가 직경이 200~300 μ m 정도의 크기로 성장한 경우 해리

하여 다시 신선하게 준비한 12 well의 feeder layer에 re-plate하였다. 상기 과정의 반복후 35mm 배양기에서 성공적으로 증식된 ES세포를 pasage 0로 명명하였으며, 이후 매 3일 간격으로 해리함으로써 계대배양을 실시하였다.

3. AP staining

AP 염색은 Sigma사의 방법에 따라 실시하였다. 간단히 요약하면, 세포는 4%의 formaldehyde에서 10분 정도 고정시킨 후, 멸균증류수로 세번 정도 세정하였다. 이들 세포는 1mg/ml Fast Red TR salt와 0.4 mg/ml naphthol AS-MX phosphate (Sigma Chemical Co. Bulletin No. 85) pH 8.4를 함유한 증류수용액에서 30분간 염색되었다.

4. AP primers의 작성

ES세포에서의 AP type를 결정하기 위하여 Hah-nell등(1990)의 보고에 따라 I-AP, E-AP, NS-AP의 primers를 다음과 같이 작성하였다: I-AP: 5'-GCT-GGAACCCAGACCCCGAG-3', anti5'-GGCCCTCTCGATGGCTAAGTCG; E-AP: 5'-CGCAC-CAGTGAGCAGGACACG, anti 5'-GCCCCGGC-TCACTGCACTGC-3'; TN-AP: 5'-GTGGATAC-ACCCCCGGGGC, anti5'-GGTCAAGGTT GG-CCCAATGCA-3'. NS-AP는 genomic DNA인 경우 1530bp를, RNA인 경우는 330 bp를, E-AP는 genomic DNA인 경우 638bp, RNA인 경우는 438bp를, I-AP는 genomic DNA인 경우는 679bp를, RNA인 경우는 396bp를 증폭한다.

5. mRNA의 분리 및 RT-PCR

배양중인 ES세포의 total RNA는 먼저번의 보고에 따라 분리되었으며(Kim et al, 1994), 분리된 RNA (1 μ g)는 Clontec사의 cDNA전환키트를 이용하여 역전사후, 이 cDNA의 1/10를 PCR에 이용하였다. PCR의 여러 조건은 먼저번의 논문에 준하여 실시되었다(Kim et al, 1994).

III. 결과 및 고찰

1. 배아주간세포의 수립

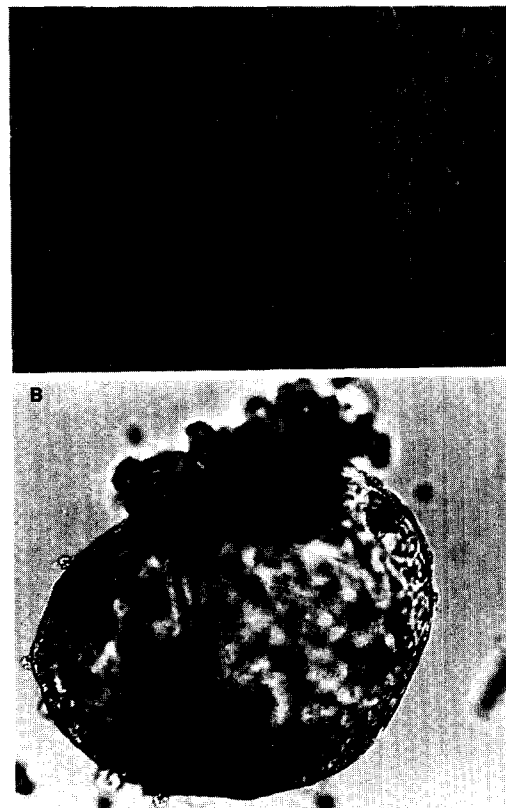


Fig. 1. A representative ES cells line established from C57BL/6 mouse.
A) undifferentiated ES cells (passage 6)
B) embryonic disc differentiated *in vitro*

Fig. 1의 A는 본 실험에 의해 분리된 생쥐 C57BL/6종으로 부터 확립된 배아주간세포의 전형적인 그림이다. 비록 이 세포의 전능성은 검증되지 않았지만 3개월 이상을 미분화된 상태로 유지되었으며, 형태학적으로는 비교적 작은 형태의 세포로서, 세포질에 비해 큰 핵을 가졌고, 세포 경계면이 불분명한 미분화된 특성을 보였다. 또한 Fig. 1의 B와 같이 체외에서 분화를 유도한 경우, 내배엽과 외배엽을 가진 embryonic disc로 발달하였다. 이러한 결과는 적어도 이들 ES유사세포는 다능성을 보유함을 시사해 주고 있다고 본다. 그러나, C57BL/6종과 이 종의 hybrid을 이용

한 계통을 제외한 중에서는 ES세포를 수립할 수 없었다. 이들 사실은 전능성을 가진 미분화된 세포와 다능성만을 가진 미분화된 세포 사이에는 유전자의 발현양식이 다르게 존재할 수 있다는 가설의 제안이 가능하다고 본다. 즉, 이 가설은 ICM세포가 어느 특정시기에 전능성을 가진 ES세포로 되기 위해 변성이 일어난다는 부가적인 가설을 야기할 수 있다. 이는 모든 ICM이 ES세포로 되는 것이 아니라 일부의 ICM만이 불사화된 전능성을 가진 ES로 수립된다는 사실을 의미하고 있다. 이 가설의 구체적인 실례로서, SV129 strain이 유독 ES세포를 수립하기 쉬운 종이라는 사실(Robertson et al, 1986)과 C57BL/6종 이외에는 수립된 ES세포로부터 카이메라의 생산이 보고되어 있지 않은 반면 BABL/C의 계통은 ES수립이 매우 어렵다는 사실에 의해서도 알 수 있다. 또한, 마우스 이외의 종에서는 비록 흰쥐의 경우 수립된 ES세포가 카이메라를 형성하였으나, germline에 참가하지 않았지만(Philip et al, 1994) 아직까지 생식세포 카이메라가 생산되지 않은 사실에 의해서도 유추될 수 있으며, 이러한 가설은 종간의 내부세포괴에서 발현하는 유전자를 상호비교함으로써 종 특이적 유전자가 단리될 때 증명될 수 있을 것이라고 사료된다.

2. AP염색법은 미분화의 마크로서 이용될 수 없다.

현재 ES/PG세포의 미분화된 형태를 결정하기 위해 가장 폭넓게 사용되는 방법으로서, AP staining이 사용되고 있다. 그러나, Fig. 2에서와 같이 AP염색은 미분화된 세포는 물론 분화중이거나, 이미 분화가 완료된 세포에서도 강력한 AP염색을 나타내었다. Fig. 3은 ES유사세포의 수립과정 및 분화에 따른 AP발현의 양식을 나타내는 그림이다. 그림에서 보는 바와 같이 ICM유래의 ES 유사 세포 (A: primary colony, B: secondary colony, C: ES-like cell, D: 분화 3일째의 ES유래의 세포, E: 분화 5일째의 ES유래의 세포, E: 분화 10일째의 embryonic disc)는 AP 염색에 의해 미분화 및 분화과정의 세포에서 강력한 AP염색을 나타내었다. Fig. 2와 3-E에서 알 수 있듯이 AP염색법은 이미 분화된 embryonic disc는 물론 다양한 세포로 분화된 경우에도 강력하게 발현되어, 미분화 정도의 척도로서 활용 불가능함을 시사한다. 또한, AP염색법은 세포의 고정방법에 따라 상당한 변이

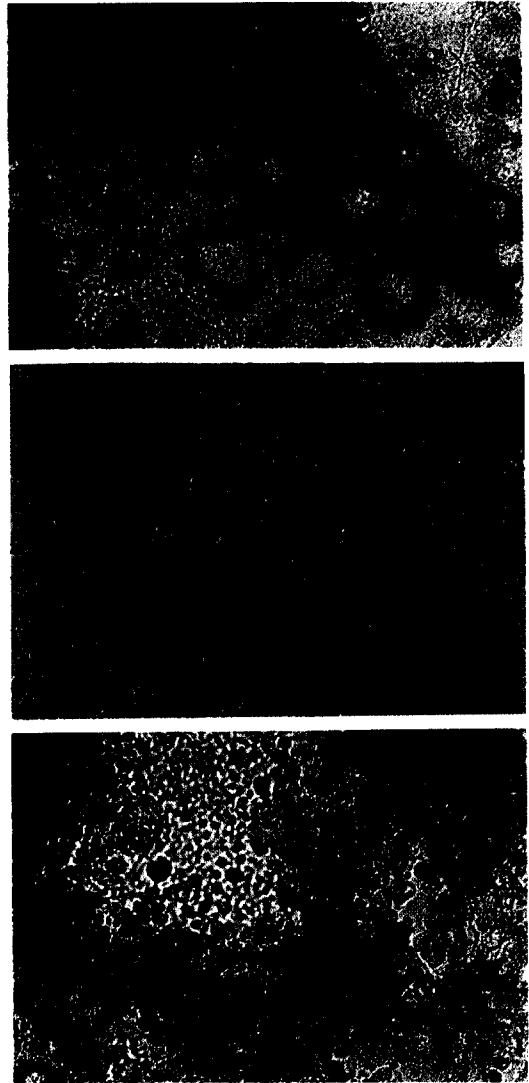


Fig. 2. AP activity in differentiating colony. ES-like cells were cultured in ES medium supplemented with 1000 unit of mLIF. Even though some colonies were already differentiated to fibroblast cells, differentiating colonies were strongly stained by fast red TR salt and naphthol AS/MX phosphate. A, B, and C: epithelial cells, neuron-like, and fibroblast-like cells respectively.

가 인정되었으나, PGC의 경우는 ES보다는 안정적인 염색양식을 보였다.

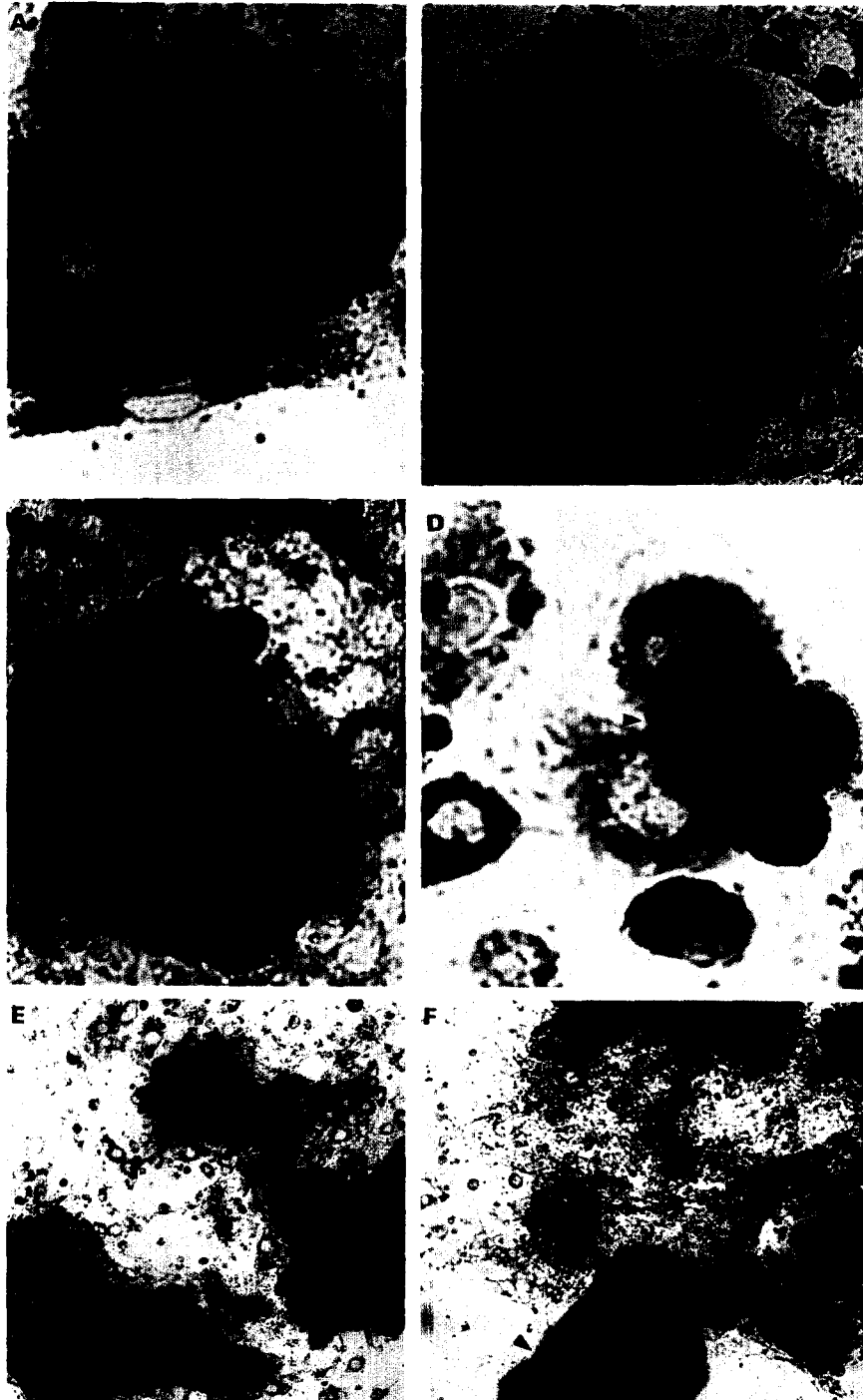


Fig. 3. Patterns of AP staining following differentiation of ES-like cell.
A: primary colony; B: secondary colony; C: ES-like cells; D and E: Day 3 and 5 after suspension culture; F: at 10 day after suspension culture, ES-like cells were differentiated to embryonic disc.

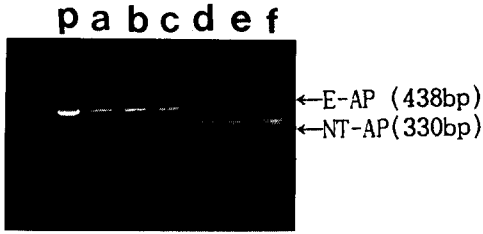


Fig. 4. RNA phenotyping of AP genes by RT-PCR.

RNAs were extracted from each cells of A, B, C, D, E and F in Fig. 3. RT-PCR was performed as described in Materials and Methods. E-AP gene was only expressed in undifferentiated ICM-derived cells. P: ICM-derived cDNA as a positive control.

3. ES세포에서의 AP발현양식의 규명

비록, AP staining의 pattern은 확립적이지만, A-P 유전자는 적어도 3종 이상이 존재하는 것으로 보고 되어 있다(Koopman and Cotton, 1984; Pease et al., 1990; Smith and Hooper, 1983). 따라서, 이들 유전자의 상이한 발현이 분화와 미분화된 ES세포에서 상이한 발현양식을 나타내는지를 조사하였다. 이들 세포의 분화상태에 따른 AP mRNA의 type을 RT-PCR에 의해 결정할 결과, Fig. 4는 Fig. 3의 RT-PCR의 결과로서, E-AP는 오직 Fig. 3의 미분화된 a, b, c에서만 발현되었으며, 이미 분화된 혹은 분화중인 3-d, e, f의 경우는 E-AP대신에 NS-AP를 발현하였다. 이 사실은 E-AP발현은 적어도 미분화의 표식인자로서 이용될 수 있음을 시사한다. 비록, E-AP발현이 ES세포의 전능성을 시사하는지는 금후의 검토가 요구되나, positive control로서 사용된 내부세포피에서도 E-AP만을 발현(Fig. 4의 P)한다는 사실을 고려할 때 전능성의 표식인자로서 가장 강력한 후보중의 하나임을 시사했다.

본 연구의 결과중 PG세포에 관한 자료는 제기하지 않았지만, 먼저번의 보고에서와 같이 PG세포의 경우는 ES세포와는 달리 오직 NS-AP만을 발현하는 것으로 밝혀졌다(kim et al, 1995). 이들 상이한 발현이 어느 특정 유전자에 의해 지시되는지는 현재로서는 알 수 없으나, 금후 검토될 대상 중의 하나이다.

4. Inhibitor에 의한 AP의 발현제어

AP염색은 AP 유전자의 상이한 발현양식을 모두 반영할 수 있다. 즉, AP발현은 NS-AP, E-AP, I-AP등으로 분류될 수 있는데, 이들 type의 발현은 각각의 세포형태에 따라 다르게 발현할 수 있다. 이러한 결과를 근거로 하여, 보다 엄밀한 AP의 발현제어에 의해 AP 발현양식을 보다 구체적으로 규명하기 위해 AP inhibitor인 L-phenylalanine (Phe), L-homoarginine과 L-phenylalanyl-glycylglycine(Phe-GlyGly)를 첨가함으로써 AP의 발현양식을 조사하였다. 그 결과 ES세포에서의 AP조직염색은 이들 inhibitor중 어느 하나만을 첨가한 경우라도 AP의 활성은 완전히 소실되었으나, RT-PCR에 의한 AP의 발현양식은 inhibitor를 처리하지 않은 군과 동일한 결과를 보였다. 이들 결과는 AP inhibitor에 의한 분화중인 ES세포에서의 비특이적인 발현제어는 불가능하다는 것을 입증한 것이라 본다.

5. 초기배에서의 AP 발현

Fig. 5에서와 같이, 난자의 발생과정에 따른 AP조직염색을 실시한 결과, 출생후 1일째의 난소로부터 회수한 난자의 경우 협막세포와 난구세포에서 발현되는 반면, 성숙한 생쥐로부터 회수한 미성숙 난자의 경우는 난포세포에서 주로 발현되었다. 수정후의 난자는 배반포 이전의 경우에는 배의 체세포에서 발현되었으며, 배반포 이후는 내부세포피에 한하여 발현되었다. 이 같은 AP의 염색 pattern이 상이한 AP유전자의 발현양식에 의한 것인지 혹은 동일 유전자의 switch on/off에 의한 것인지 본 연구에서는 조사되지 않았지만, 이들이 발생과정에 따른 상이한 유전자의 발현에 의한 것으로 사료되나, 금후의 검토가 요구된다.

IV. 결 론

AP의 초기배 발생에 따른 조직염색 pattern은 수정전의 경우는 난자의 체세포에서는 발현하지 않으나, 수정에 따라 배반포이전에는 난자의 세포질에서, 배반

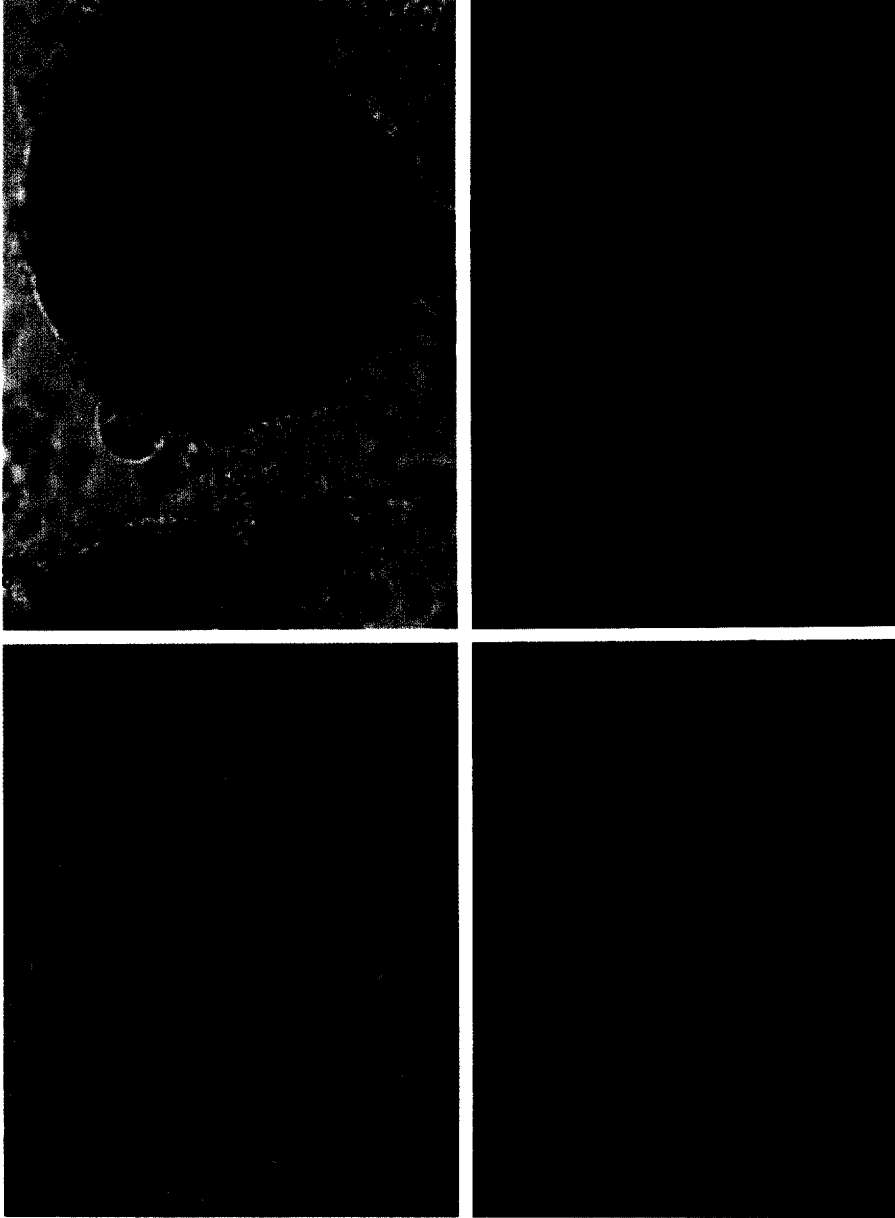


Fig. 5. AP expression during embryogenesis in mouse.

A: Oocytes recovered from ovary of postnatal female mouse; B: Oocytes isolated from adult female ovaries; C: Just hatched blastocyst; D: hatched blastocyst.

포로 부터는 내부세포피에 한하여 발현하였다. 이 내부세포피는 *in vitro*에서 적절한 환경이 제공된 경우 미분화된 상태에서 무한히 증식할 수 있다. 이들 배아

주간세포는 공여란(donor eggs)에 주입함으로써 카이메라를 형성할 수 있는 전능성과 다능성을 가지며, *in vitro*에서 백혈병저해인자(LIF/DIA) 혹은 CN-

TF에 의해 전능성을 유지한다. 반면에 원시생식세포는 Steel factor(SF 혹은 c-kit), basic fibroblast growth factor(bFGF)와 LIF/DIA의 콤비네이션에 의해 수립될 수 있으며, SF에 의해 전능성을 유지할 수 있다. ES 및 PG세포는 시험관내 유전자 조작에 의한 *in vitro*계의 모델, 질환경물의 생산 및 배 발생에 따른 치사 관련 유전자의 기전해석을 위한 유일한 수단으로 사용 가능한데, 이 목적을 위해서는 체외배양시 미분화 및 전능성의 식별을 위한 표식인자의 선발이 매우 중요하다. 현재 이 목적을 위해 사용하고 있는 AP조직염색법은 비록 그 사용이 단순하여 광범위하게 사용되고 있으나, 앞에서 살펴본 바와 같이 분화 중이거나, 분화된 세포는 물론 전능성을 상실한 세포에서도 발현되는 모순점이 야기되었다. 따라서, 멀지 않은 장래에 이들 미분화되고 전능성을 가진 표식인자의 동정은 내부세포괴, 전능성이 증명된 ES, 전능성은 가지고 있으나 germline에 기여하지 못하는 배아간세포인 PCC세포(EC세포)와 미분화된 다능성만을 가진 F9세포(EC세포)를 mRNA의 상이한 display법을 이용하여 유전자 발현의 상이성을 비교 관찰함으로써 분리될 수 있으리라 믿어지지 않는다.

V. 적 요

전능성을 가진 생식세포는 높은 AP활성을 보유하고 있다. 따라서, AP활성을 이용한 조직염색법은 전능성을 가진 ES세포의 분리 및 배양을 위한 새로운 방법으로서 활용 가능하다. 또한, 이 기술은 간단하고, 빠르며 오직 Naphthol AS/MS기질과 Fast Red 혹은 Blue만이 요구되므로 저렴하다. 그러나, 본 연구에서 AP염색법에 의하여 분화중인 ES세포는 물론 미분화중인 ES세포에서도 강한 AP활성을 보였다. 이는 AP염색의 유용성을 보고한 Talbot등의 결과와는 상이한 결과로서, 이 결과는 적어도 AP의 조직염색법은 미분화된 혹은 전능성을 가진 ES세포의 표식인자로서 활용 불가능함을 시사하였다. 따라서, 미분화된 하나의 표식인자를 동정하기 위해 RT-PCR에 의해 AP의 발현양식을 조사하였다. 그 결과, I-AP는 조사된 모든 세포에서 발현되지 않았으나, E-AP는 오직 미분화된 ES세포에서만 발현되었으며, NS-AP는 7.5일 경으로부터 13일 경에 회수한 태아의 원시생식세포에서만

발현되었다. 그러나, AP의 inhibitor인 L-phenylalanine(Phe), L-homoarginine(Har)과 L-phenylalanyl-glycylglycine(PheGlyGly)를 첨가한 경우, 모든 세포는 AP활성이 소실되었으나, RT-PCR결과는 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 이들 결과는 E-AP는 미분화된 ES세포를 위해, NS-AP는 미분화된 원시생식세포의 유용한 마크로서 활용가능함을 시사하였다.

사 은

본 연구의 수행에 있어 AP inhibitor 구입과 많은 조언을 주신 심호섭 박사(UCLA, Davis Univ., U. S. A.)께 진심으로 감사드립니다.

VI. 인용문헌

1. Andress, P. N., I. W. Oosterhins, I. Damjanov. 1987. Cell lines from human germ cell tumours. In Robertson E(ed): "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach." Oxford: IRL Press, pp 207-248.
2. Bradley, A., M. Evans, M. H. Kaufman and E. Robertson. 1984. Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teracarcinoma cell lines. Nature 309:255-256.
3. Doetschman, T., P. Williams and N. Maeda. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem(ES) cells. Dev. Biol. 127:224-227.
4. Hahnell, A. C., D. A. Rappoloe, J. L. Millan, T. Manes, C. A. Ziomek, N. G. Theodosiou, Z. Werb, R. Pedersen and G. A. Schultz. 1990. Two alkaline phosphatase gene are expressed during early development in the mouse embryo. Development 110:555-564.
5. Iannaccone, P. M., G. U. Taborn, R. L. Garton, M. D. Caplice and D. R. Brenin. 1994. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. Development Biology 163:288-292.

6. Kim, J. H., H. D. Park, H. T. Park, and K. S. Chung. 1994. Differential display of mRNA in the preimplantation embryos by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Korean J. Animal Reprod.* 18:199-206.
7. Kim, J. H., K. Utsumi, A. Iritani, H. T. Lee, and K. S. Chung. 1994. Characterization of morphological abnormalities in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene. *Mol. Cells* 4:381-386.
8. Kim, J. H., D. H. Koo, H. T. Lee, and K. S. Chung. 1995. Expression patterns of mRNA for members of the alkaline phosphatase family in embryonic stem and primordial germ cells of mouse. *Theriogenology* 43:248.
9. Koopman, P. and R. G. H. Cotton. 1984. A factor produced by feeder cells which inhibits embryonal carcinoma cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 154:233-242.
10. Lallemand, Y. and P. Brulet. 1990. An *in situ* assessment of the routes and extends of colonization of mouse embryo by embryonic stem cells and their descendants. *Development* 110:1241-1248
11. Mann, J. R. 1990. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoa microinjected under the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 38:1077-1083.
12. Mann, J. R., I. Gadi, L. Harbison, S. J. Abbondanzo and C. Stewart. 1990. Androgenetic mouse embryonic stem cells are pluripotent and cause skeletal defects in chimeras: Implications for genetic imprinting. *Cell* 62:251-260.
13. Nagy, A., E. Gocza, E. M. Diaz, V. R. Pridiaux, E. Ivanyi, M. Markkula and J. Rossant. 1990. *Development* 110:815-821.
14. Noguchi, S. and N. Nakatsuji. 1991. ジンタゲテイ-ングによる増殖因子の解析. *実験醫學* 9:1018-1023.
15. Pease, S., P. Braghetta, D. Gearing, D. Grail and R. L. Williams. 1990. Isolation of embryonic stem(ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor(LIF). *Dev. Biol.* 141:344-352.
16. Riele, H. T., E. R. Maandag, A. Clarke, M. Hooper and A. Berns. 1990. Consecutive inactivation of both alleles of the pim-1 proto-oncogene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 348:649-651.
17. Robertson, E., A. Bradley, M. Kuehn and M. Evans. 1986. Germ line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector. *Nature* 323:445-448.
18. Robertson, E. 1987. Embryo-derived stem cell lines. In Robertson E(ed): "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach." Oxford: IRL Press, pp 71-112.
19. Robertson, E. J. 1991. Using embryonic stem cells to introduce mutation into the mouse germ line. *Biol. Reprod.* 44:238-245.
20. Setoyama, C. 1991. ジ-ントラップを用いた胚幹細胞特異的な遺傳子の検索. *実験醫學* 9:1030-1035.
21. Smith, A. T., M. L. Hooper. 1983. Medium conditioned by feeder cells inhibits the differentiation of embryonal carcinoma cultures. *Exp. Cell. Res.* 145:458-462.
22. Tabolt, N. C., C. E. Rexord, V. G. Pursul and A. M. Powell. 1993. Alkaline phosphatase staining of pig and sheep epiblast cell in culture. *Mor. Reprod. Dev.* 36:139-147.
23. Tokunaga, T. and H. Imai. 1994. Personal communication.
24. Yagi, T. and S. Aizawa. 1991. 變異個體によるチロシンリンの遺傳子解析. *実験醫學* 9:1018-1023. 9:1010-1017.