

이종이식거부반응의 조절: 이종췌도이식을 중심으로

서울대학교 의과대학 의학연구원 장기이식연구소¹, 서울대학교병원 장기이식센터 및 장기이식연구소², 서울대학교 의과대학 신장내과 및 장기이식연구소³

김화정¹ · 양재석² · 안규리³

Current Strategies for Successful Islet Xenotransplantation

Hwajung Kim, Ph.D.¹, Jaeseog Yang, M.D.² and Curie Ahn, M.D.³

Transplantation Research Institute, Seoul National University Medical Research Center¹, Transplantation Center Seoul National University Hospital, Transplantation Research Institute, Seoul National University Medical Research Center², Division of Nephrology, Transplantation Research Institute, Seoul National University Medical Research Center³, Seoul, Korea

Diabetes mellitus is increasing all over the world and is a serious health problem. Pancreatic islet transplantation is promising treatment for diabetes mellitus, but an imbalance between deceased pancreas donors and recipients limited the widespread clinical application. Therefore, pig islets could be used as an alternative islet source in transplantation. However, a big hurdle to clinical application of islet xenotransplantation is the instant blood mediated inflammatory reaction (IBMIR), which is characterized by activation of the coagulation cascade, platelets and complement systems. Innate immune cells infiltrate the islets in the process of IBMIR and thereby accelerate the early graft loss. Characteristics of IBMIR in islet xenotransplantation are very different from the rejection in solid organ xenotransplantation. Therefore, we focus on the molecules for surmounting IBMIR in order to accomplish successful islet xenotransplantation. To prevent the IBMIR in islet xenotransplantation, development of genetic modified pigs containing anti-coagulant, anti-thrombosis and complement regulatory genes, or capsulation of islet with biomaterials for blocking immune response around islet surface can be tried. G α -Gal knockout pigs and the diverse transgenic pigs for complement regulatory protein or anti-coagulant genes have been developed for xenotransplantation. This review summarized on characteristics of rejection in islet xenotransplantation and discusses the strategies for overcoming the rejection.

Key Words: Islet xenotransplantation, Instant blood mediated inflammatory reaction (IBMIR), Genetically modified pig, Diabetes mellitus

중심 단어: 이종췌도이식, 급성혈액교환, 염증반응, 형질전환돼지, 당뇨병

이종췌도이식의 역사

당뇨병은 당 대사 장애 이외에도 말기신부전증, 망막질환, 말초혈관질환, 신경질환 등 다장기 합병증이 수반되어 환자의 삶의 질을 낮추고, 많은 경제적 부담을 갖게 한다. 수명의 증가와 식생활의 변화로 당뇨병의 유병률이 전세계적으로 크게 증가하고 있고, 특히 아시아 지역의 유병률은 서구사회보다도 빠르게 증가하고 있다.(1) 국내 당뇨병 유병률은 2005년 조사 결과 30세 이상 성인에서 당뇨병 유병률은 9.1% (256만 명 추정)이며 남자가

10.2%로 여자 7.9%에 비해 더 높고 연령이 증가함에 따라 유병률은 더 증가하였다.(2)

당뇨병의 치료는 경구혈당강하제 및 인슐린을 이용한 치료방법과 췌장 및 췌도를 이용한 이식이 있다. 경구혈당강하제는 췌장에서 인슐린 분비를 증가시키거나 인슐린에 대한 내성을 개선시켜서 제2형 당뇨병 초기에 치료제로서 이용이 가능하나, 인슐린 분비가 되지 않는 제1형 당뇨병과 진행된 제2형 당뇨병의 치료에는 이용이 제한적이다. 인슐린 치료제는 다양한 인슐린 제형이 개발되어 많이 사용되고 있지만, 잦은 인슐린의 투여로 당뇨병 환자의 삶의 질이 감소되며, 저혈당 발생으로 인한 위험 증가가 동반될 뿐 아니라, 인슐린 치료만으로는 합병증을 근본적으로 예방하지 못하여 우리나라의 경우에도 최근 당뇨병성 신병증이 말기신부전증의 주요 원인으로 그 비도는 45%에 달한다(2007년도 대한신장학회 통계).

책임저자 : 안규리, 서울시 종로구 대학로 103
서울대학교 의과대학 신장내과 및 장기이식연구소, 110-799
Tel: 02-2072-2222, Fax: 02-763-6317
E-mail: curie@snu.ac.kr

접수일 : 2009년 12월 28일, 게재승인일 : 2009년 12월 28일

1990년 Scharp 등(3)은 혈당조절을 위하여 인슐린 치료가 필요한 당뇨병 환자들에게 공여자의 췌장을 췌도 단위로 분리한 후 이식하는 방법, 즉 췌도 이식을 시도하였다(Fig. 1). 췌도 이식은 췌장 이식에 비해 시술이 간단하고 수술 합병증이 적으며 반복적인 이식이 가능하다는 장점을 가지고 있어서, 제1형 당뇨병 환자에 적용 가능한 유망한 치료법이다.(4) 2000년에 이르러 Shapiro (5)에 의해 동종췌도이식의 방법이 임상적으로 응용할 수준으로까지 상당히 개선되었다. 그러나 한 명의 당뇨병 환자를 치료하기 위해서는 두 명 이상의 뇌사자로부터 췌도를 공급받아야 하지만 뇌사자 장기의 공급에는 제한이 있으므로 급증하는 이식 수요를 충족시키는데 한계가 있다. 그러므로 췌도의 안정적인 공급이 가능한 방법으로써 돼지의 췌도를 이용한 이종췌도이식에 대한 관심이 급증하고 있다.(6)

한편 이종이식은 장기이식 분야를 중심으로 발전하였다. 이종장기나 세포의 공급원으로는 이종장기이식이 처음 시도되던 1963년 경에는 바분원숭이와 같은 영장류가 많이 사용되었다. 특히 이종이식의 아버지라 불리는 Reemtsma는 침판지의 신장을 신부전 환아에게 이식하여 최장 9개월의 생존을 유지하였으며(7) 1984년에는 Bailey에 의해 선천성 심장질환이 있는 Baby Fae에게 바분원숭이의 심장을 이식하여 20일간 유지한 바 있다.(8) 그러나 영장류는 멸종 위기종인데다가 번식이 어렵고, 이종장기 공급원으로 활용하기에는 사회적 거부감이 높으며, 높은 감염의 위험성을 가지고 있어서, 검토 결과 미니돼지가 적절한 이종장기 공급원으로 선정되었다. 미니돼지는 사람과 같은 크기의 돼지로서 장기의 크기가 사람과 유사하고, 임신 기간이 127일로 번식이 용이하며, 사람과 오랜 시간을 같이 지낸 동물이어서 사람에게 치명적인 감염원을 보유할 가능성이 낮다. 또한, 형질전환 무균사육이 가능하다는 장점을 가지고 있을 뿐 아니라, 돼지의 인슐린은 아미노산 염기서열이 사람과 85.5%가 유사하기 때문에 장기뿐 아니라 췌도 공급원으로서 돼지의 활용 가능성 역시 매우 높게 평가되어서 이종췌도이식은 자연스럽게 돼지 췌도를 대상으로 개발되었다.

한편, 돼지의 장기를 인체에 이식할 경우, 동종이식보다 훨씬 심각한 이종이식 거부반응이 일어난다. 이러한 이종이식 거부반응을 극복하고 이식 초기의 급격한 이종장기 손상을 방지하여 안정적인 이식 기능을 유지하도록 하기 위하여, 면역거부반응을 조절하여 면역관용을 유도하거나 장기의 생존율을 증가를 유도할 수 있는 유전자를 삽입 또는 제거한 형질전환돼지의 개발이 필수적이다. 본 종설에서는 이종이식 시에 발생하는 거부반응의 특성

과 이를 극복하기 위해 개발된 다양한 형질전환돼지 및 그 한계점에 대해 알아보고, 성공적인 이종췌도이식을 위하여 어떠한 추가적인 전략이 필요한지에 대해 기술하고자 한다.

이종이식 거부반응의 3단계

이종장기이식을 하는 경우에는 동종이식보다 강하고 빠른 거부반응이 일어나는데, 이종장기이식 거부반응은 발생 순서에 따라 초급성 거부반응(hyperacute rejection, HAR), 급성혈관성 거부반응(acute vascular rejection, AVR), 급성세포매개성 거부반응(cell mediated rejection, CMR)으로 분류한다(Fig. 2). 초급성 거부반응은 돼지에 존재하는 항원에 대해 인간이 이미 가지고 있는 자연항체(xenoreactive natural antibody, XNR)가 반응함에 따라 발생하는 거부반응이다. 이 거부반응은 ABO 혈액형 부적합 장기이식에서 관찰되는 급격한 초급성 거부반응과 유사해서 이식 후 수분 또는 수 시간 내에 이식된 장기 혈관에 혈전이 생성되고 괴사에 이르는 심한 손상이 발생한다. 이 초급성 거부반응의 주 원인은 (1) 돼지 내피세포에 다량 존재하는 알파갈(Galactose- α 1,3-Galactose, α Gal)에 대한 자연항체 반응과 (2) 혈청보체 조절인자(complement regulatory proteins, CRPs)의 분자호환성 결여에 따른 과도한 혈청보체 활성화에 의한 손상이다. 인간은 돼지가 가지고 있는 알파갈 전이효소(α -1,3-galactosyltransferase)가 없기 때문에 돼지에 존재하는 당단백질인 알파갈에 대한 자연항체를 가지고 있어서, 돼지의 장기가 인간에게 이식되었을 경우 격렬한 항원-항체 반응이 일어난다. 이 항원-항체 반응이 일어나면 혈청보체가 활성화되면서 2차적인 조직 손상이 일어나는데, 혈청보체 활성화를 조절하는 혈청보체 조절인자가 인간과 돼지 사이에 종간 호환성이 없기 때문에 혈청보체 활성화가 지속적으로 발생하여 조직 손상이 가속화된다. 초급성 거부반응을 극복하기 위해 human decay accelerating factor (hDAF) 유전자 등의 인간 혈청보체 억제 유전자를 발현시키거나,(9) 알파갈 항원을 결손 시킨 돼지가 제작되었다.(10) 초급성 거부반응은 혈관 접합이 이루어지는 고형장기 이종이식에서는 격렬하게 나타나지만 성체 돼지의 췌도에는 알파갈 발현이 매우 적은 테다가, 장기 이식에서처럼 혈관을 직접 연결하지 않기 때문에 췌도이식에서의 초급성 거부반응은 다행히 매우 약한 편이다.

급성혈관성 거부반응은 혈관 내피세포가 2차적으로 활성화되어 선천성 면역세포의 침윤과 함께 혈액응고 현상이 나타나는 것이 특징이다. 알파갈이 결손된 상황이라

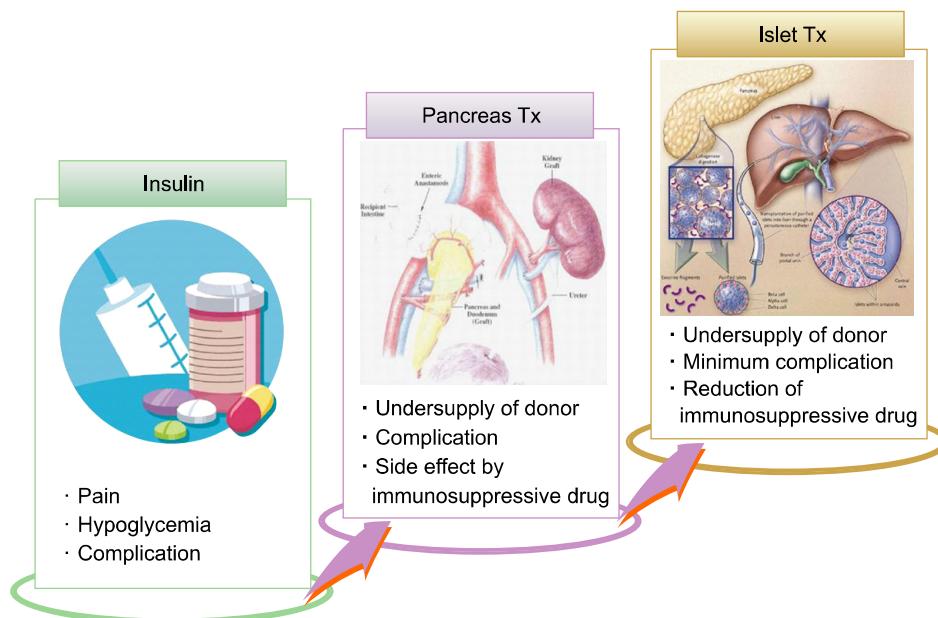


Fig. 1. Treatment of diabetes mellitus—strength & weakness.

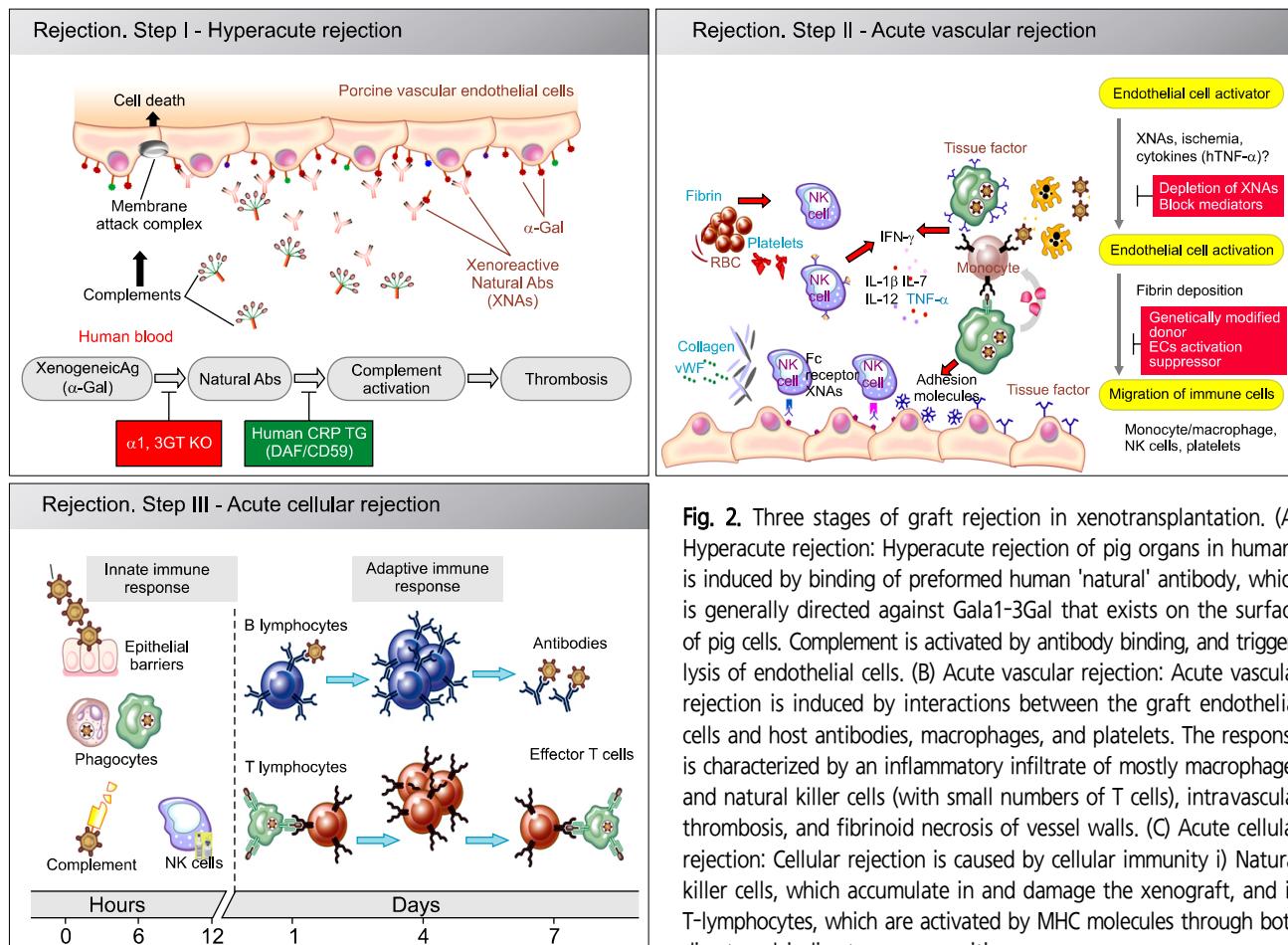


Fig. 2. Three stages of graft rejection in xenotransplantation. (A) Hyperacute rejection: Hyperacute rejection of pig organs in humans is induced by binding of preformed human 'natural' antibody, which is generally directed against Galactosial-3Gal that exists on the surface of pig cells. Complement is activated by antibody binding, and triggers lysis of endothelial cells. (B) Acute vascular rejection: Acute vascular rejection is induced by interactions between the graft endothelial cells and host antibodies, macrophages, and platelets. The response is characterized by an inflammatory infiltrate of mostly macrophages and natural killer cells (with small numbers of T cells), intravascular thrombosis, and fibrinoid necrosis of vessel walls. (C) Acute cellular rejection: Cellular rejection is caused by cellular immunity i) Natural killer cells, which accumulate in and damage the xenograft, and ii) T-lymphocytes, which are activated by MHC molecules through both direct and indirect xenorecognition.

Abbreviations: MHC, major histocompatibility complex.

고 해도 알파갈 이외의 돼지 특이 항원이 존재하므로 이에 대한 항체 반응이 미약하게 유발되고, 허혈성 손상, 분자 적합성의 결여 등에 의해서도 혈관 내피세포가 활성화되어 섬유소(fibrin)가 침착되고, 선천성 면역반응계 세포의 침윤이 일어난다. 이를 극복하기 위해서는 선천성 면역반응 조절과 함께 항응고 유전자를 과발현 시키거나, 섬유소 분해를 촉진하는 유전자를 도입한 형질전환 돼지의 개발이 필요하다.

본 연구팀은 급성혈관성 거부반응 유도에 돼지 CD40 (pCD40)와 사람 CD40 수용체(hCD40L) 사이의 역할을 검토하였다. 췌도 이식을 포함한(11) 대부분의 이종장기 이식에서는 항-CD154 항체가 사용되어 왔으나, 그 작용 기전에 대해서는 정확히 밝혀지지 않았다. 돼지 혈관내피 세포의 pCD40를 자극하면, NF κ B 신호전달 체계를 통해서 돼지의 주조직 복합체(swine leukocyte antigen, SLA)와 접촉분자의 발현이 증가하는 편, 특히 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), IL-10 같은 chemokine 분비가 현저히 증가하여 이식한 조직 내로 중성구, 단핵구 등 염증세포가 침윤하게 된다. (12) 그 뿐 아니라 혈관내피세포의 Fgl2 발현이 증가되어 (13) 혈액응고 반응을 촉진시킨다. 따라서 이종이식거부 반응에서의 pCD40-hCD40L 상호작용은 이종이식의 급성 혈관성 거부반응에서 관찰되는 선천성 면역거부반응의 주요 매개 기전이므로 이를 효과적으로 차단하는 것이 이종이식 장기 생존에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

가장 후기에 관찰되는 급성세포매개성 거부반응은 동종이식에서 흔하게 관찰되는 세포매개성 거부반응과 유사하며, 임파구 등 면역 세포에 의해 발생하는 거부반응으로 선천성 면역반응보다는 후천성 면역반응이 주로 관여하며, 이식 후부터 수개월까지 발생하는 거부반응이라고 알려져 있다. 그러나 이종이식 시의 급성세포매개성 거부반응은 동종이식보다 강력할 것으로 예상된다. 예를 들면, 혈관 연결이 필요없고, 알파갈 항원이 모두 존재하는 rat to mouse 사이에서 이종피부이식을 해 보면, 이종 피부이식의 생존기간이 major histocompatibility complex (MHC) 부적합 마우스간의 동종피부이식보다 생존 기간 보다 짧아짐을 볼 수 있다. 그 원인을 살펴보면, 이종이식편에는 보다 심한 중성구와 단핵구의 침착이 관찰되며, IP-10, MCP-1, RANTES 등 chemokine의 발현이 동종이식에서 보다 현저히 증가되어 있고(14) 매우 심한 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 활성화가 관찰된다.(15) 그리고 돼지의 RANTES(16), IP-10(17)는 돼지와 사람 사이에 분자서열이 유사하여 염증반응 유도에 관여

할 것으로 추정된다. 그뿐 아니라 pCD86-hCD28 차단만으로는 T-림프구 활성화를 충분히 차단할 수 없어서(18) 이종이식에서의 T-림프구 활성화와 침윤 과정에도 역시 선천성 면역반응 세포나 chemokine, 항산화분자 같은 면역매개 반응이 추가적으로 관여할 것으로 추정되며, 이를 극복하기 위해서는 다른 차원의 면역억제제 개발이 추가로 필요할 것이다.

이종췌도이식 거부반응

이종췌도이식에서는 이종장기 이식에서 관찰되는 초급 성 거부반응은 미약하고, 급성혈관성 거부반응은 유사하게 발생하지만, 혈액응고 반응이 심한 급성혈액매개성 염증반응(instant blood mediated inflammatory reaction, IBMIR)이라고 하는 독특한 거부반응이 관찰된다(Fig. 3). IBMIR에 관여하는 기전은 크게 (1) 혈액응고시스템의 활성화 및 혈소판 활성화 (2) 혈청보체의 활성화로 인한 세포 용해 (3) 선천면역 세포의 췌도 내 침윤 등으로 구분할 수 있다. IBMIR은 이식된 췌도가 혈액에 직접 노출될 경우, IgG, IgM 항체가 췌도 표면에 결합하여 혈청보체와 조직인자(tissue factor, TF)를 활성화하고, 활성화된 조직인자에 의해 트롬빈이 형성되고, 이와 같은 혈액응고계 및 혈소판, 혈청보체 활성화는 결국 췌도 주위로 혈액응고와 섬유소 침착, 염증매개 세포의 침윤을 유발하여 췌도가 급격히 파괴되는 현상으로서(19) 역시 조직인자가 핵심 역할을 하는 혈액응고계와 선천면역반응이 주로 관여하지만, 일부 저산소증 같은 비면역적 요인에 의해서도 진행된다.(20) 이러한 IBMIR는 이식 초기 췌도의 급격한 소실을 초래하므로 이를 조절하기 위해서는 IBMIR를 조절할 수 있는 항응고, 항혈소판, 항보체, 항염증 유전자가 도입된 돼지의 개발이 추가로 필요할 것으로 생각된다.

1) 혈액응고

1999년에 Bennet는 췌도를 간문맥으로 이식할 경우, 췌장 이식에 비해 이식 성적이 월등히 떨어지는 것을 확인하였고, 이러한 원인은 췌도와 혈액 사이에 발생하는 염증반응 때문임을 최초로 보고하였다.(21) 그 후 이들은 사람이나 돼지의 췌도에 동종의 혈액을 흘려주었을 때, 혈소판이 활성화되고 선천면역 세포들이 췌도 내로 침윤하며, 췌도 주변에 혈액이 응고되는 것을 관찰하였다. 이는 췌도를 특히 간문맥으로 이식할 때 혈액응고시스템과 혈소판의 활성화를 피할 수 없음을 보여준다. 또한 돼지의 췌도를 영장류에 간문맥으로 이식한 후 2일째에 간을

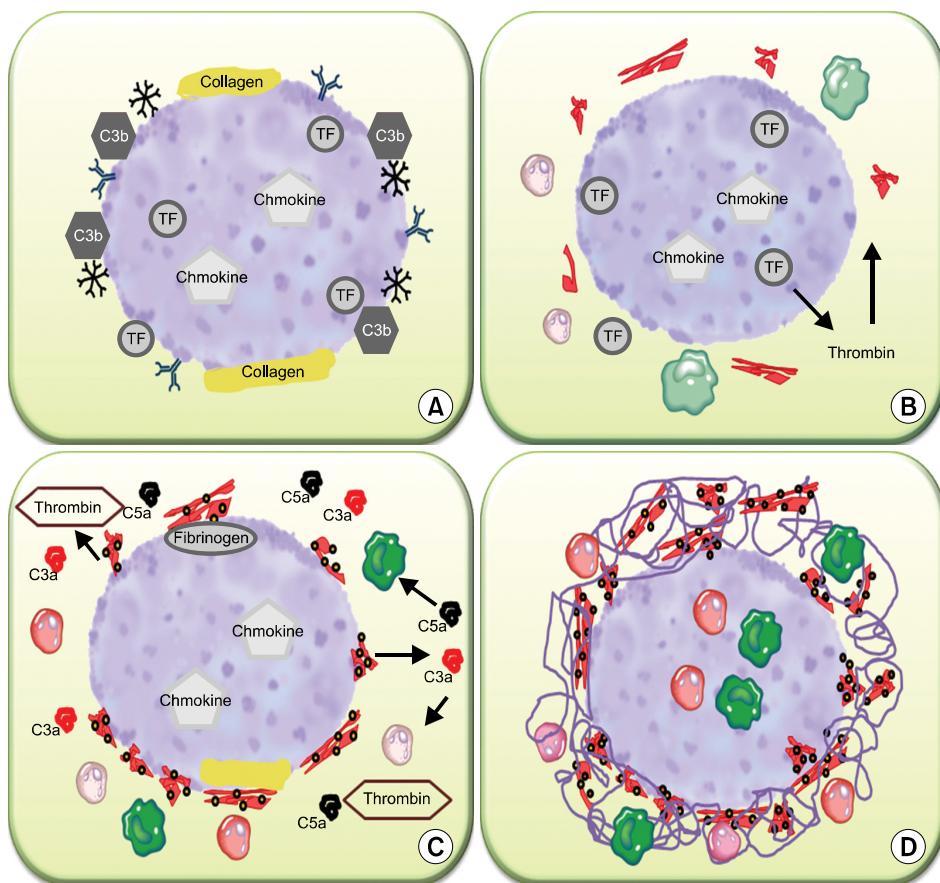


Fig. 3. Putative model for the IBMIR. (A) In contact with blood, IgG and IgM antibodies bind to the islet surface and activate complement which leads to deposition of C3b/iC3b to the surface. (B) Tissue factor (TF) activates the coagulation system via the extrinsic pathway. As a consequence of extrinsic pathway activation, prothrombin is cleaved into thrombin. Thrombin subsequently generates fibrin and activates platelets. (C) Platelet activation increases the affinity of the integrins GPIIb-IIIa and a2b1 for fibrin and collagen, respectively. Activated platelets bind to fibrin and collagen on the islet surface. (D) Amplified by platelets, thrombin generates more fibrin creating a capsule containing platelets, PMNs, and monocytes surrounding the islets. Chemotactic factors (e.g., C5a and IL-8) that were released as a consequence of IBMIR or released directly from the islets (e.g., MCP-1, IL-8 etc.), exert their action on PMNs and monocytes that infiltrate the islets in large numbers after 30 min.

Abbreviations: IBMIR, instant blood mediated inflammatory reaction; IL-8, Interleukin-8; PMNs, polymorphonuclear leukocytes; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1.

Source: Nilson B. The instant blood-mediated inflammatory reaction in xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation* 2008;15:96-8. p.97.

생검하였을 때, 췌도 주변에 혈전이 형성되고 췌도의 괴사가 일어난 것이 관찰됨으로써, 이종이식의 경우 혈액응고계의 활성화가 더욱 격렬할 것임을 시사하였다.(22)

한편, 혈액응고시스템은 외인성 경로와 내인성 경로에 의해 활성화되며(Fig. 4), 혈액 내 순환하는 혈청 단백질 또는 효소원에 의해 철저하게 조절된다.(23,24) 췌도를 간문맥으로 이식했을 경우, 췌도 표면에 잔류되어 있는 콜라겐과 음전하를 띤 유전자에 의해 내인성 응고반응이 진행될 뿐만 아니라, 분리된 췌도의 표면에 노출된 조직인자로 인한 외인성 응고반응이 모두 작용하게 된다. 혈

액응고 조절에 관여하는 주요 유전자로는 tissue factor pathway inhibitor (TFPI), TM, Antithrombin (AT), CD39 (ectoATPase, CD39) 등이 있다. 이 중 TFPI는 FVIIa와 FXa에 결합하여 조직인자에 의해 유도되는 혈액응고시스템의 초기단계를 방어하게 된다.(24) 분리된 췌도의 표면에는 조직인자가 다량 노출되어 있으므로, 췌도 표면에 TFPI의 발현을 높여줄 경우 외인성 응고 기전을 방어하는데 효과적일 수 있다. 그러나 췌도 표면에 노출된 조직인자와 인간 혈액내 순환하는 FVIIa와의 결합에 의해 혈액응고시스템이 활성화되어 트롬빈이 소량이라도 활성화

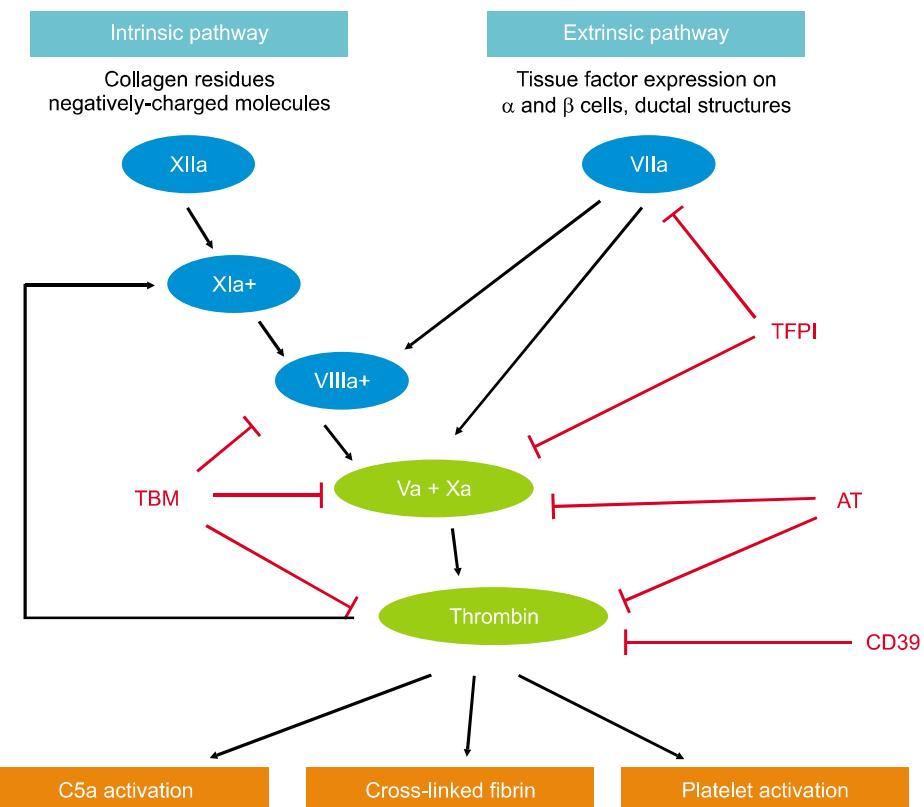


Fig. 4. Schematic representation of the coagulation pathways. 'a' present the activated clotting factors. Briefly, coagulation is initiated when islet-expressed tissue factor (TF) is exposed to the blood in IBMIR. TF then complexes with VIIa and enhances its activity. This sequence of coagulation activation is known as the extrinsic pathway. The complex of VIIa/TF activates factors IXa and Xa, which mediate the conversion of prothrombin into the active thrombin. Nevertheless, the small quantity of thrombin formed is sufficient to activate Xla, which reinforces thrombin generation by activating the intrinsic pathway. Furthermore, the intrinsic pathway can be activated by collagen residues or other negatively charged molecules on the islet surface. Thrombin, a potent platelet activator, cleaves fibrinogen into fibrin monomers, and activates the coagulation factor that cross-links fibrin monomers into an insoluble thrombus (XIIIa, not shown). Coagulation systems can be modulated by anti-coagulant molecules as TBM (thrombomodulin), TFPI (tissue factor pathway inhibitor), AT (antithrombin) and CD39 (ectoATPase).

Source: van der Windt DJ, Bottino R, Casu A, Campanile N, Cooper DK. Rapid loss of intraportally transplanted islets: an overview of pathophysiology and preventive strategies. *Xenotransplantation* 2007;14:288-97. p.289.

되면, 트롬빈 활성화에 의한 혈액응고시스템이 자체적으로 증폭되어 혈소판이 활성화되고, 섬유소 생성이 증가한다. 따라서, 초기의 혈액응고시스템에만 관여하는 TFPI를 조절하는 것은 전체적인 혈액응고시스템을 방지하기에는 충분치 않으며 혈액응고시스템을 효과적으로 억제하기 위해서는 혈액응고 관련 유전자뿐 아니라, 트롬빈 활성화 및 혈소판 활성화에 관여하는 유전자를 모두 조절하는 것이 중요할 것으로 생각된다.

혈소판은 혈액응고시스템에 의해 활성화되는 경우 외에도 다양한 기전을 통해서 활성화되기 때문에 이종췌도 이식에서 발생하는 IBMIR에 중요한 역할을 한다. Lin의 보고에 따르면, 돼지 내피세포와 인간의 혈청을 공동배양 하였을 때, 돼지내피세포에서 분비되는 조직인자는 혈청

보체 의존적임을 확인하였으나, 인간의 혈청없이, 인간의 혈소판과 돼지 내피세포를 공동배양하였을 때는, 돼지 내피세포와 인간의 혈소판 모두에서 조직인자가 분비되는 것을 확인하였다.(25) 뿐만 아니라, 분리된 췌도의 표면에 잔존하는 콜라겐이 인간 혈액에 노출될 경우, 혈액 내 von Willebrand factor (vWF)와 결합하여 혈소판 활성화를 유도한다.(23) 따라서 혈소판 활성화를 억제하기 위한 형질전환돼지의 췌도 개발은 물론 혈소판 억제제 사용이 필요하다.

Thrombomodulin (TBM)은 protein C 기전의 한 가지 구성 성분으로서, 혈액응고를 방지하고 염증을 억제하는 역할을 한다.(26) 구체적으로는 TBM의 특정 부위가 트롬빈의 활성화에 중요한 역할을 하는 부위를 폐쇄하여 트롬빈을

불활성화 시키고, protein C를 활성화하여 혈액 내 순환하는 FVa와 FVIIIa에 결합함으로써 혈액응고시스템을 효과적으로 억제한다. 특히 protein C는 내피세포 표면에 존재하는 protein C 수용체(endothelial cell PC receptor, EPCR)과 결합할 경우 강력한 항응고능을 가지는 활성화된 protein C의 양을 20배 이상 증가시킨다.(27,28) 그러므로 protein C의 기전을 조절하는 형질전환돼지의 개발은 이종췌도 특이적인 거부반응을 줄이는 좋은 방안이 될 수 있다. Antithrombin (AT)은 간에서 합성되는 세린 프로테아제 억제제로서 혈소판과 FXa를 억제하여 효과적인 항응고 기능을 갖는다.(29) CD39 (ectoATPase, CD39)는 혈소판의 길항제로 알려져 있는 ATP와 ADP를 AMP로 전환하여 혈소판의 활성화를 억제하는 항응고능을 갖는다.(30) 특히, ATP와 AMP는 neutrophil의 활성화에 서로 상반된 기능을 가지기 때문에, CD39가 혈소판의 길항제로써 역할을 할 뿐 아니라, 염증반응에도 관여할 것이라는 관심이 증가하였다. 최근에는 CD39가 염증반응을 조절하고 면역억제 기능을 갖는 등 다양한 기능을 가지고 있음이 보고되었으므로 이종췌도이식을 위한 유용한 타겟유전자라 생각된다.(31)

앞에 언급한 항응고 또는 항혈소판 유전자는 돼지 췌도 표면에 일부 존재하지만, 이식 초기단계의 복합적인 스트레스에 의해 그 기능이 현저히 떨어지게 되며, 특히 이러한 유전자의 이종간 부적합성으로 인해 응고 기전이 더욱 가속화된다.(23) 돼지의 TBM은 인간의 트롬빈에 접합하기는 하지만, 강력한 항응고능을 가지는 활성화된 protein C의 생성에는 관여하지 못하며, 항혈소판 기능을 갖는 CD39의 발현은 이식 초기의 스트레스로 인하여 발현이 급격히 감소되는 것이 보고되었다.(32) 또한 혈소판 활성화를 유도하는 vWF의 경우는 종간 부적합성이 없기 때문에, 이종이식 시에 혈소판을 활성화시키는데 기여하게 된다.(23) 이와 같이 돼지 췌도 내의 내재적인 보호 효과가 있는 유전자의 발현이 소실되거나 제기능을 하지 못하게 되고 손상을 유도하는 유전자는 그대로 기능을 유지하기 때문에 이러한 종간 부적합성에 의해 이종이식 시에는 보다 심한 혈액응고 현상이 관찰된다. 따라서, 이종췌도이식 시에 가장 큰 문제가 되는 IBMIR을 극복하기 위해서는 항응고 및 항혈소판 유전자를 과발현하거나 응고를 유도하는 유전자의 발현을 억제할 수 있는 형질전환돼지의 개발이 필요하다.

2) 항체 순환 및 보체 활성화

보체가 활성화되는 경로는 고전경로, 대체경로, 렉틴경로라 불리는 세 가지이다. 이 세 가지 과정은 보체 활성

화의 초기단계인 C3 convertase (전환효소)를 활성화시키는 경로만 다를 뿐 그 이후의 과정은 모두 같다. 보체가 활성화되면 결과적으로 이종췌도의 세포표면에 막공격 복합체(membrane attack complex, MAC)가 형성되어 세포가 용해되므로, 이종췌도이식에 있어서 큰 장애가 된다(Fig. 5). 고전경로에 의한 보체의 활성화는 채액성 면역반응의 주요한 작용기전이 되며, 항원-항체 복합체가 형성되어, 혈청속의 C1 단백질과 반응하게 되어 C1을 활성화시키고, 이 활성화된 C1에 의해 C2, C4, C3가 연쇄적으로 활성화된다.

돼지의 고령장기 이종이식의 경우, 이식 초기에 돼지 내피세포에 존재하는 알파갈 전이효소와 인간에 존재하는 알파갈 항원-항체 사이의 격렬한 항원-항체 반응에 의한 초급성 거부반응이 나타나는 것이 특징이다.(33) 하지만 돼지 췌도의 표면에는 알파갈 전이효소가 거의 없는 것으로 알려져 있기 때문에(34,35) 이종췌도이식 시에 알파갈에 대한 항원-항체 반응에 의한 보체 활성화는 거의 발생하지 않으며 이보다는 비알파갈 항원-항체 반응이나 이종 MHC 타입에 대한 항원-항체 반응에 의한 보체 활성화에 의한 손상이 주로 작용할 것으로 생각된다.(5,36,37) 그러므로 알파갈 전이효소를 제거한 형질전환돼지의 도입은 고령장기의 초급성 거부반응을 억제하는데는 효과적이겠지만 이종췌도이식에서의 역할은 불분명하다. 그러나 이종췌도이식 시 유도되는 보체의 활성화는 비알파갈 항원-항체 반응에 의한 것 외에도 혈소판에 의해 C5a가 전환되어 보체를 활성화시키므로, 보체 활성화와 혈액응고시스템 사이에 새로운 상호작용이 있을 것임을 시사하기 때문에 혈청보체 활성화 조절 역시 이종췌도이식 조절에 필수적인 역할을 할 것으로 예측한다.(38)

이러한 보체의 활성화를 조절하는 타겟 유전자로는 C1 inhibitor, complement receptor (CR1), CD46 (membrane cofactor protein, MCP), CD55 (decay accelerating factor, DAF)와 CD59 등이 있다. C1 inhibitor는 C1의 분해를 억제하여, 항원-항체 복합체에 의한 보체의 활성화를 막을 수 있으므로, 과다한 보체의 활성화를 억제하며, type 1 complement receptor (CR1)와 CD55는 생성된 C4b에 결합하여 C2a를 제거하거나, C3b에 결합하여 Bb를 제거함으로써 항보체 기능을 갖게 된다. CD46은 C3b와 C4b의 불활성화를 촉진하여 보체가 활성화되는 것을 억제함으로써 보체에 의한 세포 파괴를 방지할 수 있고, CD59는 C7, C8과 C5b6의 결합을 방해하여 막공격 복합체(MAC)의 형성을 방지함으로써 강력한 항보체능을 갖는다.(39)

CD46, 55, 59 등과 같이 보체의 활성화를 효과적으로 조절할 수 있는 유전자를 가진 형질전환돼지는 이미 개

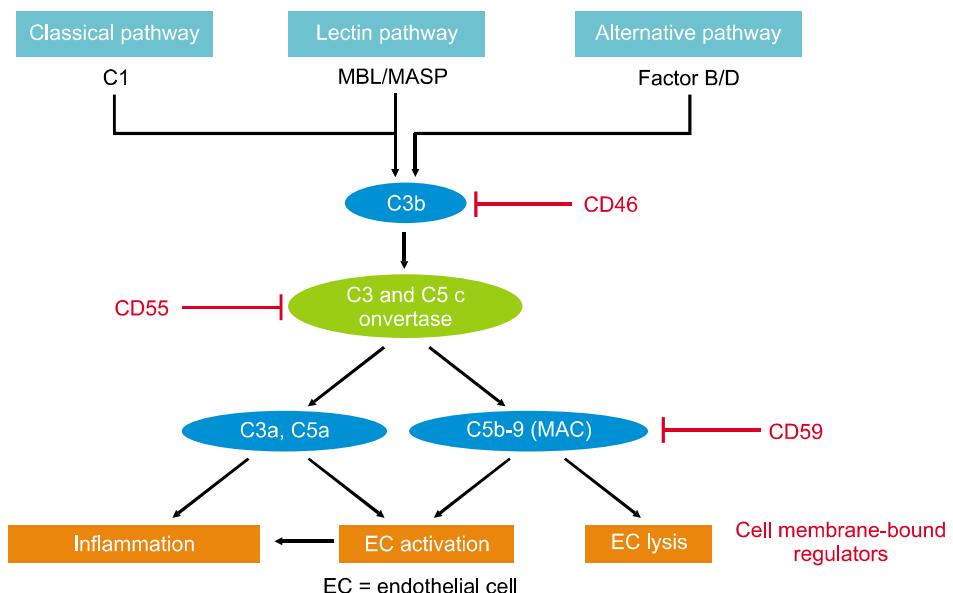


Fig. 5. Schematic representation of the complement cascades. The membrane attack complex is initiated when C5 convertase cleaves C5 into C5a and C5b. After C6, binds to C5b, the C5bC6 complex is bound by C7. This junction alters the configuration of the protein molecules exposing a hydrophobic site on C7 that allows the C7 to insert into the phospholipid bilayer of the pathogen. Similar hydrophobic sites on C8 and C9 molecules are exposed when they bind to the complex, so that they can also insert into the bilayer. The ring structure formed by C9 is a pore in the membrane that allows free diffusion of molecules in and out of the cell. If enough pores form, the cell is no longer able to survive. There is a membrane bound complement regulator such as DAF (CD55), CD59, and MCP (CD46). CD46 is an inhibitory complement receptor and decay accelerating factor (CD55) is a 70 kDa membrane protein that regulates the complement system on the cell surface. CD59 inhibits the complement membrane attack complex by binding C5b678 and preventing C9 from binding and polymerizing.

Abbreviations: MBL, Mannose binding lectin; MASP, MBL-associated serine protease; DAF, decay accelerating factor; MCP, membrane cofactor protein.

Source: van der Windt DJ, Bottino R, Casu A, Campanile N, Cooper DK. Rapid loss of intraportally transplanted islets: an overview of pathophysiology and preventive strategies. *Xenotransplantation* 2007;14:288-97. p.290.

발되었다.(40,41) 그러나 CD55 형질전환돼지에서 내피세포에서는 CD55의 발현이 높은 반면, 췌도세포 내에서는 발현이 극히 미약하므로(42) 이종췌도이식을 위한 목적 유전자로서는 부적절하다. 반면에 CD46은 돼지 췌도에 높은 발현을 보였고, 돼지 췌도 영장류 이식 실험에서 장기 생존 성적으로 보였다.(43)

3) 염증 세포 침윤

이종이식 시 혈액응고시스템과 염증반응은 밀접하게 상호작용을 한다.(44) 이식 초기에 췌도 표면에 염증성 사이토카인의 분비가 증가하면, 염증세포가 췌도 내로 침윤하여 췌도의 손상을 유도한다. 또한 강력한 염증 유도 인자 중 하나인 tumour necrosis factor (TNF)의 분비가 증가하여 세포사멸이 유도되기도 하며, 췌도 주변에 활성화된 선천면역 세포들이 항원 제시를 함으로써 적응면역의 단계에 이르게 된다.

췌도 이식 초기에 IBMIR가 진행되면 활성화된 혈소판

표면에 중성구나 단핵구에 대한 수용체로서 작용하는 p-selectin의 발현이 증가한다.(45) 또한 트롬빈이 활성화되어 혈액 내의 과립구와 단핵구 표면에 존재하는 protease activated receptor (PAR)을 자극하여 다양한 사이토카인 분비를 유도하여(46) neutrophilic granulocyte와 거식세포 등이 췌도 내에 침윤한다.(47) 췌도 이식 시 수용성 보체 활성화의 산물인 C3a와 C5a의 증가는 중성구나 거식세포에 대해 강력한 chemoattractant로 작용한다.(21) 2002년 Ozmen 등은 분리된 췌도에 트롬빈 억제제인 melagatran을 처리했을 때 IBMIR가 억제되어 면역세포의 췌도 내 침윤이 감소되는 것을 관찰함으로써(48) 혈액응고반응을 조절하는 것이 염증반응을 억제하는데 제일 중요한 과정임을 보고하였다.

췌도를 이식하기 전이나 췌도를 분리하는 과정에서도 기계적 손상과 산화적 손상이 발생하여 췌도 표면에서 MCP-1를 비롯한 IL-1b, TNF-a, IFN-c, IL-6, IL-8 등의 염증 매개 유전자가 분비된다.(49,50) 이러한 다양한 면역

매개물질들이 증가되면 췌도 내에 염증세포들이 침윤하게 되어 세포사멸이 진행된다. 중성구와 거식세포는 T-세포에 대한 항원을 제시하는 역할을 담당한다. 따라서 IBMIR는 선천면역반응으로부터 적응면역반응을 유도하거나 증가시키는, 즉 innate to adaptive talk의 과정이라고 볼 수 있다.(21) 또한 항산화 유전자 및 항세포사멸 유전자들을 발현하는 형질전환돼지를 개발하게 된다면 췌도 분리 및 췌도 이식 초기에 분비되는 면역매개반응을 억제할 수 있으므로, 면역세포의 췌도 내 침윤을 억제하고 나아가 후천성 면역반응을 감소시킬 수 있을 것이다.

이종췌도이식 거부반응의 극복

이종췌도이식 거부반응을 극복하기 위한 방안으로는 (1) 췌도 이식 특이적인 거부반응을 억제하기 형질전환돼지 개발과 (2) 췌도 피막화 기술 개발을 통한 면역거부반응 차단 방법이 제시되어 있다.

1) 형질전환돼지 개발을 통한 거부반응 극복

현재까지 알려진 이종 이식을 위한 형질전환돼지 개발 현황은 Fig. 6과 같다. 형질전환동물을 생산하여 이종 간의 장기 및 세포이식을 시도하는 연구가 본격적으로 시작

된 것은 1990년대부터이다. 이 후 체세포핵이식에 의한 동물복제 기술이 발달함에 따라 1994년 영국에서 초급성 거부반응을 완화하기 위해서 hDAF가 도입된 형질전환돼지가 생산된 것을 시작으로(51) 다양한 장기이식용 복제 돼지가 생산되었으며, 대부분은 초급성 거부반응을 줄이려는 시도로 제작되었다.(52,53) 가장 팔목할만한 성과는 2002년 미국에서 개발된 알파갈 전이효소가 제거된 형질 전환돼지이다.(54) 이 돼지는 유전자 제거 기술(gene knock-out)을 이용하여, 인간 체내에서 초급성 거부반응을 일으키는 주요 항원을 제거한 것으로, 이 돼지의 개발로 초급성 거부반응은 극복되었다.(55) 그러나 알파갈 전이효소가 제거된 형질전환돼지의 심장을 영장류에 이식하였을 때 초급성 거부반응은 관찰되지 않았으나, 장기 주변의 혈관에서 혈소판이 응집되고 혈류가 진행되어 있는 미세혈관 혈전증(Thrombotic microangiopathy, TM)의 소견이 관찰되었다. 뿐만 아니라 장기의 허혈과 고사, 부분적 출혈 및 면역억제제 과다사용에 의한 감염 등으로 인하여 팔목할만한 이식 생존율을 얻지 못했다.(32)

따라서, 알파갈이나 혈청보체 조절인자 같은 단일의 유전자 변형만으로는 인간의 복잡한 면역체계를 효율적으로 회피하기에는 부족하며, 추가적으로 미세혈관혈전증을 조절할 수 있는 항응고 및 항혈소판 유전자를 함께 발

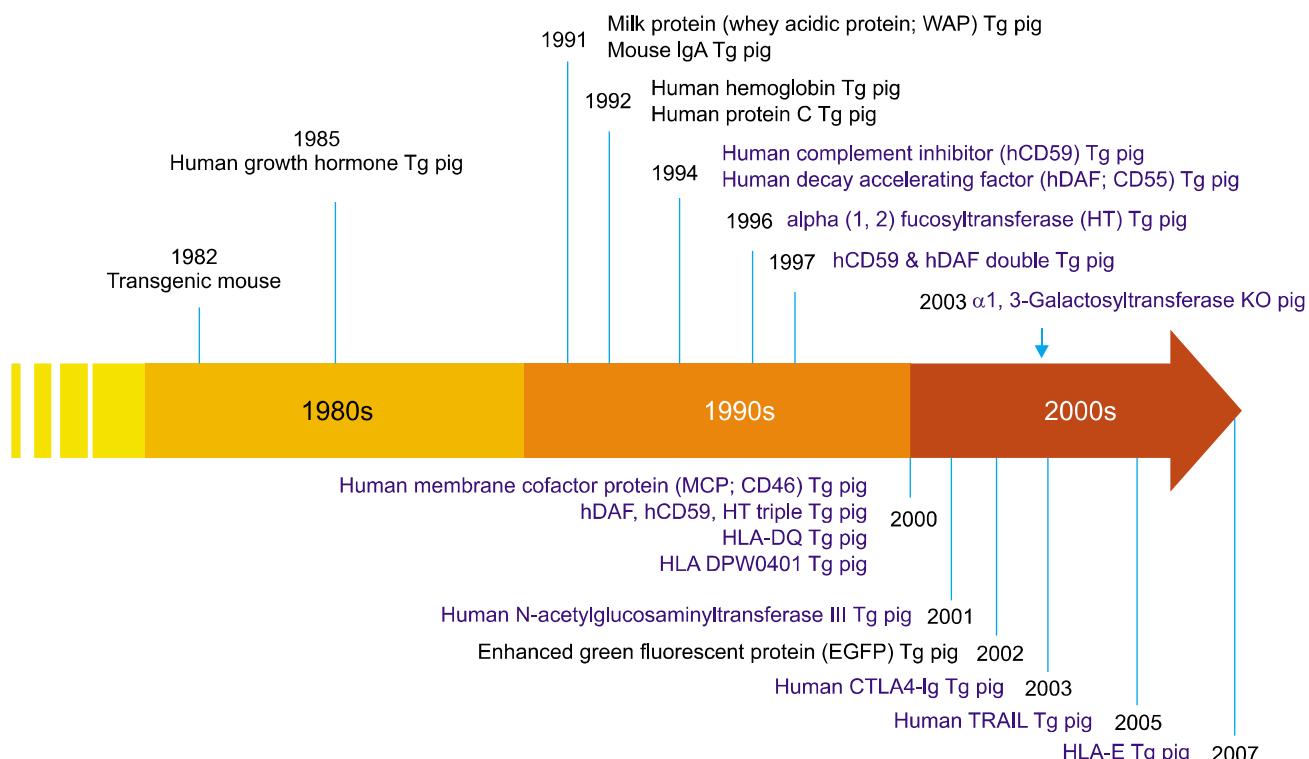


Fig. 6. Transgenic pigs production for overcoming graft rejection in xenotransplantation.

현하는 다중유전자 발현 형질전환돼지의 개발이 시급하다. 항응고 기능을 가진 형질전환돼지에 대해서는 2008년 세계이종이식학회에서 D'Apice, Cowan 등에 의해 혈액응고 조절을 위한 CD39 유전자 삽입 돼지가 개발되어 영장류 신장이식에 대한 효과가 보고된 바 있으며, TBM, TFPI에 대한 돼지가 제작되었다는 발표가 있었으나 이들 유전자 삽입 돼지의 효용성에 대하여는 검증을 요한다.

최근 이 분야의 선두 주자라고 할 수 있는 미국, 호주 및 일본 연구팀 등은 알파갈 결손 돼지를 기반으로 하여 다양한 다중의 유전자를 발현하는 돼지를 생산하는데 성공하였다.(56,57) 그러나 앞서 말한 바와 같이 현재까지의 연구는 대부분 심장, 간, 폐, 신장 등 고형의 장기이식을 위한 연구가 대부분이며, 당뇨병 치료를 위해 특화된 형질전환돼지의 생산, 즉 IBMIR을 조절하기 위한 다중형질전환 돼지 생산은 아직 초기단계에 머물러 있다.

2) 췌도 피막화

췌도를 피막화하면 이종이식에서 발생하는 면역세포나 항체의 공격으로부터 췌도를 보호할 수 있기 때문에, 최근 이식 시에 좋은 성적들이 보고되고 있으며 많은 연구와 임상시험이 진행 중이다. 하지만 이 방법은 피막이 산소와 영양물질의 전달능력을 저해하고 인슐린의 분비를 방해하기 때문에, 이러한 부작용을 최소화 시키면서 췌도의 생존을 증진시키는 피막화 기술의 확보가 필수적이다. 특히 돼지 췌도는 내피세포와 마찬가지로 허혈성 손상에 민감한데 허혈성 자극은 reactive oxygen species (ROS) 계를 활성화하여 JNK, p38 발현이 증가되고 세포사멸과 면역세포 침윤을 유발한다. 한편 H_2O_2 자극에 의해 VCAM-1 등 접착분자의 발현이 증가함을 확인되어(58) 허혈성 손상에 내성을 유도할 수 있는 HO-1, A20과 같은 유전자 도입 췌도를 확보하는 것이 도움이 될 것이다.(59)

췌도 피막화의 가장 중요한 요소는 췌도를 감싸는 피막 재료라고 할 수 있다. 가장 널리 이용되고 있는 피막 재료는 알지네이트(alginate)로 1980년 Sun 등에 의해 최초로 알려진 생체적합성 고분자이다. 알지네이트를 이용한 췌도 피막화 기술은 이미 상당한 수준에 도달한 상태로 네덜란드의 de Vos는 미세피막화 췌도를 실험용 쥐에 이식한 후 약 200일간 혈당 조절기능이 원활함을 확인하였다.(60) 또한 미국의 기업인 Microislet Inc., Cerco Medical 및 호주의 Living Cell Technologies 등이 이미 임상 시험을 준비 또는 진행 중인 상태이다. 그러나 췌도를 직접 피막화하여 이식하는 기존의 기술(미세피막화)은 이식 후 제거가 쉽지 않아 안정성 문제가 꾸준히 제기되어 왔다. 알지네이트 이외에도 polyethylene glycol

(PEG)와 같은 다양한 물질들이 췌도 피막화 연구에 활용되고 있으며, 췌도 표면에 recombinant azido-thrombomodulin 같은 특수 물질을 처리하여 혈전 형성을 차단하는 방법도 개발되어 있다.(61)

이에 대한 대안으로는 큰 구조체에 췌도를 부착한 후 이식하는 '거대피막화' 기술을 들 수 있다. 거대피막화 기술의 경우 미국 앨버타 대학의 Tatsuya Kin 그룹에서는 상용화된 생체 내 분해되는 스캐폴드(synthetic absorbable biodegradable scaffold, Ethisorb™ Dura Patch, approved by FDA)를 사용하여 췌도를 파종하고 이를 개의 장막(omentum)에 여러 겹으로 붙여 이식을 하는 연구를 수행하였다.(62) 이와 비슷한 연구로 미국 마이애미 대학의 D. M. Berman 그룹에서는 위와 같은 Ethisorb™ Dura Patch 스캐폴드를 이용하여 원숭이에 이식을 한 실험을 수행하였고(63) 캐나다 앨버타 대학의 J.M. Dufour 그룹에서도 인공 구조체인 Dura patch를 이용하여 췌도를 이식하는 연구를 수행한 바 있다.(64) 이러한 거대 피막화 기술은 개발 초기 단계 수준에 머물러 있고, 아직 상품화 단계까지는 이루지 못한 실정이다.

이종췌도이식 현황

결론적으로 성공적인 췌도 이식을 위해서는 혈액응고 반응과 보체의 활성화 및 염증반응 등을 포함하는 췌도 이식 특이적 IBMIR를 극복할 수 있어야 하며, 췌도 피막화 기술을 현실화 할 수 있어야 한다. 그러기 위해서는 기존 알파갈 결손 형질전환돼지를 기반으로 적어도 혈청 보체와 혈액응고 반응을 조절할 수 있는 다중 형질전환 돼지를 개발하여야 하며, 이를 췌도 피막화 기술과 접목한다면, 생존율이 높은 이종췌도 개발이 가능할 것이다.

지금까지 영장류를 이용한 이종췌도이식 연구결과는 적어도 4개의 연구실에서 6개월 이상의 췌도 생존율이 보고되었다. 2006년 Hering 등과(65) Cardona 등은(66) 각각 상당량의 면역억제제를 사용하여 간문맥을 통한 췌도 이식을 시행하여 6개월 이상의 췌도 생존율을 얻었으며, 2009년 피츠버그의 Cooper 팀은 CD46 유전자 삽입 돼지를 이용하여 1년 이상의 췌도 이식 생존율을 보고하였다. 므로(43) 간문맥을 통한 췌도 이식 분야에서 남아있는 과제는 앞으로 면역억제제를 어떻게 최소화 할 것인가이다. 한편 2006년 Dufrane은 면역억제제를 전혀 사용하지 않은 상태에서 췌도 피막화 기술을 이용하여 최대 354일까지의 췌도 생존율을 보고하였다.(67) 췌도 피막화를 이용한 임상시험은 현재 멕시코, 뉴질랜드, 중국, 러시아에서 시도되고 있고, 이에 대해 미국, 호주의 Food and Drug

Administration (FDA)와 World Health Organization (WHO)에서는 임상시험 가이드라인을 제시하였다.

REFERENCES

- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414:782-7.
- Korea National Health and Nutrition Examination Survey. Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2005 [internet]. Seoul: The Korea Centers for Disease Control and Prevention; 2009. Available from: <http://knhanes.cdc.go.kr>.
- Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, et al. Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes* 1990;39:515-8.
- Park JB, Kim SJ. Clinical islet transplantation: where do we stand on? *J Korean Soc Transplant* 2007;21:196-202.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbett GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230-8.
- Rood PP, Buhler LH, Bottino R, Trucco M, Cooper DK. Pig-to-nonhuman primate islet xenotransplantation: a review of current problems. *Cell Transplant* 2006;15:89-104.
- Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel JU, Pearl MA, Pearce CW, Dewitt CW, et al. Renal heterotransplantation in man. *Ann Surg* 1964;160:384-410.
- Bailey LL, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W, Jolley WB. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* 1985;254:3321-9.
- Pruitt SK, Kirk AD, Bollinger RR, Marsh HC Jr, Collins BH, Levin JL, et al. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts. *Transplantation* 1994;57:363-70.
- Tseng YL, Kuwaki K, Dor FJ, Shimizu A, Houser S, Hisashi Y, et al. alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation* 2005;80:1493-500.
- Rayat GR, Gill RG. Indefinite survival of neonatal porcine islet xenografts by simultaneous targeting of LFA-1 and CD154 or CD45RB. *Diabetes* 2005;54:443-51.
- Choi I, Kim SD, Cho B, Kim D, Park D, Koh HS, et al. Xenogeneic interaction between human CD40L and porcine CD40 activates porcine endothelial cells through NF-kappaB signaling. *Mol Immunol* 2008;45:575-80.
- Ahn C, et al. Fgl2 induction in porcine endothelial cells through xenogeneic CD40-CD40L interaction.(in press)
- Lee EM, Park JO, Kim D, Kim JY, Oh KH, Park CG, et al. Early up-regulation of CXC-chemokine expression is associated with strong cellular immune responses to murine skin xenografts. *Xenotransplantation* 2006;13:328-36.
- Kim JY, Kim D, Lee EM, Choi I, Park CG, Kim KS, et al. Inducible nitric oxide synthase inhibitors prolonged the survival of skin xenografts through selective down-regulation of pro-inflammatory cytokine and CC-chemokine expressions. *Transpl Immunol* 2003;12:63-72.
- Yang J, Cho B, Choi I, Kim DH, Kim SD, Koh HS, et al. Molecular characterization of miniature porcine RANTES and its chemotactic effect on human mononuclear cells. *Transplantation* 2006;82:1229-33.
- Yang J, Choi I, Kim SD, Kim ES, Cho B, Kim JY, et al. Molecular characterization of cDNA encoding porcine IP-10 and induction of porcine endothelial IP-10 in response to human TNF-alpha. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;117:124-8.
- Choi I, Cho B, Kim SD, Park D, Kim JY, Park CG, et al. Molecular cloning, expression and functional characterization of miniature swine CD86. *Mol Immunol* 2006;43:480-6.
- Nilsson B. The instant blood-mediated inflammatory reaction in xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation* 2008;15:96-8.
- Bennet W, Groth CG, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O. Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci* 2000;105:125-33.
- Bennet W, Sundberg B, Groth CG, Brendel MD, Brandhorst D, Brandhorst H, et al. Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? *Diabetes* 1999;48:1907-14.
- Bühler L, Deng S, O'Neil J, Kitamura H, Koulmanda M, Baldi A, et al. Adult porcine islet transplantation in baboons treated with conventional immunosuppression or a non-myeloablative regimen and CD154 blockade. *Xenotransplantation* 2002;9:3-13.
- van der Windt DJ, Bottino R, Casu A, Campanile N, Cooper DK. Rapid loss of intraportally transplanted islets: an overview of pathophysiology and preventive strategies. *Xenotransplantation* 2007;14:288-97.
- Cowan PJ. Coagulation and the xenograft endothelium. *Xenotransplantation* 2007; 14:7-12.
- Lin CC, Chen D, McVey JH, Cooper DK, Dorling A. Expression of tissue factor and initiation of clotting by human platelets and monocytes after incubation with porcine endothelial cells. *Transplantation* 2008;86:702-9.
- Glaser CB, Morser J, Clarke JH, Blasko E, McLean K, Kuhn I, et al. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *J Clin Invest* 1992;90:2565-73.
- Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:

- 10212-6.
- 28) Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation *in vivo*. *Blood* 2001; 97:1685-8.
- 29) Pike RN, Buckle AM, Le Bonniec BF, Church FC. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS J* 2005; 272:4842-51.
- 30) Dwyer KM, Mysore TB, Crikis S, Robson SC, Nandurkar H, Cowan PJ, et al. The transgenic expression of human CD39 on murine islets inhibits clotting of human blood. *Transplantation* 2006;82:428-32.
- 31) Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 2007;3:171-80.
- 32) Shimizu A, Hisashi Y, Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Houser SL, et al. Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Am J Pathol* 2008;172:1471-81.
- 33) Cooper DK, Good AH, Koren E, Oriol R, Malcolm AJ, Ippolito RM, et al. Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transpl Immunol* 1993;1:198-205.
- 34) Rood PP, Bottino R, Balamurugan AN, Smetanka C, Ayares D, Groth CG, et al. Reduction of early graft loss after intraportal porcine islet transplantation in monkeys. *Transplantation* 2007;83:202-10.
- 35) Rayat GR, Rajotte RV, Hering BJ, Binette TM, Korbutt GS. *In vitro* and *in vivo* expression of Galalpha-(1,3)Gal on porcine islet cells is age dependent. *J Endocrinol* 2003; 177:127-35.
- 36) Hering BJ, Kandaswamy R, Harmon JV, Ansrite JD, Clemmings SM, Sakai T, et al. Transplantation of cultured islets from two-layer preserved pancreases in type 1 diabetes with anti-CD3 antibody. *Am J Transplant* 2004;4:390-401.
- 37) Mohanakumar T, Narayanan K, Desai N, Ramachandran S, Shenoy S, Jendrisak M, et al. A significant role for histocompatibility in human islet transplantation. *Transplantation* 2006;82:180-7.
- 38) Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 2006;12:682-7.
- 39) Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th ed. New York: Garland Science, 2005:55-75.
- 40) Kues WA, Schwinzer R, Wirth D, Verhoeven E, Lemme E, Herrmann D, et al. Epigenetic silencing and tissue independent expression of a novel tetracycline inducible system in double-transgenic pigs. *FASEB J* 2006;20:1200-2.
- 41) Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, Brown AA, Chen CG, Fisicaro N, et al. Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation* 2000; 27:69:2504-15.
- 42) Bennet W, Björkland A, Sundberg B, Brandhorst D, Brendel MD, Richards A, et al. Expression of complement regulatory proteins on islets of Langerhans: a comparison between human islets and islets isolated from normal and hDAF transgenic pigs. *Transplantation* 2001; 72:312-9.
- 43) van der Windt DJ, Bottino R, Casu A, Campanile N, Smetanka C, He J, et al. Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets. *Am J Transplant* 2009;9:2716-26.
- 44) Shrivastava S, McVey JH, Dorling A. The interface between coagulation and immunity. *Am J Transplant* 2007;7:499-506.
- 45) Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, Bilbao G, Vilatoba M, Ringland SE, et al. Activated protein C preserves functional islet mass after intraportal transplantation: a novel link between endothelial cell activation, thrombosis, inflammation, and islet cell death. *Diabetes* 2004;53: 2804-14.
- 46) Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407:258-64.
- 47) Moberg L, Korsgren O, Nilsson B. Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood. *Clin Exp Immunol* 2005;142:125-31.
- 48) Ozmen L, Ekdahl KN, Elgue G, Larsson R, Korsgren O, Nilsson B. Inhibition of thrombin abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction triggered by isolated human islets: possible application of the thrombin inhibitor melagatran in clinical islet transplantation. *Diabetes* 2002;51:1779-84.
- 49) Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, Profozich J, et al. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* 2004;53:2559-68.
- 50) Hanley S, Liu S, Lipsett M, Castellarin M, Rosenberg L, Tchervenkov J, et al. Tumor necrosis factor alpha production by human islets leads to postisolation cell death. *Transplantation* 2006;82:813-18.
- 51) Langford GA, Yannoutsos N, Cozzi E, Lancaster R, Elsome K, Chen P, et al. Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor. *Transplant Proc* 1994;26:1400-1.
- 52) Murakami H, Nagashima H, Takahagi Y, Miyagawa S, Fujimura T, Toyomura K, et al. Transgenic pigs expressing human decay-accelerating factor regulated by porcine MCP gene promoter. *Mol Reprod Dev* 2002;61:302-11.
- 53) Zhou CY, McInnes E, Copeman L, Langford G, Parsons N, Lancaster R, et al. Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor. *Xenotransplantation* 2005;12:142-8.

- 54) Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002;295:1089-92.
- 55) Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 2003;299:411-4.
- 56) Tu CF, Hsieh SL, Lee JM, Yang LL, Sato T, Lee KH, et al. Successful generation of transgenic pigs for human decay-accelerating factor and human leucocyte antigen DQ. *Transplant Proc* 2000;32:913-5.
- 57) Ramsoondar JJ, Macháty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL, Bondioli KR. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biol Reprod* 2003;69:437-45.
- 58) Lee S, Chung J, Ha IS, Yi K, Lee JE, Kang HG, et al. Hydrogen peroxide increases human leukocyte adhesion to porcine aortic endothelial cells via NF κ B-dependent up-regulation of VCAM-1. *Int Immunol* 2007;19: 1349-59.
- 59) Hancock WW, Buelow R, Sayegh MH, Turka LA. Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 1998;4:1392-6.
- 60) de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 2006;27:5603-17.
- 61) Stabler CL, Sun XL, Cui W, Wilson JT, Haller CA, Chaikof EL. Surface re-engineering of pancreatic islets with recombinant azido-thrombomodulin. *Bioconjug Chem* 2007;18:1713-5.
- 62) Kin T, O'Neil JJ, Pawlick R, Korbutt GS, Shapiro AM, Lakey JR. The use of an approved biodegradable polymer scaffold as a solid support system for improvement of islet engraftment. *Artif Organs* 2008;32:990-3.
- 63) Berman DM, O'Neil JJ, Coffey LC, Chaffanjon PC, Kenyon NM, Ruiz P Jr, et al. Long-term survival of non-human primate islets implanted in an omental pouch on a biodegradable scaffold. *Am J Transplant* 2009;9:91-104.
- 64) Dufour JM, Rajotte RV, Zimmerman M, Rezania A, Kin T, Dixon DE, et al. Development of an ectopic site for islet transplantation, using biodegradable scaffolds. *Tissue Eng* 2005;11:1323-31.
- 65) Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hårdstedt M, Aasheim TC, Jie T, et al. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nat Med* 2006;12:301-3.
- 66) Cardona K, Korbutt GS, Milas Z, Lyon J, Cano J, Jiang W, et al. Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways. *Nat Med* 2006;12:304-6.
- 67) Dufrane D, Goebbel RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. *Transplantation* 2006;81:1345-53.