

이종장기이식의 현황과 전망

서울대학교 의과대학 미생물학교실¹, 서울대학교병원 바이오 이종장기 개발사업단², 서울대학교 의학연구원 장기이식 연구소³, 서울대학교 암연구소⁴, 서울대학교병원 외과⁵

박정규^{1,2,3,4} · 김정식^{1,2,3,4} · 신준섭^{1,2,3,4} · 김용희^{1,2,3,4} · 김상준^{2,5}

Current Status and Future Perspectives of Xenotransplantation

Chung-Gyu Park, M.D.^{1,2,3,4}, Jung-Sik Kim, Ph.D.^{1,2,3,4}, Jun-Seop Shin, Ph.D.^{1,2,3,4}, Yong-Hee Kim, M.D.^{1,2,3,4} and Sang-Joon Kim, M.D.^{2,5}

Department of Microbiology and Immunology¹, Xenotransplantation Research Center², Transplantation Research Institute SNUMRC³, Cancer Research Institute and TIMRC⁴, Department of Surgery⁵, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Xenotransplantation using pigs as the transplant source holds great promise to resolve the severe shortage of human organ donors. Although stem-cell-derived organ and tissue regeneration have a potential to solve this as well for the future, it still remains as very early experimental phase. Likewise, artificial organs and mechanical devices have been simply used for bridge therapy to transplant. Therefore, xenotransplantation might provide the most imminent solution to the scarcity of human organ donors. In the last two decades, major progress has been made in understanding the mechanisms of xenografts rejection, zoonotic infections including porcine endogenous retrovirus (PERV) and production of genetically engineered pigs including α 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. With these elaborations, it is now on the threshold of first clinical application. Particularly promising first target is porcine pancreatic islet xenotransplantation. Graft survival has been prolonged to almost one year in the non-human primate study and is waiting for the development of relatively non-toxic or clinically applicable immunosuppressive or tolerance-inducing regimens. This review highlights the currently known obstacles to translate xenotransplantation into clinical therapies and the possible strategies to overcome these hurdles, as well as current status and future perspective for clinical xenotransplantation.

Key Words: Xenotransplantation, Porcine, Islet transplantation, Transplant rejection, Immune tolerance
중심 단어: 이종이식, 돼지, 돼도 이식, 이식 거부, 면역 관용

서론

말기 장기부전 환자의 유일한 치료방법은 새로운 대체 장기를 이식하는 것이다. 하지만 국내외적으로 급격히 증가하는 이식대기 환자에 비해 절대적으로 부족한 공여 장기의 수급 불균형은 불법 장기 매매를 비롯한 여러 가지 사회적, 경제적 문제를 야기하고 있다. 국립장기이식 관리센터(Korean Network for Organ Sharing, KONOS)의 2008년 통계에 따르면, 고형 장기의 경우 국내의 이식 대기자 대비 이식건수는 불과 10% 내외로 이러한 불균형

은 점점 급격히 증가하는 추세이다(Fig. 1). 국내외적으로 이러한 장기부족현상을 해결하기 위해 바이오 이종장

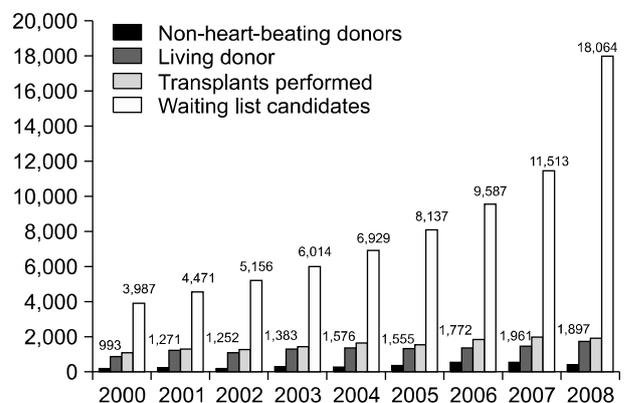


Fig. 1. Shortage of organ donor in Korea (Data from Korean Network for Organ Sharing, KONOS).

책임저자 : 박정규, 서울시 종로구 대학로 103
 서울대학교 의과대학 미생물학교실, 110-799
 Tel: 02-740-8308, Fax: 02-743-0881
 E-mail: chgpark@snu.ac.kr

접수일 : 2009년 12월 18일, 게재승인일 : 2009년 12월 22일

기, 인공장기, 줄기세포 분화, 생체조직공학을 이용한 조직 재생법 등의 연구가 전임상 및 임상단계에서 진행되고 있다(Table 1). 이중 바이오 이종장기이식은 부족한 장기를 무한정 공급할 수 있을 뿐 아니라 유전공학적 기법을 이용한 환자 맞춤형 형질전환장기의 생산이 가능하다는 점에서 타 분야에 비해 현실적으로 장기 부족문제를 가장 빠르게 해결할 수 있는 방법이라 할 수 있다(Table 2). 하지만 이종장기가 대체장기로써 활용되기 위해서는 면역학적 거부반응, 인수공통감염문제, 생리학적 부적합, 동물장기를 이식받아 발생하는 윤리적인 문제 등을 극복하여야 한다. 초급성(hyperacute), 체액성 급성(acute humoral), 세포 매개성(cell-mediated) 및 만성(chronic) 거부반응이 해결해야 할 대표적인 면역학적 거부반응이다. 2002년 초급성 면역거부반응을 일으키는 주요 항원을 만드는 효소인 α 1,3-galactosyltransferase (α 1,3GalT)가 결여된 돼지 및 hCRPs (human complement regulatory proteins)가 발현되는 돼지가 생산되었고, 이 돼지의 신장, 심장, 간, 폐를 이식하여 전임상 연구를 실시한 결과 이식 거부반응이 수 일에서 수 개월 지연되는 성과를 얻을 수 있었다(Table 3). 이로써 초급성 면역거부반응이 극복될 수 있음이 확인되었다. 최근에는 남아있는 난관인 보체 활성화(complement activation), 응고 병증(coagulopathy),

세포 매개성 거부반응 등을 극복하기 위해 CD39, tissue factor pathway inhibitor (TFPI), Thrombomodulin, CD47, human leukocyte antigen-E (HLA-E), UL16 binding protein-1 (ULBP-1) 등의 유전자가 최소한 하나 이상 발현되는 돼지가 생산되고 있고, 면역관용을 유도하기 위해 혼합 키메라(mixed chimerism)나 이중 가슴샘(xenothymus)을 이식하는 방법 또한 연구되고 있다(Table 3).

여러 장기 또는 조직 중 췌도가 첫 번째 이종이식의 임상적용 대상으로 고려되고 있다. 왜냐하면 췌도 이식은 고형장기에 비해 면역학적 및 생리학적 거부반응이 적고, 실패하더라도 치명적이지 않으며, 돼지 인슐린은 상당히 오랜 기간 동안 사람에게 사용되어 그 기능이 확인되었고, 수혜를 받을 수 있는 환자(1형 당뇨병)의 수가 많다는 점 등 때문이다. 또한 동종 췌도 이식에서 2~4명의 공여자로부터 분리된 충분한 양의 췌도가 필요한 점은 췌도 이식이 다른 장기 이식에 비해 공여 장기 부족 현상이 더 심각하다는 점도 고려되었다. 돼지 췌도 이식의 경우 이미 임상적용의 경험이 있는데,(1,2) 두 경우 모두 이종이식에 수반된 감염 문제나 윤리적인 문제에 대한 심각성이 충분히 고려되지 않은 상황에서 실시되었다. 2007년 뉴질랜드의 Living Cell Technology (LCT)사는 캡슐화 췌도(DiabeCell)의 임상 I/IIa 상 시험을 러시

Table 1. Replacement of donor organ shortage

Replacement \ Organs	Heart	Kidney	Liver	Lung
Allograft	Applied clinically	Applied clinically	Applied clinically	Applied clinically
Artificial organ (mechanical)	Applied clinically	Under development	Applied clinically	Under development
Cell therapy	Under development	-	Under development	-
Tissue engineering	Under development	Under development	Under development	-
Artificial organ (biological)	-	Under development	-	-
Xenograft	Under development	Under development	Under development	Under development

Source: Modified from Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol* 2007;7:519-31. and Cascualho, M Platt JL. New technologies for organ replacement and augmentation. *Mayo Clin Proc* 2005;80:370-8.

Table 2. Solutions to organ shortage

Solution	Applicable organ	Current status
Porcine xenografts	Most organs; liver needs further investigation	Preclinical; limited clinical trials for pig pancreatic islet transplantation
Mechanical devices	Most successful for cardiac failure	Bridge therapy to transplant; destination therapy for non-transplant candidates
Bio-artificial kidney	Renal tubule assist device for acute renal failure	Extracorporeal dialysis
Tissue regeneration from stem cells	All organs	Experimental and clinical trials for cell therapies; solid organ regeneration still in very early experimental phase

Source: Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol* 2007;7:519-31. p.527

Table 3. Different approaches to overcome xenograft rejection

Intervention	Effect
Removal of anti- α Gal antibodies	Prevention of HAR
Inhibition of complement system	Prevention of HAR
CD55, CD46, and CD59 transgenic pigs	Prevention of HAR
α GalT ^{-/-} pigs	Prevention of HAR
	Prevention of AHXR mediated by newly elicited α Gal antibodies
	Attenuated T cell responses
	Attenuated macrophage response
HLA-E transgenic pigs	Prevention of NK-mediated xenorejection
ULBP1 transgenic pigs	Prevention of NK-mediated xenorejection
huCD47 transgenic pigs	Attenuation of macrophage response
huCD39 transgenic pigs	Prevention of thrombosis
T/B-cell suppression	Attenuation of T-and B-cell responses
Mixed chimerism	T-cell tolerance
	B-cell tolerance
	Nk hyporesponsiveness
Xenothymus transplantation	T-cell tolerance

Abbreviations: AHXR, acute humoral xenograft rejection; α GalT, α 1,3-galactosyltransferase; HAR, hyperacute rejection; HLA-E, human leukocyte antigen-E; NK, natural killer; ULBP-1, UL16 binding protein-1.

Source: Sprangers B, Waer M, Billiau AD. Xenotransplantation: where are we in 2008? *Kidney Int* 2008;74:14-21. p.16

아에서 실시하였고 이 결과를 토대로 뉴질랜드 보건 당국의 승인 하에 2009년 현재 뉴질랜드에서 임상 2상 시험 중에 있다. 미국의 미네소타 대학은 돼지 췌도 이종이식을 위한 “Spring Point Project”를 시작하여 2009~2010년에 임상시험을 시도할 예정이다. 이렇게 이종이식의 임상적용이 임박하여 세계이종이식학회의 전문가들은 2009년 8월 이종췌도이식의 임상시험에 관한 전문가들의 의견을 정리하여(3) 임상시험 시 반드시 갖추어야 할 요건들에 대한 가이드라인을 제시하고 있다. 돼지 췌도 이종이식이 성공적인 결과를 가져올 경우 이종이식은 새로운 전기를 맞이할 것으로 예상된다. 본 종설에서는 성공적인 이종장기이식을 위해 극복해야 할 문제점과 극복 방안, 현재까지 국내외의 연구현황 및 전망에 대해 다루고자 한다.

본 론

1) 이종장기이식 시 발생하는 거부 반응 기전

이종장기이식의 임상적용을 위해서는 우선 면역학적 거부반응 장벽을 해결해야 한다. 이종장기이식 시 수 분만에 장기의 기능을 정지시킬 수 있는 초급성(hyperacute) 거부반응을 시작으로 체액성 급성 거부반응(acute humoral xenograft rejection, AHXR), 세포 매개성 거부반응(cell-mediated rejection)이 연속적으로 일어나게 된다. 초급성 거부반응은 수여자에 이미 존재하는 자연항체

(natural antibody) 중 Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc (α 1,3Gal)에 대한 항체에 의하여 일어난다.(4) 이 자연항체는 이식편의 혈관내피세포에 결합하여 보체계(complement system)를 활성화시키고, 혈관내피의 부종(edema)과 미세혈관혈전증(microvascular thrombosis)을 일으켜 장기의 기능을 정지시킨다.(5) 체액성 급성 거부반응의 경우 초급성 거부반응과 유사한 병리소견을 보이나 24시간 이후에 발생하는 지연반응이라는 차이가 있다.(6) 작은 양의 항 α 1,3Gal 항체나 또 다른 자연항체(Non- α Gal) 그리고 이식 후 유도된 항체(induced antibody)가 이식편의 혈관내피세포에 결합하여 반응이 시작되고 결국은 초급성 거부반응과 같이 혈관병증(angiopathy)을 일으켜 장기의 기능을 정지시킨다. 이종장기에 대한 급성 거부반응에는 또한 다양한 면역세포들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 급성 거부반응의 병리소견에서 T 림프구와 B 림프구, 큰 포식세포(macrophage), NK 세포(natural killer cell)의 침윤과 직접적인 조직의 파괴가 보이며 이를 세포성 급성 거부반응이라고 부른다.(7) 이식절편 내에서 혈액응고를 조절하는 조절 단백질의 생리학적 구조 차이 또한 급성 거부반응의 원인이다. 돼지 이식절편의 TFPI와 사람의 혈액응고요소 Xa와의 불일치로 인한 혈전증은 그 좋은 예이다.(8)

2) 초급성 면역 거부반응의 극복

이종장기이식의 공여자로 이용할 수 있는 돼지의 혈관

내피세포 표면에는 $\alpha 1,3GalT$ 유전자에 의해 $\alpha 1,3Gal$ 항원이 발현되어 있다. 반면 사람은 이러한 $\alpha 1,3Gal$ 항원이 발현되지 않고 사람의 자연항체의 80% 정도가 $\alpha 1,3Gal$ 을 인식한다.(4) 이런 항 $\alpha 1,3Gal$ 자연항체는 돼지 장기이식 시 초급성 면역 거부반응을 일으키는 주요 원인이다. 2000년 초부터 여러 가지 보체 활성화 조절 단백질(complement regulatory proteins)을 발현하는 형질전환 돼지가 만들어졌는데, hDAF (human decay-accelerating factor, CD55),(6) MCP (membrane cofactor protein, CD46)(9) 또는 protectin (CD59)(10)을 발현하는 돼지가 그 예이다. 또한 미국의 PPL Therapeutic Inc. 등에서는 $\alpha 1,3GalT$ (alpha 1,3 Galactosyl Transferase)가 결여된 돼지의 장기를 생산하였고, 이들을 이용한 이종장기 이식으로 초급성 거부반응을 완전히 억제 할 수 있었다.(11)

3) 체액성 급성 거부반응(AHXR)의 극복

$\alpha 1,3GalT$ 가 결여된 돼지 장기의 이식으로 초급성 면역 거부반응은 극복되었지만, 미세혈관혈전증과 파종성 혈관 내용고 증후군(disseminated intravascular coagulation, DIC)으로 대표되는 체액성 급성 거부반응의 극복은 아직까지 과제로 남아있다.(12) 비록 $\alpha 1,3GalT$ 외의 또 다른 대체 유전자인 iGb_3 synthase (A3GALT2)에 의해 미량의 $\alpha 1,3Gal$ 항원이 생겨날 수 있고(13) Non- αGal 항원 또한 수여자의 자연항체에 반응하여 거부반응에 영향을 줄 수 있겠지만, 체액성 급성 거부반응은 주로 non- αGal 항원에 반응하는 유도항체에 의해 일어난다고 알려져 있다.(14) 하지만 앞에서 언급된 보체 조절 단백질을 발현하는 형질전환 돼지를 통하여 보체에 의한 반응을 없앤 경우에도 체액성 급성 거부반응을 막지는 못했다.(15) 그 이유는 체액성 급성 거부반응에는 활성화된 보체계와 혈액응고 경로가 함께 작용하기 때문이다.(14) 따라서 체액성 면역반응을 억제하기 위해 적절한 면역억제제가 보조요법으로 사용되고 있다.(16) B 림프구에 의한 항체 생산은 대체로 T 림프구 의존성이기 때문에 T 나 B 림프구의 활성을 직접적으로 억제함으로써 상당부분 체액성 급성 거부반응을 막을 수 있음이 보고되고 있다.(12,17) 혈액응고경로의 극복에 대해서는 응고병증의 극복에서 좀 더 자세히 다루도록 하겠다.

4) 세포 매개성 거부반응의 극복

세포 매개성 면역거부반응은 이종이식 거부반응의 극복에 중요한 난관이기도 하지만 대동물체를 이용한 고형장기이식의 경우 그 발생기전이 잘 밝혀지지는 않았다. 하지만 T 림프구가 이종장기 이식의 거부반응에 직접적으

로 작용할 수 있다는 연구 결과는 B 림프구가 제거된 원숭이에 돼지의 심장을 이식했을 때 T 림프구에 의해 혈관내피세포 손상이 발생한다는 연구결과를 보면 알 수 있다.(18) 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)는 직접적으로 세포를 파괴하거나 사이토카인 생산 등을 통해 큰 포식세포, 호중구 등을 끌어오는 등 간접적인 역할을 한다고 알려져 있다.(19) 췌도와 같은 비혈관 조직(non-vascularized tissue)의 경우 주로 T 림프구의 활성화에 의해 이식된 조직의 거부반응이 발생한다는 사실은 영장류 실험을 통해서도 잘 알려져 있다.(20) 이는 영장류를 이용한 돼지 췌도 이식모델에서 T 세포 특이 면역억제제나 공동자극분자 차단제를 사용하면 이식된 췌도가 6~9개월 이상 생존할 수 있다는 연구 결과에서 알 수 있다.(21,22) 이러한 T 림프구의 활성을 억제하기 위해 앞서 언급한 형질전환 돼지의 장기 이식과 함께 강력한 면역활성 억제제들(예; Rapamycin, calcineurin inhibitors, MMF, leflunomide)이 사용되고 있다. 하지만 장기간 사용하면 세포독성과 같은 부작용이 심하다는 문제가 있다.(19) 이종항원에 특이적인 면역관용을 유도하는 방법은 부작용없이 이식절편이 장기간 생존할 수 있는 궁극적인 방법이다. 이를 위해 공동자극분자(co-stimulatory molecule) 차단을 통하거나(예; CTLA4-Ig, anti-CD154 항체 등), 가슴샘이식, 혼합 키메라법 등의 방법이 시도되고 있고, 실제로 설치류를 이용한 이종이식 모델에서는 면역관용이 재현성있게 유도되고 있다(Table 3). 하지만, 대동물 이종이식모델의 경우 이식절편의 생존이 연장되기는 하지만 영구적인 관용이 유도된 성과는 아직 없다.(23,24) 하지만 원숭이에 $\alpha 1,3GalT$ 결여 돼지의 신장을 가슴샘과 함께 이식하였을 때 83일까지도 거부반응이 없었던 결과(25) 등을 보아 추가적인 연구들을 통해 대동물에서의 면역관용 유도도 가능할 것으로 생각된다. NK 세포 및 큰 포식세포와 같은 선천성 면역반응 또한 이식된 장기의 거부반응에 작용한다.(26,27) 원천적으로 NK 세포의 활성은 돼지의 class I major histocompatibility complex (MHC)와 사람 NK 세포의 억제수용체와의 불일치로 인해 생겨난다.(28) 사람의 HLA-E는 NK 세포의 활성을 억제하는 MHC 중 하나로 이 유전자가 발현된 장기의 혈관내피세포는 NK 세포에 의한 공격으로부터 보호될 수 있음이 보고 되었다.(29) 다른 예로 돼지장기의 ULBP-1은 사람의 NK 세포를 직접적으로 활성화시킬 수 있는데, 이런 ULBP-1이 결여된 돼지의 생산은 NK 세포에 의한 이식장기의 손상을 억제하는데 일조할 것으로 기대하고 있다.(28) 큰 포식세포도 역시 이종장기에 대한 세포 매개성 거부반응에 중요한 역할을 한다고 알려져

있다.(30,31) 큰 포식세포의 억제에는 signal-regulatory protein- α (SIRP- α) 라는 억제성 수용체가 중요한 역할을 하는데 평소 이들은 조직내의 CD47를 통해 자신의 포식을 막는다.(32) 하지만 생리학적 불일치로 인해 돼지 장기의 CD47은 사람 큰 포식세포의 SIRP- α 에 억제 신호를 전달해 줄 수 없어서 비 특이적으로 큰 포식세포가 활성화 된다. 따라서 사람의 CD47을 발현하는 형질전환 돼지가 만들어 졌고 이를 이용하여 큰 포식세포에 의한 포식작용이 유의하게 줄어들 수 있음이 보고되었다.(33)

5) 응고병증(coagulopathy)의 극복

체액성 급성 거부반응의 원인 중 하나는 응고병증으로부터 유래하는데, 크게 이식편이나 주위에 혈전이 생성되어 이식편의 생존율을 현저히 저하시키는 혈전혈관병증(thrombotic angiopathy)과 혈액응고에 관여하는 단백질 용해제(proteases), 혈소판, 피브리노젠(fibrinogen) 등이 부족하여 전신에서 관찰되는 소비성응고병증(consumptive coagulopathy)으로 나눌 수 있다. 응고병증의 원인으로는 이종이식 후 활성화된 항체와 보체 매개 내피세포 활성화나 이에 따른 혈소판활성화에 의해서 일어난다. α 1,3Gal이 결여된 돼지의 연구결과로 영장류에는 많은 종류의 non-Gal 항원이 존재하는 것으로 알려졌으며, 최근의 연구결과에서 80명의 자원공여자(volunteer)들은 각기 개체 차이가 있긴 하지만, 공통적으로 anti-non-Gal 유형의 IgM과 IgG가 있는 것으로 보고되었다.(34) 이러한 항체는 보체를 고정하여 내피세포를 활성화시킬 수 있다. 한 가지 흥미로운 non-Gal 항원으로 Hanganutziu-Deicher 항원이 보고되었는데, 이 항원은 sialic acid의 N-glycolylneuraminic acid 유형을 포함하고 있으며, 돼지의 세포에는 있으나, 사람의 세포에서는 관찰되지 않는다.(35) 보체의 활성화는 크게 항체에 의한 고전적 경로(classical pathway), 만노스 결합 렉틴(mannose-binding lectin)과 특정 당쇄의 상호작용에 의한 렉틴 경로(lectin pathway), 막 결합 C3b에 의한 대체경로(alternative pathway)에 의해 이루어지는데, 최근의 연구결과에 의하면 여러 다른 경로들이 존재하는 것으로 알려졌다. 트롬빈(Thrombin)이 C3와는 무관하게 직접적으로 C5를 활성화시키는 것(36)과, 만노스 결합 렉틴이 C2를 거치지 않고, C3를 직접적으로 활성화시키는 경로(37) 등이 좋은 예가 된다. 혈관내피세포가 활성화되어 혈관 내에 응고과정이 진행되면 강력한 혈소판 활성화도 동반되는데, 혈관내피세포에 ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39), ecto-5'-nucleotidase (CD73) 효소가 소실되어 ADP가 축적되면 혈소판 활성화를 더욱 자극한다.(38) 활성화된 혈소판은

많은 종류의 염증성 매개체들을 분비하고 표면에 glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)과 같은 리간드(ligand)를 표현하여 특정자극에 반응하여 혈소판 응집을 증가시킨다.(39) 또한, P-selectin을 통해 백혈구 표면에 p-selectin 리간드와 격렬히 결합하여 혈소판-백혈구 복합체를 형성한다.(40) 활성화된 혈소판은 이식편이나 주위뿐만 아니라 전신에서도 관찰되며 소비성응고병증을 일으키는 주요 원인 중 하나로 여겨지고 있다. 또 다른 응고병증의 원인으로서는 돼지와 영장류 사이에서 혈액응고 과정에 관여하는 단백질의 차이 때문에 일어난다. 가장 잘 알려진 예로써 돼지의 von Willebrand factor (vWF)는 별다른 자극 없이 O-glycosylated A1 domain과 혈소판의 glycoprotein Ib의 상호작용을 통해 자연적으로 사람의 혈소판을 응집시킬 수 있다.(41) 또한, 혈액응고 과정에 관여하는 thrombomodulin은 영장류에서 응고반응을 효율적으로 조절할 수 없다.(42) 이러한 응고병증을 극복하기 위해 여러 유전자가 형질전환된 돼지가 생산되고 있다. 우선, Gal-T KO background에 hCRF (CD46, hDAF)를 도입하여 초급성 거부반응을 극복하고, 여기에 하나의 항응고, 항혈전 유전자(vWF^{-/-}, Fgl-2^{-/-}, TFPI^{+/+}, CD39^{+/+})를 도입하여 혈전형성과 혈소판 활성화를 방지하려는 노력이 진행 중이다.(43) Statin을 이용한 약물투여 방법도 시도되고 있다. Statin은 혈관내피세포 활성화 방지(44), tissue factor 발현 및 활성화저해(45), ecto-5'-nucleotidase 발현 및 활성화 증강시킬 수 있다.(46)

6) 생물 안전성의 확보: 인수 공통 감염 위험 요인 제거

이종이식의 임상적용에 있어 가장 심각한 문제 중의 하나는 이종 이식편에서 수혜자로 잠재적인 병원체(pathogen)가 전이되고, 크게는 일반대중에게 전파될 수 있는 위험성이 존재한다는 것이다. 이종이식에 사용될 돼지를 특정 병원체가 없는(designated pathogen-free) 시설에서 번식, 사육함으로써 대부분의 돼지 유래 미생물의 전이 위험성은 극복할 수 있으나, 돼지 게놈(genome)에 내재하는 porcine endogenous retrovirus (PERV)은 근본적으로 제거하기 불가능하다. 또한, 이종이식 수혜자들은 면역억제의 영향으로 porcine cytomegalovirus (PCMV), porcine lymphotropic herpesvirus (PLHV)-1, 2, 3 등의 잠복 바이러스들이 활성화될 위험성도 가지고 있다. PERV는 A, B, C 유형으로 분류될 수 있는데, 체외실험에서 사람세포를 감염시킬 수 있다고 알려진 A와 B 유형은 모든 돼지 genome에서 발견되는 반면, C 유형은 매우 낮은 정도로 있거나 돼지의 종에 따라 존재하지 않는 경우도 있다.(47) 하지만, 최근 A와 C의 조합으로 만들어

진 새로운 유형의 PERV A/C 재조합 바이러스가 발견되고, 사람 세포를 감염시킬 수 있다는 보고가 있었다.(48) 이 재조합 바이러스는 PERV A와 PERV C의 세포내 재조합에 의해 만들어지기 때문에 선택적으로 PERV C가 배선(germ line)에서 제거되도록 육종한 돼지를 개발하려는 노력이 진행되고 있다.(49) 여러 체외실험결과와는 다르게 사람과 원숭이에게 시행된 현재까지의 이종이식 실험에서 PERV 감염은 보고되지 않고 있으나, 최근에 발표된 국제 이종이식학회의 이종이식에 관한 임상시험 안내지침에 따르면 돼지의 PERV를 real-time RT-PCR로 정량하고, PERV 감염을 감지할 수 있는 항체기반 방법(ELISA, Western blot)을 개발할 것을 권고하고 있다.(50) 또 다른 바이러스로 PCMV는 체외실험에서 사람 세포를 감염시킬 수 있고 현재 사용되고 있는 항 바이러스제에 덜 민감하다고 보고되었다. 하지만, 원숭이 실험에서 이종이식 후 면역억제제의 사용으로 PCMV의 복제가 증가되고 조직 이식 편에서 바이러스의 출현으로 인해 혈관내피세포의 손상과 소비성응고병증이 유도됨이 보고되었으나 다행히 수혜동물의 장기에서 2차 감염이나 복제는 관찰되지 않았다.(51) 조기 이유를 통해 돼지에서 제거할 수 있지만, 모든 영장류 실험과 임상실험에서 PCMV를 지속적으로 감시하도록 요구하고 있다.(52) PLHV는 herpesvirus로서 림프세포증식질환(lymphoproliferative disease)과 관련이 있다. PLHV-1과 -2 virus는 사람의 herpesvirus-8과 Epstein-Barr virus (EBV)와 유사하고, 돼지에서의 증상도 사람에서 나타나는 질병과 유사한 것으로 보고되었다. 이 바이러스는 PCMV와 같은 방법으로 돼지에서 근본적으로 제거할 수 없으므로 지속적인 감시 시스템이 필요하다.

7) 임상적용을 위한 윤리성과 제반 규제의 정립

최근 이종체도이식의 영장류 전임상 실험이 성공적으로 진행되면서 이종체도이식의 임상적용이 임박해있다. 이미 2003년에 국제이종이식학회는 이종이식에 의한 윤리적인 제반 요구사항들을 정리하여 윤리 위원회의 입장을 표명한 바 있고(53), 2008년 중국의 Changsha에서 WHO 주관 하에 미국, 유럽, 아시아 여러 나라들이 참여하여 이종이식의 임상적용에 대한 법적 제반 사항에 대한 자문결과가 발표되었다. 이 “Changsha Communique”에서는 임상 적용 전 반드시 영장류 실험을 수행하여 그 효과를 증명하고, 인수공통 감염에 대한 모니터링을 실시하며, 책임 있는 국가 기관의 통제를 받으면서 실시할 것을 권고하고 있다. 2007년 뉴질랜드의 Living Cell Technology사에서 개발한 캡슐화 체도(DiabeCell)는 뉴질랜드 보건당국의 승인하에 현재 임상 2상 시험 중에 있으며, 미국

Minnesota 대학의 Hering 등은 영장류 실험결과를 바탕으로 돼지체도의 임상 시험 계획에 대해 FDA와 지속적인 협의를 하고 있다. 국내에서도 서울대학교병원 바이오 이종장기 개발사업단의 권복규 등은 이종이식에 대한 윤리적, 법적 규제사항을 설치하기 위해 일반 대중들에게 그 이득과 위험성(benefits and risks)에 대해 설명하고, Korea Food & Drug Administration (KFDA)와 협의하여 국제기구의 요구에 부응하면서 국내 실정에 맞는 안내지침 마련을 위해 활발히 노력하고 있다.

8) 이종장기의 임상 및 전임상 시험

이종세포를 세포치료제로 임상 적용한 예는 돼지신경세포를 이식한 경우에서 우선 찾을 수 있다. 1994년 뇌졸중 환자의 손상된 뇌에 돼지 신경세포를 이식하여 일상 생활이 가능하도록 호전된 사례를 비롯하여 1997년 뇌졸중 환자, 1998년 반신마비 환자의 치료에 효과를 본 결과가 있다. 전격간부전(fulminant hepatic failure) 환자의 체외 보조용(extracorporeal support)으로 돼지 간을 사용한 예는 1965년 이후 2000년 대 초까지 151건에 이르고 이중 23%의 환자가 이 보조덕분으로 생존하였다. 이러한 생존율은 hCRPs가 발현된 α 1,3GalT 결여 돼지의 간을 사용하면 훨씬 좋아질 것으로 기대되고 있다. 최근의 이종장기를 이식한 전임상 실험 결과는 이종장기가 손상된 사람의 대체장기로 사용될 수 있는 길을 열고 있다. 2003년 미국의 PPL Therapeutic Inc.에서 α 1,3GalT 결여 돼지의 생산이 발표된 이후 CD46, CD55, CD59, CD39, TFPI, Thrombomodulin, CD47, HLA-E, ULBP-1 등의 돼지가 만들어지고 교차변식을 통해 한가지 이상의 유전자가 형질 전환된 트랜스제닉 돼지가 생산되고 있다 (Table 3). 또한 이들 장기를 이용한 전임상 연구 또한 활발하게 진행되고 있다(Table 4).(54) 2005년 Kuwaki 등은 돼지 심장을 Baboon 원숭이에 다른 자리 이식(heterotopic transplantation)하여 최장 179일까지 생존한 결과를 nature medicine에 발표하였다.(12) McGregor CGA 등은 돼지 심장을 같은 자리(orthotropic) 이식하였는데, 원숭이는 평균 40일까지 생존하였다. 신장의 경우 미국 Harvard 대학의 Yamada 등이 돼지 가슴샘 이식법으로 시행한 thymokidney가 가장 좋은 결과인데 최장 83일까지 생존하였다.(25) 2000년 Cozzi 등 또한 hDAF 돼지를 이식하여 평균 39일, 최고 78일 생존한 결과를 발표하였다.(16) 돼지 간 및 폐 이식의 경우 같은 자리 이식 후 수 시간 내에 이식절편의 거부반응이 생겨나는 것으로 보아 급성거부반응의 극복을 위한 노력이 더 필요하다. 현재까지 임상시험에 가장 근접한 이종이식은 돼지 체도

Table 4. Results of selected pig-to-non-human primate solid organ transplantation studies

	Type	Pigs	Recipient	Number	Survival (days)	Average (days)
Kidney						
Cozzi E (2000)		hDAF	Cyno	9	5,6,9,18,39,50,56,56,78	39
Richards AC (2002)		hDAF	Cyno	20	Groups 1-2 (4-60)	30.5
Yamada K (2005)		GT-KO	Baboon	6	Groups 1 (4,13,31,33,56,68)	32
				5	Groups 2 (16,18,26,81,83)	26
				3	Groups 3 (20,33,34)	33
Chen G (2005)		GT-KO	Baboon	6	8,9,10,11,13,16	10.5
Liver						
Ramirez P (2005)	Ortho	hDAF/CD59/H-Transferase	Baboon	5	13,18,20,21,24 hours	20 hours
Heart						
Bhatti FNK (1999)	Hete	hDAF	Baboon	9	10,12,15,15,26,32,37,44,99	26
Houser SL (2004)	Hete	hDAF	Baboon	10	4-139	27
Kuwaki K (2005)	Hete	GT-KO	Baboon	8	16,23,56,59,67,78,110,179	78
McGregor (2008)	Ortho	MCP	Baboon	3	34,40,57	40
Lung						
Cantu E (2003)	Ortho	vWF ^{-/-}	Baboon	3	not available	22.6
	Ortho	MCP	Baboon	3	not available	67 hours

Abbreviations: Ortho, orthotopic; Hete, heterotopic; GT-KO, α 1,3Gal knockout; vWF, von-Willebrent Factor; cyno, cynomolgus. Source: Modified from Eksler B, Rigotti P, Gridelli B, Cooper DK. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. 2009;21:87-92. P.88.

이식을 통한 당뇨병의 치료라 할 수 있다.

(1) 췌도 이식과 임상시험: 내분비기관으로서 췌도는 α 1,3Gal 항원의 발현이 고형장기에 비해 5%에 불과하며 췌도 분리 과정 중 α 1,3Gal 항원이 주로 발현되어 있는 혈관내피세포가 제거되기 때문에 고형장기와 달리 초급성 거부반응이 발생되지 않고 이식 실패 시 발생하는 합병증에 대한 위험도 적다. 이종췌도이식 시 α -Gal 항원이 거부반응에 미치는 영향은 미미하거나 거의 없다는 사실은 α 1,3GalT가 결여된 돼지 췌도를 원숭이에 이식한 결과에서 잘 밝혀져 있다.(54) 오히려 non-Gal에 대한 항체가 거부반응에 작용하는 것으로 알려져 있다.(55) 또한 현재 임상적으로 사용되고 있는 간문맥을 통하여 췌도를 이식하였을 경우 immediate blood-mediated inflammatory response (IBMIR)에 의해 이식된 췌도의 60~70%가 생착 전 기능을 상실하는 것으로 알려져 있다.(56) IBMIR에 대한 명확한 기전 및 이를 일으키는 요인 또한 정확하게 밝혀져 있지 않지만 hCRPs 발현 췌도의 이식이나, low molecular dextran sulfate의 사용, 또는 이식부위의 변경과 같은 방법을 통해 상당부분 해소될 것으로 보고 있다. 이종췌도이식 거부반응은 세포매개 거부반응이 주된 기전으로 특히 T 림프구가 중요한 역할을 하므로 이들 세포의 제어는 이종췌도이식에서 중요한 연구 대상이 되고 있다. 돼지 췌도를 원숭이에 이식하여 6개월 이상 생존한 경우는 현재까지 모두 5군데 연구 그

룹에서 발표되고 있다. 2005년 미국의 Minnesota 대학의 Hering 등은 성체 돼지 췌도를 이용하여 최고 6개월, 2005년 미국의 Emory 대학의 Cardona 등은 neonatal porcine cell clusters (NPCC)를 이용하여 최고 400일까지 성공한 예를 발표하였다.(21,22,57) 두 경우 모두 임상 적용이 곤란한 강력한 면역억제요법을 사용하였지만 영장류에서 돼지 췌도 이식으로 혈당을 충분히 조절할 수 있다는 효과를 보임으로써 앞으로 이종췌도이식의 경우 적절한 면역억제요법 또는 면역관용 유도법이 개발되면 바로 임상 적용이 가능하게 되었다. 최근 Windt 등은 hCD46이 발현된 돼지 췌도를 면역억제요법과 병행하면서 이식한 결과 최장1년 이상 생존한 놀라운 결과를 발표하였다.(58) 이러한 연구성과들을 바탕으로 2009년 돼지 췌도를 임상적으로 적용하기 위한 가이드라인을 명시한 International Xenotransplantation Association consensus statement가 발표되어 머지않은 장래에 돼지 췌도를 사람에게 이식할 수 있음을 시사하였다.(59) 지금까지 돼지 췌도를 사람에게 이식한 예는 4예가 있었다.(2) 1994년 스웨덴의 Groth 등이 fetal pig islet을 7명의 당뇨병 환자에 이식하였고(1) 2005년에는 중국의 Wang 등이 간동맥을 통해 fetal pig islet을 20명의 환자에게 이식하였다 [Wang W, Zhaohui M, Bin Y et al. Intra-hepatic artery transplantation of newborn porcine islets (NPI) into 20 type 1 diabetic patients with steroids immunosuppression protocol

Table 5. Isolation variables and islet characterization

Pig strain	n	Total islet yield (IEQ)	Islet yield per pancreas weight (IEQ/g)	Isolation index	ATP (pmol/IEQ)	Stimulation index (18 m/1,8 m)
ACM	9	540,325±136,127	9,589±2,823	1.04±0.31	0.81±0.39	1.90±1.25
APM	4	117,897±68,699 [†]	1,752±974 [†]	0.73±0.37	0.71±0.14	1.98±0.79
AM	13	173,026±85,140 [†]	1,931±947 [†]	0.62±0.33 [†]	0.90±0.59	1.65±0.60
YCM	6	120,551±67,233 [†]	3,460±1,985 [†]	0.49±0.21 [†]	0.96±0.65	1.75±0.94

Abbreviations: ACM, SPF adult CMS miniature; APM, adult PWG miniature; AM, adult market; YCM, SPF young CMS miniature; SPF, specific pathogen-free; CMS, Chicago Medical School.

**P*<0.05, [†]*P*<0.01, [‡]*P*<0.001 vs. SPF adult CMS miniature pigs.

The total islet yield of the ACM pigs (540,325±136,127 IEQ) was much higher than that of the APM pigs (117,897±68,699 IEQ), AM pigs (173,026±85,140 IEQ), or YCM pigs (120,551±67,232 IEQ; Table 2). The islet yield per gram of pancreas of the ACM pigs (9,589±2,823 IEQ/g) was also significantly higher than that of the APM pigs (1,752±874 IEQ/g), AM pigs (1,931±947 IEQ/g), or YCM pigs (3,460±1,985 IEQ/g; Table 2). The isolation index of the ACM pigs was significantly higher than those of the AM or YCM pigs. However, the purity of the islets, as estimated by dithizone staining, was not significantly different among the experimental groups and was always more than 90%.

Source: Kim JH, Kim HI, Lee KW, Yu JE, Kim SH, Park HS, et al. Influence of strain and age differences on the yields of porcine islet isolation: extremely high islet yields from SPF CMS miniature pigs. *Xenotransplantation* 2007;14:60-6. p.63

(Abstract OP-056). Presented at the 10th Congress of the International Pancreas and Islet Transplantation Association in Geneva 2005]. 2007년 Living Cell Technology사에서 개발한 캡슐화 췌도는 뉴질랜드 보건 당국의 승인 하에 현재 임상 2상 시험 중에 있다. 미국의 Hering는 이러한 결과를 바탕으로 돼지 췌도의 임상 시험 계획을 발표하였고 이를 위해 FDA 승인을 기다리고 있다.

9) 국내 현황

국내에서는 보건복지부(현 보건복지가족부), 과학기술부(현 교육과학기술부)가 주축이 되어 바이오 이종장기 개발사업단, 장기복제이식기술 개발사업단을 만들어 2004년부터 3단계(1단계 3년, 총 9년) 연구를 시작하였다. 서울대학교 Biomax산하 특수생명자원연구센터에서는 무균 미니돼지의 생산 및 유지 기술을 확립하고 현재 70 두 정도를 유지하고 있으며 5년 동안의 개체별 데이터베이스를 축적하고 있고 이종장기원으로서 국제적 기준을 만족하고 있다. 2007년 2단계 사업을 시작한 장기복제이식기술 개발사업단은 교육과학기술부의 지원을 받고 있으며 2009년 초급성 거부반응을 극복할 수 있는 α 1,3 GalT 유전자 적중 돼지 및 사람 보체 수용체(hDAF) 형질전환 돼지를 생산하였다. 같은 시기에 시작된 바이오 이종장기 개발사업단은 보건복지가족부의 지원을 받으며 면역거부반응을 최소화할 수 있는 이식용 이종장기의 생산과 면역 거부반응의 극복을 위한 효과적 방법의 모색 및 이를 바탕으로 이종이식 기술을 개발, 적용하여 만성 장기부전 환자의 구제 및 이 기술을 산업화하는 것

Table 6. Predictors of high islet isolation yield

	Odds ratio	95% Confidence interval	<i>P</i> -value
Parameters for higher IEQ/g			
Distension (moderate vs. poor)	40.06	3.21 ~ 500.36	0.004 [†]
Distension (good vs. poor)	18.71	1.99 ~ 176.17	0.010*
Male	5.35	1.49 ~ 19.12	0.010*
Parameters for higher Total IEQ			
Older age group (> 2 yr)	25.60	2.22 ~ 294.73	0.009 [†]
Distension (moderate vs. poor)	70.15	2.51 ~ 1958.62	0.012 [†]
Male	7.55	1.35 ~ 42.31	0.022*
Good decapsulation	10.18	0.78 ~ 132.79	0.077
Distension (good vs. poor)	14.05	0.73 ~ 270.26	0.080

Binary logistic regression analysis; **P*<0.05, [†]*P*<0.01.

Three donor parameters including pig body weight, age and sex, and three procurement parameters including anesthesia duration, decapsulation, and distension status were analyzed using total IEQ and IEQ/g as outcome variables Working forward analysis provided a simplified model for predicting higher islet yield. Identified variables allowed for an accuracy of 71.2% for higher IEQ/g and 83.1% for higher total IEQ.

Source: Kim HI, Lee SY, Jin SM, Kim KS, Yu JE, Yeom SC, et al. Parameters for successful pig islet isolation as determined using 68 specific-pathogen-free miniature pigs. *Xenotransplantation* 2009;16:11-18. P.15.

을 최종 목표로 하고 있다. 2007년 시작 된 2단계에서는 당뇨병 치료를 위한 췌도 이식 및 심장판막, 각막 이식의 임상적용을 위한 원숭이 전임상 실험을 시행 중에 있다. 심장판막 및 각막 이식은 2011년, 췌도 이식은 2012년에 임상시험을 실시할 목표로 연구를 진행하고 있다. 사업

단이 개발 보유하고 있는 SNU 미니돼지는 현재 알려져 있는 미니돼지 종류 중 체장 단위 면적 당 가장 많은 체도를 생산하고 있다.(60) (Table 5) 이를 이용하여 사업단에서는 안정적인 체도 분리기술 및 기능평가 기술을 개발하였고,(61) (Table 6) 향후 임상 적용을 위한 good manufacturing practice (GMP) 시설을 구축하기 위해 노력하고 있다. 또한 분리된 돼지 체도를 이용하여 영장류에서 체도 이식 기술을 확립하였고, 임상 적용 가능한 면역억제 요법을 개발하기 위한 연구를 수행하고 있다.

결 론

이종장기이식은 인공장기 및 줄기세포 분화에 의한 장기 이식에 비해 가장 빠르게 임상에 적용할 수 있는 기술이다. 2000년대 들어 유전공학적 기술을 이용한 α -1,3GalT 결여 돼지의 생산은 이종장기이식의 발전에 획기적인 전기를 마련해 주었다. 이와 함께 이종장기이식 거부반응의 기전에 대한 학문적 발전, 형질전환 돼지 생산기술의 발달 및 새로운 특이적 면역억제요법의 개발로 이식된 이종장기가 장기간 생존하고 기능을 유지할 수 있음이 영장류 실험을 통해 입증되고 있다. 향후 보체 활성화, 응고 병증, 세포 매개성 거부반응과 같은 남아있는 면역학적 장벽을 하나하나 극복해 나간다면 머지 않은 장래에 이종장기이식은 사람의 질병을 치료하고 생명을 구하는 중요한 치료적 수단으로 자리잡을 것이다. 현재 돼지 이식을 통한 당뇨병의 치료는 임상 시험에 가장 근접해 있다. 이종 돼지의 임상시험에 대한 연구는 러시아를 비롯한 뉴질랜드에서 진행 중에 있다. 그러나 이러한 과학적 발전과 더불어 안정성의 확보와 윤리적인 문제의 해결도 같이 병행되어야 한다. 세계이종이식학회나 World Health Organization (WHO)에서는 이종장기의 임상 시험은 반드시 국제적인 가이드라인과 국가의 통제하에 안전하게 이루어져야 하고 모든 결과는 국제 사회에 보고되어야 함을 강조하고 있다. 이는 이종장기이식이 가져올 위험성을 미연에 방지하고 안정성을 확보하며 나아가 세계 이종장기이식의 장기적인 발전을 도모하기 위함이다. 이러한 측면에서 세계이종이식학회에서 제시된 가이드라인과(53) WHO에서 채택한 이종이식에 관한 가이드라인(resolution 57.18)은(62) 이종이식의 임상 적용 시 반드시 고려되어야 한다. 국내에서도 서울대학교 병원 바이오 이종장기개발사업단을 중심으로 이종이식에 관한 적절한 법제도의 확립 및 임상적용을 위한 윤리적 문제의 해결을 위해 많은 노력을 기울이고 있다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A040004).

REFERENCES

- 1) Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Möller E, Bolinder J, et al. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 1994;344:1402-4.
- 2) Rood PP, Cooper DK. Islet xenotransplantation: are we really ready for clinical trials? *Am J Transplant* 2006;6:1269-74.
- 3) Hering BJ, Cooper DK, Cozzi E, Schuurman HJ, Korbitt GS, Denner J, et al. The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes-- executive summary. *Xenotransplantation* 2009;16:196-202.
- 4) Galili U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 1993;14:480-2.
- 5) Schuurman HJ, Cheng J, Lam T. Pathology of xenograft rejection: a commentary. *Xenotransplantation* 2003;10:293-9.
- 6) Schuurman HJ, Pino-Chavez G, Phillips MJ, Thomas L, White DJ, Cozzi E. Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors. *Transplantation* 2002;73:1146-51.
- 7) Cozzi E, Bosio E, Seveso M, Vadori M, Ancona E. Xenotransplantation-current status and future perspectives. *Br Med Bull* 2005;75-76:99-114.
- 8) Cowan PJ. Coagulation and the xenograft endothelium. *Xenotransplantation* 2007;14:7-12.
- 9) Diamond LE, Quinn CM, Martin MJ, Lawson J, Platt JL, Logan JS. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation* 2001;71:132-42.
- 10) Niemann H, Verhoeven E, Wonigeit K, Lorenz R, Hecker J, Schwinzer R, et al. Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. *Transplantation* 2001;72:1898-906.
- 11) 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.
- 12) Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, et al. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 2005;11:29-31.
- 13) Milland J, Christiansen D, Lazarus BD, Taylor SG, Xing PX, Sandrin MS. The molecular basis for galalpha(1,3)gal expression in animals with a deletion of the alpha1,3galactosyltransferase gene. *J Immunol* 2006;176:2448-54.

- 14) Cascalho M, Platt JL. The immunological barrier to xenotransplantation. *Immunity* 2001;14:437-46.
- 15) Ramírez P, Montoya MJ, Ríos A, García Palenciano C, Majado M, Chávez R, et al. Prevention of hyperacute rejection in a model of orthotopic liver xenotransplantation from pig to baboon using polytransgenic pig livers (CD55, CD59, and H-transferase). *Transplant Proc* 2005;37:4103-6.
- 16) Cozzi E, Bhatti F, Schmoekel M, Chavez G, Smith KG, Zaidi A, et al. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* 2000;70:15-21.
- 17) Chen G, Qian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, et al. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* 2005;11:1295-8.
- 18) Davila E, Byrne GW, LaBreche PT, McGregor HC, Schwab AK, Davies WR, et al. T-cell responses during pig-to-primate xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2006;13:31-40.
- 19) Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol* 2007;7:519-31.
- 20) Simeonovic CJ. Xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation* 1999;6:1-5.
- 21) Cardona K, Korbitt 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.
- 22) 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.
- 23) Tseng YL, Dor FJ, Kuwaki K, Ryan D, Wood J, Denaro M, et al. Bone marrow transplantation from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Xenotransplantation* 2004;11:361-70.
- 24) Cosimi AB, Sachs DH. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation* 2004;77:943-6.
- 25) Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, et al. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med* 2005;11:32-4.
- 26) Itescu S, Kwiatkowski P, Artrip JH, Wang SF, Ankersmit J, Minanov OP, et al. Role of natural killer cells, macrophages, and accessory molecule interactions in the rejection of pig-to-primate xenografts beyond the hyperacute period. *Hum Immunol* 1998;59:275-86.
- 27) Candinas D, Belliveau S, Koyamada N, Miyatake T, Hechenleitner P, Mark W, et al. T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation* 1996;62:1920-7.
- 28) Sprangers B, Waer M, Billiau AD. Xenotransplantation: where are we in 2008? *Kidney Int* 2008;74:14-21.
- 29) Lilienfeld BG, Crew MD, Forte P, Baumann BC, Seebach JD. Transgenic expression of HLA-E single chain trimer protects porcine endothelial cells against human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Xenotransplantation* 2007;14:126-34.
- 30) Lin Y, Vandeputte M, Waer M. Contribution of activated macrophages to the process of delayed xenograft rejection. *Transplantation* 1997;64:1677-83.
- 31) Wallgren AC, Karlsson-Parra A, Korsgren O. The main infiltrating cell in xenograft rejection is a CD4+ macrophage and not a T lymphocyte. *Transplantation* 1995;60:594-601.
- 32) Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000;288:2051-4.
- 33) Ide K, Wang H, Tahara H, Liu J, Wang X, Asahara T, et al. Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:5062-6.
- 34) Baumann BC, Stussi G, Huggel K, Rieben R, Seebach JD. Reactivity of human natural antibodies to endothelial cells from Galalpha(1,3)Gal-deficient pigs. *Transplantation* 2007;83:193-201.
- 35) Morozumi K, Kobayashi T, Usami T, Oikawa T, Ohtsuka Y, Kato M, et al. Significance of histochemical expression of Hanganutziu-Deicher antigens in pig, baboon and human tissues. *Transplant Proc* 1999;31:942-4.
- 36) 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.
- 37) Selander B, Mårtensson U, Weintraub A, Holmström E, Matsushita M, Thiel S, et al. Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J Clin Invest* 2006;116:1425-34.
- 38) Khalpey Z, Yuen AH, Kalsi KK, Kochan Z, Karbowska J, Slominska EM, et al. Loss of ecto-5' nucleotidase from porcine endothelial cells after exposure to human blood: Implications for xenotransplantation. *Biochim Biophys Acta* 2005;1741:191-8.
- 39) Morrell CN, Sun H, Swaim AM, Baldwin WM, 3rd. Platelets an inflammatory force in transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:2447-54.
- 40) Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood* 2008;111:5271-81.
- 41) Schulte Am Esch J, 2nd, Robson SC, Knoefel WT, Hosch SB, Rogiers X. O-linked glycosylation and functional incompatibility of porcine von Willebrand factor for human platelet GPIb receptors. *Xenotransplantation* 2005;12:30-7.
- 42) Roussel JC, Moran CJ, Salvaris EJ, Nandurkar HH, d'Apice AJ, Cowan PJ. Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI. *Am J Transplant* 2008;8:1101-12.

- 43) Lin CC, Cooper DK, Dorling A. Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate. *Transpl Immunol* 2009;21:75-80.
- 44) Ezzelarab M, Cooper DK. The potential of statins in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2007;14:100-3.
- 45) Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001;103:276-83.
- 46) Ledoux S, Laouari D, Essig M, Runembert I, Trugnan G, Michel JB, et al. Lovastatin enhances ecto-5'-nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: implication of rho-family GTPases. *Circ Res* 2002;90:420-7.
- 47) Wilson CA. Porcine endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3399-412.
- 48) Bartosch B, Stefanidis D, Myers R, Weiss R, Patience C, Takeuchi Y. Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination. *J Virol* 2004;78:13880-90.
- 49) Scobie L, Takeuchi Y. Porcine endogenous retrovirus and other viruses in xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14:175-9.
- 50) Denner J, Schuurman HJ, Patience C. The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes--chapter 5: Strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses. *Xenotransplantation* 2009;16:239-48.
- 51) Mueller NJ, Barth RN, Yamamoto S, Kitamura H, Patience C, Yamada K, et al. Activation of cytomegalovirus in pig-to-primate organ xenotransplantation. *J Virol* 2002;76:4734-40.
- 52) Mueller NJ, Livingston C, Knosalla C, Barth RN, Yamamoto S, Gollackner B, et al. Activation of porcine cytomegalovirus, but not porcine lymphotropic herpesvirus, in pig-to-baboon xenotransplantation. *J Infect Dis* 2004;189:1628-33.
- 53) Sykes M, d'Apice A, Sandrin M.; IXA Ethics Committee. Position paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association. *Xenotransplantation* 2003;10:194-203.
- 54) Dufrane D, Gianello P. Pig islets for clinical islet xenotransplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:495-500.
- 55) McKenzie IF, Koulmanda M, Mandel TE, Sandrin MS. Pig islet xenografts are susceptible to "anti-pig" but not Gal alpha(1,3)Gal antibody plus complement in Gal o/o mice. *J Immunol* 1998;161:5116-9.
- 56) 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.
- 57) Giovagnoli S, Luca G, Casaburi I, Blasi P, Macchiarulo G, Ricci M, et al. Long-term delivery of superoxide dismutase and catalase entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microspheres: *in vitro* effects on isolated neonatal porcine pancreatic cell clusters. *J Control Release* 2005;107:65-77.
- 58) 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.
- 59) Cooper DK, Casu A. The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes--chapter 4: Pre-clinical efficacy and complication data required to justify a clinical trial. *Xenotransplantation* 2009;16:229-38.
- 60) Kim JH, Kim HI, Lee KW, Yu JE, Kim SH, Park HS, et al. Influence of strain and age differences on the yields of porcine islet isolation: extremely high islet yields from SPF CMS miniature pigs. *Xenotransplantation* 2007;14:60-6.
- 61) Kim HI, Lee SY, Jin SM, Kim KS, Yu JE, Yeom SC, et al. Parameters for successful pig islet isolation as determined using 68 specific-pathogen-free miniature pigs. *Xenotransplantation* 2009;16:11-8.
- 62) Sykes M. Commentary: World Health Assembly resolution 57.18 on xenotransplantation. *Transplantation* 2005;79:636-7.