

이종이식에 활용할 α 1,3-galactosyltransferase 비활성화 및 Membrane Cofactor Protein 발현 동형접합 형질전환 돼지 개발

이진섭, 박상현, 이해선, 지수정, 이주영, 변승준, 황성수, 김경운, 옥선아, 오진봉[†]
국립축산과학원 동물바이오통과

Development of α 1,3-galactosyltransferase Inactivated and Human Membrane Cofactor Protein Expressing Homozygous Transgenic Pigs for Xenotransplantation

Gunsup Lee, Sang Hyoun Park, Haesun Lee, Soo-Jeong Ji, Joo Yung Lee, Sung-June Byun, Seongsoo Hwang, Kyung Woon Kim, Sun A Ock and Keon Bong Oh[†]

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Wanjugun 55365, Republic of Korea

ABSTRACT

Transplantation is considered to be a very useful approach to improve human welfare and to prolong life-span. Heterologous organ transplantation using pig organs which are similar to human beings and easy to make mass-production has known as one of the alternatives. To ensure potential usage of the pig organ for transplantation application, it is essentially required to generate transgenic pig modifying immuno-related genes. Previously, we reported production of heterozygous α 1,3-galactosyltransferase (GalT) knock-out and human membrane cofactor protein (MCP) expressing pig ($\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$), which is enforced for suppression of hyperacute and acute immunological rejection. In this study, we reported generation of homozygous pig ($\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$) by crossbreeding $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$ pigs. Two female founders gave birth to six of $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$, and seven $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$ pigs. We performed quantitative real-time PCR, western blot, and flow cytometry analyses to confirm GalT and MCP expression. We showed that fibroblasts of the $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ pig do not express GalT and its product Gal antigen, while efficiently express MCP. We also showed no expression of GalT, otherwise expression of MCP at heart, kidney, liver and pancreas of transgenic pig. Taken together, we suggest that the $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ pig is a useful candidate to apply xenotransplantation study.

(Key word: Xenotransplantation, α 1,3-Galactosyltransferase, Membrane cofactor protein, Pig)

서론

장기 부족 문제를 극복하기 위한 대안 중의 하나로 이종장기가 중요한 해결책으로 제시되었다(Shimizu와 Yamada, 2006). 이에 따라, 이종장기의 공여체로 가장 부각되고 있는 동물은 해부학적 및 생리학적으로 사람과 매우 유사하고 공통적으로 감염가능성이 적은 돼지를 이용하여 많은 연구들이 수행되고 있다(Cooper, 2012). 하지만, 돼지를 이종장기의 공여체로 활용하기에는 면역거부 반응이라는 문제점을 가지고 있어(Cooper 등, 2016; Klymiuk 등, 2010), 돼지의 장기가 수용체에서 이종의 장기로 인식하지 못하게 하기 위해 관련 유전자를 변형시킨 돼지를 개발한 연구가 보고되고 있다.

돼지를 활용한 이종이식의 가장 큰 걸림돌인 초급성 거부반응을 억제 하기 위하여 galactose alpha-1,3-galactose epitope (Gal)을 합성하는 유전자인 alpha-1,3-galactosyltransferase (GalT)의 기능을 불활성화(knock-out, KO) 시키기 위한 연구를 수행하였으며(Dai 등, 2002; Kolber-Simonds 등, 2004; Nottle 등, 2007), 급성 거부 반응도 억제시키기 위하여 각종 면역 반응 및 감염방어 기전에 관여하는 보체 활성을 억제 시킬 수 있는 membrane cofactor protein (MCP), decay accelerating factor (DAF), CD59와 같은 보체 조절 단백질을 발현 하는 돼지를 개발하여 이종이식 연구에 이용하고 있다(Adams 등, 2001; Miyagawa 등, 2010; Niemann 등, 2001; White 등, 1995; Zhou 등, 2002).

[†] Correspondence: Keon Bong Oh
Phone: 82-63-238-7254
E-mail: keonoh@korea.kr

국내에서도 이미 GalT KO 돼지를 개발하여(Ahn 등, 2011), 사육 및 면역 특성에 관한 기본적인 연구가 수행되었다(Min과 Park, 2011). 본 연구팀에서도 GalT 유전자에 사람 MCP 발현 벡터가 도입된 체세포 및 이를 핵 치환방법으로 이형접합(heterozygote) 형질전환 GalT^{MCP/+} 돼지를 생산하였다(Hwang 등, 2013; Ko 등, 2013). 본 논문에서는 GalT^{MCP/+} 돼지의 교배를 통해 이종장기 이식 연구에 활용할 수 있는 GalT^{MCP/-MCP} 돼지를 생산하여, 실제로 Gal 항원의 발현이 억제되는지와 사람 MCP가 발현되는지 분석하였다. 결론적으로 GalT^{MCP/-MCP} 돼지는 Gal 항원을 발현하지 않으며, 사람 MCP를 효과적으로 발현한다는 것을 확인하였다. 이 돼지는 원숭이에 장기와 조직 또는 세포의 이종이식 전 임상연구와 거부반응 억제 유도 유전자를 추가하여 거부반응 억제 기능이 향상된 형질전환 돼지 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. 공시 돼지 및 유전자 검증

본 연구에 공시된 형질전환 돼지의 품종은 Massachusetts General Hospital (MGH) 미니 돼지이다. 육안 검사방법으로 발정이 확인된 GalT^{MCP/+} 암컷 2두 8번과 11번을 수컷 GalT^{MCP/+} 돼지 34.3번과 자연교배를 통해 임신을 유도하였다. 임신 후 만기 출생한 자손의 귀 조직 일부를 채취하여 소독된 가위로 잘게 분쇄하였고 Maxwell 16 Tissue DNA Purification kit (Promega, Wisconsin, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 이 DNA를 주형으로 중합효소연쇄 반응(PCR) 분석을 실행하였다. 총 50 μ l의 반응액이 되도록 50ng의 DNA, 10 μ l의 5 \times buffer, 4 μ l의 2.5mM dNTPs, 프라이머 141F (5'-AATGGTGGAGAGTAGCTGGGAATGTTACAG-3') 1 μ l와 138R (5'-TTATAGAGAAACAA GAGTCTAATTGACTTGT-3') 1 μ l, HS prime 효소 0.5 μ l (TaKaRa, Tokyo, Japan)를 혼합하여 수행하였고 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 62 $^{\circ}$ C에서 30초 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 7분씩 각각 35회 반복하였다. PCR 반응 후 전기영동을 통해 2.3kb의 단일 밴드 생성 시 wild type, 5.7kb의 단일 밴드 생성 시 GalT^{MCP/-MCP} 돼지로 그리고 2.3kb와 5.7kb 두 개의 밴드 생성 시 GalT^{MCP/+} 돼지로 판정하였다.

2. 항체

본 연구에 사용된 MCP 항체는 BioLegend (San diego, USA)에서 구입하였으며, GalT 단일 항체는 Mybiosource (San diego, USA)사에서 구입하였다. Gal 항원에 대한 flow cytometry 분석은

FITC conjugated Isolectin B₄ (Enzo, NY, USA)를 사용하였다.

3. 양적 실시간 PCR (Quantitative real-time PCR) 분석

돼지의 심장, 신장, 췌장, 간 조직을 채취하여 막자 사발로 분쇄한 후 100mg 정도의 분쇄 조직을 1.5ml 튜브에 담아 TRIzol (Thermo, Massachusetts, USA) 방법을 통해 총 RNA를 분리하였다. Superscript III first-strand synthesis system kit (Thermo, Massachusetts, USA)를 이용하여 총 RNA로부터 cDNA를 합성한 후 PCR을 수행하였다. 사람 MCP 유전자의 증폭을 위해 5'-GAAGCTATGGAGCTCATTGGTAAA-3'와 5'-TTGCTACTGATCCTTTAAGTTCAC-3'를, GalT 유전자 증폭을 위해 5'-TACATCATGGTGGATGATATCTC-3'와 5'-GCCTGTAGCTGAGCCACCGAC TG-3'를, beta-actin 확인을 위해 5'-CATCGCCGACAGGATGCAGAAG-3'와 5'-TGCTGGAA GGTGGACAGCGAG-3'를 프라이머로 사용하였다. Gapdh 유전자에 대한 프라이머 서열은 5'-TCGGAGTGAACGGATT TG-3'와 5'-CCTGGAAGATGGTGATGG-3'이다. PCR 반응은 총 20 μ l의 반응액에 SYBR premix Ex Taq (TaKaRa, Tokyo, Japan) 10 μ l, Rox reference dye 0.4 μ l을 첨가하여 Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia)을 이용해 수행하였다. 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 20초, 60 $^{\circ}$ C에서 20초 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분씩 각각 40회를 반복하였다.

4. 웨스턴 분석

돼지의 세포와 조직을 M-PER mammalian protein extraction reagent (Thermo, Massachusetts, USA)를 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리 한 후 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 1차 항체(GalT antibody; 1:1000 dilution, hMCP antibody; 1:500 dilution, Actin antibody; 1:1000 dilution)로 반응시킨 후 HRP가 conjugation 된 2차 항체로 1시간 동안 상온에서 반응 시켰다. 형광분광분석기인 EZ-capture II장비를 이용하여 발현을 확인하였다.

5. flow cytometry 분석

세포들은 2% paraformaldehyde를 처리해 10분간 상온에서 고정 되었으며 1% BSA가 첨가된 PBS로 세척하였다. 3% BSA와 0.1% (v/v) Triton X-100가 첨가된 PBS로 30분간 blocking 수행한 후 FITC가 conjugation 된 항체로 1시간 동안 상온에서 반응하였다. Attune NxT Acoustic focusing cytometer (Thermo, Massachusetts, USA)를 사용하여 형광을 분석하였다.

6. 통계처리

각 샘플의 분리된 조직에서 GalT 및 MCP 유전자 발현량의 통계처리는 GraphPAD Prism (GRAPHPAD software, CA, USA)을 이용하여 One-way ANOVA와 Tukey's 사후 분석을 통해 분석하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 이하를 통계적으로 유의 하다고 판단하였다.

결과

1. GalT^{MCP/MCP} 돼지의 생산

재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 GalT^{MCP/+} 돼지의 암수 간 교배를 통해 13두의 자손을 생산한 후 귀 조직을 채취하여 PCR 분석을 수행하였다. Figure 1A에 보이는 것처럼 GalT 유전자의 엑손 9번에 MCP 발현 벡터가 삽입되도록 설계되어 있으므로, 141F 및 138R primer를 사용하여 PCR 분석을 실시하면, 일반돼지(wild type)에서는 약 2.3 kb의 크기로 밴드가 형성되며, 형질전환 돼지에서 MCP 벡터가 GalT 유전자에 적중 되었다면 삽입된 3.4kb의 벡터 크기가 더해져 5.7kb 크기의 밴드가 형성된다. 13두의 유전자를 분석한 결과 6두에서 두 개의 대립유전자에 모두 적중된 5.7kb 크기의 밴드가 형성

되어 GalT^{MCP/MCP} 돼지로 판명되었으며, 7 두에서는 2.3kb와 5.7kb 두 개의 밴드가 형성되어 한 개의 대립유전자에 MCP 발현 벡터가 적중된 GalT^{MCP/+} 돼지로 판명되었다. 일반 돼지는 생산되지 않는 것으로 판명되었다(Figure 1B).

2. 섬유아세포에서 Gal 항원 및 사람 MCP 발현 분석

형질전환 돼지로 판명된 GalT^{MCP/+} 돼지, GalT^{MCP/MCP} 돼지 중에서 각 1두의 귀 조직에서 분리하여 배양한 섬유아세포 (fibroblast)와 대조군으로 일반돼지에서 분리 및 배양한 섬유아세포에서 GalT 유전자의 knock-out 여부를 역전사-PCR과 flow cytometry 방법으로 비교 분석을 실시하였다. Figure 2의 A와 같이 GalT^{MCP/MCP} 돼지 세포에서 GalT 유전자의 mRNA가 발견되지 않아 이 유전자의 knock-out에 의해 기능이 불활성화되었다는 것을 보여주었다. GalT에 의해 합성되는 Gal 항원의 발현을 FITC-Isolectin B₄ (Enzo, NY, USA)를 사용하여 유세포 분석을 실시한 결과 일반돼지의 것과는 다르게 GalT^{MCP/MCP} 돼지 세포에서는 Gal 항원이 발현되지 않는 것을 확인하여(Figure 2B), 두 개의 GalT 유전자 좌위에 MCP 발현 벡터가 삽입되어 GalT 유전자가 knock-out 되었다는 것을 확인할 수 있었다. MCP의 발현 수준을 일반돼지, GalT^{MCP/+} 돼지 및 GalT^{MCP/MCP} 돼지 유래 섬유아세포에서

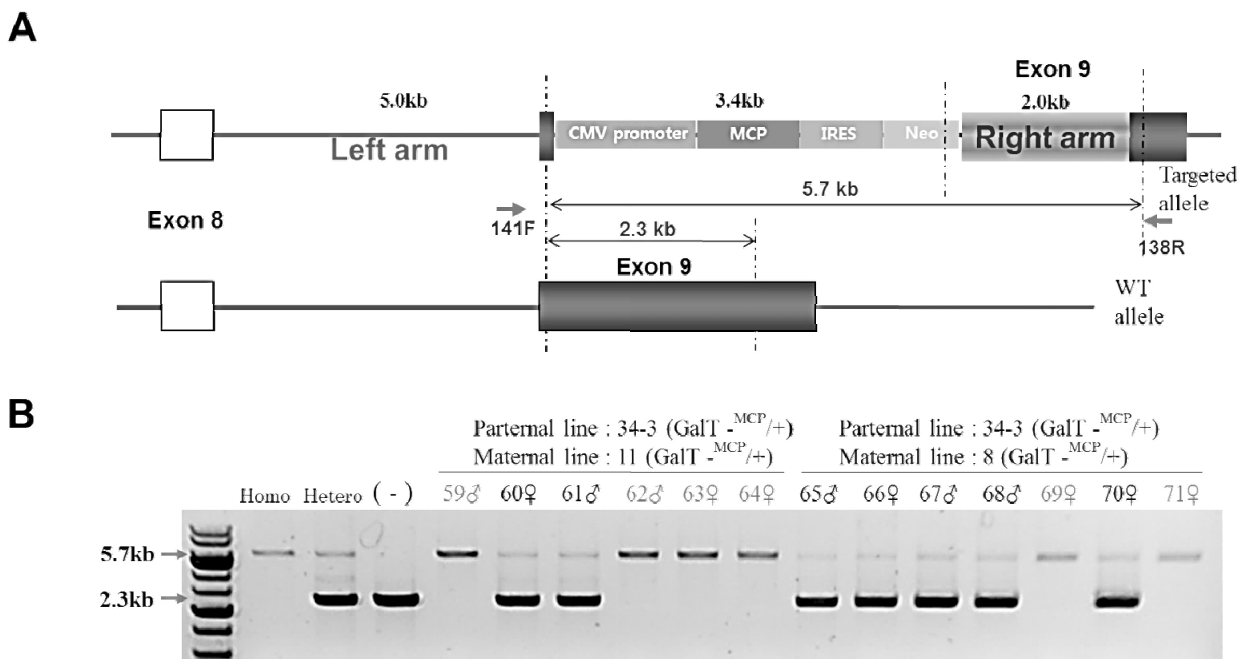


Figure 1. Structure of MCP expression vector insertion into GalT locus, and strategy to confirm its gene-targeting event. (A) Arrows indicate the PCR primers for verifying GalT targeting of MCP expression vector. (B) PCR analysis. 5.7 kb of PCR product indicates of homozygote (GalT^{MCP/MCP}), 5.7kb and 2.3kb of PCR products indicate heterozygote (GalT^{MCP/+}), and 2.3kb of PCR product indicates wild type (GalT^{+/+}). The numbers 59♂, 62♂, 63♀, 64♀, 69♀, and 71♀ are confirmed as homozygous pigs, and the numbers 60♀, 61♂, 65♂, 66♀, 67♂, 68♂, and 70♀ are heterozygous.

분석하였다. 웨스턴 분석결과 MCP의 발현 수준은 $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$ 돼지에서도 과 발현되는 것이 확인되었고, $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ 돼지에서는 그 발현 수준이 증가하여 GalT 유전자 좌위에 도입된 copy 수에 따라 발현이 조절된다는 것을 확인하였다(Figure 3A). 이러한 MCP의 발현 양상은 flow cytometry 분석에서도 동일하게 나타내어(Figure 3B), $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ 돼지 유래 섬유아세포에서는 Gal 항원이 발현되지 않고, 사람 MCP가 효율적으로 발현된다는 것을 알 수 있었다.

3. 조직에서의 GalT 유전자 및 사람 MCP 발현 분석

이종이식을 위해 개발된 형질전환 돼지는 실제로 바분 원숭이를 비롯한 영장류에 주로 심장, 신장, 췌장, 간의 이식 연구가 활발히 진행되고 있다(Yung 등, 2017). 본 연구에서도 $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$ 돼지 및 $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ 돼지 1두와 유사 연령의 일반 돼지 1두로부터 심장, 신장, 췌장, 간을 적출하여 GalT 와 MCP의 mRNA와 단백질 발현 수준을 유전자 양적 실시간 PCR 방법과 웨스턴 방법으로 분석을 실시하였다. 그 결과 GalT 의 유전자의 mRNA 발현 수준이 일반돼지의 심장, 신장,

췌장, 간에서 $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$ 돼지 심장에 비해 14.25배, 18.62배, 2.58배, 5.1배 더 높았고, 이에 비해 $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ 돼지의 장기에서는 발현이 거의 확인되지 않았다(Figure 4A). 심장을 선별하여 GalT 발현 수준을 웨스턴 분석으로 실시한 결과 $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$ 돼지에서 발현이 감소하였고, $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ 돼지에서는 발현이 확인되지 않아, GalT 유전자가 정확하게 knock-out 되었다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4B).

MCP mRNA의 발현 수준은 세포의 분석 결과와 유사하게 GalT 유전자에 도입된 MCP의 copy에 따라 발현 수준이 증가하여 $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$ 돼지에 비해 $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ 돼지 심장에서 약 29.54배 높았고, 신장, 췌장, 간 조직에서 각각 6.2배, 22.48배, 23.98배 증가하였으며, 일반돼지에의 조직에서는 발현되지 않았다(Figure 5A). 웨스턴 분석에서도 $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$ 돼지와 $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ 돼지의 심장조직에서만 사람 MCP를 발현하는 특이적인 밴드를 확인하였다(Figure 5B).

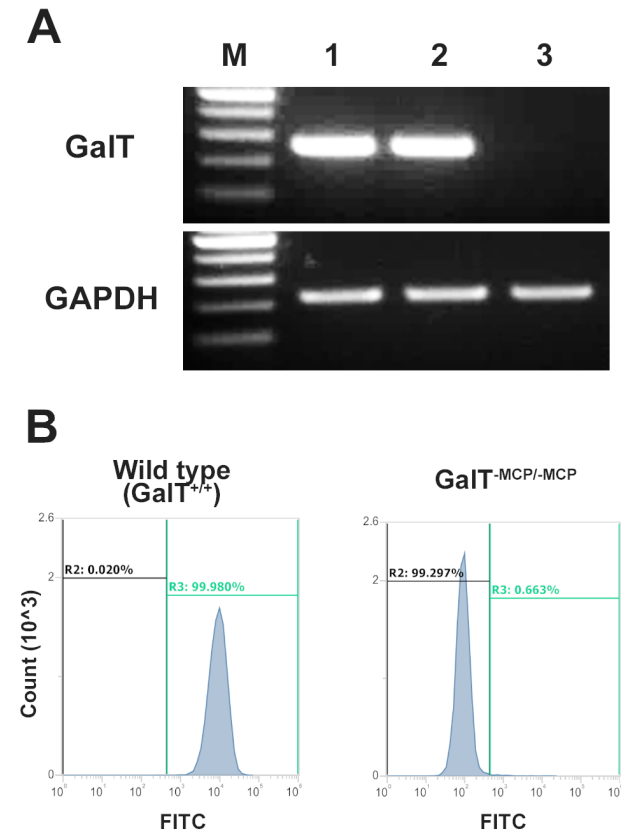


Figure 2. No expression of GalT and Gal epitope in fibroblasts of $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ pig. (A) reverse-transcription PCR analysis. M: 100bp ladder, 1: wild type, 2: $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$, 3: $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$. (B) Flow cytometry analysis to detect expression of Gal epitope.

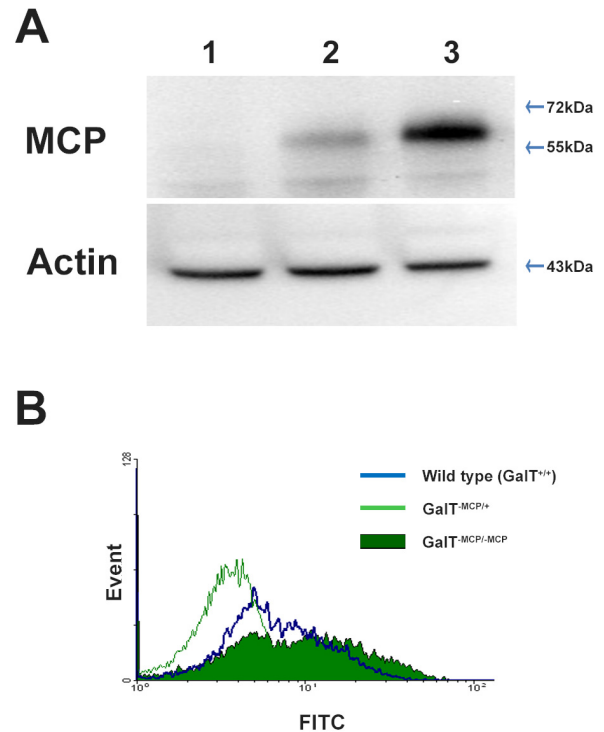


Figure 3. Identification of MCP expression in porcine ear fibroblast. (A) Western blot analysis. 1: wild type, 2: $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}$, 3: $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$. (B) Flow cytometry analysis.

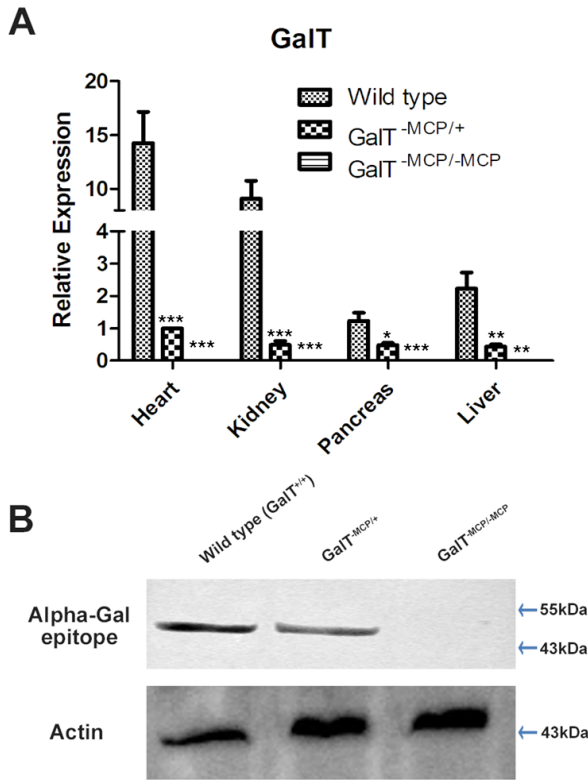


Figure 4. No expression of GalT in various tissues of GalT^{MCP/+MCP} pig. (A) Quantitative real-time PCR analysis. The relative concentrations of GalT in heart, kidney, pancreas, and liver were calculated after normalization to the actin gene using the delta delta C_T method. Data bars represent mean \pm standard error of mean. *, **, *** indicate significant differences from wild type at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively (one-way analysis of variance and Tukey's post hoc *t*-test). (B) Western blot analysis to detect GalT expression in heart of GalT^{MCP/+} and GalT^{MCP/-MCP} pigs.

고찰

본 연구에서 이중이식 연구에 활용할 목적으로 GalT^{MCP/+} 돼지 간 교배를 통해 GalT^{MCP/+MCP} 돼지를 생산하였고, 돼지의 장기를 영장류에 이식하게 되면 발생하는 초급성 거부반응의 원인 물질인 Gal 항원을 제거함과 동시에, 급성거부반응 억제 유력 물질인 사람 MCP를 효과적으로 발현하는 것을 확인하였다.

본 연구에 공시된 돼지에서 GalT 유전자와 사람 MCP 유전자의 발현 수준은 copy수에 따라 다르게 발현되는 양상을 나타내었다. GalT 유전자의 발현 수준은 한쪽의 대립유전자만 knock-out되어 1 copy의 이형접합 GalT^{MCP/+} 돼지에서 2 copy

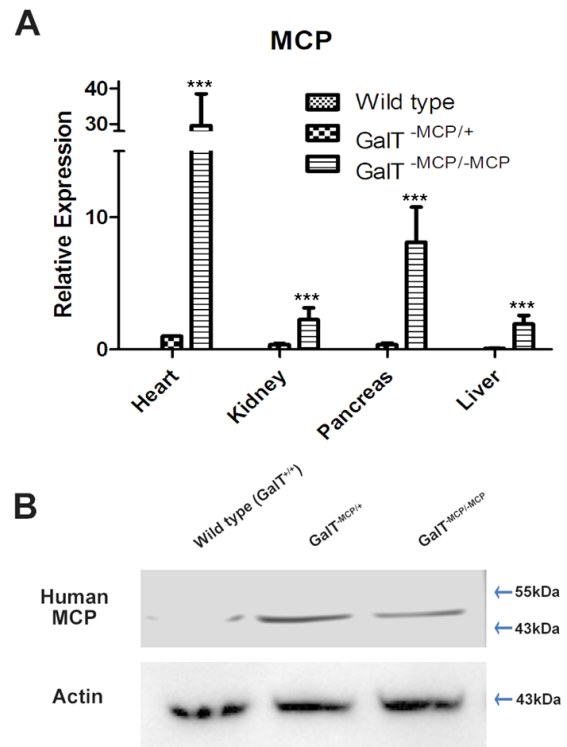


Figure 5. Verification of MCP expression in various tissues of GalT^{MCP/+} and GalT^{MCP/-MCP} pig. (A) Quantitative real-time PCR analysis. The relative concentrations of MCP in heart, kidney, pancreas, and liver were calculated after normalization to the actin gene using the delta delta C_T method. Data bars represent mean \pm standard error of mean. *** indicate significant differences from wild type at $p < 0.001$, respectively (one-way analysis of variance and Tukey's post hoc *t*-test). (B) Efficient expression of MCP in heart of GalT^{MCP/+} and GalT^{MCP/-MCP} pigs.

의 정상돼지 보다 감소하였고, 완전히 knock-out된 동형접합 GalT^{MCP/-MCP} 돼지에서는 발현이 확인되지 않았다. 이러한 양상은 microsomal triglyceride protein 유전자의 knock-out 생쥐 연구(Raabe 등, 1998)와 Murine Retinal Dehydrogenase 12 유전자의 knock-out 생쥐 연구(Kurth 등, 2007)에서 보고된 이형접합 knock-out 생쥐에서의 발현 수준이 정상 생쥐보다 발현 수준이 감소했다는 결과와 동일하였다. GalT 유전자 좌위에 삽입된 MCP 유전자의 발현 수준은 역으로 1 copy 보다는 2 copy를 보유하고 있는 GalT^{MCP/+MCP} 돼지에서 높게 나타나, GalT 유전자의 발현을 조절하는 인자에 영향을 받는 것으로 생각된다.

이중이식을 위해 개발된 형질전환 돼지는 실제로 바분 원

승이를 비롯한 영장류에 주로 심장, 신장, 췌장, 간의 이식 연구가 활발히 진행되고 있다(Yung 등, 2017). Mohiuddin 등 (2014)은 연구팀은 GalT knock-out 기반에 MCP를 발현하는 돼지의 심장을 바분 원숭이에 이식하여 380일까지 생존하였다고 보고하였고, 곧 이어 2016년 GalT knock-out 기반에 MCP와 추가로 thrombomodulin (TBM)을 발현하는 돼지의 심장을 이식하여 최장 945일 생존을 보고하였다(Mohiuddin 등, 2016). 이러한 결과는 돼지를 이종이식에 활용하기 위해서는 기본적으로 GalT knock-out 기반에 MCP를 발현해야 하며 추가로 TBM의 발현이 생존기간을 크게 연장시킬 수 있다는 것을 의미한다. 본 연구에서 개발한 GalT^{-MCP/+MCP} 돼지의 심장을 cynomolgus 원숭이에 이식하여 60일까지 생존하였고, 사망 후 병리분석 결과 면역반응에 의한 거부반응 징후가 발견되지 않았다(미발표 결과), 이러한 결과는 본 연구에서 개발된 GalT^{-MCP/+MCP} 돼지는 GalT 유전자가 정확하게 비활성화되었고, 사람 MCP가 효과적으로 발현하며, 이러한 특성에 의해 원숭이에 이식 시 초급성과 급성 거부반응을 효과적으로 억제하는 기능을 수행하는 것으로 판단된다. 향후 GalT^{-MCP/+MCP} 돼지는 TBM 유전자나 세포성 거부반응을 억제시킬 수 있는 유전자(Yung 등, 2017)가 추가로 도입된 돼지 개발에 활용될 계획이다.

결론

이전의 연구에서 이종이식에서 발생하는 초급성 거부반응의 원인 유전자인 GalT의 기능 불활성화와 보체조절 단백질의 하나인 MCP를 발현시키기 위한 이형접합 형질전환 GalT^{-MCP/+} 돼지를 생산하였다. 본 연구에서는 GalT^{-MCP/+} 돼지의 교배를 통해 13 두의 산자 중 6두의 동형접합 형질전환 GalT^{-MCP/MCP} 돼지를 생산하였다. 이 돼지의 귀 조직에서 분리한 섬유아세포에서 양적 실시간 PCR, 웨스턴, flow cytometry 분석을 통해 GalT에 의해 합성되는 Gal 항원을 발현하지 않으며, 동시에 MCP를 효율적으로 발현하는 것을 확인하였다. 또한 실제로 이종이식에 활발히 활용되고 있는 심장, 신장, 췌장, 간에서도 양적 실시간 PCR 방법으로 분석한 결과 GalT^{-MCP/MCP} 돼지에 GalT는 발현하지 않으며, MCP를 발현하는 것을 확인하였다. 추가적으로, 심장에서는 웨스턴 분석 방법으로 확인하였다. GalT^{-MCP/+MCP} 돼지는 원숭이에 이종이식 연구에 활용 중이며, 향후 유전자를 추가하여 거부반응 억제 기능이 향상된 형질전환 돼지 개발에 활용할 예정이다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 바이오장기용 형질전환 돼지 생산 및 계통 조성, 세부과제번호: PJ01094403)의 지원과 2017년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Adams DH, Kadner A, Chen RH and Farivar RS. 2001. Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation* 8:36-40.
- Ahn KS, Kim YJ, Kim M, Lee BH, Heo SY, Kang MJ, Kang YK, Lee JW, Lee KK and Kim JH. 2011. Resurrection of an alpha-1, 3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theriogenology* 75:933-939.
- Cooper DK. 2012. A brief history of cross-species organ transplantation. *Proceedings (Baylor University Medical Center)* 25:49-57.
- Cooper DK, Ezzelarab MB, Hara H, Iwase H, Lee W, Wijkstrom M and Bottino R. 2016. The pathobiology of pig-to-primate xenotransplantation: a historical review. *Xenotransplantation* 23:83-105. doi: 10.1111/xen.12219.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA and Ayares DL. 2002. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology* 20:251-255. doi: 10.1038/nbt0302-251.
- Hwang S, Oh KB, Kwon DJ, Ock SA, Lee JW, Im GS, Lee SS, Lee K and Park JK. 2013. Improvement of cloning efficiency in minipigs using post-thawed donor cells treated with roscovitine. *Molecular Biotechnology* 55:212-216.
- Klymiuk N, Aigner B, Brem G and Wolf E. 2010. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Molecular Reproduction and Development* 77:209-221. doi: 10.1002/mrd.21127.
- Ko N, Lee JW, Hwang SS, Kim B, Ock SA, Lee SS, Im GS, Kang MJ, Park JK and Jong Oh S. 2013. Nucleofection-Mediated α 1, 3-galactosyltransferase Gene Inactivation and Membrane Cofactor Protein Expression for Pig-to-Primate

- Xenotransplantation. *Animal Biotechnology* 24:253-267.
- Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS and Hawley RJ. 2004. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 101:7335-7340. doi: 10.1073/pnas.0307819101.
- Kurth I, Thompson DA, R  ther K, Feathers KL, Chrispell JD, Schroth J, McHenry CL, Schweizer M, Skosyrski S and Gal A. 2007. Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene *Rdh12* does not limit visual cycle function. *Molecular and Cellular Biology* 27:1370-1379.
- Min G and Park JY. 2011. Alpha 1, 3-Galactosyltransferase Deficiency in Miniature Pigs Increases Non-Gal Xenoantigens. *Reproductive & Developmental Biology* 35:511-518.
- Miyagawa S, Yamamoto A, Matsunami K, Wang D, Takama Y, Ueno T, Okabe M, Nagashima H and Fukuzawa M. 2010. Complement regulation in the GalT KO era. *Xenotransplantation* 17:11-25. doi: 10.1111/j.1399-3089.2010.00569.x.
- Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC, Hoyt RF, Thomas M, Lewis BG, Eckhaus M, Reimann KA, Klymiuk N and Wolf E. 2014. One Year Heterotopic Cardiac Xenograft Survival in a Pig to Baboon Model. *American Journal of Transplantation* 14:488-489.
- Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC, Thomas ML, 3rd, Clark T, Lewis BG, Hoyt RF, Eckhaus M, Pierson RN, 3rd, Belli AJ, Wolf E, Klymiuk N, Phelps C, Reimann KA, Ayares D and Horvath KA. 2016. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. *Nature Communications* 7:11138. doi: 10.1038/ncomms11138.
- Niemann H, Verhoeven E, Wonigeit K, Lorenz R, Hecker J, Schwinzer R, Hauser H, Kues WA, Halter R, Lemme E, Herrmann D, Winkler M, Wirth D and Paul D. 2001. Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. *Transplantation* 72:1898-1906.
- Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ, O'Connell PJ, Salvaris EJ, Fisticaro N, Pommey S, Cowan PJ and d'Apice AJ. 2007. Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 14:339-344. doi: 10.1111/j.1399-3089.2007.00417.x.
- Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL and Young SG. 1998. Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 95:8686-8691.
- Shimizu A and Yamada K. 2006. Pathology of renal xenograft rejection in pig to non-human primate transplantation. *Clinical Transplantation* 20 Suppl 15:46-52. doi: 10.1111/j.1399-0012.2006.00550.x.
- White DJ, Cozzi E, Langford G, Oglesby T, Wang MW, Wright L and Wallwork J. 1995. The control of hyperacute rejection by genetic engineering of the donor species. *Eye (Lond)* 9 (Pt 2):185-189. doi: 10.1038/eye.1995.37.
- Yung GLP, Rieben R, B  hler L, Schuurman HJ and Seebach JD. 2017. Xenotransplantation: where do we stand in 2016. *Swiss Medical Weekly* 147:w14403.
- Zhou CY, McInnes E, Parsons N, Langford G, Lancaster R, Richards A, Pino-Chavez G, Dos Santos Cruz G, Copeman L, Carrington C and Thompson S. 2002. Production and characterization of a pig line transgenic for human membrane cofactor protein. *Xenotransplantation* 9:183-190.

Received July 31 2017, Revised August 23 2017,

Accepted September 08, 2017