

이종 장기이식 및 조직 공학을 위한 Alpha gal 유전자 결손돼지 (1, 3-galactosyltransferase-deficient pigs)에서 혈관내피세포(aortic endothelial cells)의 구축

옥선아[†], 임맑음, 김영지, Imran Ullah, 신유리안나, 김영임, 오건봉, 황성수, 허태영, 이승훈, 임기순
농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과

Isolation and Culture of Purified Aortic Endothelial Cells Derived from Alpha 1, 3-galactosyltransferase-deficient Pigs

Sun A Ock[†], Malgum Lim, Yeongji Kim, Imran Ullah, Yurianna Shin, Youngim Kim, Keon Bong Oh,
Seongsoo Hwang, Tai-Young Hur, Seunghoon Lee and Gi-Sun Im

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, 1500,
Kongjipwatjwi-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do, (55365) Republic of Korea.

ABSTRACT

Tissue engineering (TE) has been developed to create functional organs and tissue by combining 3D matrix and cells in vitro. Vascularization and angiogenesis are utmost important for supply of nutrients and oxygen in tissue engineered organs. The present study was performed to isolate and characterize primary endothelial cells (EC) from aorta of alpha 1, 3-enzyme galactosyltransferase knock out (GalT KO) pig, to minimize immune rejection and analyze body immune system for future xenotransplantation studies. Isolation of primary EC from aorta were performed by incubation with dispase for 8-10 min at 37°C. Primary EC were cultured in EC growth medium on different extra cellular matrix (ECM), either collagen or gelatin. Primary EC exhibits morphological characteristics and showed positive expressions of EC specific marker proteins i.e. PECAM1, KDR and VWF despite of their ECM surface; however, on collagen based surface they showed increase in mRNA level analyzed by qPCR. Primary EC cultured on collagen were sorted by flow cytometer using KDR marker and cultured as KDR positive cells and KDR negative cells, respectively. KDR positive cells showed dramatically increased in *PECAM1* and *VWF* level as compared to KDR negative cells. Based on the above results, primary EC derived from GalT KO are successfully isolated and survived continuously in culture without becoming overgrown by fibroblast. Therefore, they can be utilize for xeno organ transfer, tissue engineering, and immune rejection study in future.

(Key words: Alpha 1, 3-enzyme galactosyltransferase knock out (GalT KO) pig, Primary endothelial cells, Extra cellular matrix (ECM), Collagen)

서 론

줄기세포 및 조직 특이 전구 세포들에 대한 연구가 활성화되면서 이를 이용한 조직공학(Tissue engineering)연구도 활성화되고 있다. 일반적인 조직 공학연구의 목적은 손상된 장기나 조직을 대체하는 것이고, 목적달성을 위해서는 두 가지 선행 기술인 3D-matrix 제작 기술과 적합세포 부착 배양 기술이 개발되어야만 기능적 조직과 장기의 생산이 가능해질 수 있다(Ramm 등, 2015; Chan과 Leong, 2008). 3D-matrix 제작 기

술은 최근 사람이나 동물의 조직을 탈세포화 하거나 생체 내에서 분해 가능한 polymer의 사용으로 면역 거부 반응을 최소화 할 수 있게 되었다. 재세포화를 위한 세포원으로는 Induced pluripotent stem cell(iPSC)이 개발되어 환자 자신의 세포를 이용하여 줄기세포를 구축이 가능해 졌다(Olmer와 Martin, 2014). 환자 맞춤형 iPSC 는 면역학적 거부 반응을 유발할 위험도가 낮으며, 동시에 주어진 세포의 배양 환경에 따라 원하는 세포타입으로 분화할 수 있어 차후 세포 치료제나 조직 공학적 세포 공급원으로 매우 유용한 세포원(cell source)이다.

[†] Correspondence: Sun A Ock
Phone: 82-63-238-7255
E-mail: ocksa@korea.kr

조직 공학적 측면에서 공통적으로 중요한 또 다른 세포원 중 하나는 혈관 형성을 위한 혈관내피세포(endothelial cells)이다. 조직과 장기가 기능적으로 장기생존하기 위해서는 산소와 영양분의 공급이 필수적이며 이것들은 혈관을 통해 전달되어야만 유지가 가능하기 때문이다(Novoselemd, 2011).

사람의 부족장기 및 조직을 공급하기 위한 대안적인 연구로서 사람과 생리학적 해부학적 특성이 유사한 유전적 변형 돼지를 이용한 조직공학적 접근들이 최근 이루어지고 있다(Chen 등, 2017). 일반적으로 이종간의 조직 및 장기 이식시 걸림돌이 되는 것은 사람에는 존재하지 않고 돼지에 존재하는 alpha 1, 3-galactosyltransferase에 의한 초급성 면역거부 반응이다. 그러나 생명공학 기술의 발달로 이 유전자가 제거된 돼지들이 여러 팀에서 생산되었고, 현재 장기 이식 연구를 위해 사용되고 있다(Kuwaki 등, 2005; Yamada 등, 2005; Cooper 등, 2007; Mohiuddin 등 2012, 2016; Azimzadeh 등, 2015). 이종 장기 이식시 vascular endothelial cells(EC)은 xenoreactive antibodies, complement, ischemia-reperfusion injury(Cowan과 d'Apice, 2009; Chen 등 2017) 등에 의해 활성화되고 손상된 혈관 벽은 혈소관의 활성을 촉진 최종적으로 thrombosis와 coagulation을 유발하여 이종장기 이식 실패의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Iwase 등, 2014).

따라서 이 연구는 조직 공학측면과 이종간 장기 이식시 면역 반응에 중요한 세포원인 혈관내피세포를 연구하기 위하여 Alpha gal 유전자 결손돼지(1, 3-galactosyltransferase-deficient pigs)의 대동맥(aorta)으로부터 혈관 내피 세포를 분리하고 이들의 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 배양액

세포의 분리 및 배양에 사용된 모든 배양액은 Gibco(Grand Island, NY, USA)제품을 사용하였고, 별도로 표시된 경우가 아니면 모든 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다

2. 돼지로부터 대동맥 혈관내피세포(aortic endothelial cells, EC)의 추출

혈관내피세포를 회수하기 위하여 1개월령의 Alpha gal 유전자 결손돼지(1, 3-galactosyltransferase-deficient pigs)의 대동맥(Aorta)을 멸균된 상태에서 외과적으로 분리하였다. 분리된 대동맥은 PBS로 2번 수세하고 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 Dispase enzyme solution (25UL/ml in DMEM)을 대동맥 속에 흘려 넣고 관의 위와 아래를 surgical silk로 묶어 37°C 인큐베이터

속에서 10 분간 반응을 유도하였다. 용액은 회수되었고, 10% FBS 가 첨가된 Endothelial Cell Growth Medium (Lonza, ECGM)을 가지고 원심 분리(700g, 5분)에 의해 2번 수세되었다. 최종적으로 세포 pellet은 2% FBS가 첨가된 EC Growth Medium이 함유된 collagen coated dish혹은 gelatin이 coated dish속에 seeding 되었다(계대배양 0). ECGM은 3일에 한번 교체하였고 80% confluence 상태에서 계대배양을 진행하였다.

실험에 사용된 돼지는 Ahn 등(2011)의 방법에 의해 생산되었고 교배에 의해 Alpha gal 유전자가 완전히 제거된 개체를 생산하여 실험에 사용하였다. 이 실험은 국립축산과학원 동물 윤리위원회의 승인을 받아 수행되었다.

3. 혈관내피 세포인자 단백질 발현

혈관내피세포 특이 단백질 발현을 확인하기 위하여 계대배양 3의 primary EC를 collagen coated chamber slide(Corning, NY, USA)나 Gelatin coated chamber slide에 하루 동안 세포를 부착시키고 formalin solution 10%, neutral buffer에 고정 한 후, 0.1% triton X-100, 1% BSA가 첨가된 PBS(PBST)를 사용하여 3회 세척하였다. 최종적으로 30분 동안 이 용액에 침전하여 세포의 투과성을 증가시키고, blocking을 유도하였다. 특이 단백질 염색을 위해 1차 항체로 Anti-Von Willebrand Factor(VWF, Abcam ab6994, 1:400), PECAM1(Abcam ab28364, 1:20), KDR (Santa Cruz 393163, 1:400)을 사용하여 4 °C에서 overnight 하였다. 1차항체의 제거 및 blocking을 위해 1% BSA가 첨가된 PBS로 15분간 3회 세척하였다. 2차 항체로는 KDR을 위해서는 polyclonal antibody인 Goat Anti-Mouse IgG H&L(FITC) (Abcam ab6785,1:1000), VWF와 PECAM1을 위해서는 goat anti-rabbit IgG-FITC(Santa Cruz sc-2012, 1:100)을 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 1% BSA가 첨가된 PBS로 15분간 3회 세척하고 1ug/ml Propidium iodide(PI)로 핵을 대조 염색하였다. 형광의 보존을 위해 Vectashield antifade Mounting Medium(Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)로 봉입하고, 형광현미경(Leica DMI 6000B, Wetzlar, Germany) 아래에서 녹색 파장(FITC)을 특이 단백질의 positive reaction으로 판단하였고, 빨강파장은 핵으로 판단하였다.

4. 혈관내피세포의 tube formation assay

혈관내피세포의 in vitro angiogenesis 확인하기 위한 tube formation 검사를 DeCicco-Skinner 등(2014)의 방법으로 조사하였다. 분석 전 세포들은 0.2% FBS가 첨가된 ECGM 속에서 1일간 배양되었다. 세포들이 single cell로 분리되기 전에 일부 세포들은 2ug/ml Calcein AM (Invitrogen C3099)을 30분간 처리하였고, trypsin-EDTA를 사용하여 single cell로 분리 후 ECGM으로 두 번 수세하였다. 24-well plate에 4°C의 250ul BD Matrigel matrix

growth factor reduced(BD Bioscience 354230)를 넣고 37°C 인큐베이터 속에서 30분간 방치하여 고체가 되도록 하여 matrix를 형성하게 하였다. 세포 현탁액(1×10^5 cell/ 350ul ECGM)을 BME matrix 위에 접종하고 2시간에서 4시간 사이에 tube formation을 일반 현미경 혹은 형광현미경 아래에서 관찰하였다.

5. 유세포 분석기를 이용한 혈관내피세포의 sorting

순수한 EC 세포들을 회수하기 위하여 KDR monoclonal Antibody (D-8) FITC(1:25, Santa Cruz Biotechnology sc-393163 FITC)를 사용하여 세포를 sorting 하였고 정확한 분별을 위하여 Isotype control mouse monoclonal IgG(abcam ab91356)과 염색이 되지 않은 세포 3가지 처리군을 사용하여 유세포 분석기(Bio rad cell sorter system)를 사용하여 세포를 분별하였다(Fig. 3A). 살아있는 세포 중 Isotype control mouse monoclonal IgG의 형광발현량을 기준으로 KDR monoclonal Antibody에 양성세포를(KDR+)와 그렇지 않은 세포(KDR-) 나누어 각각 collagen coated dish 속에서 추가로 배양되었다(Fig. 3B).

6. 유전자 정량분석(Real-time PCR)

계대배양 3의 primary EC의 total RNA는 RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사 방법에 준하여 추출되었다. 추출된 RNA 500ng과 Omniscript Reverse Transcriptase(QIAGEN, Hilden, Germany), 10 × RT buffer, dNTP mix, RNase inhibitor, oligo dT를 이용하여 37°C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 StepOnePlus Real-Time PCR System(Agilent Technology, Santa Clara, USA)을 이용하여 SYBR Green master mix (Applied Biosystems, CA, USA)을 사용하여 수행하였으며, Specific gene 분석을 위해 사용된 primer sequence는 Table 1에 나타내었다. 유전자 발현의 상대적 정량은 ΔCt 값을 계산하고 난 다음 $\Delta \Delta Ct$ 값을 구하여 relative quantity(RQ) 값으로 계산하였다. 실험은 모두 5 반복으로 수행되었다. Internal control은 *GAPDH*를 사용하였고 EC특이 유전자들을 분석하였다. 대조군은 같은

돼지의 ear fibroblast를 사용하였다. Sorting 후 유전자 발현량 분석에 사용된 primary EC는 계대배양 6이었다.

7. 통계 처리

본 연구에서 수행된 mRNA 발현 분석은 5회 반복하였으며 통계프로그램은 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, IBM)을 이용하여 One-way ANOVA에 의해 사후검증-다중비교(Tukey)에 의해 평균 간 차이를 $p < 0.05$ 의 수준에서 유의성을 분석하였다. 실험 결과 값은 relative quantification (RQ)로 오차바는 $RQ \pm \min$ 과 $RQ \pm \max$ 로 나타내었다.

결 과

1. 대동맥혈관내피세포의(Aortic endothelial cell, EC) 구축

세포의 기질(extra cellular matrix, ECM)은 세포간 연결체로서 구조적인 역할과 세포의 분열과 분화 그리고 사멸 등 여러 세포생리 조절인자로서 매우 중요한 역할을 담당하고 있어 적절한 ECM의 선택은 체외배양에서 필수적인 요소이다. 이 실험에서는 적절한 ECM의 선택하기 위해 2가지 ECM을 사용하여 조사하였다. 대동맥 혈관으로부터 회수된 세포들은 seeding 후 24시간 후에 전형적인 'Cobblestone-like morphology'를 ECM타입에 상관없이 나타내었다(Fig 1A). 추정상 Primary EC임을 확인할 수 있었다.

2. Primary EC의 특성 분석

In vitro angiogenesis능력을 확인하기 위하여 배양된 계대배양 3의 Primary EC의 tube formation assay를 수행하여 비록 완벽하지는 않지만 2시간과 4시간 사이에 3D-Matrigel matrix 위에서 형성됨을 2군 모두에서 확인하였다(Fig. 1B).

ECM이 EC유지능력에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 EC세포에서 특이하게 발현되는 3가지 단백질들을 확인하였다. ECM의 종류와 상관없이 추정상의 Primary EC들의 세

Table 1. Primer sequences of specific genes used for real time PCR

Gene symbol	Primer sequence	Genebank Number
Von Willebrand factor (<i>VWF</i>)	Forward 5'-GACGCTTGGCAAATCTTCGA-3'	NM_001246221.1
	Reverse 5'-GCTGTACATGCTCTGATCAAAGGT-3'	
Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1 (<i>PECAMI, CD31</i>)	Forward 5'-GGATGACGTGCTGTTTCACAA-3'	NM_213907.1
	Reverse 5'-CGGGCTTCGGAAATGAAATAA-3'	
Kinase insert domain receptor (<i>KDR, VEGFR2, KLF1</i>)	Forward 5'-CGAGTGGAGGTGACAGATTGC-3'	AJ245446.1
	Reverse 5'-CCGATCACTTTTGGAAATTGTGA-3'	
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-CCATCTTCCAGGAGCGAGATC-3'	NM_001206359.1
	Reverse 5'-GCCTTCTCCATGGTCGTGAA-3'	

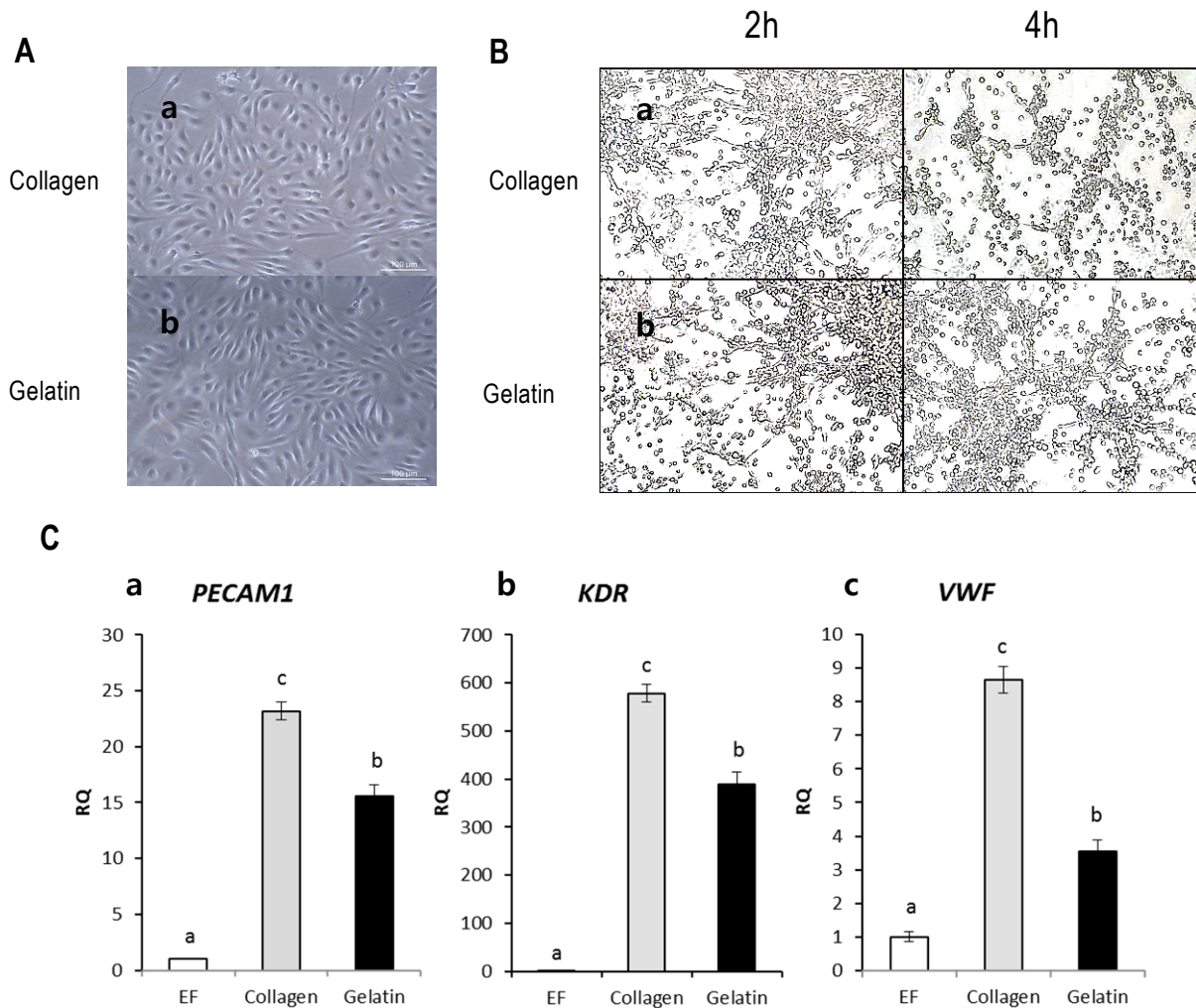


Fig. 1. Characterization of primary endothelial cells isolated from genetic modified porcine aorta. A, presumptive endothelial cells cultured on collagen (a) or gelatin (b) coated dishes. B, Tube formation capacity depends on different extra cellular matrices; C, The expression of endothelial cell specific markers cultured on different extra cellular matrices.

포 표면에서 PECAM과 KDR이 발현되었고, 세포질 내에서 VWF의 발현이 관찰되었다. 그러나 두 ECM에서 배양된 추정상의 Primary EC들 사이에서 단백질 형광염색을 통한 발현량의 차이는 확인되지 않았다(Fig. 2).

두 가지 ECM위에서 배양된 Primary EC를 이용하여 EC에서 주요하게 발현되는 단백질을 만드는데 필요한 유전자 발현을 계대배양 3에서 정량 PCR을 통해 확인하였다. 대조군으로 사용된 같은 개체의 귀 섬유아세포와 비교하여서 2가지 ECM위에서 배양된 Primary EC 세포들에서 EC특이 유전자(PECAM, KDR, VWF) 발현이 모두 증가함이 확인되었고, Collagen 위에서 배양된 Primary EC의 경우 gelatin 위에서 배양된 Primary EC보다 PECAM, KDR, VWF이 유의적으로 높은 수준으로 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

이상의 결과를 조합하여 정량 PCR에서 유의적으로 높은 발현량을 보였던 collagen matrix를 다음 실험을 위한 기본배양 조건으로 설정하였다. 비록 EC특이 인자들의 유전자 발현량에는 차이가 존재하였지만, 관련 유전자들과 단백질의 발현이 확인되어, 성공적으로 Primary EC가 추출 배양되었음을 확인할 수 있었다.

3. 유세포 분석기를 이용한 Primary EC의 sorting

돼지 특이 KDR monoclonal antibody를 사용하여 세포를 sorting 하였고 극히 일부의 Primary EC만이 KDR에 양성 반응을 보였다. 분별된 Primary EC들은 KDR에 양성 반응을 보인 Primary EC와 음성반응을 보인 Primary EC로 나뉘어졌고(Fig. 3A), 각각 배양되었다. 세포접종 후 배양이 진행됨에 따라 KDR

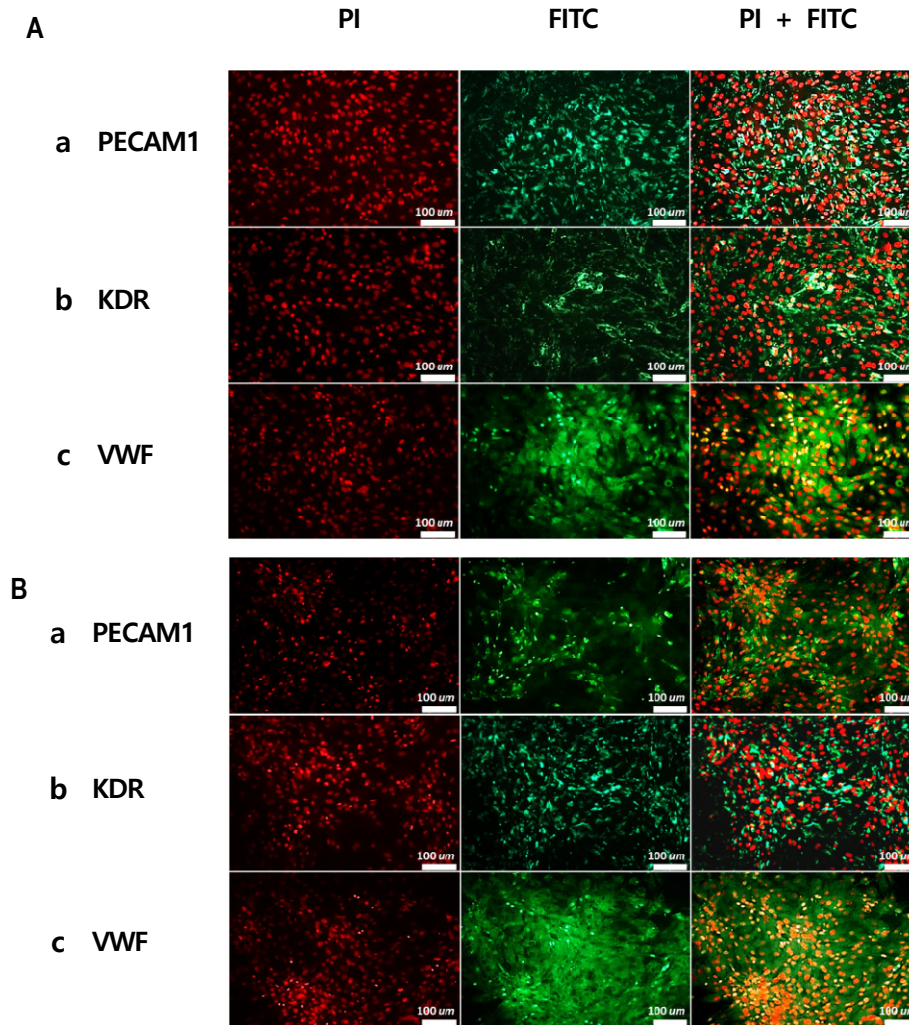


Fig. 2 .Expression of endothelial cell markers cultured on different extra cellular matrices

A, Collagen matrix; B, Gelatin matrix. FITC, positive reaction of each specific antibody; PI, counter staining.

에 양성 반응을 보인 세포는 전형적인 ‘Cobblestone-like morphology’를 유지하였지만 KDR에 음성반응을 보인 Primary EC는 형태가 섬유아세포와 같은 형태가 많이 관찰됨을 확인할 수 있었다.

4. Sorting된 Primary EC의 EC특이 유전자 발현

KDR을 표지인자로 Sorting된 Primary EC를 가지고 EC 특이 유전자의 mRNA의 발현을 정량 PCR을 통해 분석하였다. *PECAM*과 *VWF*의 두 유전자 모두에서 KDR에 양성 반응을 보인 Primary EC가 유의적으로 높은 발현을 보였다(Fig. 3C).

KDR을 양성 반응을 보인 Primary EC는 배양 후 계대배양 6에서 In vitro angiogenesis능력을 명확히 확인하기 위하여 살아있는 세포에 형광 염색되는 Calcein AM 염색을 수행하였다. 3D-Matrigel matrix 위에서 Primary EC의 tube formation이 seeding후 4시간에 명확히 관찰되었다(Fig. 4).

고 찰

조직공학적 활용 및 이종장기 이식시 혈관내에서 발생하는 면역 반응 기전을 연구하기 위하여 Alpha gal 유전자 결손돼지의 EC를 추출 배양하고 그 특성을 분석하였다.

Alpha gal 유전자 결손돼지유래 primary EC들은 유전적 변형을 가지지 않은 돼지와 사람으로부터 추출된 primary EC와 동일하게 전형적인 ‘Cobblestone-like morphology’가 ECM의 타입에 상관없이 관찰되었고, 그들은 계대배양 10까지 지속적 배양이 가능하였다. EC의 경우 혈관 형성능이 가장 중요한 특성이기 때문에 체외 혈관 형성능을 확인하기 위하여 Tube formation을 3D Matrix위에서 확인하였다. 비록 완벽하지는 못했지만 2시간과 4시간 사이에 network의 형성이 확인되었다. 그리고 사진에는 없지만 8시간이 지나면 이러한 형성

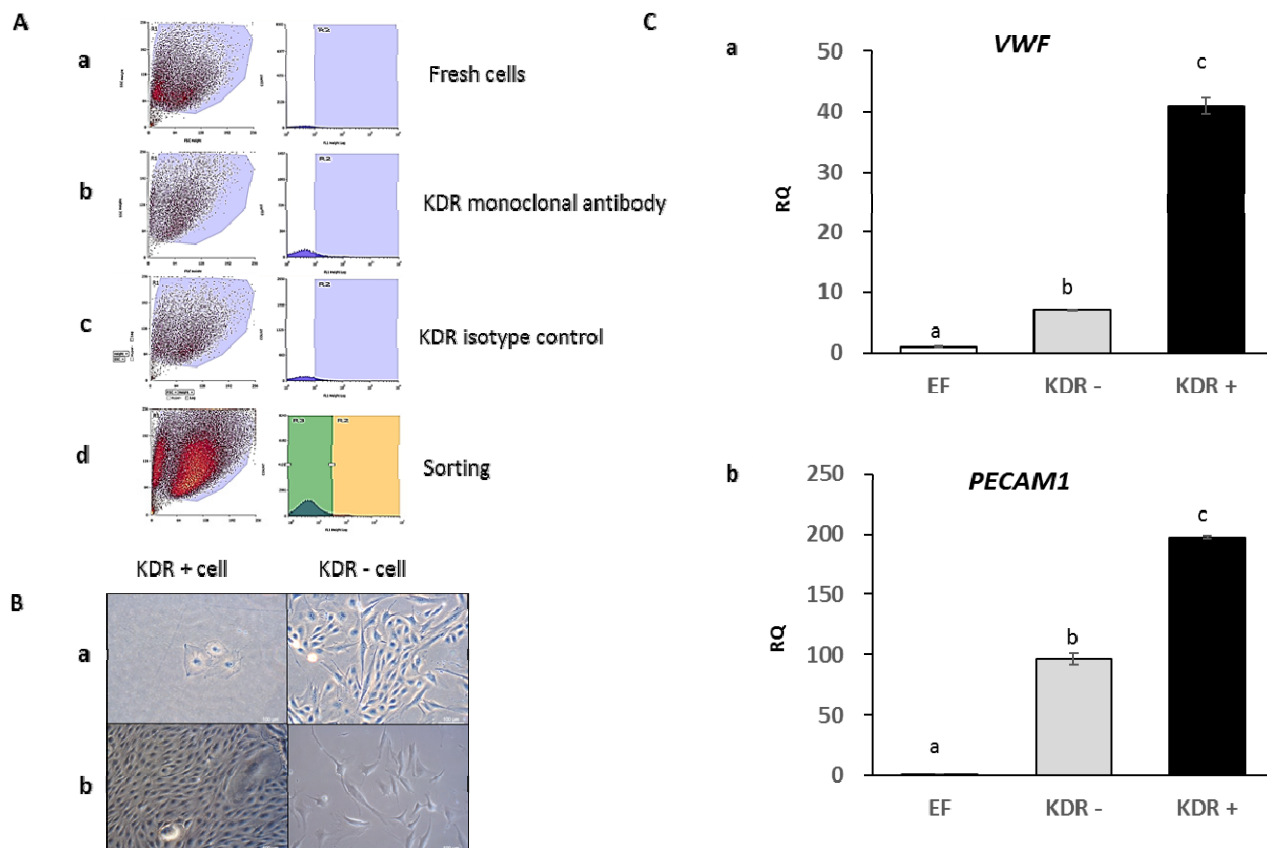


Fig. 3. Expressions of endothelial cell markers after sorting using KDR monoclonal antibody

A, cell sorting by a sorter (a, live cells; b, KDR monoclonal antibody expression cells; c, isotype matched control); B, KDR positive cells (a) and KDR negative cells (b) cultured on collagen matrix; C, qPCR of VWF (a) and PECAM1 (b).

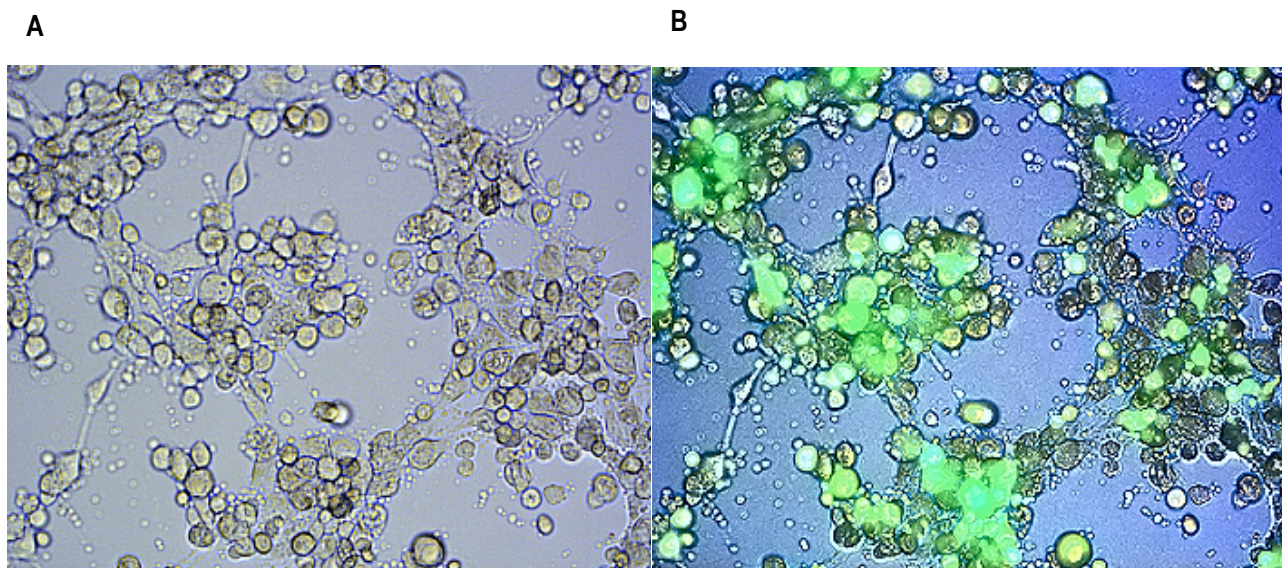


Fig. 4. Tube formation of KDR positive endothelial cells cultured on collagen coated dish after sorting
A, bright field; B, green fluorescence for detecting of calcen AM.

이 사라지고 세포가 군집을 이루는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 형태학적 특징과 *In vitro* angiogenesis 능력은 2가지 ECM의 타입에서 모두 가능함이 확인되었다.

PECAM1 단백질은 일반적으로 CD31로도 불리어지고 EC에서 주요하게 관찰된다(Muller 등, 2002; Mannucci 등, 1995). PECAM1은 angiogenesis과정 중 인접한 EC 사이의 염증반응시 heterophilic cell 사이의 부착 다단계 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다(Sun 등, 1998). VWF는 다당체 당 단백질로 EC에서 합성되고 저장되며, 혈장내의 coagulation factor VIII의 운반자와 같은 역할을 하여 fibrin과 platelet-rich thrombi의 형성을 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다(Muller 등, 2002). KDR는 type III tyrosine kinase이고 vascular endothelial growth factor receptor 2(VEGFR-2), CD309, Fetal liver kinase 1(FLK1)으로 명명된다. KDR은 VEGF에 대한 주요 수용체이고, VEGF는 vasculogenesis와 angiogenesis 둘 다에 관여하는 중요한 신호 단백질이다. 특히 VEGFR은 세가지 subtype으로 세포 표면에 존재하고 VEGFR-1이 haematopoietic cell의 발달에, VEGFR-2는 vascular endothelial cell development에 VEGFR-3는 lymphatic cell development에 관여하는 것으로 알려져 있다(Kankanala 등, 2012). 이상에서 언급된 3가지 단백질은 EC의 특징을 대표하므로 이 실험에서 분리된 primary EC에서 3가지 단백질의 발현 및 유전자의 발현을 ECM에 따라 분석하였다. ECM의 종류와는 상관없이 3가지 단백질의 발현이 면역 형광 염색을 통해 확인이 되었지만 2개의 ECM사이에 단백질의 발현량을 확인 하기는 어려웠다. 그러나 mRNA의 경우 collagen이 gelatin 보다는 우수한 EC 능력이 유지됨이 확인되었고 특히 KDR의 경우 다른 2 유전자에 비해 극히 높은 발현량을 보임을 확인할 수 있었다.

Primary EC의 순도를 높이기 위하여 KDR을 표지인자로 하여 유세포분석기를 사용하여 sorting을 유도하였다. 대부분의 논문이 EC 표지인자로 CD 31(Ramm 등, 2015; Beigi 등, 2017) 혹은 KDR(Mahaian 등, 2017)을 사용하였고, 이 실험에서는 KDR을 사용하였다. 비록 세포 내 단백질 발현을 확인을 위해 면역 형광 염색시에 이차 항체로 Polyclonal antibody를 사용함으로써 많은 세포가 양성 반응을 보이는 것 같았지만, 유세포 분석기 전용 형광이 부착된 monoclonal antibody를 사용하고 Isotype control의 형광값 기준으로 세포를 분석하였을 경우 KDR + cell의 비율은 극히 낮았다. 양성 반응을 보인 세포와 음성 반응을 보인 세포를 각각 배양하였을 때 양성반응을 보인 세포는 ‘Cobblestone-like morphology’의 유지와 PECAM1과 VWF의 mRNA 발현이 증가되어 Primary EC의 순도가 높아졌음이 확인되었다. 그러나 음성 반응을 보인 세포들은 두 유전자의 발현은 확인되었지만 상대적으로 낮고, 섬유아세포의 형태들이 관찰되어 순도가 떨어짐이 확인되었다.

이상의 결과들로 Alpha gal 유전자 결손돼지로부터 aortic endothelial cells은 이종간 장기이식·조직공학연구와 면역 거부 반응제어 연구에 활용되기 위해 순수하게 분리될 수 있으며, 비록 직접적인 비교는 하지 않았지만 선행연구들(Beigi 등, 2017; Chen 등, 2017)에서 보고된 유전적 변형을 가지지 않는 wild type의 EC와 같은 특성을 가지고 있음이 규명되었다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 성과물은 국립축산과학원 축산시험연구사업(과제번호 PJ01094404)에 의해 이루어졌다.

REFERENCES

- Ahn KS, Kim YJ, Kim M, Lee BH, Heo SY, Kang MJ, Kang YK, Lee JW, Lee KK, Kim JH, Nho WG, Hwang SS, Woo JS, Park JK, Park SB and Shim H. 2011. Resurrection of an alpha-1,3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theriogenology* 75:933-999.
- Azimzadeh AM, Kelishadi SS, Ezzelarab MB, Singh AK, Stoddard T, Iwase H, Zhang T, Burdorf L, Sievert E, Avon C, Cheng X, Ayares D, Horvath KA, Corcoran PC, Mohiuddin MM, Barth RN, Cooper DK, Pierson RN, 3rd. 2015. Early graft failure of GalTKO pig organs in baboons is reduced by expression of a human complement pathway-regulatory protein. *Xenotransplantation* 22:310-316.
- Beigi F, Patel M, Morales-Garza MA, Winebrenner C, Gobin AS, Chau E, Sampaio LC, and Taylor DA. 2017. Optimized method for isolating highly purified and functional porcine aortic endothelial and smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.* 232:3139-3145
- Chan BP, and Leong KW. 2008. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* 17 Suppl 4:467-479.
- Chen P, Gao H, Lu Y, Nie H, Liu Z, Zhao Y, Fan N, Zou Q, Dai Y, Tang A, Hara H, Cai Z, Cooper DKC, Lai L, and Mou L. 2017. Altered expression of eNOS, prostacyclin synthase, prostaglandin G/H synthase, and thromboxane synthase in porcine aortic endothelial cells after exposure to human serum-relevance to xenotransplantation. *Cell Biol. Int.* 41:798-808.

- Cooper DK, Dorling A, Pierson RN, 3rd, Rees M, Seebach J, Yazer M, Ohdan H, Awwad M, and Ayares D. 2007. Alpha1, 3-galactosyltransferase gene-knockout pigs for xenotransplantation: where do we go from here? *Transplantation* 84:1-7.
- Cowan PJ, and d'Apice AJ. 2009. Complement activation and coagulation in xenotransplantation. *Immunol. Cell Biol.* 87:203-208.
- DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, Tabib T, Gwilliam JC, Watson NJ, Bullwinkle EM, Falkenburg L, O'Neill RC, Morin A, and Wiest JS. 2014. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *J. Vis. Exp.* 91:e51312.
- Iwase H, Ezzelarab MB, Ekser B, and Cooper DK. 2014. The role of platelets in coagulation dysfunction in xenotransplantation, and therapeutic options. *Xenotransplantation* 21:201-220.
- Kankanala J, Latham AM, Johnson AP, Homer-Vanniasinkam S, Fishwick CW, and Ponnambalam S. 2012. A combinatorial in silico and cellular approach to identify a new class of compounds that target VEGFR2 receptor tyrosine kinase activity and angiogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 166:737-748.
- Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, and Cooper DK. 2005. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat. Med.* 11:29-31.
- Mahajan KD, Nabar GM, Xue W, Anghelina M, Moldovan N, Chalmers J, and Winter J. 2017. Mechanotransduction Effects on Endothelial Cell Proliferation via CD31 and VEGFR2: Implications for Immunomagnetic Separation. *Biotechnol. J.* doi:10.1002/biot.201600750.
- Mannucci PM. 1995. Platelet von Willebrand factor in inherited and acquired bleeding disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:2428-2432.
- Mohiuddin MM, Corcoran PC, Singh AK, Azimzadeh A, Hoyt RF, Jr, Thomas ML, Eckhaus MA, Seavey C, Ayares D, Pierson RN, 3rd, Horvath KA. 2012. B-cell depletion extends the survival of GTKO.hCD46Tg pig heart xenografts in baboons for up to 8 months. *Am. J. Transplant.* 12:763-771.
- Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC, Thomas Iii ML, Clark T, Lewis BG, Hoyt RF, Eckhaus M, Pierson Iii RN, 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. *Nat. Commun.* 7:11138.
- Müller AM1, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller KM, and Kirkpatrick CJ. 2002. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp. Mol. Pathol.* 72:221-229.
- Novosel EC, Kleinhans C, and Kluger PJ. 2011. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63:300-311.
- Olmer R, and Martin U. 2014. Induced pluripotent stem cells differentiate into functional cardiomyocytes. In: and Hayat MA, ed. *Stem cell and Cancer stem cells.* vol 12. Netherlands: Springer: 47-62.
- Ramm R, Hartmann T, Tudorache I, Haverich A, and Hilfiker A. 2015. No evidence for α Gal epitope transfer from media containing FCS onto human endothelial cells in culture. *Xenotransplantation* 22:345-355.
- Sun QH, Paddock C, Visentin GP, Zukowski MM, Muller WA, and Newman PJ. 1998. Cell surface glycosaminoglycans do not serve as ligands for PECAM-1. PECAM-1 is not a heparin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 273:11483-11490.
- Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, O'Malley P, Nobori S, Vagefi PA, Patience C, Fishman J, Cooper DK, Hawley RJ, Greenstein J, Schuurman HJ, Awwad M, Sykes M, and Sachs DH. 2005. 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.* 11:32-34.

Received August 12 2017, Revised September 05, 2017,
Accepted September 13, 2017