

基因修饰猪作为异种器官移植供体的研究进展

李文玲 鲍磊 肖磊*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要 器官移植是治疗脏器官终末病变的根本方法, 目前器官移植的最大障碍是供体器官的缺乏。异种器官移植为解决上述难题打开了一扇门。猪与人类在解剖学和生理学等方面非常相似, 是理想的器官移植的供体。基因修饰猪在异种器官移植中有着重要的应用, 该文就猪-人异种器官移植发生免疫排斥的机制及其对策、器官移植后的生理功能以及潜在的病毒感染风险等方面的研究进行了综述和讨论, 为异种器官移植提供理论基础。

关键词 异种器官移植; 排斥反应; 病毒感染; 基因修饰猪

The Progress of Genetic-modified Pigs as Donors in Xenotransplantation

Li Wenling, Bao Lei, Xiao Lei*

(College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Organ transplantation is an ultimate method for treating terminal organic disorder. Lacking of organs is the most serious impediment to the development of organ transplantation. Xenotransplantation opens the door to solve this problem. Pigs are the most ideal donors whose anatomy and physiology are remarkably similar to human. Genetic-modified pigs play key roles in xenotransplantation. This paper reviewed the researches about the mechanisms of pig-human xenotransplantation immune rejection and how to overcome immune rejection, the physiological functions of organ after transplantation, as well as the possible risk of virus infection which provide a theoretical basis for xenotransplantation.

Key words xenotransplantation; rejection reaction; virus infection; genetic-modified pig

随着科学技术的进步, 器官移植成功率越来越高, 而器官缺乏问题日益显著。每年都有大量需要器官移植的病人因为找不到合适的器官而死亡。据统计, 即使在美国, 也仅30%的病人有可用的移植器官; 在中国, 由于受到传统观念的影响, 仅2%的病人能找到可用的移植器官。因此, 许多科学家致力于异种器官移植的研究。异种器官移植是指通过手术的方法将一个物种的器官或组织移植到另一个物种体内, 代替原来器官或组织继续发挥功能。目前, 异种器官移植研究主要是以猪为供体来源的。

相比于其他动物, 猪作为异种器官移植的供体有许多优势: 猪的生理学、解剖学结构、代谢过程都与人类相似; 猪来源广、产仔多、繁殖周期短、生长周期长; 猪的器官易获取、无需等待; 猪涉及的伦理问题少; 猪的遗传背景研究清楚, 便于进行基因修饰。随着基因工程、细胞工程的发展, 人们已经生产了大量的基因修饰猪, 在农业及生物医学领域具有重要的应用^[1-4]。本文主要对近年来基因修饰猪作为器官供体在异种器官移植中的应用进展作一综述。

收稿日期: 2014-03-31 接受日期: 2014-06-03

国家自然科学基金(批准号: 31271577)和浙江省自然科学基金(批准号: LY13C120001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88982506, E-mail: leixiao@zju.edu.cn

Received: March 31, 2014 Accepted: June 3, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271577) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY13C120001)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88982506, E-mail: leixiao@zju.edu.cn

网络出版时间: 2014-08-28 10:17 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0105.html>

1 异种器官移植的免疫障碍

相比于同种器官移植, 异种器官移植免疫排斥反应更为复杂, 主要包括: 超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)、急性血管排斥反应(acute vascular rejection, AVR)、急性细胞性排斥反应(acute cellular rejection, ACR)和慢性排斥反应(chronic rejection, CR)等。

1.1 超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)

在异种器官移植免疫排斥中, 反应最快、破坏力最大的是超急性排斥反应(HAR)。所谓超急性排斥反应, 是指移植物与受体血管接通后数分钟至24 h内发生的排斥反应, 移植物被攻击而失去功能^[5]。

超急性排斥反应是由受者体内预先存在的针对供体组织抗原的抗体(如IgM、IgG等)介导的^[6]。抗体与供体器官血管内皮细胞表面的靶抗原结合, 激活补体系统, 形成C5b6789复合物即所谓的膜攻击复合物(membrane attack complex, MAC)。MAC在胞膜上形成小孔, 使小的可溶性分子、离子以及水分子可自由透过胞膜, 但蛋白质之类的大分子却难以从胞浆中逸出, 最终导致胞内渗透压降低、内皮细胞溶解、血小板聚集、黏附形成血栓进而导

致器官坏死(图1)。除了人和旧世界猴外, 绝大多数的哺乳动物细胞表面都有由 α -1,3-半乳糖苷转移酶(alpha-1,3-galactosyltransferase, GGTA1)催化产生的Gal抗原表位。因此, 当猪的器官移植到人体内时, Gal抗原表位被Gal的抗体识别会引发超急性免疫排斥, 导致移植失败。

超急性排斥反应是异种移植的最大障碍, 目前已研究出若干种预防办法, 其中最有效的方法是对供体猪进行基因修饰, 既可以有效降低超急性免疫排斥反应, 同时又不会影响猪器官的功能。进行基因修饰的猪可以正常存活并繁殖后代。通过基因修饰的方法来降低超急性免疫排斥的途径之一是在供体猪中表达人的补体调节蛋白基因, 使猪的器官被人的补体系统误识别为“自我”器官, 从而防止该反应的发生。补体调节蛋白(complement regulatory proteins, CRP)主要是指以可溶性或膜结合形式存在、参与调节补体活化的一类蛋白质分子, 包括血浆中的备解素、C1抑制物、I因子C4结合蛋白、H因子、S蛋白、Sp40/40以及细胞膜表面的衰变加速因子(decay-accelerating factor, DAF, 即CD55)、膜辅助蛋白(membrane cofactor protein, MCP, 即CD46)、

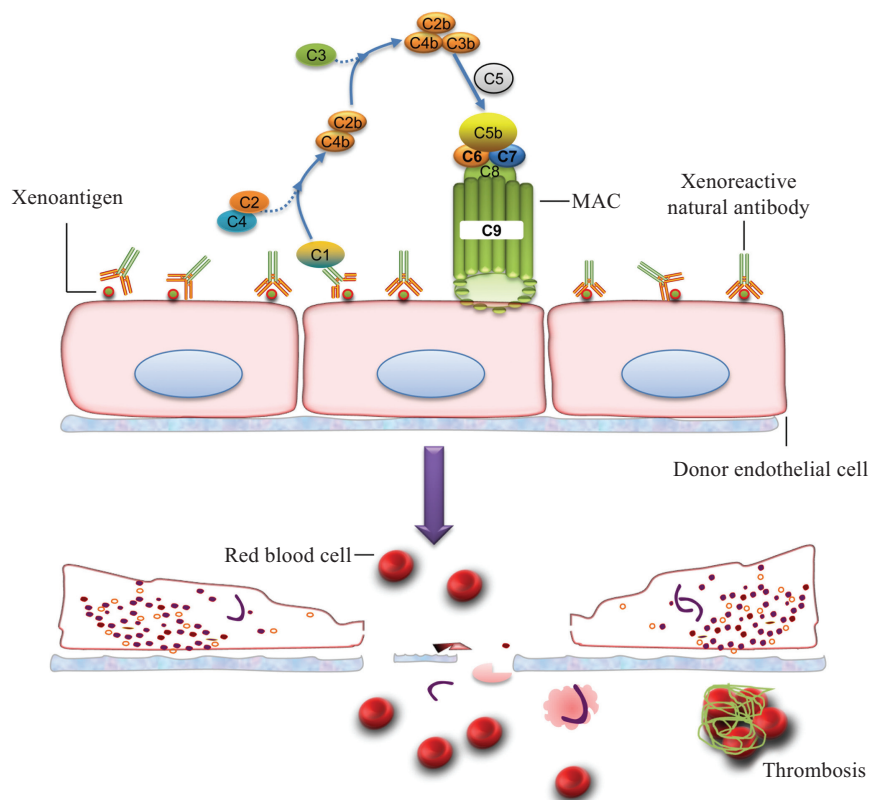


图1 超急性排斥反应示意图(根据参考文献[5]作适当修改)

Fig.1 Schematic diagram of hyperacute rejection (modified from reference [5])

膜反应性溶解抑制物(membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL, 即CD59)等。实验证明, 将携带hDAF转基因猪的器官移植到非人灵长类动物体内, 移植物存活时间最长可达到139 d, 克服了异种移植的超急性排斥反应^[7-9]。体外实验证明, 同时表达hCD46与人类白细胞抗原E(human leucocyte antigen E, HLA-E)的 α -1,3-半乳糖苷转移酶基因克隆猪可以明显地改善超急性免疫排斥反应^[10]; 体内试验也得出了类似的结果, 携带hCD46转基因猪的心脏在狒狒体内的最长存活时间可以达到109 d^[11]。此外, 在转基因猪体内同时表达衰变加速因子和膜反应性溶解抑制物也是克服超急性免疫排斥的有效策略, 如Menoret等^[12]的实验证明, 同时表达hCD55/hCD59的转基因猪的肾脏在没有使用免疫抑制剂的条件下可以在狒狒体内存活6 d; Ramirez等^[13]的实验证实, 表达hCD55、hCD59和H-transferase的转基因猪心脏移植到狒狒体内也克服了超急性免疫排斥反应(表1)。

克服超急性免疫排斥反应的另一个途径是将 α -1,3-半乳糖苷转移酶基因敲除, 从而彻底阻断Gal抗原的合成。科学家们利用同源重组和体细胞核移植技术获得了 α -1,3-半乳糖苷转移酶单等位基因敲除的转基因克隆猪^[14-15], 随后又利用锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)或者转录激活因子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术结合体细胞核移植技术产生了 α -1,3-半乳糖苷转移酶双等位基因敲除的克隆猪^[16-18], 之后的体内体外实验一致证明, Gal抗原表位的去除显著延长了器官的存活时间, 并且没有出现超急性免疫排斥的迹象^[19-21]。在Gal抗原表位去除的转基因克隆猪中表达人的CD55或者同时表达CD55-59/CD39可以明显降低免疫排斥反应^[22-23]。最近, Chen等^[24]在GTKO/hCD55/hCD59/hHT转基因猪模型中研究异种抗体在异种器官移植中的作用, 为

促进异种器官移植临床应用提供了理论基础。

1.2 急性血管排斥反应(acute vascular rejection, AVR)

急性血管排斥反应(AVR)又称急性体液性异种移植排斥反应(acute humoral xenograft rejection, AHXR), 一般在移植后几天或数周内发生, 是猪-灵长类异种移植器官长期存活的主要障碍^[25]。急性血管排斥反应主要由anti-non- α Gal抗体结合抗原表位引发移植物内皮细胞激活和组织因子表达, 在移植物内造成炎症、间质出血及纤维素沉积并伴有弥散性血管内凝血, 导致移植物失活^[25-26]。此外, 越来越多的证据说明, 灵长类动物的中性粒细胞可能参与了猪内皮细胞的激活^[27]。

克服急性血管排斥反应的方法很多, 比如在供体器官内表达人的抗凝基因, 减少血栓形成, 从而降低急性血管排斥对器官的损伤。Lin等^[28]发现, 在猪中过表达一个或多个人的抗凝基因, 器官移植后可以明显抑制血小板聚集, 显著增加移植物的存活时间。巨噬细胞在血管排斥反应中也扮演着重要角色, 抑制巨噬细胞活性也是降低急性血管排斥的方法之一, 例如: CD47是信号调节蛋白 α (signal regulatory protein α , SIRP α)的配体, 两者结合后能抑制巨噬细胞的活性, 表达人CD47的转基因猪的细胞几乎可以完全抵抗巨噬细胞的吞噬作用^[29-30]。上述实验证明, 对猪进行基因修饰可以有效降低急性血管排斥反应, 同时不影响猪器官功能, 是降低异种移植免疫排斥的一个非常好的策略。

1.3 急性细胞性排斥反应(acute cellular rejection, ACR)

急性细胞性排斥反应(ACR)是指异种器官移植所引起的细胞介导的免疫应答。CD4⁺ T细胞是该应答的起始细胞, 而CD8⁺ T细胞和巨噬细胞是最终的效应细胞。CD4⁺ T细胞和中性粒细胞在体外会对

表1 猪-灵长类动物异种移植的实验结果

Table 1 The results of pig-to-primate xenotransplantation

供体 Donor	器官 Organ	受体 Recipient	移植物存活时间 Time of graft survival	参考文献 Reference
hDAF transgenic pig	Kidney	Monkey	78 d	[8]
hDAF transgenic pig	Thymokidney	Baboon	30 d	[7]
hCD55/hCD59 transgenic pig	Kidney	Baboon	6 d	[12]
hDAF transgenic pig	Heart	Baboon	139 d	[9]
hCD46 transgenic pig	Heart	Baboon	109 d	[11]
hCD55+GGTA1 KO transgenic pig	Heart	Baboon	28 d	[23]

猪的内皮细胞产生强烈的免疫反应; 在猪-灵长类动物异种移植中, 巨噬细胞也参与了细胞免疫应答^[31]。急性细胞性排斥反应的病理特征: 移植物出现部分间质纤维化, 动脉肌内膜增生肥大并伴有T细胞和巨噬细胞的浸润现象。

目前, 防止急性细胞性排斥反应的方法主要有三种。一是使用免疫抑制剂, 如环孢霉素A。环孢霉素A可以降低T细胞活性及T细胞所产生的免疫反应, 显著改善移植器官的存活能力。实验表明, 将环孢霉素A与其他免疫抑制药物一起使用可以延长移植到灵长类动物体内的猪肾脏的存活时间^[32]。二是在异种器官移植的同时移植供体胸腺组织, 可以诱导受体的T细胞耐受。Yamada等^[21]将GGTA1 KO猪的肾脏和胸腺组织同时移植到狒狒体内, 2只狒狒分别存活了81 d和83 d, 而对照组只活了20, 30, 34 d, 效果非常显著。三是供体猪进行基因修饰: 在供体猪中过表达人的FasL/Fas分子, 可以降低免疫排斥反应, 同时不会影响猪器官的功能。研究证明, 异种器官移植的CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)细胞毒作用的发生机理是CTL细胞表面的FasL与靶细胞表面的Fas相互识别, 通过Fas触发靶细胞内部的凋亡程序, 使靶细胞发生程序性细胞死亡。Kawamoto等^[33]在猪胰岛细胞表面过表达人FasL和Fas分子, 干扰凋亡途径, 从而抵抗CD8⁺细胞毒性T细胞介导的细胞毒作用。

1.4 慢性排斥反应(chronic rejection, CR)

慢性排斥反应(CR)一般在器官移植后数月甚至数年发生。主要病理特征是移植器官的毛细血管内皮细胞增生, 间质纤维化, 血管硬化性改变。慢性排斥反应在同种器官移植中是影响移植物长期发挥功能的主要原因^[34-37], 但在异种器官移植中研究很少, 具体成因尚不清楚。

2 异种器官在移植后的生理功能

除了免疫排斥反应之外, 另一个重要的问题是猪的器官移植后能否在人体内正常发挥功能。猪的胰腺、肝脏、肾脏移植等一系列的实验证明, 猪的器官移植后可以发挥正常功能, 基本满足灵长类的生命需求。如Lee等^[38]研究发现, 将猪的胰岛移植到恒河猴肝脏中, 胰岛功能良好, 恒河猴血糖耐受能力增强; Soin等^[39]的实验证明, 猪肾脏移植后功能良好, 无不良反应; 猪的肾脏移植给非人灵长类后, 可以基本

维持受者的正常生活, 但有一些小的功能缺陷, 如蛋白尿及磷酸盐代谢方面的问题, 仍需要进一步研究。

3 异种器官移植潜在的安全隐患

异种器官移植虽然有望解决器官供体不足的问题, 但是安全问题不容忽视。如何避免人畜共患病以及如何避免猪的内源性病毒整合到人基因组内对人产生危害等问题仍然没有解决, 猪的器官移植实现临床应用任重而道远。

猪细胞巨化病毒(porcine cytomegalovirus, PCMV)是一类常见的人畜共患病毒。Mueller等^[40]研究发现, 在猪-狒狒的移植物中, 检测到了PCMV的感染, 导致移植失败。为了防止此类人畜共患病的发生, 必须在无特定病原(specific pathogen free, SPF)条件下培养供体动物, 即饲养条件封闭、严格无菌、剖腹产仔、定期监测供体动物病原体, 以保证供体免受感染^[41]。

比人畜共患病毒更难以防治的是猪的内源性病毒, 如猪内源性逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)。PERV主要包括PERV-A、PERV-B、PERV-C三类, 存在于所有猪的基因组中^[42]。实验证明, 在接受过猪器官移植的NOD-SCID小鼠体内发现了PERV的感染, 但是在狒狒体内没有发现类似情况^[43-44]。虽然, Clémenceau等^[45-47]的调查研究证明, 接受过猪组织移植的人身上未发现PERV的感染, 但是Specke等^[48]的实验证明, PERV在体外与人细胞共培养时可以感染人的细胞。PERV在体内是否会感染人的细胞还需要进一步研究确认。为了确保异种器官移植的安全性, 可以利用RNA干扰的方法降低PERV的表达^[49-50]。此外, 利用ZFN、TALEN、CRISPR/Cas(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein)等新兴基因修饰技术从根源上将PERV病毒基因组破坏^[51-53], 也是应对此类猪内源性病毒感染的一个很好的策略。

4 结语与展望

近年来, 异种器官移植取得了非常显著的进展, 但是距离应用到临床还有很长的一段路要走。ZFN、TALEN、CRISPR/Cas等新兴基因修饰工具的出现, 大大提高了基因修饰的效率, 为培育适用于器官移植的转基因克隆猪开辟了新的道路。目前, 免疫排斥反应仍然是异种器官移植的最大障碍, 因此

当务之急是确立一个最佳的免疫抑制方案或者产生一个优化的低免疫原性基因修饰猪。异种移植的另一个难题是异种器官移植后的安全问题。目前,没有确切证据证明猪的内源性病毒不能感染人的细胞,为了确保异种移植的安全性,需要进一步探索一些更灵敏的技术来检测猪的内源性病毒,或者在基因水平将这个安全隐患去除。与此同时,猪-人异种器官移植可能带来的心理、伦理问题不容忽视,相关部门应该加大异种移植的科学宣传力度,规范伦理方面的法律法规,为异种器官移植走向临床保驾护航。

参考文献 (References)

- Kues WA, Niemann H. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol* 2004; 22(6): 286-94.
- 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(5605): 411-4.
- Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L, Greenstein JL. Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 2003; 59(1): 115-23.
- Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, *et al.* Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 2008; 321(5897): 1837-41.
- Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: Current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(7): 519-31.
- 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(2): 193-201.
- Barth RN, Yamamoto S, LaMattina JC, Kumagai N, Kitamura H, Vagefi PA, *et al.* Xenogeneic thymokidney and thymic tissue transplantation in a pig-to-baboon model: I. Evidence for pig-specific T-cell unresponsiveness. *Transplantation* 2003; 75(10): 1615-24.
- Cozzi E, Bhatti F, Schmoedel 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(1): 15-21.
- Houser SL, Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJ, Gollackner B, Cheng J, *et al.* Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. *Xenotransplantation* 2004; 11(5): 416-25.
- Bongoni AK, Kiermeir D, Jenni H, Bahr A, Ayares D, Klymiuk N, *et al.* Complement dependent early immunological responses during *ex vivo* xenoperfusion of hCD46/HLA-E double transgenic pig forelimbs with human blood. *Xenotransplantation* 2014; 21(3): 230-43.
- Byrne GW, Schirmer JM, Fass DN, Teotia SS, Kremers WK, Xu H, *et al.* Warfarin or low-molecular-weight heparin therapy does not prolong pig-to-primate cardiac xenograft function. *Am J Transplant* 2005; 5(5): 1011-20.
- Menoret S, Plat M, Blancho G, Martinat-Botte F, Bernard P, Karam G, *et al.* Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination. *Transplantation* 2004; 77(9): 1468-71.
- Ramirez P, Montoya MJ, Rios A, Garcia Palenciano C, Majado M, Chavez 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(9): 4103-6.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, *et al.* Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002; 20(3): 251-5.
- 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(5557): 1089-92.
- Bao L, Chen H, Jong U, Rim C, Li W, Lin X, *et al.* Generation of GGTA1 biallelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and somatic cell nuclear transfer. *Sci China Life Sci* 2014; 57(2): 263-8.
- Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, *et al.* Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(29): 12013-7.
- Xin J, Yang H, Fan N, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, *et al.* Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One* 2013; 8(12): e84250.
- Kim H, Chee HK, Yang J, Hwang S, Han KH, Kang J, *et al.* Outcomes of alpha 1,3-GT-knockout porcine heart transplants into a preclinical nonhuman primate model. *Transplant Proc* 2013; 45(8): 3085-91.
- van Poll D, Nahmias Y, Soto-Gutierrez A, Ghasemi M, Yagi H, Kobayashi N, *et al.* Human immune reactivity against liver sinusoidal endothelial cells from GalTalpha(1,3)GalT-deficient pigs. *Cell Transplant* 2010; 19(6): 783-9.
- 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(1): 32-4.
- McGregor CG, Ricci D, Miyagi N, Stalboerger PG, Du Z, Oehler EA, *et al.* Human CD55 expression blocks hyperacute rejection and restricts complement activation in Gal knockout cardiac xenografts. *Transplantation* 2012; 93(7): 686-92.
- Westall GP, Levvey BJ, Salvaris E, Gooi J, Marasco S, Rosenfeldt F, *et al.* Sustained function of genetically modified porcine lungs in an *ex vivo* model of pulmonary xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32(11): 1123-30.
- Chen Y, Stewart JM, Gunthart M, Hawthorne WJ, Salvaris EJ, O'Connell PJ, *et al.* Xenoantibody response to porcine islet cell transplantation using GTKO, CD55, CD59, and fucosyltransferase multiple transgenic donors. *Xenotransplantation* 2014; 21(3): 244-53.
- Gollackner B, Goh SK, Qawi I, Buhler L, Knosalla C, Daniel S, *et al.* Acute vascular rejection of xenografts: Roles of natural and elicited xenoreactive antibodies in activation of vascular endothelial cells and induction of procoagulant activity. *Transplantation* 2004; 77(11): 1735-41.
- Lam TT, Paniagua R, Shivaram G, Schuurman HJ, Borie DC,

- Morris RE. Anti-non-Gal porcine endothelial cell antibodies in acute humoral xenograft rejection of hDAF-transgenic porcine hearts in cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation* 2004; 11(6): 531-5.
- 27 Schneider MK, Seebach JD. Current cellular innate immune hurdles in pig-to-primate xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13(2): 171-7.
- 28 Lin CC, Cooper DK, Dorling A. Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate. *Transpl Immunol* 2009; 21(2): 75-80.
- 29 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 USA* 2007; 104(12): 5062-6.
- 30 Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, Ohdan H, *et al.* Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRPalpha capable of binding to human CD47. *Cell Transplant* 2011; 20(11/12): 1915-20.
- 31 Kirchoff N, Shibata S, Wijkstrom M, Kulick DM, Salerno CT, Clemmings SM, *et al.* Reversal of diabetes in non-immunosuppressed rhesus macaques by intraportal porcine islet xenografts precedes acute cellular rejection. *Xenotransplantation* 2004; 11(5): 396-407.
- 32 Cozzi E, Vial C, Ostlie D, Farah B, Chavez G, Smith KG, *et al.* Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts. *Xenotransplantation* 2003; 10(4): 300-10.
- 33 Kawamoto K, Tanemura M, Komoda H, Omori T, Fumimoto Y, Shimada K, *et al.* Adenoviral-mediated overexpression of membrane-bound human FasL and human decoy Fas protect pig islets against human CD8+ CTL-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* 2006; 38(10): 3286-8.
- 34 Pilat N, Farkas AM, Mahr B, Schwarz C, Unger L, Hock K, *et al.* T-regulatory cell treatment prevents chronic rejection of heart allografts in a murine mixed chimerism model. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33(4): 429-37.
- 35 Ruttens D, Wauters E, Kicinski M, Verleden SE, Vandermeulen E, Vos R, *et al.* Genetic variation in interleukin-17 receptor A is functionally associated with chronic rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32(12): 1233-40.
- 36 Verleden GM, Raghu G, Meyer KC, Glanville AR, Corris P. A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33(2): 127-33.
- 37 Zeng Q, Ng YH, Singh T, Jiang K, Sheriff KA, Ippolito R, *et al.* B cells mediate chronic allograft rejection independently of antibody production. *J Clin Invest* 2014; 124(3): 1052-6.
- 38 Lee JI, Shin JS, Jung WY, Lee G, Kim MS, Kim YS, *et al.* Porcine islet adaptation to metabolic need of monkeys in pig-to-monkey intraportal islet xenotransplantation. *Transplant Proc* 2013; 45(5): 1866-8.
- 39 Soin B, Smith KG, Zaidi A, Cozzi E, Bradley JR, Ostlie DJ, *et al.* Physiological aspects of pig-to-primate renal xenotransplantation. *Kidney Int* 2001; 60(4): 1592-7.
- 40 Mueller NJ, Kuwaki K, Dor FJ, Knosalla C, Gollackner B, Wilkinson RA, *et al.* Reduction of consumptive coagulopathy using porcine cytomegalovirus-free cardiac porcine grafts in pig-to-primate xenotransplantation. *Transplantation* 2004; 78(10): 1449-53.
- 41 Schuurman HJ. Regulatory aspects of pig-to-human islet transplantation. *Xenotransplantation* 2008; 15(2): 116-20.
- 42 Bittmann I, Mihica D, Plesker R, Denner J. Expression of porcine endogenous retroviruses (PERV) in different organs of a pig. *Virology* 2012; 433(2): 329-36.
- 43 van der Laan LJ, Lockey C, Griffith BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, *et al.* Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 2000; 407(6800): 90-4.
- 44 Nishitai R, Ikai I, Shiotani T, Katsura N, Matsushita T, Yamakouchi S, *et al.* Absence of PERV infection in baboons after transgenic porcine liver perfusion. *J Surg Res* 2005; 124(1): 45-51.
- 45 Clemenceau B, Jegou D, Martignat L, Sai P. Long-term follow-up failed to detect *in vitro* transmission of full-length porcine endogenous retroviruses from specific pathogen-free pig islets to human cells. *Diabetologia* 2001; 44(11): 2044-55.
- 46 Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, *et al.* Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 1999; 285(5431): 1236-41.
- 47 Scobie L, Padler-Karavani V, Le Bas-Bernardet S, Crossan C, Blaha J, Matouskova M, *et al.* Long-term IgG response to porcine Neu5Gc antigens without transmission of PERV in burn patients treated with porcine skin xenografts. *J Immunol* 2013; 191(6): 2907-15.
- 48 Specke V, Rubant S, Denner J. Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology* 2001; 285(2): 177-80.
- 49 Li ZG, Liu GB, Pan MX, Wu QS, Ge M, Du J, *et al.* Knockdown of porcine endogenous retroviruses by RNA interference in Chinese experimental miniature pig fibroblasts. *Transplant Proc* 2013; 45(2): 748-55.
- 50 Ramsoondar J, Vaught T, Ball S, Mendicino M, Monahan J, Jobst P, *et al.* Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation* 2009; 16(3): 164-80.
- 51 Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(18): 5978-90.
- 52 Joung JK, Sander JD. TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(1): 49-55.
- 53 Zhou J, Shen B, Zhang W, Wang J, Yang J, Chen L, *et al.* One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 46: 49-55.