

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

探討異種移植中 HLA-DR 轉殖基因減緩急性細胞性排斥之程  
度

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-002-121-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：戴浩志

共同主持人：湯月碧，張金堅

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 2 月 15 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫

## 94年度研究計畫成果報告

計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 一般型計畫		
研究型別	<input type="checkbox"/> 整合型計畫		
計畫歸屬	<input checked="" type="checkbox"/> 生物處		
本計畫 名稱	中文	探討 hHO-1 及 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於 hPBMC-SCID 小鼠之急性細胞性排斥反應	
	英文	Studies of Acute Cell-mediated Rejection in hHO-1 and HLA-DR Transgenic Porcine Skin Transplanted to hPBMC-SCID Mouse	
計畫主持人姓名	戴浩志	職稱	主治醫師
申請機關	台大醫學院	申請系所 (單位)	外科
執行期限	自民國 <u>93</u> 年 <u>08</u> 月 <u>01</u> 日起至民國 <u>94</u> 年 <u>07</u> 月 <u>31</u> 日		
研究性質	<input checked="" type="checkbox"/> 基礎研究 <input type="checkbox"/> 應用研究 <input type="checkbox"/> 技術發展		
本計畫為 <input type="checkbox"/> 多年期計畫，共 <u>1</u> 年			
計畫連絡人	姓名： <u>戴浩志</u> 電話：(公) <u>02-2312-3456 ext 5109</u>		
通訊地址	台北市中山南路7號台大外科		
傳真號碼	<u>02-2322-4337</u>	E-MAIL	<u>taihc@ha.mc.ntu.edu.tw</u>

本研究計畫發表情形:	<input type="checkbox"/> 論文已發表	<input type="checkbox"/> 投稿中	<input type="checkbox"/> 學會發表	<input checked="" type="checkbox"/> 未發表
------------	--------------------------------	------------------------------	-------------------------------	---

計畫成果摘要:(約二百字)

不過器官來源短缺，促使科學家尋求異種器官來源。豬在解剖構造及生理功能與人類極為近似，數量多，又無猿猴保育之問題，可為人類異種器官最佳的來源。科學家以人類壞死加速因子(hDAF)基因進行基因轉殖豬之產製，並由該基因轉殖豬器官移植給狒狒之前臨床實驗，證實移植之器官可克服超急性排斥反應。本計畫利用台灣養豬科學研究所(PRIT)產製的hDAF基因轉殖豬，試驗本土hDAF基因轉殖豬減緩異種器官移植中超急性排斥之程度。

實驗設計，是以HLA-DR基因轉殖豬皮膚移植於HLA-DR、HO-1、HLA-DR/HO-1基因轉殖鼠背部（實驗組），或以HLA-DR基因轉殖豬皮膚移植於非基因轉殖鼠背部（對照組），於豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小鼠，作切片檢查及血液檢查，包括檢驗皮膚排斥時間，病理變化（H&E染色）、細胞激素(使用ELISA方法測量TNF- $\alpha$ 、IL-6)、免疫細胞(使用Flow Cytometry方法測量CD4+CD25+、及CD8+ T細胞)

實驗結果，以HLA-DR基因轉殖豬皮膚移植於HLA-DR、HO-1、HLA-DR/HO-1基因轉殖鼠背部（實驗組），或以HLA-DR基因轉殖豬皮膚移植於非基因轉殖鼠背部（對照組），可以以肉眼觀察，加上豬皮組織切片在hematoxylin and eosin染色下觀察，可以判定，所有豬皮都在移植後14天內被小鼠排斥，可見明顯淋巴球細胞侵潤。實驗組與對照組沒有明顯差異。

由Flow Cytometry數值看出，無論實驗組或對照組，CD8+ T細胞在豬皮移植後前二天，數值都很低，平均為1.4% - 2.6%；而在豬皮移植後二天至七天，數值大幅上升，平均為12.4% - 19.5%，高峰在豬皮移植後七天至十天，可達49.6% - 53.6%，之後逐漸降到正常值4.54%。CD4+CD25+ T細胞在豬皮移植後十天內，數值變化不大，平均為6.3% - 6.7%。

由CD8+，及CD4+CD25+ T細胞變化推論，所有豬皮都在移植後14天內被排斥，主要是自移植後第三天起，被增加的小鼠CD8+ T細胞排斥掉；豬皮被排斥掉的時間，約在移植後第七天至第十天。由於CD4+CD25+ T細胞在移植後第十天仍未增加，故無法發揮調節或抑制CD8+ T細胞的作用。

TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6細胞激素的變化，移植後之數值參差不齊，沒有一致的趨勢，無法區分實驗組與對照組差異，故不是好指標。以HLA-DR基因轉殖豬皮膚移植至於喪失T/B/NK細胞功能之SCID小鼠背部之資料正整理中。

目前已經建立模擬人類單核白血球排斥豬皮的動物試驗，以檢驗HLA-DR基因轉殖豬皮膚是否可以預防異體移植之急性細胞性排斥，實驗結果將整理成論文，投稿相關期刊。往後實驗，應該增加免疫抑制劑的使用，抑制CD8+ T細胞排斥作用，直到CD4+CD25+ T細胞增加，法發揮調節或抑制CD8+ T細胞的作用。

# 研究計畫成果報告

## 壹、簡介 (Introduction)

計畫背景：

直接以普通豬之心臟、肝臟、腎臟、肺臟等實體供給人類，進行異種器官移植 (xenotransplantation) 時，將遭受超急性排斥、急性血管性排斥、急性細胞性排斥、與慢性排斥等反應。產生超急性排斥的機制，在於人類血液中自然抗體 (anti-Gal Ab) 和豬血管內皮細胞抗原 (Gal epitope) 結合，因而啟動人類血液中補體系統，及造成豬之第一型血管內皮細胞之活化，最後豬器官因廣泛之血管內血栓而壞死。人類衰敗加速因子 (hDAF)，可以抑制人類補體系統中 C3 之形成，因而抑制人類血液中補體系統之啟動；最近科學家以人類衰敗加速因子 (hDAF) 基因進行基因轉殖豬之產製，並由該基因轉殖豬器官移植給狒狒之前臨床實驗，證實異種心臟移植者可維持 30 天以上、異種腎臟移植者可超過 78 天，移植之器官可克服超急性排斥反應，惟該等器官最後仍遭受排斥反應。此外，2001 年底，有二家生技公司產製出 Gal 基因敲毀複製豬 (cloned Gal-transferase knockout pig)，也為克服超急性排斥，提供一個方向。故在跨越超急性排斥障礙之後，急性血管性排斥、急性細胞性排斥、與慢性排斥反應之研究，將是未來異種移植之研究重點。

異體器官移植 (allograft transplantation) 時，產生之排斥，主要為急性排斥，此為細胞性排斥 (cell-mediated rejection)，其排斥機制有直接路徑及間接路徑 (direct pathway & indirect pathway)。直接路徑，乃是外來器官之血管內皮細胞，透過第二型主要組織相容複合體 (MHC class II)，直接活化器官接受者血液中 CD4-T 細胞，及透過第一型主要組織相容複合體 (MHC class I)，直接活化器官接受者血液中 CD8-T 細胞，進而產生細胞毒殺作用，因而破壞外來器官。間接路徑，乃是器官接受者抗原呈現細胞 (antigen presenting cell，例如 dendritic cell)，將外來器官之抗原，呈現給器官接受者淋巴組織中 CD4 及 CD8-T 細胞，進而產生細胞毒殺作用，因而破壞外來器官。

異種器官移植之急性細胞性排斥，也類似異體器官移植，有直接路徑及間接路徑之排斥機制。異種皮膚移植，是研究異種器官移植之急性細胞性排斥，很好的實驗模式。將豬皮移植至 Recombinase-activating gene-1-deficient 小鼠 (缺少 mature B & T cells) 數週後，再以人類淋巴細胞重建小鼠免疫系統，可見到單獨人類 CD4-T 細胞就可以排斥豬皮，這可能透過直接路徑產生排斥 (圖一、圖二)。

第二型人類白血球表面抗原 (human leucocyte antigen class II, HLA-II) 可

調節 T-細胞性之排斥反應，在臨床異體腎臟移植觀察中，只要外來器官和器官接受者間，有一個 HLA-II 相容（例如二者都有相同 HLA-DR2），在短暫免疫抑制劑作用下，此異體腎臟移植成功率很高，並且往後可以不再使用免疫抑制劑。在迷你豬異體腎臟移植觀察中，亦有類似之結果。其理論基礎，在於的 Tolerance 及 Linked suppression 產生。在短暫免疫抑制劑使用後，Tolerance 可能產生，這和 T 細胞的成熟有關，例如 HLA-DR2 器官接受者，其餘體內的 anti- HLA-DR2-T 細胞，於發育過程中，在胸腺中經 negative selection 被去除了。而 Linked suppression，是指器官接受者對 HLA-DR2 產生 Tolerance 之後，可能可以對 HLA-I 等亦產生 Tolerance。（圖三）

第一型血基質氧化酶 (heme oxygenase-1, HO-1) 在生物體內鐵離子代謝的過程中扮演相當重要的角色；除此之外，HO-1 已被證實具有抗發炎。HO-1 在異種器官移植之作用，在一項異種移植的實驗，將倉鼠的心臟移植到老鼠身上，再使用百步蛇的蛇毒血清的抗補體因子 (Cobra Venom Factor, CVF)，以及環孢靈素 (Cyclosporine Rapamycine) 來預防超急性排斥。等到實驗對象存活下之後，將牠們被移植而來的心臟取出，再移植到另一隻老鼠身上，同時不再施打蛇毒血清，而改投予其他的補體和抗體，結果老鼠也存活了七十天。根據實驗結果推論出老鼠移植的心臟在調適過程得到某種保護，以分子學的分析，分離出一種名為 HO-1 (Heme Oxygenase) 的保護基因，可以保護心臟，避免排斥現象的發生，這是在異種器官移植醫學上，避免慢性排斥方法之一。

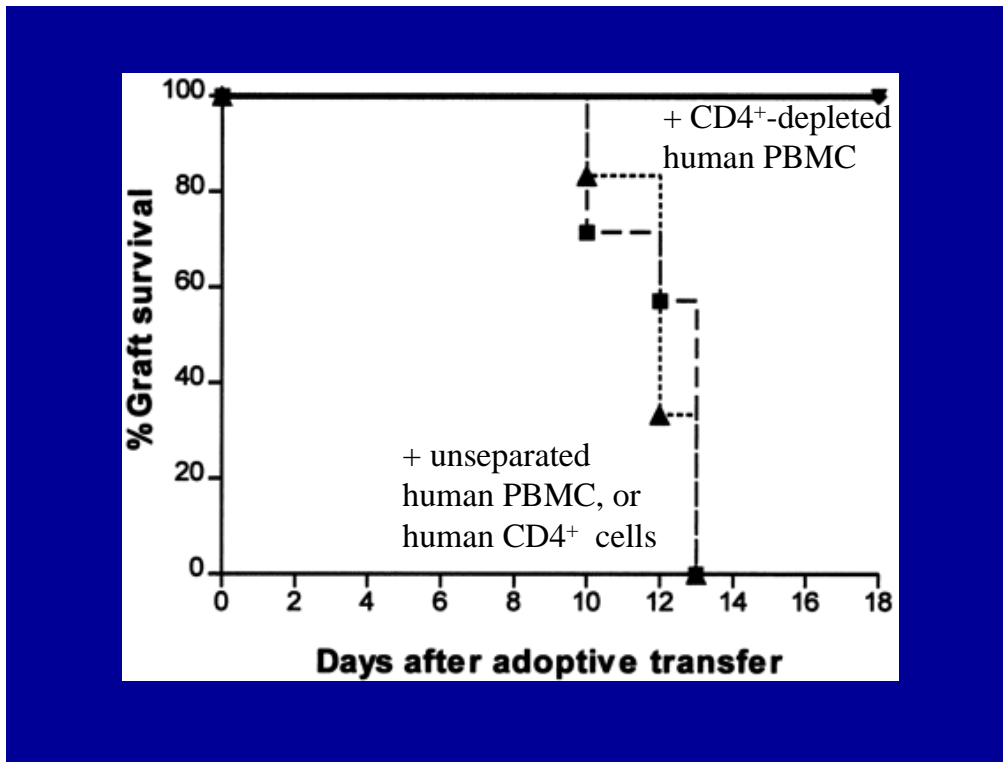
在過去五年由國科會支持計畫，臺灣動物科技研究所(ATIT)已產製兩系 hDAF 基因轉殖豬及七系 HLA-II 基因轉殖豬<sup>A1,2,3,6</sup>。HLA-II 基因轉殖豬之產製非常困難，其成功率在 0.6 - 2 %。並且成功地轉植 HO-1 在豬的身上。目前臺灣動物科技研究所的轉殖豬身上，已經帶有 DAF (抗超急性排斥基因)、HLA-II (抗急性排斥基因) 和 HO-1 (保護基因) 三種基因。過去台大醫學院所作的前臨床實驗，豬淋巴球對人類淋巴球之混合淋巴球培養(MLC)，已經證實使用 HLA-II 基因轉殖豬淋巴球時，其刺激指數(SI)比使用非基因轉殖豬淋巴球時為低，表示 HLA-II 基因轉殖豬引起之急性細胞性排斥反應程度減緩不少<sup>A4,5</sup>。

計畫目的：

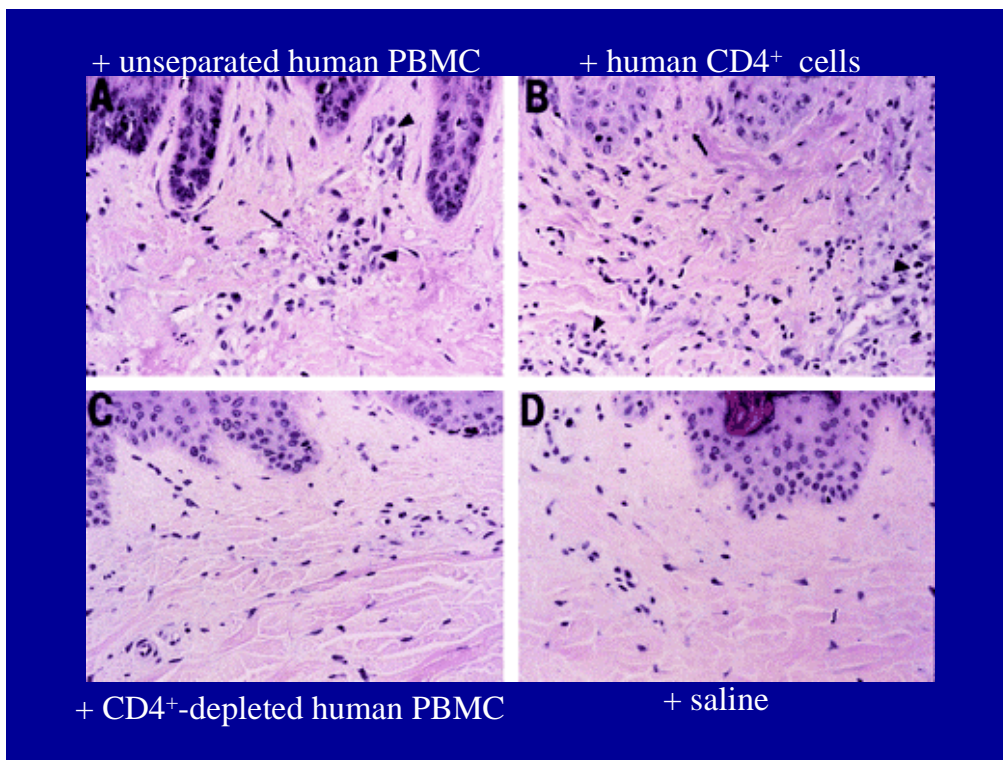
本研究計畫之目的，乃是利用臺灣動物科技研究所(ATIT)產製之 HLA-DR 基因轉殖小鼠與豬，進行異種移植時急性細胞性排斥之研究。實驗模式一 是以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚，移植於 HLA-DR、HO-1、HLA-DR/HO-1 小鼠背部，以觀察是否有 Tolerance 誘發。實驗模式二是以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚，移植於喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID 小鼠背部，三週之後，以 hPBMC (human peripheral blood mononuclear cell) 注射入 SCID 小鼠腹腔 (SCID 小鼠成為 hPBMC-SCID 小鼠)，模擬人類單核白血球排斥豬皮的過程，以觀察是否有 Tolerance 誘發。以上述二項實驗模式，檢驗 HLA-DR、HO-1 基因轉殖豬皮膚是否可以減緩異體移植之急性細胞性排斥。

所有基因轉殖小鼠與豬均以 PCR、Southern blot、RT-PCR、FACS、Immunohistochemical stain 進行分析 (圖四、圖五)。前臨床試驗則進行相關 cytokines 分析 (TNF-alpha, IL-2, IL-6 等)，與病理切片分析 (H&E stain, Immunohistochemistry stain for CD4、CD8 cells 等)。

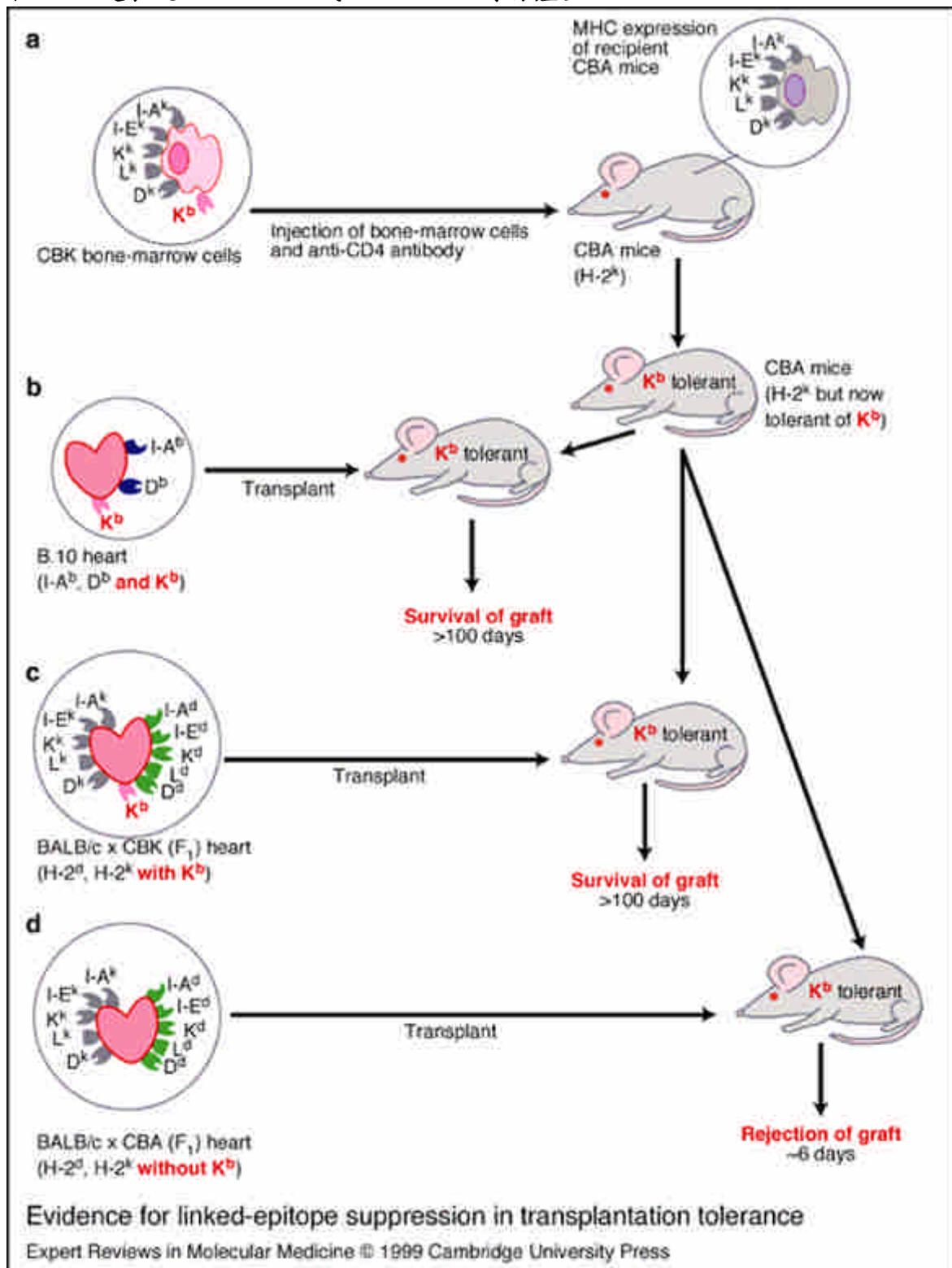
圖一、將豬皮移植至 Recombinase-activating gene-1-deficient 小鼠（缺少 mature B & T cells）數週後，再以人類淋巴細胞重建小鼠免疫系統，可見到單獨人類 CD4<sup>+</sup>-T 細胞就可以排斥豬皮，這可能透過直接路徑產生排斥。



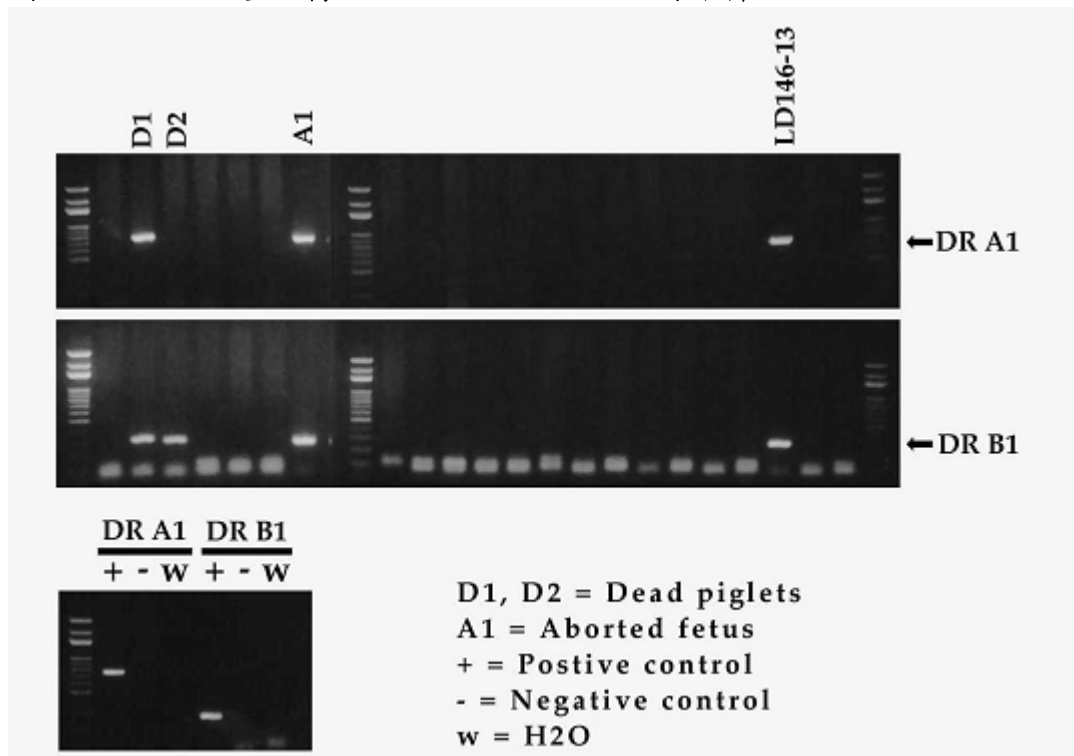
圖二、單獨人類 CD4<sup>+</sup>-T 細胞就可以排斥豬皮



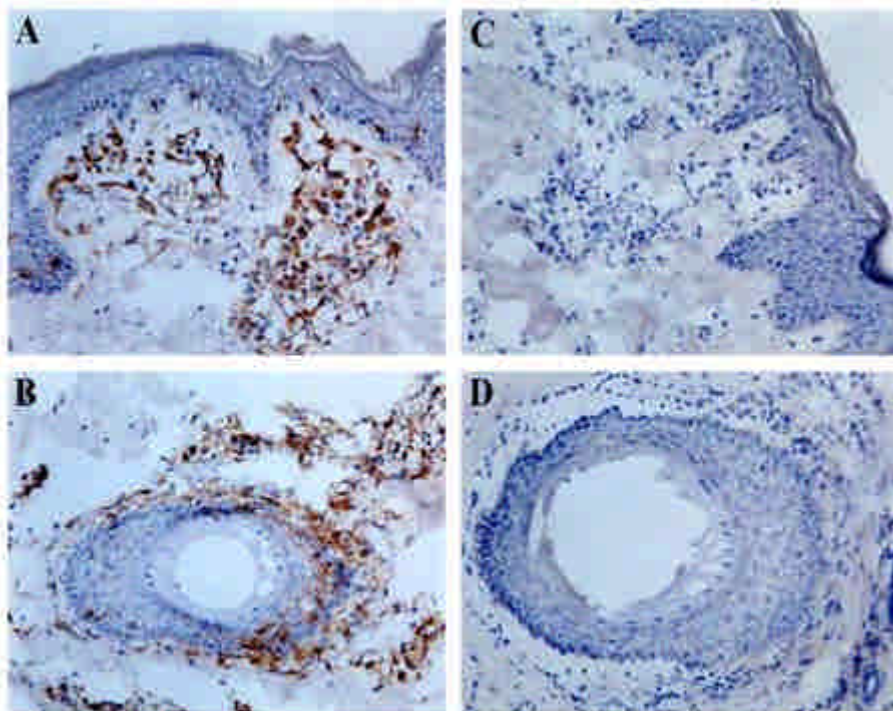
圖三、而 Linked suppression, 是指器官接受者對  $K^b$  產生 Tolerance 之後, 可能可以對和  $K^b$  一起表現之  $I-A^b$ 、 $D^b$  或  $H-2^d$ 、 $H-2^k$  等亦產生 Tolerance。



圖四、HLA-DR 基因轉殖豬以 Western blot 進行分析



圖五、HLA-DR 基因轉殖豬以 Immunohistochemical stain 進行分析



## 期刊論文

1. Tu, Ching-Fu, T. Sato, M. Hagihara, K.-H. Lee, Y.C. Lee, C.N. Weng, R. Chu, K. Tsuji, C.J. Lee, 1998. The expression of HLA-DP antigen on peripheral blood mononuclear cells of HLA-DP transgenic pigs. *Transplant. Proc.* 30 (7A): 3502-3. (SCI; NSC86-2621-B-059-001 A21 and NSC86-2621-B-059-002 A21) (SCI)
2. Tu, Ching-Fu, K. Tsuji, K.-H. Lee, R. Chu, T.J. Sun, Y.C. Lee, C.N. Weng, C.J. Lee, 1999. Generation of HLA-DP transgenic pigs for the study of xenotransplantation. *Int. Surg.* 84:176-182. (SCI; NSC85-2321-B-059-013 A21, NSC85-2321-B-059-014 A21, NSC86-2621-B-059-001 A21, and NSC86-2621-B-059-002 A21) (SCI)
3. Tu, Ching-Fu, Hsieh SL, Lee JM, Yang LL, Sato T, Lee KH, Weng CN, Mao SJ, Tsuji K, Lee CJ. 2000. Successful generation of transgenic pigs for human decay-accelerating factor and human leucocyte antigen DQ. *Transplant Proc.* 32(5): 913-5. (SCI)
4. Lee, J.-M, Ching-Fu Tu, K. Tsuji, Y.C. Lee, C.J. Lee. 2000. The effective antigen presentation of human MHC on the lymphocyte of HLA DPw4 transgenic pig: examination with xenogenic mixed lymphocyte culture and primed lymphocyte test. *Transplant. Proc.*32: 7. (SCI , in press)
5. Lee, J.-M., Ching-Fu Tu, P.-W. Yang, K.-H. Lee, K. Tsuji, M.-K. Tsai, R. J. Chen, C.-Y. Hu, R.-P. Hsieh, H.-C. Tai, B.-L Chiang, C.-N. Weng, Y.-C. Lee, C.J. Lee. Reduction of human-to-pig cellular response by alteration of porcine MHC with human HLA DPw0401 exogenes. *Transplantation*, 73(2): 193-197. (SCI)
6. Tu Ching-Fu, Yang L.-L., Lee J.-M., Sato T., Lee K.H., Weng C.-N., Mao S.J.T., Tsuji K., Lee C.J. 2000. The expression of HLA-DP antigen on the organs and tissues of HLA-DP transgenic pigs. (in preparation) (SCI)

## 貳、材料及方法 (Subjects and Methods)

一、材料：(1) HLA-DR 基因轉殖豬：帶 HLA-DR 基因。

(2) 非基因轉殖豬。

(3) HLA-DR 基因轉殖鼠：帶 HLA-DR 基因。

(4) HO-1 基因轉殖鼠：帶 HO-1 基因。

(5) HLA-DR/HO-1 雙基因轉殖鼠：帶 HLA-DR/HO-1 雙基因。

(6) 喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID

(severe combined immune deficiency) 小鼠。

(7) hPBMC (human peripheral blood mononuclear cell)。

1. 基因轉殖小鼠與豬的產製：由臺灣動物科技研究所(ATIT)負責產製及分析，目前已經產製帶 HLA-DR 基因之基因轉殖小鼠與豬。
2. 所有基因轉殖小鼠與豬均以 PCR、Western blot、RT-PCR、FACS、Immunohistochemical stain 進行分析 (圖四、圖五)。
3. HLA-DR 基因：可調節 T 細胞之細胞性排斥反應。
4. HO-1 基因：具有 anti-inflammation, anti-apoptosis 反應。
5. SCID 小鼠的取得：SCID 小鼠將向台灣大學醫學院實驗動物中心購買，並由臺灣動物科技研究所(ATIT)實驗動物中心代為照顧。
6. hPBMC 的取得：由帶 HLA-DR 基因之志願者抽血，經 Ficoll 溶液分離，取出 Buffy Coat Layer，即為 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)。HLA-DR 志願者乃經 HLA typing 確認。

## 二、實驗步驟：

### 1、實驗模式一：

- a. 實驗組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於 HLA-DR、HO-1、HLA-DR/HO-1 基因轉殖鼠背部。於豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小鼠，作切片檢查及血液檢查。實驗組預計每次完成各十五隻 HLA-DR、HO-1、HLA-DR/HO-1 基因轉殖鼠之皮膚移植。
- b. 對照組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於非基因轉殖鼠背部。於豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小鼠，作切片檢查及血液檢查。對照組預計每次完成十五隻 HLA-DR 基因轉殖鼠之皮膚移植。
- c. 實驗組與對照組小鼠為 little mates。
- d. 檢測項目：
  - (i) 皮膚排斥時間。
  - (ii) 病理變化：H&E 染色。
  - (iii) 細胞激素：TNF- $\alpha$ 、IL-6 (使用 ELISA 方法)。
  - (iv) 免疫細胞：CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>，及 CD8<sup>+</sup> T 細胞 (使用 Flow Cytometry 方法)。

註：皮膚移植沒有接通血管，故沒有超急性排斥的發生。

## 2、實驗模式二：

- a. 實驗組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID 小鼠背部，三週之後，以 hPBMC (human peripheral blood mononuclear cell) 注射入 SCID (severe combined immune deficiency) 小鼠腹腔，使 SCID 小鼠成為 hPBMC-SCID 小鼠。於豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小鼠，作切片檢查及血液檢查。實驗組預計完成十二隻 SCID 小鼠之皮膚移植。
- b. 對照組 (1)：以非基因轉殖豬皮膚移植至於喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID 小鼠背部，三週之後，以 hPBMC 注射入 SCID 小鼠腹腔 (使 SCID 小鼠成為 hPBMC-SCID 小鼠)。於豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小鼠，作切片檢查及血液檢查。對照組 (1) 預計完成十二隻 SCID 小鼠之皮膚移植。
- c. 對照組 (2)：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植至於喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID 小鼠背部，不以 hPBMC 注射入 SCID 小鼠腹腔。於皮膚移植後使用短暫免疫抑制劑 (Rapamycin, 二週)。於豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小鼠，作切片檢查及血液檢查。對照組 (2) 預計完成十二隻 SCID 小鼠之皮膚移植。
- d. 實驗組與對照組小鼠為 little mates。
- e. 檢測項目：
  - (i) 皮膚排斥時間。
  - (ii) 病理變化：H&E 染色。
  - (iii) 細胞激素：TNF- $\alpha$ 、IL-6 (使用 ELISA 方法)。
  - (iv) 免疫細胞：CD4+CD25+，及 CD8+ (使用 Flow Cytometry 方法)。註：皮膚移植沒有接通血管，故沒有超急性排斥的發生。

## 三、研究方法：

1. 豬之照顧與麻醉：基因轉殖豬及的非基因轉殖豬的產製與照顧，由臺灣動物科技研究所(ATIT)負責，依照臺灣動物科技研究所的實驗動物標準操作程序，照顧豬及進行實驗。取豬皮膚時，於動物科技研究所手術室進行，使用 Atropine 及 Ketamine 做麻醉誘導，使用靜脈注射 Thiopental 麻醉豬，Thiopental 劑量為 1 mg/kg IV。以手動取皮刀 (Dermatome) 取豬皮 (Tangential excision of skin)。豬的取皮傷口，以優碘藥膏塗抹及以消毒紗布覆蓋，二週後經表皮新生而癒合。
2. HLA-DR 基因轉殖鼠之照顧與麻醉：HLA-DR 基因轉殖鼠的產製與照顧，由臺灣動物科技研究所(ATIT)負責，依照臺灣動物科技研究所的實驗動物標準操作程序，照顧 HLA-DR 基因轉殖鼠及進行實驗。HLA-DR 基因轉殖鼠的麻醉，使用 Ketamine 藥劑(劑量為 40-150 mg/kg、IM)，加上 Diazepam 藥劑(劑量為 3-5 mg/kg、IM)。
3. SCID 小鼠之照顧與麻醉：SCID 小鼠將向台灣大學醫學院實驗動物中心購買，並由台灣大學醫學院實驗動物中心代為照顧。依照台灣大學醫學院實驗動物中心的實驗動物標準操作程序，照顧 SCID 小鼠及進行實驗。豬皮膚移植於 SCID 小鼠背部的手術，及以 hPBMC 注射入 SCID 小鼠腹腔的操作，皆在台灣大學醫學院實驗動物中心的抽風櫃操作室進行。SCID 小鼠的麻醉，使

- 用 Ketamine 藥劑(劑量為 40-150 mg/kg、IM)，加上 Diazepam 藥劑(劑量為 3-5 mg/kg、IM)。
4. HLA-DR 基因轉殖鼠與 SCID 小鼠之安樂死：Cervical Dislocation。
  5. 豬皮之取得及備製：由台灣養豬科學研究所取得的豬，在麻醉後，以手動取皮刀 (dermatome) 取得裂層豬皮(split-thickness skin graft)，千分之十英寸，將此取下的裂層豬皮包在 normal saline 紗布中。
  6. 植皮手術：乃將 1 X 1 cm 的新鮮豬皮，移植到小白鼠背部肌膜（去掉全層皮膚）上。於豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小鼠，作切片檢查及血液檢查。
  7. hPBMC 的取得：由帶 HLA-DR 基因之志願者抽血，經 Ficoll 溶液分離，取出 Buffy Coat Layer，即為 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)。HLA-DR 志願者乃經 HLA typing 確認。
  8. 建立 hPBMC-SCID 小鼠：以  $10^8$  hPBMC 注射入 SCID 小鼠腹腔。（參考資料 *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 5256-5262.）
  9. 皮膚排斥時間：排斥與否很容易由皮膚外觀判別。未被排斥之皮膚呈現原本膚色、柔軟、不會脫落，被排斥之皮膚呈現黑暗色、乾焦收縮狀、易脫落。（Criteria of Skin Rejection：使用 Score for skin graft rejection：0 = skin grafts intact, soft, and white; 1 = soft with slight redness; 2 = mild induration with slight to severe redness; 3 = moderate induration, areas of scab formation, severe redness; 4 = severe induration, diffuse scab formation, obvious necrosis. Grade 3 is the minimal score at which grafts were considered to be rejected. Skin grafts receiving a grade 3 or higher did not spontaneously recover after initial injury。參考資料 *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 5256-5262. Human CD4<sup>+</sup> T Cells Mediate Rejection of Porcine Xenografts.)
  10. 小白鼠血液之抽取、保存與分析：於豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小鼠，由小鼠眼窩後組血管抽取定量之血液 (1-0.5 ml)，保存於 -70°C 的冰庫以供日後檢驗。使用 ELISA 方法檢驗 TNF- $\alpha$ 、IL-6 細胞激素的變化。
  11. 豬皮組織切片檢查：定期切下的豬皮組織切片，一部分以 formalin 固定，之後以 hematoxylin and eosin 染色，在光學顯微鏡下檢查細胞形態的改變。
  12. 豬皮排斥反應之組織切片圖像：未被 hPBMC-SCID 小鼠排斥的豬皮組織切片圖像，呈現很少淋巴球細胞侵潤。被 hPBMC-SCID 小鼠排斥的豬皮組織切片，在 hPBMC 重建後 7 至 14 天內可見較明顯且較多淋巴球細胞侵潤。（Criteria of infiltration：使用 Graded for extent of infiltration：0=leukocytes equal or less than in normal skin (i.e., only rare perivascular inflammatory cells); 1=sparse perivascular infiltrates above baseline; 2=pronounced perivascular infiltrate around most vessels or patchy perivascular inflammation with some involvement of interstitium; 3=dense perivascular infiltrates with some interstitial dermal inflammation; 4=sheets of inflammatory cells filling and obscuring the dermis。參考資料 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, pp. 8767-8772, August 1997. Pig but not human interferon- $\gamma$  initiates human cell-mediated rejection of pig tissue *in vivo*.)  
(Criteria of dermal microvascular injury：Dermal microvascular injury 定義為 endothelial cell loss, fibrin deposition in the vessel wall, and/or intravascular thrombosis，使用 Scale for dermal microvascular injury：0=all vessels patent

and uninvolved; 1=fewer than 25% of vessels show injury; 2=at least 50% of vessels show injury; 3=75% of vessels show injury; 4=all discernable vessels show injury. 參考資料 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, pp. 8767-8772, August 1997. Pig but not human interferon- $\gamma$  initiates human cell-mediated rejection of pig tissue *in vivo*)

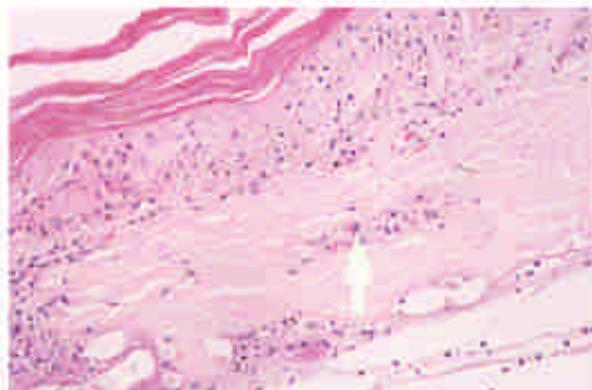
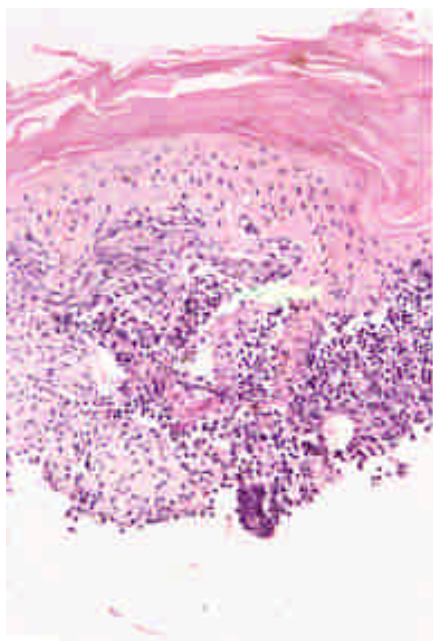
13. 統計分析: 以基因轉殖豬為實驗組, 以非基因轉殖豬為對照組。實驗組與對照組之間的差異, 使用 student's t test 或 the Mann-Whitney test 的統計方法來比較, P 值至少小於 0.05 才視為兩組之間有差異。

## 參、結果 (Results)

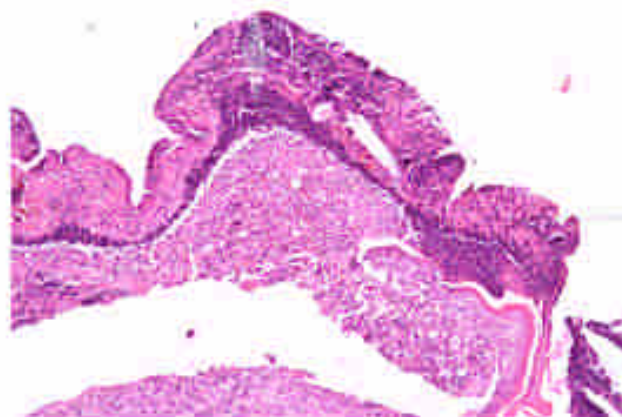
### 一、先期實驗之結果：

1. 已進行豬皮移植至小白鼠背部之先期實驗: 共完成 20 對 little mates 之試驗 (實驗組: HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植至 HLA-DR 基因轉殖小鼠背部, 及對照組: HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植至非基因轉殖小鼠背部, 實驗組與對照組小鼠為 little mates)。
2. 豬皮組織切片檢查及小白鼠血液檢查: 豬皮移植後第一天、第三天、第七天、第十天、第十四天各犧牲二對配對之小白鼠, 。
3. 豬皮組織切片檢查: 以 hematoxylin and eosin 染色下觀察, 所有豬皮都在移植後 7 至 14 天內被小白鼠排斥。實驗組與對照組沒有明顯差異 (圖六)。
4. 豬皮組織切片檢查: 以免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry Stain), 在光學顯微鏡下檢查 CD4、CD8-T 細胞, 豬皮在移植後 7 至 14 天內可見較明顯 CD4、CD8 T 細胞侵潤。但實驗組與對照組沒有明顯差異 (圖七)。
5. 小白鼠血液之分析: IL-2 細胞激素的變化, 可見移植後第三天、第十天各有一個高峰。但實驗組與對照組沒有明顯差異 (圖八)。

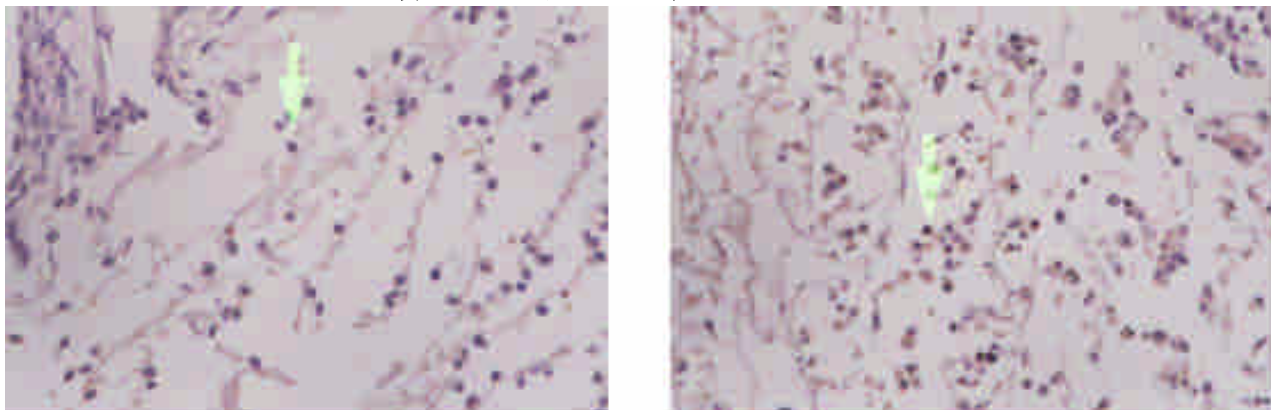
圖六、豬皮移植後第十天，以 hematoxylin and eosin 染色下觀察。所有豬皮都在移植後 7 至 14 天內被小白鼠排斥，可見明顯淋巴球細胞侵潤。實驗組與對照組沒有明顯差異。



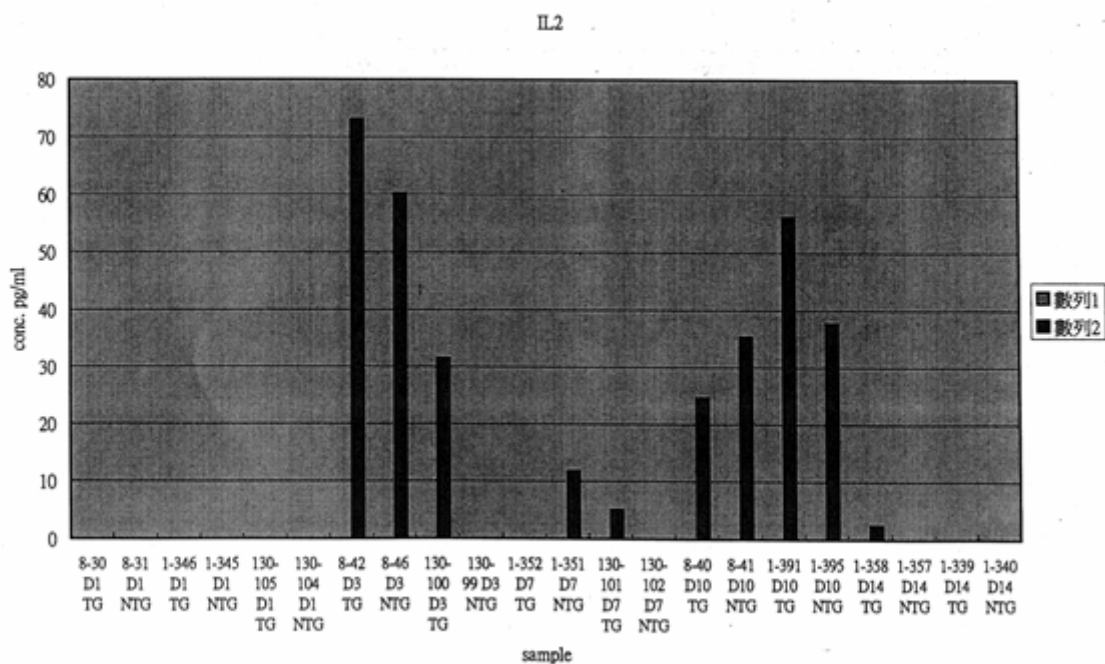
豬皮移植後第十四天，以 hematoxylin and eosin 染色，可見明顯淋巴球細胞侵潤。



圖七、豬皮移植後第十天，以免疫組織化學染色(Immunohistochemistry Stain)，在光學顯微鏡下檢查 CD4、CD8-T 細胞。豬皮在移植後 7 至 14 天內可見較明顯 CD4、CD8-T 細胞侵潤。但實驗組與對照組沒有明顯差異。



圖八、IL-2 細胞激素的變化，可見移植後第三天、第十天各有一個高峰。但實驗組與對照組沒有明顯差異



## 二、期中實驗之結果：

### 1. 實驗模式一：

(a.) 實驗組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚，移植於 HLA-DR 基因轉殖鼠背部，每組各完成 15 隻小鼠實驗。

(b.) 對照組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於非基因轉殖鼠背部，每組各完成 15 隻小鼠實驗。

(c.) 實驗組與對照組小鼠為 little mates。

### 2. (a.) 實驗組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚，移植於 HLA-DR 基因轉殖鼠背部，每組各完成 15 隻小鼠實驗。

(b.) 對照組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於非基因轉殖鼠背部，每組各完成 15 隻小鼠實驗。

(c.) 實驗組與對照組小鼠為 little mates。

### 3. (a.) 實驗組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚，移植於 HLA-DR/HO-1 雙基因轉殖鼠背部，每組各完成 15 隻小鼠實驗。(圖九)

(b.) 對照組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於非基因轉殖鼠背部，每組各完成 15 隻小鼠實驗。(圖九)

(c.) 實驗組與對照組小鼠為 little mates。(圖九)

### 4. 有些小鼠術後幾日死亡，可能原因是術中或術後脫水。經過術後腹腔注射 Lactic Ringer Solution 或 Normal Saline Solution 後，小鼠術後死亡情形大幅減少。

### 5. 豬皮組織切片檢查及小鼠血液檢查：豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小鼠。(圖九)

### 6. 豬皮移植前之 HLA-DR 基因轉殖豬皮組織切片檢查：以免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry Stain)，證明 HLA-DR 基因成功轉殖至豬皮。和小鼠皮膚組織切片比較，豬皮組織切片的特徵是表皮層較多層，真皮層沒有明顯的毛囊。(圖十)

### 7. 豬皮組織切片檢查：以 hematoxylin and eosin 染色下觀察，所有豬皮都在移植後 14 天內被小鼠排斥，可見明顯淋巴球細胞侵潤。實驗組與對照組沒有明顯差異。(圖十一、十二)

### 8. 小鼠血液之分析: TNF- $\alpha$ 細胞激素的變化，移植後高峰低谷之數值參差不齊，沒有一致的趨勢，故實驗組與對照組沒有辦法區分出差異。IL-6 細胞激素的變化，由於小鼠血液數量太少，不足以進行檢查，故無法做為實驗組與對照組差異之比較依據。(圖十三)

### 9. 免疫細胞：CD8<sup>+</sup>，及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞變化，使用 Flow Cytometry 方法來檢驗。(1)、對照組 CD8<sup>+</sup> T 細胞在豬皮移植後前二天，數值都很低，平均為 2.6%；而在豬皮移植後二天至七天，數值大幅上升，平均為 19.5%，高峰在豬皮移植後七天至十天，可達 53.6%，之後逐漸降低。(2)、實驗組 CD8<sup>+</sup> T 細胞在豬皮移植後前二天，數值都很低，平均為 1.4%；而在豬皮移植後二天至七天，數值大幅上升，平均為 12.4%，高峰在豬皮移植後七天至十天，可達 49.6%，之後逐漸降到正常值 4.54%。(3)、對照組 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞在豬皮移植後十天內，數值變化不大，平均為 6.7%。(4)、實驗組 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞在豬皮移植後十天內，數值變化不大，平均為 6.3%。(圖十四-十七)

圖九、以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於、HLA-DR/ HO-1 雙基因轉殖鼠背部，與以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於非基因轉殖鼠背部，豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各犧牲二對配對之小白鼠。

### Tg swine → Tg/NTg mice

A, Swine: YYDY242-13A (HLA-DR Tg Pig)

B, Mice: Tg (HLA-DR/hHO-1) 15隻/NTg 10隻

C, 移皮大小: 1×1 cm<sup>2</sup>

Date	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 7	Day 10
Mice	Tg	3	3	3	3	3
	NTg	2	2	2	2	2

D, Take pictures (Day 1, Day 2, Day 3, Day 7, Day 10)

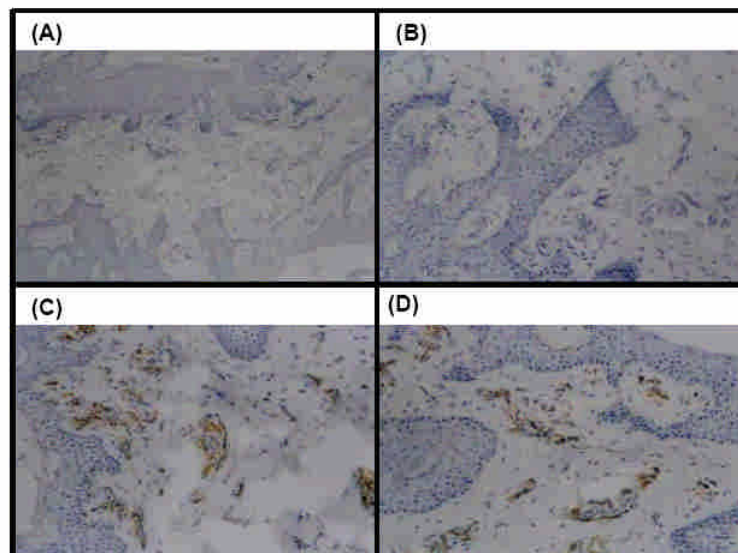
E, ELISA (IL-6, TNF- $\alpha$ )

F, IHC (HLA-DR)

G, H&E staining

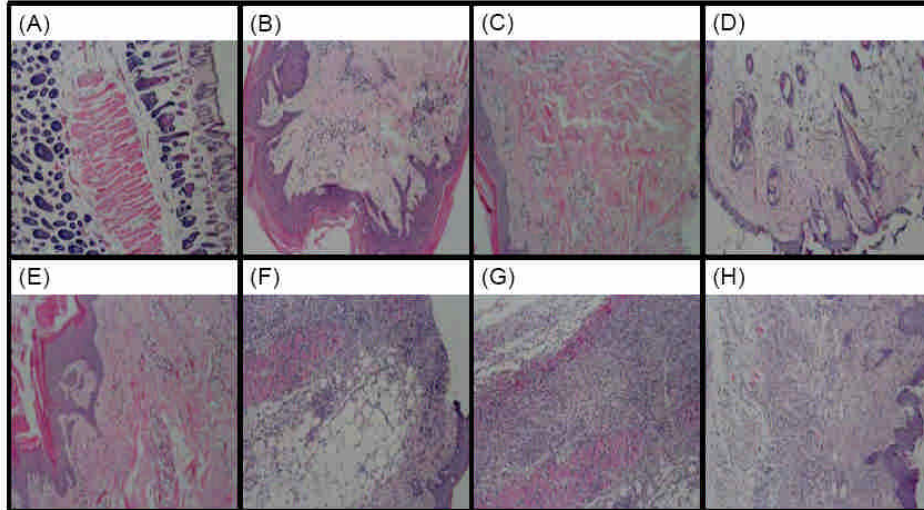
F, Flow cytometry assay (CD4CD25, CD8)

圖十、以免疫組織化學染色(Immunohistochemistry Stain)，證明 HLA-DR 基因成功轉殖至豬皮。豬皮組織切片的特徵是表皮層較多層，真皮層沒有明顯的毛囊。



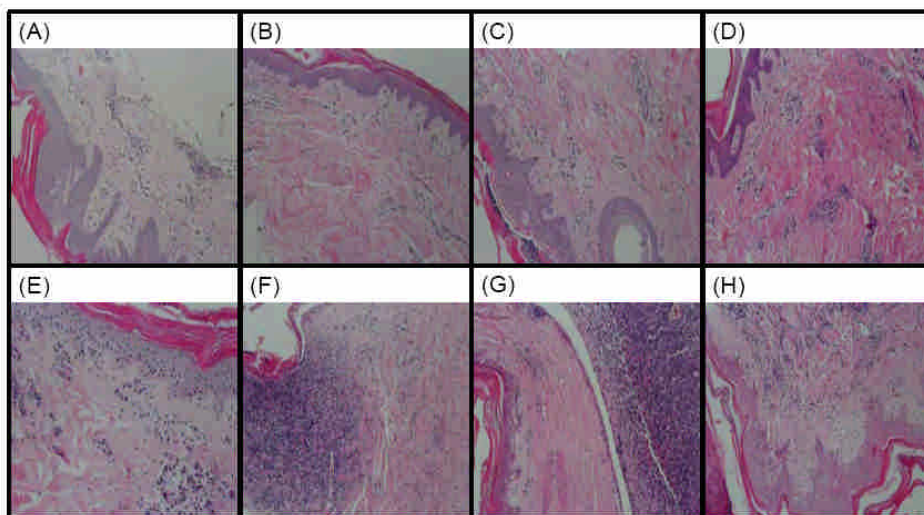
**Figure 1.** Immunohistochemical staining of HLA-DR in transgenic pig's epidermis. (A) and (B) Non-transgenic pig. (C) and (D) HLA-DR-positive staining in transgenic pig (YYDY242-13A). Original magnification ×100 (A); ×200 (B), (C) and (D).

圖十一、對照組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於非基因轉殖鼠背部，豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各小鼠。以 hematoxylin and eosin 染色下觀察，所有豬皮都移植後在 14 天內被小鼠排斥，可見明顯淋巴球細胞侵潤。實驗組與對照組沒有明顯差異。



**Figure 4.** H&E staining of transgenic porcine skin grafts harvested from non-transgenic mice in different days. (A) mouse skin, (B) porcine skin, (C) and (D) Day 1, (E) Day 3, (F) and (G) Day 7, (H) Day 10. Original magnification  $\times 100$  (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G) and (H).

圖十二、實驗組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於 HLA-DR、HO-1、HLA-DR/HO-1 基因轉殖鼠背部，豬皮移植後第一天、第二天、第三天、第七天、第十天各小鼠。以 hematoxylin and eosin 染色下觀察，所有豬皮都移植後在 14 天內被小鼠排斥，可見明顯淋巴球細胞侵潤。實驗組與對照組沒有明顯差異。



**Figure 5.** H&E staining of transgenic porcine skin grafts harvested from transgenic mice in different days. (A) Day 1, 146-841 (HLA-DR); (B) Day 1, 146-844 (hHO-1); (C) Day 2, 146-842 (HLA-DR); (D) Day 2, 146-843 (HLA-DR/hHO-1); (E) Day 7, 146-898 (HLA-DR); (F) Day 7, 146-904 (hHO-1); (G) Day 7, 146-902 (HLA-DR/hHO-1); (H) Day 10, 146-911 (hHO-1). Original magnification  $\times 200$  (E);  $\times 100$  (A), (B), (C), (D), (F), (G) and (H).

圖十三、TNF- $\alpha$ 細胞激素的變化，數值參差不齊，實驗組與對照組沒有辦法區分出差異。IL-6細胞激素的變化，由於小鼠血液數量太少，不足以進行檢查。

ELISA TNF- $\alpha$ (pg/ml)

Day	HLA-DR	hHO-1	HLA-DR/hHO-1	NTg
1	7.31	12.14	10.89	12.83
2	35.36	2.96	6.09	16.63
3	4.83	10.89	13.38	5.45
7	19.59	14.14	15.39	11.04
10	13.52	13.52	20.36	10.42

ELISA IL-6(pg/ml)

Day	HLA-DR	hHO-1	HLA-DR/hHO-1	NTg
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	87.54	1.01
3	99.25	ND	ND	ND
7	410.27	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND

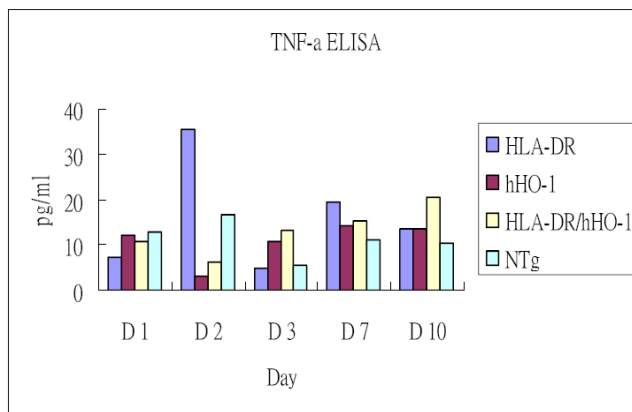


Figure 2. ELISA analysis of the amount of TNF- $\alpha$  for skin-grafted mice serum in different days.

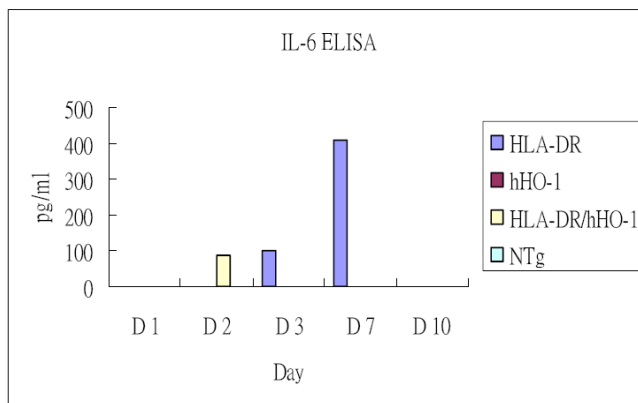
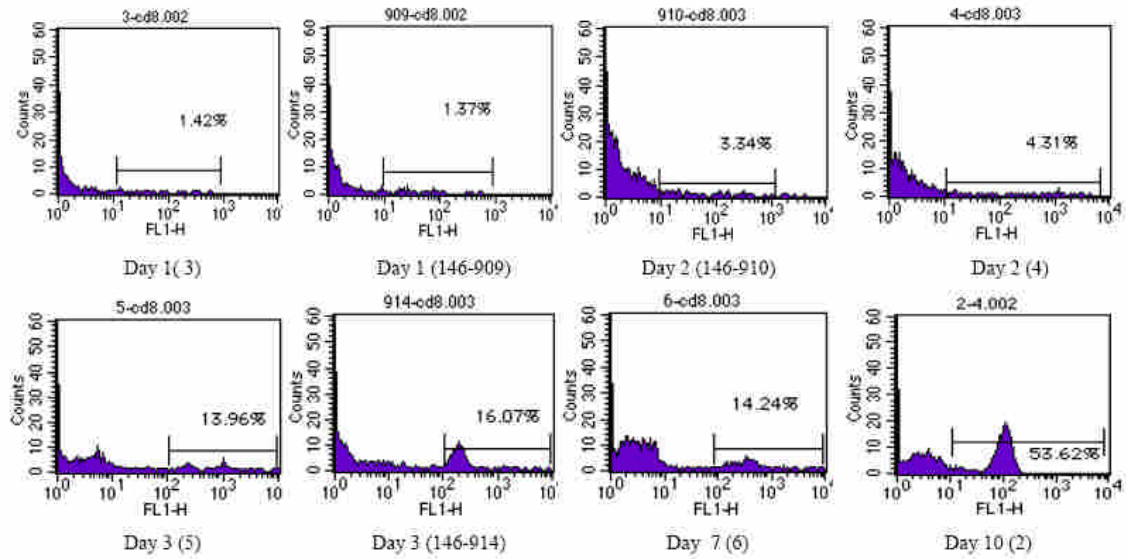


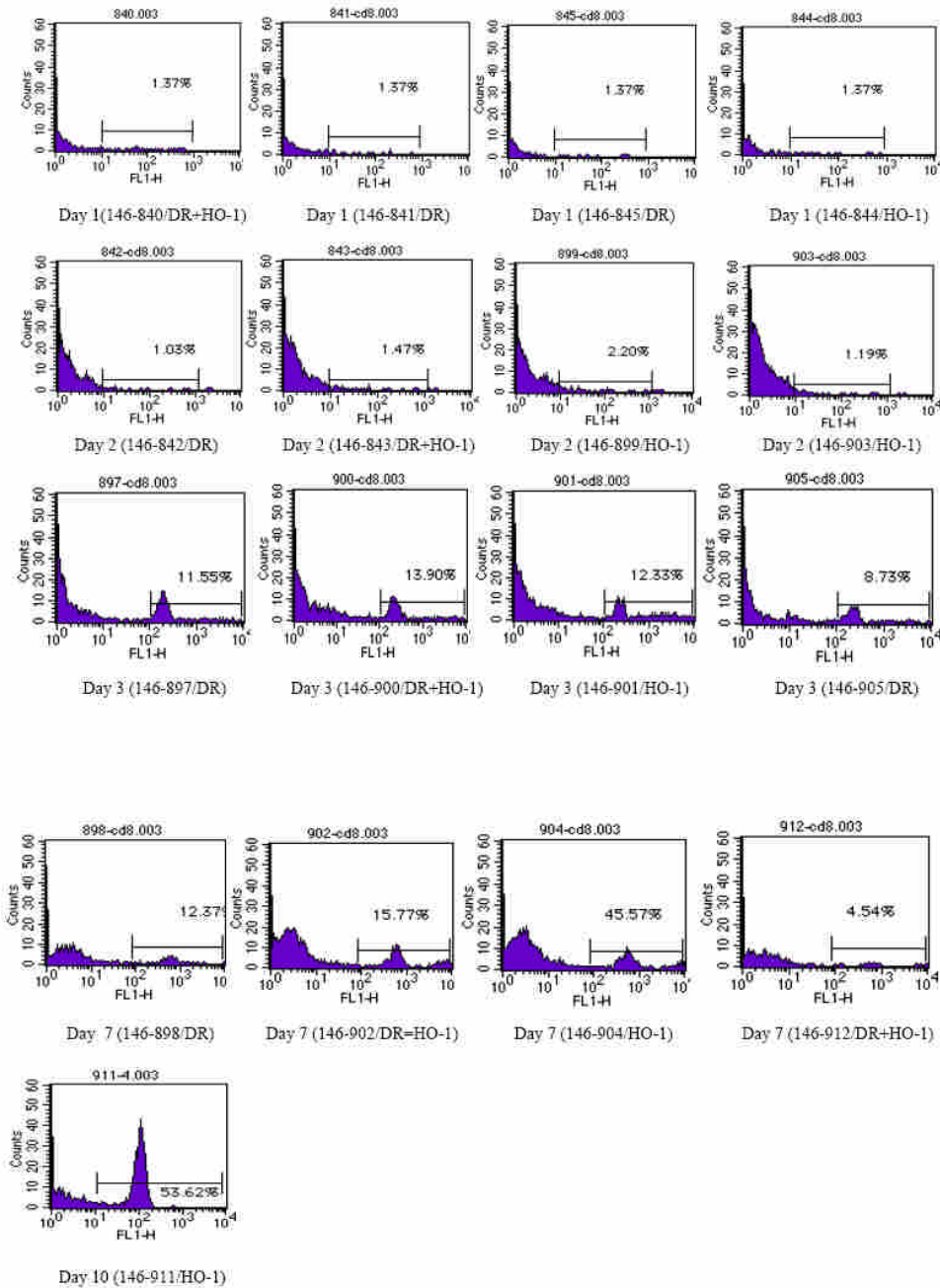
Figure 3. ELISA analysis of the amount of IL-6 for skin-grafted mice serum in different days.

圖十四、CD8+ T細胞變化使用 Flow Cytometry 方法來檢驗。對照組 CD8+ T細胞在豬皮移植後前二天，數值都很低，平均為 2.6%；而在豬皮移植後二天至七天，數值大幅上升，平均為 19.5%，高峰在豬皮移植後七天至十天，可達 53.6%，之後逐漸降低。



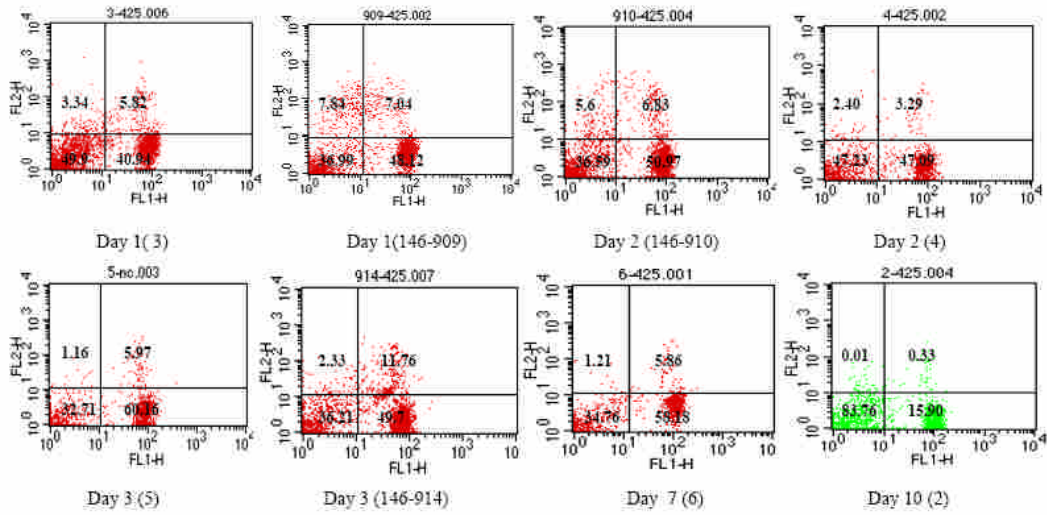
**Figure 6.** The expression level of CD8 for each non-transgenic mouse in different days was determined by using anti-CD8  $\alpha$ -FITC antibody and analyzed with flowcytometer.

圖十五、CD8+ T細胞變化使用 Flow Cytometry 方法來檢驗。實驗組 CD8+ T細胞在豬皮移植後前二天，數值都很低，平均為 1.4%；而在豬皮移植後二天至七天，數值大幅上升，平均為 12.4%，高峰在豬皮移植後七天至十天，可達 49.6%，之後逐漸降到正常值 4.54%。



**Figure 8.** The expression level of CD8 for each transgenic mouse in different days was determined by using anti-CD8  $\alpha$ -FITC antibody and analyzed with flowcytometer.

圖十六、CD4+CD25+ T 細胞變化使用 Flow Cytometry 方法來檢驗。對照組 CD4+CD25+ T 細胞在豬皮移植後十天內，數值變化不大，平均為 6.7%。



**Figure 7.** The expression level of CD4CD25 for each non-transgenic mouse in different days was determined by using anti-CD4-FITC antibody and anti-CD25-RPE antibody and analyzed with flowcytometer.

圖十七、CD4+CD25+ T 細胞變化使用 Flow Cytometry 方法來檢驗。實驗組 CD4+CD25+ T 細胞在豬皮移植後十天內，數值變化不大，平均為 6.3%。

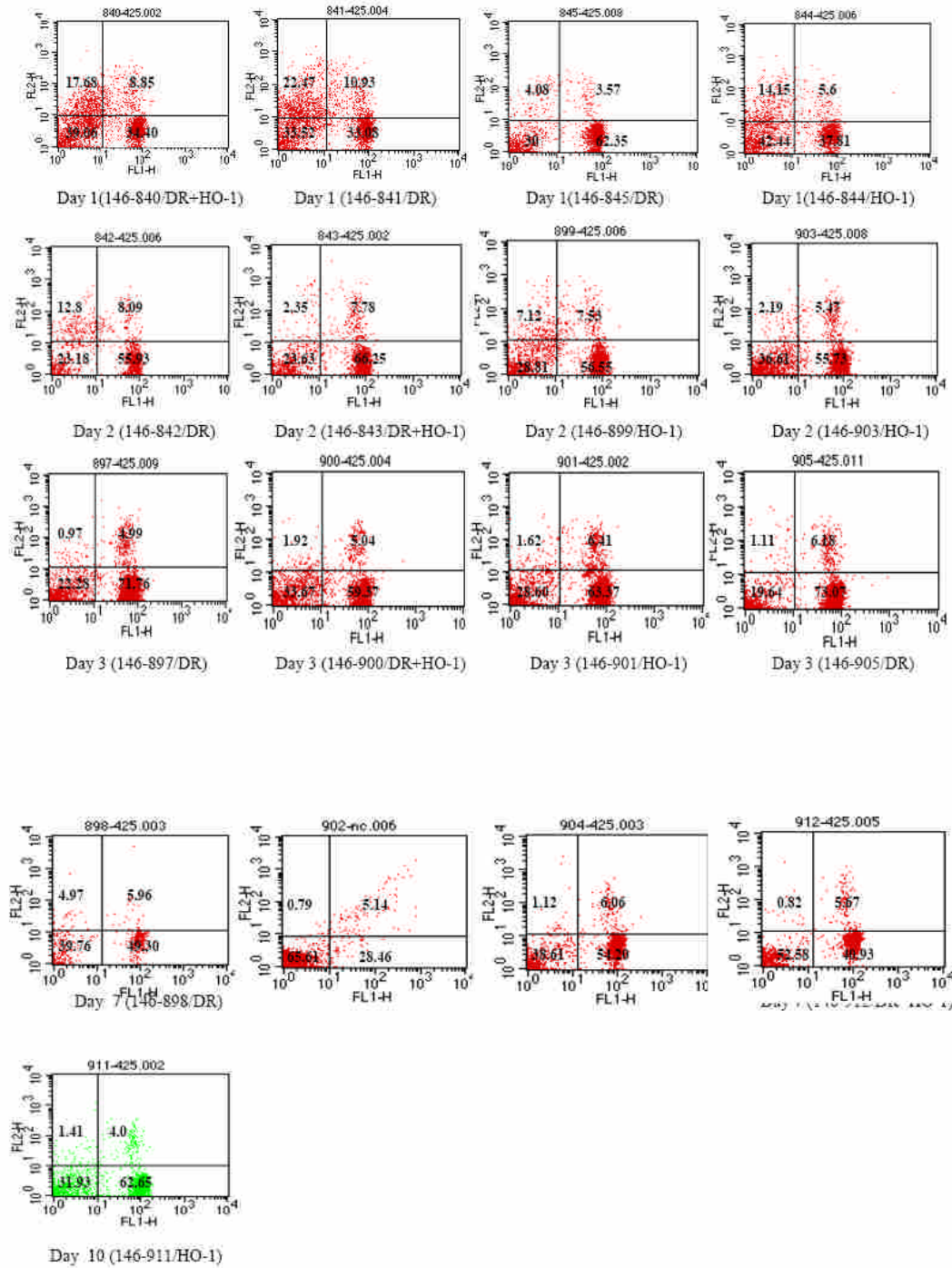


Figure 9. The expression level of CD4CD25 for each transgenic mouse in different days was determined by using anti-CD4-FITC antibody and anti-CD25-RPE antibody and analyzed with flowcytometer.

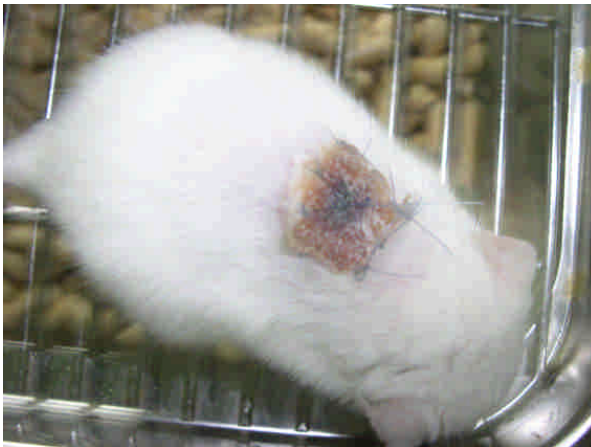
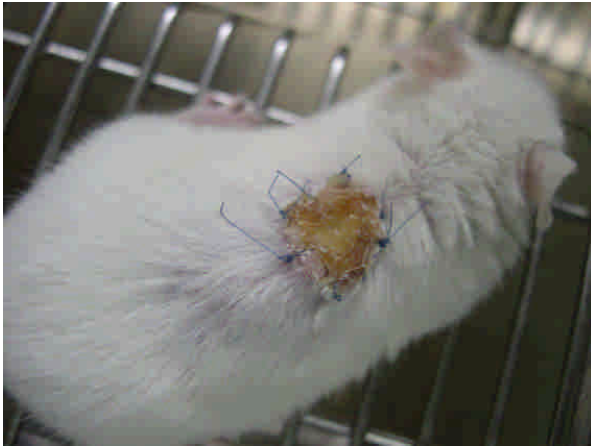
## 二、期中實驗之結果：

### 實驗模式二：

(a.) 對照組 (2)：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植至於喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID 小鼠背部，不以 hPBMC 注射入 SCID 小鼠腹腔。於皮膚移植後第十天、第二十八天各犧牲六隻小白鼠，作切片檢查及血液檢查。對照組 (2) 目前完成十二隻 SCID 小鼠之皮膚移植 (圖十八)。以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植至於喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID 小鼠背部之資料正整理中。

(b.) 實驗組：以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID 小鼠背部，三週之後，以 hPBMC (human peripheral blood mononuclear cell) 注射入 SCID 小鼠腹腔，使 SCID 小鼠成為 hPBMC-SCID 小鼠。於皮膚移植後第十天、第二十八天各犧牲六隻 hPBMC-SCID 小鼠，作切片檢查及血液檢查。預計完成十二隻 hPBMC-SCID 小鼠之皮膚移植。實驗組尚未完成。

圖十八、以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植至於喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID 小鼠背部，不以 hPBMC 注射入 SCID 小鼠腹腔。上、下圖：於豬皮膚移植後第二十一天，豬皮膚表面部分因壞死而硬化。



### 三、後續需要完成之工作項目

1. 皮膚排斥時間：使用短暫免疫抑制劑下，以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於 HLA-DR 基因轉殖鼠背部，皮膚排斥時間應該延長。使用短暫免疫抑制劑下，HLA-DR 基因轉殖豬皮膚，未被 hPBMC-SCID 小鼠排斥的時間，應該遠長於非基因轉殖豬皮膚，呈現統計學上顯著差異。
2. 豬皮組織切片檢查：使用短暫免疫抑制劑下，以 hematoxylin and eosin 染色下觀察，HLA-DR 基因轉殖豬皮膚，應該呈現未被 hPBMC-SCID 小鼠排斥的圖像，即很少淋巴球細胞侵潤；非基因轉殖豬皮膚，在 hPBMC 重建後 7 至 14 天內可見較明且較多淋巴球細胞侵潤。實驗組與對照組應該呈現統計學上顯著差異。
3. 豬皮組織切片檢查：使用短暫免疫抑制劑下，以免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry Stain)，在光學顯微鏡下檢查 CD4、CD8-T 細胞，HLA-DR 基因轉殖豬皮膚，應該呈現未被 hPBMC-SCID 小鼠排斥的圖像，即很少 CD4、CD8-T 細胞侵潤，遠少於非基因轉殖豬皮膚。實驗組與對照組應該呈現統計學上顯著差異。
4. 免疫細胞：使用短暫免疫抑制劑下，CD8<sup>+</sup>，及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞變化，使用 Flow Cytometry 方法來檢驗。實驗組 CD8<sup>+</sup> T 細胞在豬皮移植後數值應該都很低，CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞應該在豬皮移植後三十天後，數值逐漸增加。
5. HLA-II 基因轉殖豬皮膚，移植至人體時。應該可以減緩不少急性細胞性排斥反應程度。

四、對於學術研究、國家發展及其他應用方面之貢獻：

1. 建立模擬人類單核白血球排斥豬皮的動物試驗，檢驗 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚是否可以預防異體移植之急性細胞性排斥。
2. 多種基因轉殖豬 hDAF, HLA-II 之產製成功，使用基因轉殖豬器官之動物試驗及前臨床試驗，必刻不容緩地進行，以求證基因遺傳工程產製之豬器官，可否代替人類器官，普遍地被使用在人體移植上，挽救瀕臨死亡邊緣之末期器官衰竭病人，並解決人類器官捐贈短缺之問題。

五、對於參與工作人員之訓練：

1. 增進工作人員對異體器官移植 (allotransplantation)，及異種器官移植 (xenotransplantation) 中，急性細胞性排斥反應的認識。
2. 增進工作人員操作 SCID 小鼠實驗之經驗。增進工作人員操作 ELISA、Flow Cytometry 檢驗，及操作免疫組織化學染色之經驗。
3. 增進工作人員操作 hPBMC 分離之經驗、及建立 hPBMC-SCID 小鼠實驗模式之經驗。

## 肆、討論 (Discussion)

1. 由上述實驗推論，以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於 HLA-DR、HO-1、HLA-DR/HO-1 基因轉殖鼠背部（實驗組），或以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植於非基因轉殖鼠背部（對照組），可以以肉眼觀察，加上豬皮組織切片在 hematoxylin and eosin 染色下觀察，可以判定，所有豬皮都在移植後 14 天內被小鼠排斥，可見明顯淋巴球細胞侵潤。實驗組與對照組沒有明顯差異（圖十一、十二）。
2. TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 細胞激素的變化，移植後之數值參差不齊，沒有一致的趨勢，無法區分實驗組與對照組差異，故不是好指標。
3. 由 Flow Cytometry 數值看出，無論實驗組或對照組，CD8+ T 細胞在豬皮移植後前二天，數值都很低，平均為 1.4% - 2.6%；而在豬皮移植後二天至七天，數值大幅上升，平均為 12.4% - 19.5%，高峰在豬皮移植後七天至十天，可達 49.6% - 53.6%，之後逐漸降到正常值 4.54%。CD4+CD25+ T 細胞在豬皮移植後十天內，數值變化不大，平均為 6.3% - 6.7%。
4. 由 CD8+，及 CD4+CD25+ T 細胞變化推論，所有豬皮都在移植後 14 天內被排斥，主要是自移植後第三天起，被增加的小鼠 CD8+ T 細胞排斥掉；豬皮被排斥掉的時間，約在移植後第七天至第十天。
5. 由於 CD4+CD25+ T 細胞在移植後第十天仍未增加，故無法發揮調節或抑制 CD8+ T 細胞的作用。（註：CD4+CD25+ T 細胞增加的時間，是在移植後三十天以上）。
6. 小鼠術後幾日死亡情形，可經由術後腹腔注射 Lactic Ringer Solution 或 Normal Saline Solution 後，大幅減少小鼠術後死亡。
7. 往後實驗，應該增加免疫抑制劑的使用，抑制 CD8+ T 細胞排斥作用，直到 CD4+CD25+ T 細胞增加，法發揮調節或抑制 CD8+ T 細胞的作用。
8. 以 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚移植至於喪失 T/B/NK 細胞功能之 SCID 小鼠背部之資料正整理中。
9. 目前已經建立模擬人類單核白血球排斥豬皮的動物試驗，以檢驗 HLA-DR 基因轉殖豬皮膚是否可以預防異體移植之急性細胞性排斥，實驗結果將整理成論文，投稿相關期刊。

## 五、參考文獻 (References)

1. Tu, Ching-Fu, T. Sato, M. Hagihara, K.-H. Lee, Y.C. Lee, C.N. Weng, R. Chu, K. Tsuji, C.J. Lee, 1998. The expression of HLA-DP antigen on peripheral blood mononuclear cells of HLA-DP transgenic pigs. *Transplant. Proc.* 30 (7A): 3502-3. (SCI)
2. Tu, Ching-Fu, K. Tsuji, K.-H. Lee, R. Chu, T.J. Sun, Y.C. Lee, C.N. Weng, C.J. Lee, 1999. Generation of HLA-DP transgenic pigs for the study of xenotransplantation. *Int. Surg.* 84:176-182. (SCI)
3. Tu, Ching-Fu, Hsieh SL, Lee JM, Yang LL, Sato T, Lee KH, Weng CN, Mao SJ, Tsuji K, Lee CJ. 2000. Successful generation of transgenic pigs for human decay-accelerating factor and human leucocyte antigen DQ. *Transplant Proc.* 32(5): 913-5. (SCI)
4. Lee, JM, Ching-Fu Tu, K. Tsuji, Y.C. Lee, C.J. Lee. 2000. The effective antigen presentation of human MHC on the lymphocyte of HLA DPw4 transgenic pig: examination with xenogenic mixed lymphocyte culture and primed lymphocyte test. *Transplant. Proc.*32: 7. (SCI , in press)
5. Lee, J.-M., Ching-Fu Tu, P.-W. Yang, K.-H. Lee, K. Tsuji, M.-K. Tsai, R. J. Chen, C.-Y. Hu, R.-P. Hsieh, H.-C. Tai, B.-L Chiang, C.-N. Weng, Y.-C. Lee, C.J. Lee. 2002, Reduction of human-to-pig cellular reponse by alteration of porcine MHC with human HLA DPw0401 exogenes. *Transplantation* 73(2):193-197. (SCI)
6. Tu Ching-Fu, Yang L.-L., Lee J.-M., Sato T., Lee K.H., Weng C.-N., Mao S.J.T., Tsuji K., Lee C.J. 2000. The expression of HLA-DP antigen on the organs and tissues of HLA-DP transgenic pigs. (in preparation) (SCI)
7. Mason, D. W., P. J. Morris. 1986. Effector mechanisms in allograft rejection. *Annu. Rev. Immunol.* 4:119.
8. Pober, J. S.. 1988. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology. *Am. J. Pathol.* 133:426.
9. Jr Auchincloss, H., D. H. Sachs. 1998. Xenogeneic transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 16:433.
10. Dorling, A., R. I. Lechler. 1998. T cell-mediated xenograft rejection: specific tolerance is probably required for long term xenograft survival. *Xenotransplantation* 5:234.
11. Murray, A. G., M. M. Khodadoust, J. S. Pober, A. L. Bothwell. 1994. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity* 1:57.
12. Rollins, S. A., S. P. Kennedy, A. J. Chodera, E. A. Elliott, G. B. Zavoico, L. A. Matis. 1994. Evidence that activation of human T cells by porcine endothelium involves direct recognition of porcine SLA and costimulation by porcine ligands for LFA-1 and CD2. *Transplantation* 57:1709.
13. Yamada, K., D. H. Sachs, H. DerSimonian. 1995. Human anti-porcine xenogeneic T cell response: evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J. Immunol.* 155:5249.

14. Dorling, A., R. Binns, R. Lechler. 1996. Cellular xenoresponses: observation of significant primary indirect human T cell anti-pig xenoresponses using co-stimulator-deficient or SLA class II-negative porcine stimulators. *Xenotransplantation* 3:11.
15. Shishido, S., B. Naziruddin, X. Xu, T. Howard, T. Mohanakumar. 1998. Indirect recognition of porcine xenoantigens by human CD4<sup>+</sup> T cell clones. *Transplantation* 65:706.
16. Tsang, Y. T. M., P. E. Stephens, S. T. Licence, D. O. Haskard, R. M. Binns, M. K. Robinson. 1995. Porcine E-selectin: cloning and functional characterization. *Immunology* 85:140.
17. Watier, H., I. Vallee, G. Thibault, A. C. Lalmanach, M. Lacord, Y. Gruel, Y. Lebranchu, H. Salmon, P. Bardos. 1994. Effect of human inflammatory cytokines on porcine endothelial cell MHC molecule expression: unique role for TNF- $\alpha$  in MHC class-II induction. *Transplant. Proc.* 26:1152
18. Batten, P., M. H. Yacoub, M. L. Rose. 1996. Effect of human cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes. *Immunology* 87:127.
19. Sultan, P., A. G. Murray, J. M. McNiff, M. I. Lorber, P. W. Askenase, A. L. Bothwell, J.S. Pober. 1997. Pig but not human interferon- $\gamma$  initiates human cell-mediated rejection of pig tissue in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8767.
20. Murray, A. G., P. Petzelbauer, C. C. Hughes, J. Costa, P. Askenase, J. S. Pober. 1994. Human T-cell-mediated destruction of allogeneic dermal microvessels in a severe combined immunodeficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9146.
21. Sultan, P., J. S. Schechner, J. M. McNiff, P. S. Hochman, C. C. W. Hughes, M. I. Lorber, P. W. Askenase, J. S. Pober. 1997. Blockade of CD2-LFA-3 interactions protects human skin allografts in immunodeficient mouse/human chimeras. *Nat. Biotechnol.* 15:759.
22. Murray, A. G., J. S. Schechner, D. E. Epperson, P. Sultan, J. M. McNiff, C. C. W. Hughes, M. I. Lorber, P. W. Askenase, J. S. Pober. 1998. Dermal microvascular injury in the human peripheral blood lymphocyte reconstituted-severe combined immunodeficient (HuPBL-SCID) mouse/skin allograft model is T cell mediated and inhibited by a combination of cyclosporine and rapamycin. *Am. J. Pathol.* 153:627.
23. Lorber, M. I., J. H. Wilson, M. E. Robert, J. S. Schechner, N. Kirkiles, H. Y. Qian, P. W. Askenase, G. Tellides, J. S. Pober. 1999. Human allogeneic vascular rejection after arterial transplantation and peripheral lymphoid reconstitution in severe combined immunodeficient mice. *Transplantation* 67:897.
24. Tellides, G., N. C. Kirkiles, D. A. Tereb, J. S. Schechner, J. H. Wilson, M. I. Lorber, J. S. Pober. 1998. Transplantation models in human/mouse chimeras. , , , , , ed. *Organ Transplantation in Rats and Mice: Microsurgical Techniques and Immunological Principles* 615. Springer-Verlag, Berlin.
25. Pescovitz, M. D., J. K. Lunney, D. H. Sachs. 1984. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J. Immunol.* 133:368.
26. Collins, T., L. A. Lapierre, W. Fiers, J. L. Strominger, J. S. Pober. 1986.

- Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:446.
27. Pujol-Borrell, R., I. Todd, M. Doshi, G. F. Bottazzo, R. Sutton, D. Gray, G. R. Adolf, M. Feldmann. 1987. HLA class II induction in human islet cells by interferon- $\gamma$  plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 326:304.
  28. Pfizenmaier, K., P. Scheurich, C. Schlüter, M. Krönke. 1987. Tumor necrosis factor enhances HLA-A,B,C and HLA-DR gene expression in human tumor cells. *J. Immunol.* 138:975.
  29. Maher, S. E., K. Karmann, W. Min, C. C. W. Hughes, J. S. Pober, A. L. M. Bothwell. 1996. Porcine endothelial CD86 is a major costimulator of xenogeneic human T cells. *J. Immunol.* 157:3838.
  30. Yan, H. C., H. M. Delisser, J. M. Pilewski, K. M. Barone, P. J. Szklut, X. J. Chang, T. J. Ahern, P. Langer-Safer, S. M. Abelda. 1994. Leukocyte recruitment into human skin transplanted onto severe combined immunodeficient mice induced by TNF- $\alpha$  is dependent on E-selectin. *J. Immunol.* 152:3053.
  31. Harrison, A. A., C. J. Stocker, P. T. Chapman, Y. T. Tsang, T. Y. Huehns, R. H. Gundel, A. M. Peters, K. A. Davies, A. J. George, M. K. Robinson, et al 1997. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular endothelial cells in immune and nonimmune inflammatory reactions in the skin. *J. Immunol.* 159:4546.
  32. Springer, T. A.. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:30.
  33. Robinson, L. A., L. Tu, D. A. Steeber, O. Preis, J. L. Platt, T. F. Tedder. 1998. The role of adhesion molecules in human leukocyte attachment to porcine vascular endothelium: implications for xenotransplantation. *J. Immunol.* 161:6931.
  34. Herrlinger, K. R., V. Eckstein, W. Müller-Ruchholtz, K. Ulrichs. 1996. Human T-cell activation is mediated predominantly by direct recognition of porcine SLA and involves accessory molecule interaction of ICAM1/LFA1 and CD2/LFA3. *Transplant. Proc.* 28:650.
  35. Varani, J., M. J. Bendelow, D. E. Sealey, S. L. Kunkel, D. E. Gannon, U. S. Ryan, P. A. Ward. 1988. Tumor necrosis factor enhances susceptibility of vascular endothelial cells to neutrophil-mediated killing. *Lab. Invest.* 59:292.
  36. Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, G. R. Majeau, W. Fiers, R. S. Cotran, Jr M. A. Gimbrone. 1986. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4533.
  37. Movat, H. Z., C. E. Burrowes, M. I. Cybulsky, C. A. Dinarello. 1987. Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor: synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury. *Am. J. Pathol.* 129:463.
  38. Alter, B. J., F. H. Bach. 1990. Cellular basis of the proliferative response of human T cells to mouse xenoantigens. *J. Exp. Med.* 171:333.
  39. Moses, R. D., H. J. Winn, Jr H. Auchincloss. 1992. Evidence that multiple defects in

cell-surface molecule interactions across species differences are responsible for diminished xenogeneic T cell responses. *Transplantation* 53:203.

40. Fodor, W. L., B. L. Williams, L. A. Matis, J. A. Madri, S. A. Rollins, J. W. Knight, W. Velander, S. P. Squinto. 1994. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11153.
41. Wrighton, C. J., W. R. Hofer, T. Moo, R. Eytner, F. H. Bach, C. Ferran. 1996. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I $\alpha$ B $\alpha$ , an inhibitor of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J. Exp. Med.* 183:1013.
42. Bach, F. H., C. Ferran, M. Soares, C. J. Wrighton, J. Anrather, H. Winkler, S. C. Robson, W. W. Hancock. 1997. Modification of vascular responses in xenotransplantation: inflammation and apoptosis. *Nat. Med.* 3:944.
43. Sawada, T., P. A. DellaPelle, J. D. Seebach, D. H. Sachs, R. B. Colvin, J. Iacomini. 1997. Human cell-mediated rejection of porcine xenografts in an immunodeficient mouse model. *Transplantation* 63:1331.
44. Friedman, T., A. Shimizu, R. N. Smith, R. B. Colvin, J. D. Seebach, D. H. Sachs, J. Iacomini. 1999. Human CD4<sup>+</sup> T cells mediate rejection of porcine xenografts. *J. Immunol.* 162:5256.
45. Moses, R. D., R. N. I. Pierson, H. J. Winn, H. J. Auchincloss. 1990. Xenogeneic proliferation and lymphokine production are dependent on CD4<sup>+</sup> helper T cells and self antigen-presenting cells in the mouse. *J. Exp. Med.* 172:567.
46. Restifo, A. C., M. A. Ivis-Woodward, H. M. Tran, P. W. Nickerson, A. M. Lehnert, T. B. Strom, J. R. Chapman, P. J. O'Connell. 1996. The potential role of xenogeneic antigen-presenting cells in T-cell co-stimulation. *Xenotransplantation* 3:141.