



## 줄기세포 기반 수혈용 적혈구 생산

김현옥

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

### Production of Transfusable Red Blood Cells from Stem Cells

Hyun Ok Kim

Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Blood transfusion is a well-established cell therapy. However, blood available for transfusion is a limited resource and is available only through donations by healthy volunteers. Moreover, the perpetual and widespread shortage of blood products, problems related to transfusion transmitted infections, and new emerging pathogens have elicited an increase in demand for artificial blood. Therefore, research for alternative RBC substitutes has begun in the 1960s. Hemoglobin-based oxygen carriers (HBOC) and perfluorocarbon-based oxygen carrier (PBOC) were two popular study subjects; however, research on these substitute candidates was halted due to unsatisfactory results and safety issues, including death, in the 1990s. Since then, worldwide efforts to produce RBC have shifted over to stem cell-derived RBC production using cord blood and G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells, and some progress has been made. In terms of practical usefulness, however, large-scale production and cost effectiveness are still problematic. Recently, human embryonic stem cells (hESC) and human-induced pluripotent stem cells (hiPSC) have shown the potential to produce RBCs as unlimited cell sources. These two methods using hESCs and hiPSCs are also cost-effective since autologous and O, D negative blood RBCs will be used for alloimmunized patients with multiple alloantibodies or rare blood types (high incidence antigens) as well as universal blood production. We will review the current research on *in vitro* RBC production from hematopoietic stem cells and pluripotent stem cells and assess future directions in this field. (Korean J Blood Transfus 2016;27:209-219)

**Key words:** Artificial blood, Stem cells, In vitro production

#### 서론

인공지능이 소개되고 과학기술이 눈부시게 발

전하고 있으나 아직까지 수혈용 혈액은 헌혈로만 공급이 가능하다. 전 세계적으로 약 112.5백만 단위의 헌혈이 이루어지고 있지만 이중 고소득 국

Received on November 27, 2016. Revised on December 7, 2016. Accepted on December 7, 2016

Correspondence to: Hyun Ok Kim  
Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea  
Tel: 82-2-2228-2444, Fax: 82-2-313-0956, E-mail: hyunok1019@yuhs.ac

This project was supported by a grant from the Korean Healthcare Technology R&D Project, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea (HI10C1740).

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.  
Copyright ©2016 The Korean Society of Blood Transfusion

가에서 반을 사용하고 있으며, 이는 전 세계 인구의 19%에 해당하는 숫자이다.<sup>1)</sup> 아프리카에서는 27개국에서 연간 4백만 단위의 혈액 공급이 가능하여, 국가 간의 혈액사용량과 혈액관리는 극과극의 차이를 보이고 있는 것이 현실이기도 하다. 수혈로 인한 가장 큰 보건상의 위협은 감염전파이다. 세계는 이미 수혈감염으로 에이즈, 광우병의 경험을 갖고 있으며 최근에는 에볼라 바이러스, 지카바이러스, 메르스 전파를 하는 코로나 바이러스 등 새로운 바이러스 감염이 출현할 때마다 모든 바이러스는 혈액을 통해 감염될 수 있다는 공포를 갖고 있다. 이는 수혈의 안전성에 큰 위협이 되고 있으며, 이를 예방하기 위해 많은 국가에서는 필사적인 노력과 막대한 검사비용을 지출하고 있다. 또한 수혈의 가장 위험한 요소 중의 하나는 ABO 혈액형 부적합 수혈이다. 이에 대한 교육과 시스템 지원으로 실수의 오류는 많이 감소되었으나 아직까지도 수혈 사망사고의 중요한 원인이 되고 있다.<sup>2)</sup>

국내에서도 최근 들어 심한 혈액부족 상황이 이어지고 있다. 헌혈량 감소는 이미 세계적인 추세이다. 헌혈 인구인 젊은 층의 감소, 혈액사용 대상자인 노령층의 증가, 개인주의에 의한 헌혈 동기 감소, 새로운 감염질환 출현 등으로 엄격한 헌혈자 선별검사의 강화 등이 그 이유이며, 계절적인 요인인 동절기마다 이런 현상은 반복되고 있다. Park 등<sup>3)</sup>은 2006년도에 보고한 논문에서 10년 내에 혈액부족 상황이 발생할 것을 경고한 바 있으며 2015년도에 60세 이상의 노년층의 혈액사용량이 60세 이하의 환자가 사용하는 혈액량보다 많아질 것이라는 것을 보여주는 예측 그래프를 발표한 바 있다. 수혈용 혈액은 희귀한 혈액 등 아주 특수한 경우를 제외하고는 국가간 혈액교환이 이루어지고 있지 않으며, 전적으로 자국민의 헌혈에 의존해야 하는 자원이다. 따라서 전 세계

적으로 인구의 고령화, 새로운 감염원의 발생 등으로 수혈용 혈액은 장기적으로 30년 내에는 부족할 것이라는 예측과 수혈을 통한 감염전파는 아직도 해결되지 못한 과제로서 국가 간 안전한 혈액을 확보하기 위한 노력은 치열하고 인공혈액을 생산하고자 하는 기술 개발은 세계적으로 계속 경고되는 혈액부족 현상에 대해 어찌면 당연한 과학자들의 열망이기도 하였다.

인공혈액 연구는 1960년대 중반부터 시작되었으며, 헌혈에 의존하는 혈액 대체 물질로 perfluorocarbon과 같은 oxygen carrier 또는 hemoglobin solution과 같은 인공혈액을 개발하였으나 모두 수혈 후 유리산소(oxygen radical)에 의한 장기 독성사고로 더 이상의 개발이 중지된 상태이다.<sup>4)</sup> Erythropoietin은 적혈구 생산을 증진시키는 약물로 만성 빈혈 환자에서 사용이 가능하나 그 기전이 체내에서 스스로 적혈구 생산을 유도시키는 것으로 급성 실험에서는 그 효과를 기대할 수 없으며 악성혈액종양 환자에서 출혈과 같은 부작용을 일으킬 수 있어 그 적용대상이 한정적이다. 그러나 2000년대 들어 줄기세포가 의학 분야에서 재생의학이라는 새로운 패러다임으로 소개되었고 이를 기반으로 하는 많은 연구과제 중 수혈의 학에 종사하는 연구자를 중심으로 줄기세포로부터 적혈구를 생산하고자 하는 연구가 시작되었다.

본 원고에서는 앞부분에서 인공산소운반체의 연구결과를 간단히 소개하고 이 연구가 모두 실패할 수밖에 없었던 이유를 살펴본 후 줄기세포 기반 적혈구 생산기술 개발의 과정과 줄기세포로부터 수혈용 혈액생산을 위해 해결해야 할 부분이 무엇인지 등을 살펴보고 앞으로의 그 발전방향에 대해 고찰하고자 한다.

## 본 론

### 1. 산소운반체(Artificial Oxygen Carriers)의 개발

안전한 혈액 대체물질을 개발하고자 하는 노력은 1960년대 초부터 시작되었으며, 1970년대 이후에는 혈액부족 문제로 인하여 큰 의료회사들이 중심이 되어 적극적으로 개발에 나서게 되었다. 산소를 운반하는 적혈구 기능의 혈액대체물질은 합성유기물인 perfluorocarbon (PFC)을 이용한 perfluorocarbon-based oxygen carrier (PBOC)와 적혈구내의 혈색소를 이용한 hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC) 두 종류가 대표적이다(Fig. 1).

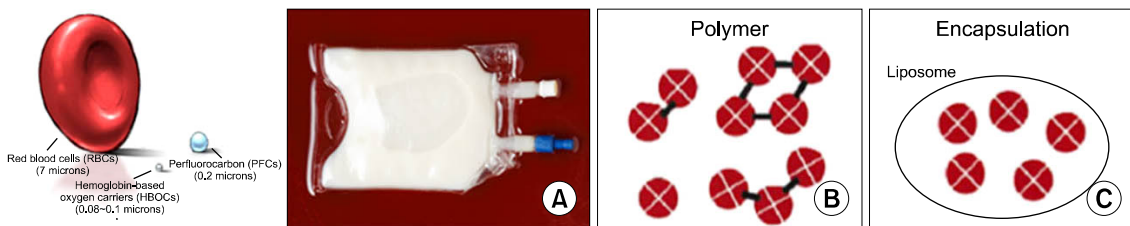
#### 1) Perfluorocarbon-based oxygen carrier (PBOC)

Perfluorocarbon (PFC)은 carbon과 fluorine의 혼합물로서 인체에 무해하고 가스용해도가 높은 합성 유기물이다. PBOC 중 가장 대표적인 상품은 1978년 개발된 Fluosol-DA (Green Cross Co., Osaka, Japan)라는 제품으로 임상실험이 진행되었지만 혈소판감소증, 감기 유사증세, 뇌졸중 등의 부작용과 투여 시 고압의 산소가 필요한 점 등 사용상의 불편함으로 인하여 1994년 생산이 중단되었다. 그 후 같은 제형으로 PFC를 lecithin으로 둘러

싸서 좀 더 안정적인 제3세대 PBOC로 개발된 Oxycte (Oxygen Biotherapeutics, Inc., Costa Mesa, CA, USA)는 혈색소를 변형해서 만든 제품들에 비해 재료 공급에 제한이 없으며 가열로 소독할 수 있는 장점으로 수술 중 수혈량을 줄이려는 목적으로 1992년에 개발되었으나 뇌졸중 유발로 임상시험이 중단되어, 현재 PBOC 제품은 모든 임상시험이 중단된 상태이다.<sup>5)</sup>

#### 2) Hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC)

최초의 HBOC는 적혈구를 깨서 만든 유리 혈색소(free hemoglobin)였는데, 반감기가 짧고, 자유 혈색소로 인한 혈관수축 작용이 심하고, 산소 라디칼의 생성으로 신독성과 고혈압을 유발하였다. 이는 혈색소 분자가 nitric oxide (NO) 분자와 결합하여 혈관 확장 및 혈소판 활성화 억제 기능을 저해하기 때문인 것으로 보고 있다. 이후 nano-medical technology 기술이 접목되면서 혈색소 내 글로빈을 여러 개 연결한 혈색소 중합체의 형태로 Hemopure<sup>®</sup> (Biopure Inc., Cambridge, MA, USA)와 polyHeme<sup>®</sup> (Northfield Laboratories Inc., Evanston, IL, USA) 등이 개발 소개되었으며 이를 좀더 안정화시키기 위해 liposome 형태로 발전시키는 연구를 진행하였으나 너무 크기가 작아 체내에 머무르는 시간이 짧고, 지속적인 유리산소



**Fig. 1.** Comparative size of RBC, perfluorocarbon, and hemoglobin-based oxygen carriers. (A) Emulsion of perfluorocarbon. (B) PolyHb can maintain the patient for 12 h after reaching the hospital. (C) The 3rd generation modified liposome-encapsulated hemoglobin.

의 장기 독성 등으로 다양한 부작용을 유발하고 특히 심장마비 등 가장 치명적인 사망사고 등이 발생하여 현재로서는 거의 사용되지 못하고 있다.<sup>4)</sup> 그러나 혈액대체물질 개발은 기업들이 경험한 실패에도 불구하고 생산가가 저렴하고, 실온이나 냉장 온도에서 1년 이상 보관이 용이하고, 혈액형에 상관없이 사용될 수 있다는 점 등의 장점으로 이 분야의 연구는 계속 진행될 전망이다.

## 2. 줄기세포로부터의 적혈구 생산

“줄기세포 기반 인공혈액 생산” 기술 개발은 인공혈액 개발의 시급성을 알고 있는 수혈의학 전문가이면서 줄기세포 연구를 하고 있는 연구자가 진행할 수 있는 연구로서 각 나라에서 소수 연구자에 의해 진행되고 있다. 현재 대표적인 국외 연구는 미국 국방과학연구소(DARPA), 일본의 리켄 연구소와 일본적십자 혈액원, 영국은 웰컴트러스트사와 에딘버러 대학의 공동연구, 프랑스의 혈액수혈연구소 등에서 진행되고 있다. 최근 중국에서도 줄기세포 기반 적혈구 생산 관련한 연구를 간헐적으로 보고하고 있으나 아직까지는 뚜렷한 연구 성과는 없다.

2000년부터 시작된 줄기세포기반의 인공혈액 생산기술은 세계 각국이 원천기술 선점을 위한 초기단계 연구는 완료되었다. 그러나 시험관내 소량 생산의 성공이며, 수혈의 혈액량 확보를 위해 반드시 필요한 대량생산을 위한 증식 및 배양 기술은 현재 극복하지 못한 상태이며, 대량의 초기 세포원을 확보하기 위해 최근에는 역분화줄기세포를 사용하여 적혈구를 생산하고자 하는 연구로 이동하고 있다.

### 1) 골수, 제대혈 CD34+ 세포로부터의 적혈구 생산

2002년 프랑스 연구팀인 Neildez-Nguyen 등<sup>6)</sup>은 제대혈 CD34+ 세포로부터 적혈구를 만들어 보

고하였으며 이는 줄기세포 기반 적혈구 생산 연구로 최초의 보고이다. 이때 CD34+ 세포로부터 체외 배양된 적혈구는 정상 적혈구와 비슷한 혈액소 농도, 모양, 수명을 지녔지만, 탈핵이 되지 않아 마지막 탈핵 과정은 NOD/SCID mouse 생체에서 시키는 과정을 거쳐야만 했다. 그 후 2005년에 같은 연구팀에서 체외에서 쥐의 중간엽줄기세포와 공배양을 통해 체외배양에서만 탈핵을 시키는 성과를 보고함으로써<sup>7)</sup> 이 배양 방식을 기반으로 적혈구 생산 연구가 시작되었다. 이때 세포원은 제대혈, G-CSF로 가동화된 말초조혈모세포 농축액 등으로부터 CD34+ 세포를 분리하여 사용하였다. 전세계 분쟁 지역에 군인을 파병하고 있는 미국은 미국국방과학연구소에서 “Blood Pharming Project”를 2007년에 시작하였고, 줄기세포로부터 인공혈액 개발을 Artericytes사(Cleveland, OH, USA)에 위탁하여 공동 연구를 진행하였으며,<sup>8)</sup> 적혈구 시제품을 2013년에 출시할 예정이라고 보고한 바 있으나 아직 그 시제품은 출시되지 않고 있다. 한편 일본에서도 줄기세포로부터 적혈구 생산하는 연구를 2006년도에 시작하였으며,<sup>9)</sup> Fujimi 등<sup>10)</sup>이 골수에서 성숙된 적혈구아세포가 대식세포 주변에 많이 모여 있다는 사실에 착안하여 in vitro 조성에서 대식세포와의 공배양을 통해 탈핵율을 높인 연구 보고도 많은 관심을 받았다. 그러나 최근 일본에서는 역분화줄기세포로부터 조혈모세포주를 개발하면서 이를 기본으로 하여 적혈구 분화 기술의 기반 연구에 중점을 두고 있다.

국내에서는 Baek 등<sup>11,12)</sup>의 연구팀이 이 분야의 유일한 연구팀이며, 제대혈로부터 적혈구 생산 기술을 완성하여 발표한 바 있다.<sup>13)</sup> 프랑스 연구팀은 2011년 자가백혈구 성분채집으로부터 얻은 CD34+ 세포로부터 GMP 시설에서 적혈구를 생산하여 HbA 88%, HbF 10.7%인 배양 혈액 2 mL를 인체 내에 성공적으로 수혈한 사례를 처음 보

고함으로써 줄기세포기반으로 생산된 적혈구가 수혈용 혈액으로 적합함을 보여주었다.<sup>14)</sup> 줄기세포기반 초기 연구진행 과정을 Table 1에 요약하였다.<sup>15,16)</sup>

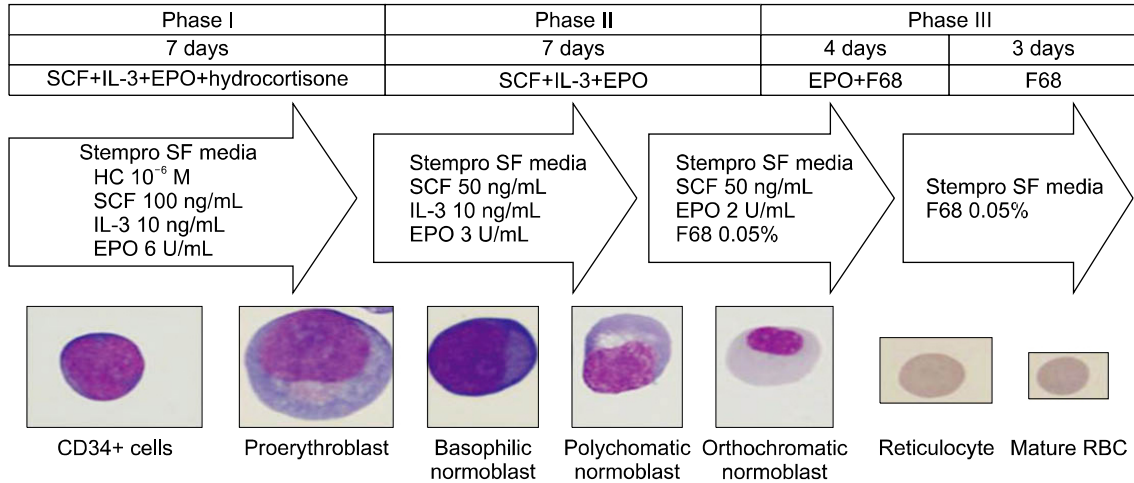
CD34+ 세포로부터 적혈구 분화기술은 연구자마다 조금 다른 배양 분화방법을 소개하고 있으나 첫 번째 단계는 CD34+ 세포를 조혈모세포 증폭 기본 배지에 stem cell factor, IL-3, erythropoietin의 사이토카인을 넣어 다양한 혈액세포로 분화가 가능한 적아구세포로 증폭시키는 단계(7일)이고, 2단계는 적혈구로 계속 분화시키는 과정(7일)이며, 3단계에서는 이를 가속화시키면서 핵을 탈핵시키는 과정이 된다. CD34+ 세포로부터 시작하여 성숙적혈구까지 분화시키는 데는 약 21일 정도 소요된다. 본 저자의 연구실에서 사용하는 RBC 생산 protocol은 Fig. 2에 요약하였다.<sup>13)</sup> 그러

나 제대혈이나 말초혈액으로부터 수혈용 적혈구를 생산하기에는 성체 줄기세포로의 증폭의 한계와 생산 비용에 대한 지적이 시작되었다. 즉, 적혈구 농축액 한 단위에는  $2 \times 10^{12}$ 개의 적혈구가 들어있다. 골수 1 mL에는 약  $2.5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 개의 유핵세포가 들어 있으며, 이중 CD34+ 세포는 1.5% 이하이기 때문에 500 mL의 골수를 채집하면 이 안에 CD34+ 세포는  $18 \sim 150 \times 10^6$ 개가 있다. 말초혈액에는 이보다 조혈모세포가 훨씬 적고, 제대혈인 경우라 하더라도 제대혈 한 단위 용량이 보통 80~200 mL이므로 유핵세포가 약  $6 \sim 10 \times 10^8$ 개 포함되어 있고, CD34+ 세포가 약 2% 정도라고 가정하면  $12 \sim 20 \times 10^6$ 개 정도의 조혈모세포를 얻을 수 있게 된다. 즉 제대혈 한 단위로부터 적혈구 농축액 한 단위에 들어있는 적혈구의 개수를 만들기 위해서는 수백만 배까지의 증폭이

**Table 1.** Chronological history of *in vitro* RBC generation from CD34+ cells

Year	Reference	Cell source	Significant outcome
2002	Neildez-Nguyen et al. <sup>6)</sup>	CB CD34+	First trial of RBC production from cord blood CD34+ cells. Final RBC maturation in NOD/SCID mouse
2005	Giarratana et al. <sup>7)</sup>	CB CD34+ Adult CD34+	Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells
2006	Miharada et al. <sup>9)</sup>	CB CD34+	Development a method to produce enucleated RBCs efficiently in the absence of feeder cells.
2008	Fujimi et al. <sup>10)</sup>	CB CD34+	Generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages
2008	Baek et al. <sup>11)</sup>	CB CD34+	The first report on generating clinical-grade RBCs by in vitro culture with human MSCs
2009	Boehm et al. <sup>15)</sup>	Human PB CD34+	RBC production using peripheral blood
2010	Baek et al. <sup>12)</sup>	CB CD34+	Enhanced enucleation of red blood cells in suspension by electrostatic interactions with culture plates
2011	Timmins et al. <sup>16)</sup>	CB CD34+	Large-scale approaches in RBC production using agitated bioreactor systems
2011	Giarratana et al. <sup>14)</sup>	Leukapheresis CD34+	First clinical trial in transfusion using cultured RBC generated from stem cells under good manufacturing practice conditions

Abbreviations: CB, cord blood; PB, peripheral blood.



**Fig. 2.** Protocol of RBC production from cord blood-derived CD34+ cells.

Abbreviations: HC, hydrocortisone; SCF, stem cell factor; EPO, erythropoietin; F68, poloxamer (reference 13 with permission).

필요한데 이것이 체외배양으로 가능하지 않았을 뿐 아니라 사용해야 하는 배지량이 계산상으로 1,000 L가 필요하므로 현혈로 얻는 혈액과 비교할 때 생산비용에 경쟁력이 없다는 결론에 도달하게 되었다.<sup>17-19)</sup> 물론 bioreactor를 통한 대량생산도 시도하여 보았으나 이 역시 좋은 결과를 얻지 못하였다.<sup>16)</sup> 따라서 연구자들이 새로운 세포원을 생각하게 되었으며 배아줄기세포 또는 역분화줄기세포를 새로운 시작 세포원으로 하여 적혈구를 생산하는 기술로 연구 방향의 전환점을 맞게 되었다.

**2) 배아줄기세포와 역분화줄기세포로부터 적혈구 분화 생산 기술 개발**

줄기세포 기반 적혈구 생산이 경제성을 얻기 위해서는 세포원을 배아줄기세포나 역분화줄기세포로부터 시작해야 한다는 것이 각 국가 연구자의 공통된 견해로 2010년 경부터 줄기세포원이 제대혈이나 말초혈액으로부터 만능줄기세포로

전환되었다. 2008년 일본 Hiroyama 등<sup>20)</sup>이 mouse 배아줄기세포로부터 성숙적혈구를 생산한 연구를 처음 보고하였으며 그 이후에는 인간배아줄기세포와 인간 역분화줄기세포로부터 적혈구를 생산하는 연구가 전세계적으로 동시 다발적으로 보고되기 시작하였다(Table 2).<sup>19)</sup> 또한 이와 동시에 모든 혈액을 줄기세포로부터 만들어진 적혈구로 대체하기 보다는 일부 특수한 상황에서의 혈액시장을 대체할 수 있는 최종 목표를 갖게 되었다. 즉 만능공혈 혈액인 O형 D 음성 현혈자로부터 얻은 혈액으로부터 역분화줄기세포를 얻어 이를 만능공혈 혈액으로 분화시키고, 희귀혈액형 및 복합 항체 보유자로 쉽게 적합한 혈액을 찾을 수 없는 혈액 수급제한 환자를 위해 자가 역분화줄기세포로부터 적혈구를 생산하고자 하는 기술에 연구가 집중되었다.

미국 NIH에 등록된 배아줄기세포주에는 만능공혈자인 O형 D 음성 혈액형인 세포주가 포함되

**Table 2.** Chronological history of *in vitro* RBC generation from human ESCs and human iPSCs

Year	Reference	Cell source	Significant outcome
2008	Lu et al.	hESC	First trial of differentiation mature hESCs into functional oxygen-carrying erythrocytes on a large scale.
2010	Lapillonne et al.	hESC, hiPSCs	First time the complete differentiation of human induced pluripotent stem cells into definitive erythrocytes capable of maturation up to enucleated red blood cells
2011	Chang et al.	hiPSCs	Production of fetal like RBCs(HbF) using hiPSCs produced from three somatic cell types
2011	Dias et al.	hESC, hiPSCs	Demonstrate the feasibility of large-scale production of erythroid cells from fibroblast-derived hiPSCs
2012	Kobari et al.	hiPSCs	Complete terminal erythroid maturation, <i>in vitro</i> in terms of nucleus expulsion and <i>in vivo</i> in terms of hemoglobin maturation from hiPSCs

Abbreviations: hESC, human embryonic stem cell; hiPSC, human induced pluripotent stem cell.

어 있지 않다고 지적된 바 있다.<sup>21)</sup> 즉 제대혈이나 배아줄기세포는 미리 혈액형을 알고 공여 받는 것이 아니고 무작위로 받고 특히 배아줄기세포주를 제조하기까지는 많은 윤리적인 지적이 있기 때문에 이를 얻기에는 어려움이 있음을 뒷받침할 수 있는 자료이기도 하다. 특히 복합 항체에 의한 동종면역이나 희귀혈액을 가진 사람에 대한 적합한 적혈구를 생산해 내기 위한 세포원을 구하는 것은 거의 불가능하다. 이런 면에서 역분화줄기세포인 경우 공여자가 자신일 수도 있으며, 쉽게 만능공혈자로부터 체세포(섬유모세포, 혈액, 소변 등)를 얻을 수 있는 장점이 있다. 연구 초기에 역분화줄기세포를 제작할 바이러스 벡터를 사용하는 경우 바이러스의 문제점과 그 수용의 문제점이 많이 지적되었으나 최근에는 배양 선택 메디아의 발전과 바이러스를 사용하지 않고도 episomal plasmid를 이용하거나 mRNA 전달을 통한 역분화줄기세포를 제작하는 방법이 소개되어 보다 쉽게 역분화줄기세포를 제작하는 단계까지 발전하였다.<sup>17)</sup>

한편 적혈구 분화기술은 줄기세포 단계에서 발

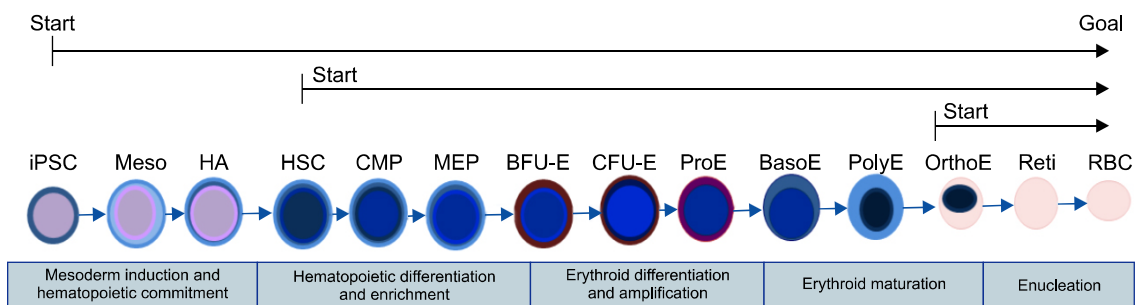
생하는 유전성 혈액질환에도 적용 할 수 있어 2015년, 미국 존스홉킨스 연구진은 겸상적혈구질환자의 혈액으로부터 얻은 단핵세포로부터 유도한 역분화줄기세포에서 돌연변이가 있는  $\beta$ -hemoglobin 유전자를 정상으로 치환한 후, 이 세포로부터 정상적인 적혈구가 생성됨으로 확인하여 보고하였다.<sup>22)</sup> 그러나 이 환자에서 유전자 조작으로 치환된 정상 적혈구로 분화시킨 적혈구 사진은 아직도 핵이 있는 정염성 정적아구(orthochromic normoblast)가 있어 이를 직접 수혈할 수 있는 성숙한 적혈구까지 완벽하게 분화에 성공하지 못한 기술이지만 난치성 유전성 혈액질환에서 병인 규명과 함께 새로운 치료기술을 제안할 수 있는 큰 성과로 평가받고 있다. 줄기세포 기반 적혈구 생산에 관한 연구로 가장 최근에 보고된 참고 문헌으로 Dowey 등<sup>17)</sup>이 발표한 plasmid vector를 사용하여 말초혈액으로부터 CD34+ 세포의 분리 과정 없이 역분화줄기세포를 만드는 연구 논문과 혈액에서 배아줄기세포나 역분화줄기세포를 제작할 때 공배양 세포없이, GMP grade로 적혈구로 분화시키는 과정에서 무혈청 배양 배지를

사용하여 효율 높은 적혈구를 생산을 보고한 Olivier 등<sup>23)</sup>의 논문을 추천한다.

### 3. 적혈구 생산을 위한 역분화줄기세포주 은행 구축

2006년 8월에 일본 교토대학의 신야 야마나카 박사는 생쥐의 피부세포를 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 유전자들로 역분화시켜 만능분화능을 가진 역분화줄기세포를 만드는데 성공했고 그 다음 해에는 인간역분화줄기세포도 제작하여 2012년에 노벨생리의학상을 수상하였다.<sup>24)</sup> 역분화줄기세포는 만능줄기세포로서 배아줄기세포와는 달리 생명에 대한 윤리적인 논란을 불러일으키지 않기 때문에 각종 질병의 병인연구, 신약 발굴, 줄기세포 기반 치료제 개발 등 차세대 세포치료제로서 가장 각광받는 세포가 되었다. 현재 역분화줄기세포 유래 세포 모델은 심장질환에서 정신분열증까지 다양한 질병연구에 사용되고 있음이 이를 뒷받침하고 있다. 줄기세포기반 인공혈액을 생산하려는 연구도 위에서 언급한 이유로 조혈모세포보다는 역분화줄기세포를 세포원으로 사용하여 연

구가 활발히 진행되고 있다(Fig. 3).<sup>18,19)</sup> 이러한 가운데 프랑스의 Douay 연구팀은 동종면역환자나 희귀혈액형을 가진 사람을 위한 역분화줄기세포주 은행을 만드는 것을 제안하였다.<sup>25)</sup> 프랑스에서 10년간 16,486명의 동종면역환자를 대상으로 분석한 결과 단 3명의 역분화줄기세포주를 확보하면 이런 환자의 99%까지 적합한 혈액 공급이 가능하다는 자료와 함께 프랑스의 희귀혈액형 보유 환자를 대상으로 할 때 15명의 O형 희귀혈액형을 갖는 정상인으로부터 역분화줄기세포를 제작하는 경우 거의 100%까지 적합한 혈액을 공급할 수 있음을 계산상으로 보여주었다. 물론 지금까지의 기술이 역분화줄기세포로부터 완전한 수혈용 적혈구를 생산하기 위해서는 대량생산, 탈핵 문제, 안전성과 생산비 문제 등 많은 문제점이 남아있다. 그러나 최종 산물인 적혈구는 HLA 문제가 없어 다른 질환에서의 역분화줄기세포 적용보다 줄기세포 기반 인공혈액 생산은 가장 빠르고 안전하게 사업화 및 임상적용이 가능한 세포치료제로 개발될 수 있다. 따라서 O형 D 음성 인공혈액 생산을 위해 국내에서도 역분화줄기세포



**Fig. 3.** Diagram representing feeder-free and serum-free erythroid differentiation of human pluripotent stem cells. Abbreviations: Meso, mesoderm; HA, hemangioblast; CMP, common myeloid progenitor; MEP, megakaryocyte-erythroid progenitor; BFU-E, burst forming unit-erythroid; CFU-E, colony forming unit-erythroid; ProE, proerythroblast; BasoE, basophilic erythroblast; PolyE, polychromatophilic erythroblast; OrthoE, orthochromatic erythroblast; Retic, reticulocyte.



주 은행 설립에 대해 외국의 연구 사례를 벤치마킹 할 필요가 있다.

## 결론

국민의 건강과 직결되는 안전한 혈액을 안정적으로 공급하고자 하는 노력은 국가 전략 사업의 하나이며, 혈액자원은 시간이 갈수록 점차 부족해지고 있어 인공혈액의 시장성은 매우 큰 미래의 신사업으로 받아들여지고 있다. 이에 2000년 중반부터 가속화되기 시작한 줄기세포 기반 수혈용 적혈구 생산 기술의 개발은 약 10년의 짧은 역사이지만 아주 빠르게 발전하고 있다. 제대혈이나 말초혈액의 CD34+ 세포로부터 성숙적혈구를 만드는 기술로 시작하였고 대량생산의 한계와 고가의 생산비용이 문제가 되면서 배아줄기세포와 역분화줄기세포로부터 적혈구를 생산하고자 하는 기술로 세포원이 확대되었다. 즉 모든 수혈 혈액을 대체하겠다는 막연한 기대로부터 가능한 최대의 기술 개발 범위 내에서 희귀혈액형 보유자나 적합한 혈액을 쉽게 찾기 어려운 동종면역환자, 그리고 O형 D음성 만능공혈 혈액을 생산하고자 하는 연구의 목표도 더욱 뚜렷해졌다. 배양 방법 및 분화기술도 발전하면서 만능줄기세포로부터 성숙 적혈구까지의 생산에 사용되는 무혈청 배지가 개발되고 기질세포가 없이도 적혈구를 만드는 연구도 가시적인 결과를 보여주고 있다. 단 줄기세포 기반 인공혈액을 임상에 적용하기 위해서는 대량생산이 중요한 기술이며, 탈핵에도 좀 더 많은 연구가 필요할 것이다. 그러나 인공혈액 개발에 대해 전세계적으로 경쟁이 본격화되고 있으며 기존의 화학물질 기반 대체 인공혈액의 임상시험이 모두 중단되어 세포기반의 혈액대체 물질 개발이 현재로서는 유일한 대안이다. 또한 혈액은 수출 수입이 안 되는 생물자원이

므로 줄기세포 기반 인공혈액 생산기술에 있어 국내 자체 기술 개발만이 제조 기술에 대한 자율권 확보임을 생각할 때 혈액 대체 물질 개발은 단순한 기업 및 연구기관이 해결해야 할 과제가 아니라, 원천기술 개발을 위한 국가 장기 프로젝트로 지원되어야 할 연구개발 주제이며, 국내 연구자들의 관심과 참여가 그 어느 때보다 절실히 필요한 시기이기도 하다.

## 요약

수혈은 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 살아있는 세포가 환자에게 주입된다는 점에서 인류역사에서 가장 오래된 세포치료제 중의 하나로 평가될 수 있다. 그러나 혈액은 헌혈로서만 충당할 수 있는 제제로 최근에는 혈액 부족현상이 발생하고 있으며, 특히 수혈로 인한 감염전파 문제는 새롭게 계속 나타나는 신종 바이러스 전염병이 보고될 때마다 수혈의 위험성이 강조되고 있다. 이런 문제를 극복하기 위한 인공혈액에 대한 연구는 1960년대 중반부터 시작되었다. 산소를 운반하는 기능인 헤모글로빈으로 구성된 혈액소기반 산소운반체와 과불화탄소(perfluorocarbon)를 이용한 산소운반체가 개발되었으나 임상시험 진행 중 사망에 이르는 다양한 부작용이 보고되면서 개발이 거의 중단되었다. 이후 줄기세포가 새로운 의료의 치료 패러다임으로 소개되면서 줄기세포를 이용하여 수혈용 적혈구를 생산하고자 하는 연구가 진행되었고 제대혈과 G-CSF 가동 말초조혈모세포로부터 CD34+ 세포를 분리하여 적혈구를 생산하는 1단계 프로토콜은 완성되었다. 그러나 수혈용으로 사용하기 위해서는 대량생산 및 고가의 생산비용이 필요한 점 등 모든 헌혈 혈액을 대체하기에는 역부족인 점이 지적되면서 만능줄기세포인 배아줄기세포나 역분화줄기세포로부터 적

혈구를 생산하는 연구로 전환하게 되었다. 두 만능줄기세포로부터 만들어지는 적혈구의 수혈 대상은 첫째, 희귀혈액형 보유자나 복합 항체 보유로 적합한 혈액을 쉽게 찾을 수 없는 환자에 대한 자가 혈액생산과 둘째 O형 D음성 혈액형을 가진 만능 공혈자로부터 얻은 말초혈액에서 역분화줄기세포를 제작하고 여기서부터 적혈구로 분화시키는 기술 개발로 만능인공혈액을 생산하는 연구까지 진행되고 있다. 물론 아직까지 완벽한 수혈용 적혈구의 생산단계에는 이르지 못했으나 앞으로 역분화줄기세포로 확대된 줄기세포기반 적혈구 생산은 생각보다 빠르게 발전할 것이며, 안전성과 가격 문제가 해결된다면, 수년 내에 그 결과를 기대할 수 있을 것이다.

### References

1. WHO. Blood safety and availability. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/) [Online] (last visited on 25 November 2016).
2. FDA. Fatalities reported to FDA following blood collection and transfusion annual summary for fiscal year 2014. <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/UCM459461.pdf> [Online] (last visited on 25 November 2016).
3. Park KU, Kwon S, Kim SW, Lim YA. Long term prospects for the blood supply and demand. *Korean J Blood Transfus* 2006;17:1-10
4. Chang TMS. From hemoglobin based oxygen carrier to oxygen therapeutics, blood substitutes, nanomedicine and artificial cells. In: Kim HW, Greenburg AG. Hemoglobin-based oxygen carriers as red cell substitutes and oxygen therapeutics. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2013:3-26
5. Castro CI, Briceno JC. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: review of products and trials. *Artif Organs* 2010;34:622-34
6. Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, et al. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2002;20:467-72
7. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:69-74
8. Business Wire. Arterioocyte awarded DARPA funding for company's blood pharming technology. [www.businesswire.com/news/home/20081110005109/en/](http://www.businesswire.com/news/home/20081110005109/en/) [Online] (last visited on 25 November 2016).
9. Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, Nagasawa T, Nakamura Y. Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:1255-6
10. Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M, Kawano Y, Nagaya T, Tanaka I, et al. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol* 2008;87:339-50
11. Baek EJ, Kim HS, Kim S, Jin H, Choi TY, Kim HO. In vitro clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34+ cells. *Transfusion* 2008;48:2235-45
12. Baek EJ, You J, Kim MS, Lee SY, Cho SJ, Kim E, et al. Enhanced production of red blood cells in suspension by electrostatic interactions with culture plates. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:1325-34
13. Kim HO. In-vitro stem cell derived red blood cells for transfusion: are we there yet? *Yonsei Med J* 2014;55:304-9
14. Giarratana MC, Rouard H, Dumont A, Kiger L, Safeukui I, Le Pennec PY, et al. Proof of

- principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* 2011;118:5071-9
15. Boehm D, Murphy WG, Al-Rubeai M. The potential of human peripheral blood derived CD34 + cells for ex vivo red blood cell production. *J Biotechnol* 2009;144:127-34
  16. Timmins NE, Athanasas S, Günther M, Buntine P, Nielsen LK. Ultra-high-yield manufacture of red blood cells from hematopoietic stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:1131-7
  17. Doweiy SN, Huang X, Chou BK, Ye Z, Cheng L. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. *Nat Protoc* 2012;7:2013-21
  18. Bouhassira EE. Concise review: production of cultured red blood cells from stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:927-33
  19. Shah S, Huang X, Cheng L. Concise review: stem cell-based approaches to red blood cell production for transfusion. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:346-55
  20. Hiroyama T, Miharada K, Sudo K, Danjo I, Aoki N, Nakamura Y. Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells. *PLoS One* 2008;3:e1544
  21. Bonig H, Chang KH, Geisen C, Seifried E, Ware C. Blood types of current embryonic stem cell lines are not conducive to culturing “universal-donor” red blood cells. *Transfusion* 2008;48:1039-40
  22. Huang X, Wang Y, Yan W, Smith C, Ye Z, Wang J, et al. Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation. *Stem Cells* 2015;33:1470-9
  23. Olivier EN, Marenah L, Mccahill A, Condie A, Cowan S, Mountford JC. High-efficiency serum-free feeder-free erythroid differentiation of human pluripotent stem cells using small molecules. *Stem Cells Translational Medicine* 2016;5:1-12
  24. Takahashi K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development* 2013;140:2457-61
  25. Peyrard T, Bardiaux L, Krause C, Kobari L, Lapillonne H, Andreu G, et al. Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. *Transfus Med Rev* 2011;25:206-16