



Review

CADASIL 동물모델의 생리학적 접근 및 연구적 가치의 예측

정성철¹, 고은아²✉

¹제주대학교 의과대학 생리학교실, ²미국 네바다 주립대학교 생리학/세포생물학 교실

Physiological approach of CADASIL animal model and its predictable implication by Sung-Cherl Jung¹, Eun-A Ko² (¹Department of Physiology, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Republic of Korea; ²Department of Physiology and Cell Biology, University of Nevada, Reno School of Medicine, Reno, Nevada 89557, USA)

Abstract Cerebral vessels are functionally and structurally specialized to provide adequate blood flow to brain which shows high metabolic rates. Cerebral hemorrhage or ischemic infarction due to cerebrovascular injury or occlusion can cause the immediate brain damage, and if not treated rapidly, can lead to serious or permanent brain damages, and sometimes life-threatening. Unlike these popular cerebrovascular diseases, there are diseases caused by genetic problems. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) is one of them. CADASIL does not show the high incidence, but it is considered to be significantly affected by regional obstructiveness such as islands and therefore, to be an important genetic disease in Jeju. This paper aims to summarize the possibility of animal model research that can provide preclinical data for CADASIL disease research and to evaluate its applicability in future research plans.

Key words: CADASIL, Animal model, Cerebral blood flow, K⁺ channel, Ca²⁺ channel

서 론

뇌혈관(cerebral vessels)은 대사율이 높은 뇌조직에 적절한 혈액량을 공급하기 위하여 기능적, 구조적으로 특화되어 있다. 뇌혈관 손상이나 폐색으로 인하여 나타나는 뇌출혈이나, 허혈성 뇌경색 등은 즉각적인 뇌조직의 손상을 유발할 수 있으며, 신속한 처치를 하지 않는 경우, 심각한 또는 영구적인 뇌기능손상으로 이어질 수 있고, 때로는 생명을 위협할 수도 있다. 이러한 대중적인 뇌혈관 질환과는 다르게, 유전적 문제로 인하여 발생하는 질환도 있을 수 있는데, 본 논문에서 언급하고자 하는 염색체 19번의 NOTCH3유전자 변형에 의한

cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)이 그중 하나이다. CADASIL은 발병률이 높은 질환은 아니나, 섬과 같은 지역적 폐쇄성에 유의적으로 영향을 받는 것으로 나타나 제주지역과 같은 곳에서는 중요한 유전질환으로 여겨지고 있다.¹⁾ 본 논문에서는 CADASIL 질환 연구를 위한 전임상적(preclinical) 자료를 제공할 수 있는 동물모델 연구에 대한 가능성을 정리해 보고 향후 연구계획에 적용할 만한 가치를 타진해 보고자 한다.

CADASIL 질환의 특성

혈관인지장애(Vascular cognitive impairment)의 일종인 CADASIL은 발병률이 높지는 않으나 전형적인 유전성 질환이다. 여러 종류의 cerebral small vessel disease들 중 유전자 변형에 의해 나타나는 CADASIL의 세계적 발병률은 10만 명당 두

Received: December 24, 2019; Revised: January 7, 2020; Accepted: January 7, 2020

✉ Correspondence to : Eun-A Ko
Department of Physiology and Cell Biology, University of Nevada, Reno School of Medicine, Reno, Nevada 89557, USA.
Tel: 1-415-624-9439
E-mail: eko@med.unr.edu

명 정도로 낮은 발병률을 보이는 질병이나, 특이하게도 제주도의 경우는 2004년 5월부터 2009년 4월까지 관련 증상을 보이는 환자들 중에 검사를 통해 CADASIL 환자로 판명된 경우가 73명이나 될 정도로 지역적 특색을 뚜렷하게 보여주고 있다.¹⁾ CADASIL이 NOTCH3 single gene mutation에 의해 발생하는 질환이라는 것을 감안한다면, 변형유전자에 의해 발생하는 질병의 발병률이 제주지역에서 비교적 높다는 것은 섬-고립화라는 지역적 특성이 많은 영향을 미치고 있다는 것을 짐작할 수 있다.

세계적으로 그 증상이 유전자에 의한 지역성을 띠기도 하지만, CADASIL 환자의 주요 증상은 비교적 젊은 시절에서 시작되어 지속되는 편두통과 간혹 편마비성 두통이 나타날 수 있고, 많은 환자들에서 허혈성 뇌졸중(ischemic stroke)이 발생하게 되며, 이때 혈관성 파킨슨증(parkinsonism)이나 거짓숨뇌마비(pseudobulbar palsy) 등이 동반되는 경우들이 있다.²⁾ 많은 환자들에서 뇌의 미세출혈(cerebral microbleed)이 관찰되며, 25% 정도의 환자에서 뇌내출혈(intracerebral hemorrhage)이 나타나기도 한다.³⁾ 이러한 뇌혈관성 인지장애 질환은 치매로 발전할 가능성이 높으며, 60% 이상의 환자에서 인지장애들이 관찰되고, 환자들 중 2/3가 65세 전에 치매를 경험하게 되는 것으로 알려져 있다.^{4,5)} 유전성에 의한 CADASIL 증상들은 일반적으로 알려진 신경퇴화성 파킨슨씨병이나 알츠하이머병의 발병 연령보다도 훨씬 일찍 진행되어 나타나게 되는 것이 특징이라 할 수 있는데, 대부분의 환자 진단은 증상이 허혈성 뇌졸중이나 편두통 등으로 시작하기 때문에 MRI 등의 뇌영상 등을 이용하여 출혈이나 경색 여부 및 위치 등을 추적하게 된다.⁶⁾

CADASIL 동물모델의 특성

CADASIL의 원인유전자인 NOTCH3의 유전 조작을 통해 동물모델(NOTCH3 transgenic mice)을 개발하는 시도가 여러 차례 진행되어 왔는데, 동물들의 대표적인 특징은 표현적 증상이 나타나지 않는 이상, 조직학적으로 뇌혈관이나 뇌신경조직의 병인적 변형이 발견되지 않는다는 것이다.⁷⁾ 이들은 NOTCH3가 생체 발생과정에서 혈관생성(angiogenesis)과 신경생성(neurogenesis)에 관여한다는 가정 하에 신경세포와 뇌혈관의 형태학적 변형특성을 정상동물과 비교하였는데, 특이점을 발견하지 못한 것이다. CADASIL 환자들이 보이는 혈관 평활근세포(vascular smooth muscle cell, vSMC)의 점진적 퇴화와 그 주변에서 발견되는 granular osmiophilic material (GOM)이 실제 동물의 초중기 성장과정 동안에서는 쉽게 발견되지 않

았다는 것이다. 흥미로운 것은, 그 이전에 발표된 다른 연구들에 의하면, CADASIL 진단을 초기에 받은 환자들에서 뇌경색이나 뇌출혈 등이 발병하기 이전부터 행동이나 인지기능장애가 나타나고 있다는 것인데, 이러한 생리학적 기능의 변화가 동물모델에서도 관찰되어, NOTCH3의 R169C mutation 동물모델에서 뇌혈관이상과 관련된 조직학적 병인은 뚜렷하지 않으나, white matter hyperintensities (WMHs) 발생으로 인해 행동학적 활동성 저하가 나타나는 경우들이 있다.⁷⁻⁹⁾ 이러한 보고들은 발달과정에서 혈관생성변이가 결국 신경생성변이와 연결된다는 가설을 가능하게 한다. 즉, NOTCH3의 변이로 인해 뇌혈관생성에 문제가 발생하면, 이는 곧 뇌혈관 세동맥(arteriole)의 기능부전을 일으킬 수 있고 이에 따라 뇌혈류량(cerebral blood flow, CBF) 조절이상이 나타날 수 있다. 결국 혈류량 조절의 이상은 신경대사에 필요한 산소 및 당의 공급에 문제를 일으키게 되고, 뇌세포생성과정 및 뇌세포의 활동성에 영향을 줌으로써 행동 및 인지기능 장애로 연결될 가능성이 높다.

CADASIL 동물모델에서 vSMC 특성

전체 뇌혈관 중 40%를 차지하고 있는 작은 혈관들, 즉 세동맥과 모세혈관들에 의한 혈류공급 방식은 혈관의 손상을 최소화하면서도 최대의 혈류량을 보장함으로써 뇌세포 대사를 유지하는 데 절대적 요소로 작용한다. 따라서, CADASIL에서 NOTCH3 변성이 혈관생성과정에 영향을 주게 되면, 뇌혈관의 형태학적 손상이 일어나기 이전부터 이미 뇌혈관 기능부전이 뇌혈류 조절기능에 영향을 줄 가능성이 높다.¹⁰⁾ 순환기계에서 혈관세동맥이 혈류량을 조절하는 기능정도를 myogenic tone으로 정의할 수 있는데, 생리학적 뇌기능 측면에서 myogenic tone의 첫 번째 목적은 CBF의 효율적 조절에 있으며, 적절한 뇌혈관압을 유지시킴으로써 미세혈관으로의 혈류량을 능동적으로 유지시키는 것이다. 이러한 myogenic tone은 vSMC가 탈분극할수록 증가하는 경향을 보이며, 과분극은 tone을 감소시키는 효과를 가져온다. CADASIL 동물모델에서 이러한 myogenic tone 조절특성이 정상동물과 다르게 나타난다는 것이 2015년도에 보고되었다.¹¹⁾ 이 연구에서는 NOTCH3 R169C 동물모델에서 혈압(intraluminal pressure)의 증가가 혈관의 직경을 감소시키지 못한다는 것이다. 정상적인 생리적 반응이라면, 혈압의 증가는 혈관의 직경을 감소시키는 방향(즉, vSMC의 수축으로 myogenic tone 증가)으로 유도하는데, R169C 동물모델에서는 이 현상이 나타나지 않는다는 것이며, 그 이유는 K⁺ 이온통로의 발현정도가 달라, 혈관평활근이 탈분극을 필요

하는 시점에 양이온의 외부누출(cation outflux)이 발생하고 이것이 탈분극을 유도하지 못하도록 방해한다는 것이다.¹¹⁾ 결국 CADASIL 모델에서는 angiogenesis 과정에서 vSMC 세포막의 단백질 발현변이가 발생하고 myogenic tone 조절 기능부전이 발생할 가능성이 있다. K⁺ 이온통로 발현정도의 변이 및 K⁺ 이온에 대한 민감도 변화와는 다르게, 직접적으로 CADASIL vSMC에서 수축 주요인자인 Ca²⁺ 이온에 대한 투과도는 떨어져 혈관압이 증가할수록 늘어나야 하는 세포 내 Ca²⁺ 농도가 정상세포보다 유의하게 감소되어 있다는 연구결과도 제시되었다.¹²⁾ 이러한 보고들은 vSMC 세포막 수준에서 평활근 세포의 탈분극을 조절하는 양이온의 유출/유입 균형에 대한 항상성 조절이 CADASIL 동물모델에서는 정상적으로 나타나지 않는다는 것을 보여준다.

실험동물을 이용한 뇌혈관 특성 연구방법 소개

뇌동맥의 혈압은 50~150 mmHg 사이에서 혈압이 일정하게 유지됨으로써 혈압의 증가로 인한 혈관벽 손상을 억제한다. 이는 혈압이 증가할수록 혈관 평활근의 수축력 증가로 혈류량 속도를 저하시켜 혈압을 일정하게 유지하는 데 기여하는데, 혈관 내 압력을 증가하였을 때 혈류의 자동 조절에 관여하여 유발되는 혈관 평활근의 수축인 근원성 반응(myogenic response)으로 혈압 조절에 중요한 역할을 한다. 이러한 myogenic response를 측정하기 위한 방법인 pressurized arterial system의 기법에서는 분리한 뇌혈관 내에 perfusion system을 연결하여 변화되는 뇌혈관의 직경을 측정하게 된다. 이와 같은 방법은 생체 내에서 혈압이 유지되는 것과 유사하게 혈관 내에 적절한 압력을 유지한 상태로 혈관의 기능을 평가하는 데 적절한 방법이다.

1. 뇌혈관 내 압력 증가에 의해 유발되는 myogenic tone 측정

혈관 내 압력이 증가할수록 뇌혈관의 수축력이 증가하여 지속적인 수축력이 유지되는 현상인 myogenic tone을 정상동물과 동물모델에서 분리한 뇌혈관에서 측정한다. 이러한 방식은 분리한 뇌혈관에 perfusion system을 연결하여 혈관 내에 적절한 압력을 유지하여 혈관의 직경을 측정하는 실험 방법(pressurized arterial system)으로 myogenic tone을 측정하기에는 최적화되어 있다.^{13,14)} 정상동물과 동물모델의 뇌에서 혈관(직경 30~80 μm)을 현미경하에서 미세가위로 분리한 후 뇌혈관의 양쪽 끝을 두 개의 glass pipettes(직경 40~50 μm)에 고정 후 혈관 내 압력을 조절하는 pressure myograph chamber(Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA)에 연

결한다. 변화하는 혈관의 직경을 측정하기 위해 video camera(The Imaging Source LLC, Charlotte, NC, USA)가 연결된 독립현미경에서 약물이나 혈관 내 달라지는 압력에 의한 혈관의 직경 변화를 기록한다(Fig. 1). 뇌혈관의 수축력 변화 측정은 초기값 20 mmHg으로 혈관 내 압력을 유지하고, PSS 용액(mM: 119 NaCl, 4.7 KCl, 24 NaHCO₃, 1.2 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 0.2 KH₂PO₄, 5 glucose)을 37°C 온도에서, 산소를 공급하며(21% O₂, 6% CO₂, 73% N₂) 30분 동안 안정화시킨 후 실험을 진행하게 된다. 안정화된 혈관에서 탈분극 특성을 확인하기 위하여 고농도의 K⁺(60 mM) 용액에 의하여 수축력이 5% 이상 증가하는 뇌동맥에서만 실험을 진행한다. Myogenic tone을 측정하기 위해 혈관 내 압력은 5 mmHg 부터 140 mmHg 사이에서 20 mmHg 간격으로 혈관 내 압력을 단계적으로 증가시키고 혈관 내 압력에 따라 변화되는 혈관의 직경을 측정한다(Fig. 1). 동물의 각 개체마다 다른 혈관의 직경 차이를 최소화하기 위해, 갈숨이 없는 용액에서 혈관 내 가해진 압력에 따라 변화되는 혈관의 직경(passive lumen diameter)을 동시에 측정하여 정상적인 갈숨 농도에서(1.8 mM)에서 측정한 myogenic tone(active lumen diameter)의 값을 보정하는 과정이 필요하다.

$$\text{보정식: } \left[1 - \frac{\text{active lumen diameter}}{\text{passive lumen diameter}} \right] \times 100$$

2. 혈관 수축을 유발하는 약물에 의한 수축반응 비교

혈관 수축을 매개하는 혈관 조절 물질에 의한 뇌동맥 혈관 수축 반응이 동물모델에서 정상동물과 비교하여 변화되었는지 관찰하기 위해, 정상동물에서 분리한 뇌동맥에서 G-protein coupled receptor(GPCR)를 활성화하는 angiotensin II(AngII)를 이용하여 약물에 의해 유발되는 뇌혈관의 수축력을 측정할 수 있다. 실제 정상 쥐에서 Ang II에 의해 ~7% 이상의 혈관 수축력이 현저히 증가되는 것이 보고되기도 하였다.¹³⁾ 뇌혈관에서 수축을 유발시킬 수 있는 다른 종류의 약물들인 endothelin-1, serotonin(5-HT), epinephrine을 이용하여 약물에 의해 유발되는 혈관의 수축력 변화정도를 실험동물 간에 비교할 수도 있다.

3. 뇌혈관 내 압력의 증가에 의해 유발되는 myogenic tone 비교

뇌동맥 혈압이 증가할수록 혈관의 수축력이 증가되는 현상인 myogenic tone을 실험동물에서 분리한 뇌혈관에서 측정한다. 동물에서 분리한 뇌혈관 내 압력을 5 mmHg부터 140 mmHg 사이에서 20 mmHg 간격으로 혈관 내 압력을 점차적으로 증가시켜 변화되는 혈관의 직경을 측정할 수 있는데, 이때, 혈관의 반응이 일정수준에서 멈추는 임계압을 찾아 동물 간에 비

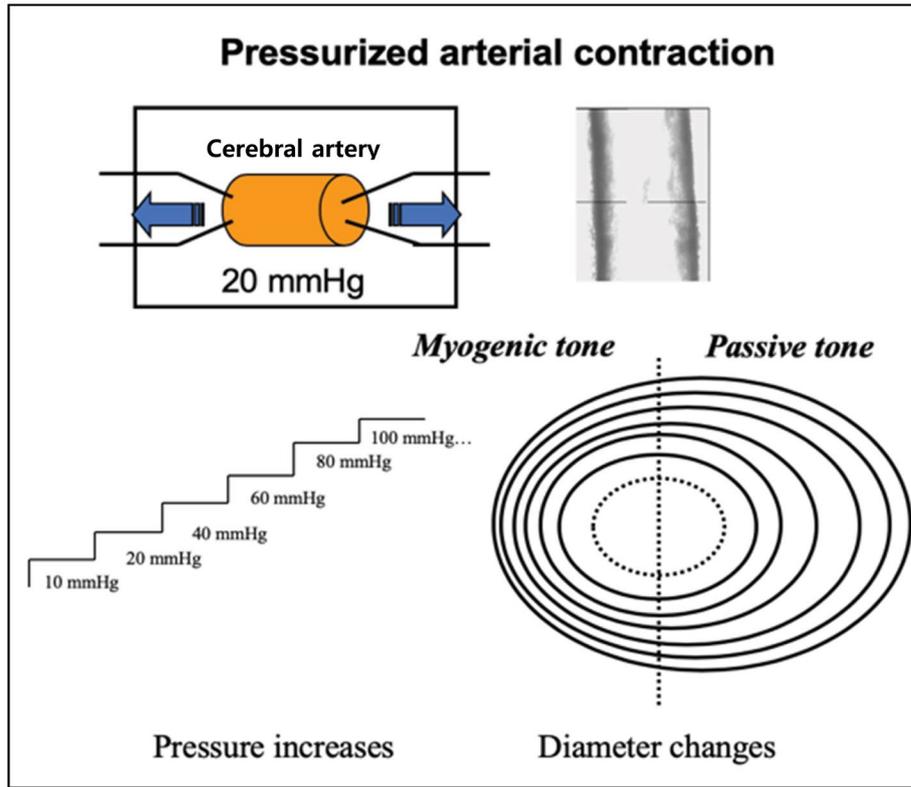


Figure 1. Summarizing the pressurized arterial system to record the change of myogenic tone of cerebral arteries and arterioles in animal models. Internal pressure of vessels can be induced with stepped increments via pipettes which are attached in both ends of isolated vessels. And then, myogenic tone can be determined by the changes of vessel diameter.

교를 할 수 있으며, 임계압까지 도달하기 위해 나타나는 tone/pressure의 상관지수를 평가하게 된다. 이러한 상관지수가 갖는 주요 의미는 평활근 세포막의 탈분극특성을 조절하는 양이온 통로들의 기질 및 발현정도, 그리고 세포 내외의 이온농도차 등의 차이를 파악할 수 있게 하며, 이를 통해 질환동물모델이 갖는 특성을 관찰하고, 임상적 증상과의 연관성을 예측할 수 있는 자료로 활용할 수 있다.

자료를 제공할 것이다. 본 논문에서 언급하였듯이, CADASIL vSMC 세포막의 이온 투과성이 다르게 나타나고 이것이 뇌혈류 조절에 영향을 준다는 것은, 결국 형태학적 뇌혈관 손상이 전에 CADASIL 환자들이 가질 수 있는 또다른 문제점(즉, 행동/인지 장애와 관련된)들을 예측할 수도 있다는 것을 암시한다. 따라서, CADASIL 동물모델은 환자를 대상으로 한 임상의 진단/치료과정에 주요한 자료를 활용될 수 있는 전임상연구 결과물들을 제공할 것으로 판단된다.

결 론

CADASIL 동물모델에서 뇌혈관 손상으로 인한 뇌경색이나 뇌출혈과 같은 형태학적 손상이 나타나고, 이때의 조직학적 특성을 관찰하는 것도 중요한 연구의 일환이지만, 뇌혈관단위의 형태학적 손상이 뚜렷하게 나타나기 이전에 뇌혈관 조절기능부전을 알아내고, 이와 관련된 증상을 구체화하는 연구는 단순한 생리학적 기능부전 연구뿐만 아니라, 혈관생성과정 과정과 신경생성과정이 어떤 연관성을 갖고 진행되는지를 알 수 있는 주요한

REFERENCES

1. Choi JC, Song SK, Lee JS, Kang SY, Kang JH. Diversity of stroke presentation in CADASIL: study from patients harboring the predominant NOTCH3 mutation R544C. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2013;22:126-31.
2. Lee JS, Choi JC, Kang SY, Kang JH, Na HR, Park JK. Effects of lacunar infarctions on cognitive impairment in patients with cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and

- leukoencephalopathy. *J Clin Neurol* 2011;7:210-4.
3. Koutroulou I, Karapanayiotides T, Grigoriadis N, Karacostas D. CADASIL presenting with spontaneous intracerebral hemorrhage: report of a case and description of the first family in Northern Greece. *Hippokratia* 2016;20:76-9.
 4. Su J, Wang M, Ban S, Wang L, Cheng X, Hua F, et al. Relationship between changes in resting-state spontaneous brain activity and cognitive impairment in patients with CADASIL. *J Headache Pain* 2019;20:36.
 5. Di Donato I, Bianchi S, De Stefano N, Dichgans M, Dotti MT, Duering M, et al. Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) as a model of small vessel disease: update on clinical, diagnostic, and management aspects. *BMC Med* 2017;15:41.
 6. Kim H, Lim YM, Oh YJ, Lee EJ, Kim KK. Comparison of brain magnetic resonance imaging between myotonic dystrophy type 1 and cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *PLoS One* 2018;13:e0208620.
 7. Klein C, Schreyer S, Kohrs FE, Elhamoury P, Pfeffer A, Munder T, et al. Stimulation of adult hippocampal neurogenesis by physical exercise and enriched environment is disturbed in a CADASIL mouse model. *Sci Rep* 2017;7:45372.
 8. Taillia H, Chabriat H, Kurtz A, Verin M, Levy C, Vahedi K, et al. Cognitive alterations in non-demented CADASIL patients. *Cerebrovasc Dis* 1998;8:97-101.
 9. Amberla K, Wäljas M, Tuominen S, Almkvist O, Pöyhönen M, Tuisku S, et al. Insidious cognitive decline in CADASIL. *Stroke* 2004;35:1598-602.
 10. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 2017;96:17-42.
 11. Dabertrand F, Krøigaard C, Bonev AD, Cognat E, Dalsgaard T, Domenga-Denier V, et al. Potassium channelopathy-like defect underlies early-stage cerebrovascular dysfunction in a genetic model of small vessel disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:E796-805.
 12. Koide M, Moshkforoush A, Tsoukias NM, Hill-Eubanks DC, Wellman GC, Nelson MT, et al. The yin and yang of KV channels in cerebral small vessel pathologies. *Microcirculation* 2018;25:10.1111/micc.12436.
 13. Pires PW, Ko EA, Pritchard HAT, Rudokas M, Yamasaki E, Earley S. The angiotensin II receptor type 1b is the primary sensor of intraluminal pressure in cerebral artery smooth muscle cells. *J Physiol* 2017;595:4735-53.
 14. Ko EA, Amiri F, Pandey NR, Javeshghani D, Leibovitz E, Touyz RM, et al. Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent on vascular inflammation: evidence from m-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1789-95.