

헌팅톤 병 동물 모델에서 치료효과 판정을 위한 운동기능 평가

연세대학교 의과대학 재활의학교실 및 재활의학연구소, ¹진단검사의학교실, ²약리학교실

조성래 · 박은숙 · 김현옥¹ · 김동구² · 박창일

Behavioral Testing for Therapeutic Outcome Measurements in an Animal Model of Huntington's Disease

Sung-Rae Cho, M.D., Eun Sook Park, M.D., Hyun-Ok Kim, M.D.¹, Dong Goo Kim, M.D.² and Chang-il Park, M.D.

Department of Rehabilitation Medicine and Research Institute of Rehabilitation Medicine, Departments of ¹Laboratory Medicine and ²Pharmacology, Yonsei University College of Medicine

Objective: To investigate which outcome measurements are useful for detecting functional changes after therapeutic approach to delayed motor impairment in an animal model of Huntington's disease (HD).

Method: R6/2 transgenic mice received intraventricular injections of adenoviral BDNF/noggin (AdB/N), AdBDNF, AdNull (n=15 each) at 4 weeks of age. Untreated R6/2s and wild-type mice were also recruited as controls. Motor performance was measured using rotarod analysis and locomotor activity test at regular intervals until preterminal age of 13 weeks.

Results: On constant speed rotarod testing, AdB/N-treated R6/2s exhibited a delayed disease progression after post-

operative 6 weeks. AdB/N also ameliorated general locomotor activity deficits. One min-rotarod analysis showed a delayed motor impairment in AdBDNF group at preterminal age compared with AdNull and untreated controls, which was not shown in 3 min and 5 min-rotarod. Accelerating rotarod paradigm was not superior to constant speed. Partial therapeutic effects on locomotor activities were detected in total 60 min-monitoring, but not in 30 min- or 10 min-monitoring.

Conclusion: Appropriate behavioral testing and outcome measurements should be selected to detect the treatment effect to slow functional deterioration in HD. (*J Korean Acad Rehab Med* 2007; 31: 503-511)

Key Words: Huntington's disease, Rotarod testing, Locomotor activity, Outcome measurement

서 론

헌팅톤 병은 IT 15 (interesting transcript 15) 유전자의 첫 번째 엑손에 CAG 반복염기서열(repeat)의 과다한 팽창으로 기형 헌팅틴(mutant huntingtin) 단백질을 발현하는 상염색체 우성의 유전병으로, 특히 기저핵 중 선조체(striatum)의 신경세포가 점진적으로 소실되어 무도병(chorea)과 같은 불수의적인 움직임 및 협조운동(coordination)의 손상을 유발하는 신경퇴행성 질환이다. 비정상적으로 생성된 기형 헌팅틴 단백질은 신경 독성을 가지며, 특히 선조체 내의 중간가시 신경세포(medium spiny neurons)의 퇴화를 야기한다.^{1,2} 이 질환에 대한 치료로 creatine,^{3,5} cystamine,^{6,7} coenzyme Q10,⁸ pyruvate,⁹ lithium,¹⁰ minocycline,^{11,12} histone deacetylase inhibitor 투여,^{13,14} 각종 신경영양 인자를 이용한 유전자 치

료¹⁵ 및 줄기세포 이식¹⁶ 등의 여러 방법이 시도되고 있지만, 모두 부분적인 효과만을 보일 뿐 확실한 치료 방법이 없는 실정이다. 최근 그동안 기능이 잘 알려지지 않았던 정상 헌팅틴(wild-type Huntingtin)이 대뇌 피질 신경세포로부터 기저핵 부위로 뇌유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)가 이동되는데 일정 역할을 하여 선조체의 신경세포를 생존하게 하는 기능이 있다는 이론이 최근 대두되면서,^{17,18} 상기 과정에 손실이 있는 헌팅톤 병에 BDNF의 투여가 효과적인 치료법이 될 수 있을 것으로 생각한다. 또한 기존의 보고¹⁹에서 신경병리학적으로 BDNF 및 noggin의 뇌실내 투여가 선조체 내 중간가시 신경세포 생성(neurogenesis)을 유도하므로, 이를 통해 새로 생성된 신경세포가 헌팅톤 병의 말기 증상을 지연시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

한편 치료 효과에 대한 표준화된 평가 방법이 없는 형편으로 연구자에 따라 검사 방법 및 치료 효과 여부의 판단 기준이 다르며, 특히 부분적인 효과에 대해서는 일치되지 않는 견해를 보이고 있다. 이와 같이 전임상(preclinical) 단계의 동물 실험에서 새로운 개념의 치료법이 임상 시도로 적용되기 위해서는 치료 효과를 민감하고 신뢰성 있게 판

접수일: 2006년 12월 12일, 게재승인일: 2007년 8월 10일

교신저자: 박은숙, 서울시 서대문구 신촌동 134

☎ 120-752, 연세의료원 재활병원 재활의학과

Tel: 02-2228-3710, Fax: 02-363-2795

E-mail: pes1234@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 재단법인 김명선 기념재단 연구비 수혜로 진행된 과제임.

정하기 위한 적절한 평가 방법을 반드시 구축하여야 한다.

이에 본 연구에서는 선조체내 중간가시 신경세포의 퇴화 및 소실이 주로 관찰되는 헌팅톤 병 형질전환 쥐 모델에서 뇌실내 BDNF 및 noggin의 병합 투여 또는 BDNF 단독 투여 후 시간경과에 따른 운동기능 악화를 지연시키는 소견을 확인하고, 대표적인 운동기능 검사인 rotarod 및 운동 활동도 검사를 여러 방법으로 평가하여 적절한 평가 방법을 살펴보고, 상기 동물 평가방법의 유용성을 확인하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1) 동물 연구 대상

헌팅톤 병 형질전환 쥐 모델로 인간 헌팅톤 유전자의 엑손 1 부위에 약 145개(115~150개)의 CAG 반복염기서열을 삽입시킨 R6/2 모델(B6CBA-Tg (HDexon1)62Gpb/1J)을 사용하였다. R6/2 형질전환 쥐 모델(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, U.S.A.)의 양육 쌍은 난소 이식(ovarian transplant) 반 유전자 접합체 암컷과 B6CBAF1/J 수컷을 교배하여 대상군을 생산하였다. 이들은 동물 보호법에 의해 관리되었고, 12 시간 간격의 조명/암실 주기 하에서 유지되었다.

2) 유전자형 분석

헌팅톤 병의 유무는 DNA의 polymerase chain reaction (PCR)을 통해 확인되었다. 즉, 이유기인 생후 3주에 각 쥐 꼬리 끝을 절단한 후, 55°C에서 24시간 동안 proteinase K가 혼합된 용액에서 DNA 추출을 시행하였다. PCR 반응은 forward primer CCGCTCAGTTCTGCTTTTA 및 reverse primer GGCTGAGGAAGCTGAGGAG와 함께 94°C 3분, 35×(94°C 30초, 58°C 1분, 72°C 1분), 72°C 2분, 이후 4°C의 cycling 조건하에서 시행되었다. R6/2 형질전환 쥐 여부는 1.2% agarous gel에서 전기영동 시행 후 611 bp 밴드를 통해 확인되었다.

3) 벡터 제조 및 대상군 설정

바이러스 벡터로 replication-incompetent ΔE1, ΔE3 type 5 아데노바이러스(adenovirus)를 사용하였고, cytomegalovirus (CMV) promotor 조절 하에 BDNF를 바이러스 DNA에 삽입시켜 재조합 adenoviral BDNF (AdBDNF)를 제조하였다. 또한 같은 방법으로 AdNoggin을 제조하였으며, 대조군으로 BDNF 또는 noggin을 포함하지 않는 AdNull을 사용하였다.

생후 4주 치료군의 R6/2 형질전환 쥐에 정위고정 수술을 통해 AdBDNF 및 AdNoggin의 혼합(AdB/N), AdBDNF 또는 AdNull을 양측 측뇌실(lateral ventricle)에 주입하였다. 정위고정 좌표는 Bregma를 기준으로 AP -0.5 mm, ML ±0.7 mm, DV -2.0 mm이었으며, 각 바이러스는 2.5×10¹¹ pfu/ml의 농도로 양측 뇌실에 각각 1.5 μl씩 주입하였다. 한편 수술 및

바이러스에 의한 영향을 배제하기 위해, 정위고정 수술을 통해 바이러스를 주입받지 않은 비 치료군의 R6/2 헌팅톤 병 형질전환 쥐 모델을 포함하였다.

4) 운동기능 평가

모든 대상군에서 운동기능 평가 방법에 적응하기 위해, 생후 3주에서 4주 사이의 적응 기간 동안 2차례 훈련을 시행하였고, 생후 4주부터 1주 간격으로 생후 13주까지 rotarod 검사를 시행하였으며, 2주 간격으로 운동 활동도 검사를 정기적으로 시행하였다.

Rotarod 검사는 기저핵 병변 질환의 주 증상인 협조운동 장애를 평가하기 위해 rotarod treadmill (Cat. No. 7650, UGO Basile, Comerio, Italy)을 이용하여, 12 rpm의 고정 속력(constant speed)과 4 rpm에서 40 rpm까지의 가속속력(accelerating speed) 방법으로 5분간 시행하는 동안 대상 동물이 막대(rod)에서 떨어지는 시간을 측정하였다. 매주 평가 시 3차례 시도하여 이들의 최대 및 평균 지속시간을 모두 분석하였으며, 또한 총 평가 시간을 1분 및 3분으로 한정된 지속시간 결과도 비교 분석하였다.

운동 활동도 검사는 41×41×33 cm 크기의 활동도 검사기 (Cat. No. 7420, UGO Basile, Comerio, Italy)를 이용하여, 하루 중 일정 시간에 암 환경(dark environment)에서 이동 능력(locomotor activity) 및 직립(rearing) 기능을 총 60분 동안 측정하였다. 활동도 수치는 2쌍으로 배열된 적외선 방출 및 감지기로 대상 동물에 의해 적외선 광선이 차단되는 횟수가 자동적으로 측정되었다.

또한 각 대상군 간에 비정상적인 신경학적 소견이 어느 시점부터 나타나는지 비교하기 위해, 꼬리를 잡고 들어올렸을 때 사지가 굴곡되는 비정상적인 정위반응인 clasping 반사 및 진전(tremor), 비정상적인 머리손질(grooming) 및 비정상적인 보행 소견을 보이는 전형적 행동 변화를 평가하였다. 또한 정적 균형 감각을 평가하기 위해 1주일 간격으로 1분 동안 막대에서 균형을 유지하는지 여부를 측정하였고, 동적 균형 감각을 평가하기 위해 12 rpm의 고정 속력 rotarod 검사에서 1분 동안 균형 유지를 지속하는지를 측정하였다. 그 외에 상기 검사들을 시행하는 동안 경련발작이 일어나는지 여부도 확인하였다.

5) 통계 방법

각 대상군 간의 기능적 평가 결과, 즉 BDNF 및 noggin의 뇌실내 투여 후 또는 BDNF 자체에 의한 운동기능 악화의 지연 소견을 분석하였다. 통계 방법은 SPSS 11.5 for window version을 사용하여 각 검사 시기에 여러 평가 방법에 따른 검사 결과를 ANOVA test 및 posthoc Bonferroni comparison을 시행하여 분석하였으며, 통계적 유의수준은 p < 0.05로 설정하였다.

결 과

1) 대상군의 일반적 특징

생후 4주에 시행한 정위고정 수술적 주입을 통해 BDNF 및 noggin 병합 투여군, BDNF 단독 투여군, null 투여군과 정위고정 수술을 시행받지 않은 비 치료군의 네 군(각 군당 15 마리)으로 구성되었다. 또한 유전자형 분석에서 R6/2 헌팅톤 병 형질전환 쥐로 진단되지 않은 정상 야생형 쥐(총 15마리)를 대조군으로 설정하였다. 각 대상군의 성별 및 수술 전 초기 체중은 모두 유의한 차이가 없었다(Table 1).

2) 각 대상군의 체중 변화

수술 1주 후인 생후 5주에 병합 투여군 및 BDNF 단독 투여군에서 BDNF에 의한 일시적인 체중 감소에 의해 정상 대조군에 비하여 유의하게 낮아졌으며, 이들은 생후 6주 이후부터 회복되는 소견을 보였다. 모든 헌팅톤 대상군의 체중은 생후 8주부터는 정상 대조군에 비해 현저하게 낮아져, 생존 말기까지 지속적으로 감소하는 소견을 보였다($p < 0.05$). 한편 병합 투여군은 수술 6주 후인 생후 10주부터 null 투여군 및 비 치료군보다 체중이 증가한 소견을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다.

3) 헌팅톤 병 대상군의 신경학적 평가

BDNF 및 noggin 병합 투여군에서 clasping 반사는 평균

7.1주부터 보이기 시작하였고, 전형적 행동 변화는 평균 9.1주부터 보이기 시작하였으나 다른 헌팅톤 병 대상군과는 통계학적인 차이가 없었다(Table 2). 그러나 병합 투여군에서 정적 균형 감각 이상이 생기는 시작 시점은 평균 13.3주로 null 투여군(평균 11.5주)에 비하여 유의하게 지연되었다($p < 0.05$). 동적 균형 감각에서도 병합 투여군이 평균 12.7주로 null 투여군(평균 10.3주) 및 비 치료군(평균 10.2주)에 비해 유의하게 지연되었다($p < 0.05$). 한편 BDNF 단독 투여군은 상기 신경학적 평가에서 null 투여군 및 비 치료군에 비해 통계학적으로 의미있는 차이를 보이지 못하였다(Table 2).

한편 상기 검사들을 시행하는 동안 BDNF 및 noggin 병합 투여군에서 총 3차례 경련발작을 일으켰으며, BDNF 단독 투여군에서는 총 5차례, null 투여군에서는 8차례, 비 치료군에서는 7차례 경련발작이 관찰되었으나, 각 헌팅톤 병 대상군 간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

4) 고정 속력 rotarod 검사

(1) 5분간 rotarod 지속 시간의 평가: 생후 4주에 시행한 신경외과적 수술 이후 매주 정기적으로 rotarod treadmill 검사를 시행하였다. 최대 및 평균 rotarod 지속 시간의 평가상, BDNF 및 noggin 병합 투여군과 BDNF 단독 투여군에서 생후 6주에 비 치료군에 비하여 rotarod 지속 시간이 유의하게 큰 소견을 보였으나($p < 0.05$), 이후 지속 시간이 감소하여 생후 9주까지는 각 군간에 의미 있는 차이가 없었다. 그

Table 1. General Characteristics of R6/2 Transgenic Mice and Wild-type Controls

	R6/2 transgenic mice				Wild-type controls
	AdB/N	AdBDNF	AdNull	Untreated	
Sample number	15	15	15	15	15
Gender (M : F)	8 : 7	8 : 7	9 : 6	8 : 7	8 : 7
Body weight (gm)	16.8±1.8	17.0±2.8	17.0±2.0	16.7±2.1	17.7±2.8

Values (Body weight) are mean±standeard deviation.

AdB/N: Group treated with adenoviral brain-derived neurotrophic factor and noggin, AdBDNF: Group treated with adenoviral brain-derived neurotrophic factor, AdNull: Group treated with adenovirus, not encoding any transgene

Table 2. Neurological Examination as a Function of Treatment in R6/2 Mice

Onset (week)	AdB/N	AdBDNF	AdNull	Untreated
Clasping	7.1±0.7	7.0±0.5	6.5±1.0	6.8±0.7
Overt behavioral symptoms	9.1±0.9	9.0±0.8	8.3±1.2	8.4±0.6
Abnormal static balance	13.3±1.6*	12.6±1.9	11.5±1.7	12.1±0.8
Abnormal dynamic balance	12.7±1.6* [†]	11.4±1.2	10.3±1.5	10.2±1.8

Values are mean±standard deviation.

AdB/N: Group treated with adenoviral brain-derived neurotrophic factor and noggin, AdBDNF: Group treated with adenoviral brain-derived neurotrophic factor, AdNull: Group treated with adenovirus, not encoding any transgene

* $p < 0.05$; vs AdNull group, [†] $p < 0.05$; vs untreated group

리나 생후 10주 이후부터 BDNF 및 noggin 병합 투여군은 null 투여군 및 비 치료군에 비해 통계적으로 유의하게 rotarod 협조운동 기능 저하의 지연 소견을 보이기 시작하였고($p < 0.05$), 특히 수술 후 7주인 생후 11주부터는 null 투여군 및 비 치료군 뿐만 아니라, BDNF 단독 투여군에 비해서도 유의하게 큰 rotarod 지속 시간을 보였다($p < 0.05$)(Fig 1A, B).

한편 정상 대조군은 고정속력 rotarod 검사 상 지속적으로 최대값인 5분(300초)을 유지하여, 최대 및 평균 지속 시간은 생후 6주부터 null 투여군 및 비 치료군에 비해 유의한 차이를 보이기 시작하였고($p < 0.05$), 생후 8~9주부터는 이들 뿐만 아니라 BDNF 단독 투여군과, 생후 11주부터는 병

합 투여군과도 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$)(Fig 1A, B).

(2) 3분간 rotarod 지속 시간의 평가: Rotarod 최대 지속 시간을 3분으로 한정하여 최대 및 평균 rotarod 지속 시간을 평가하였을 때, BDNF 및 noggin 병합 투여군에서 생후 10주에 null 투여군 및 비 치료군에 비하여 rotarod 지속 시간이 유의하게 큰 소견을 보였으며($p < 0.05$), 생후 12주(최대 지속 시간) 및 11주(평균 지속 시간)부터는 이들 대상군 뿐만 아니라, BDNF 단독 투여군에 비해서도 유의하게 큰 rotarod 지속 시간을 보였다($p < 0.05$)(Fig. 1A, B).

한편 정상 대조군은 최대 지속 시간 평가에서 생후 9주부터 비 치료군 및 null 투여군에 비해 유의한 차이를 보이기 시작하였고($p < 0.05$), 생후 11주부터는 BDNF 투여군과, 생

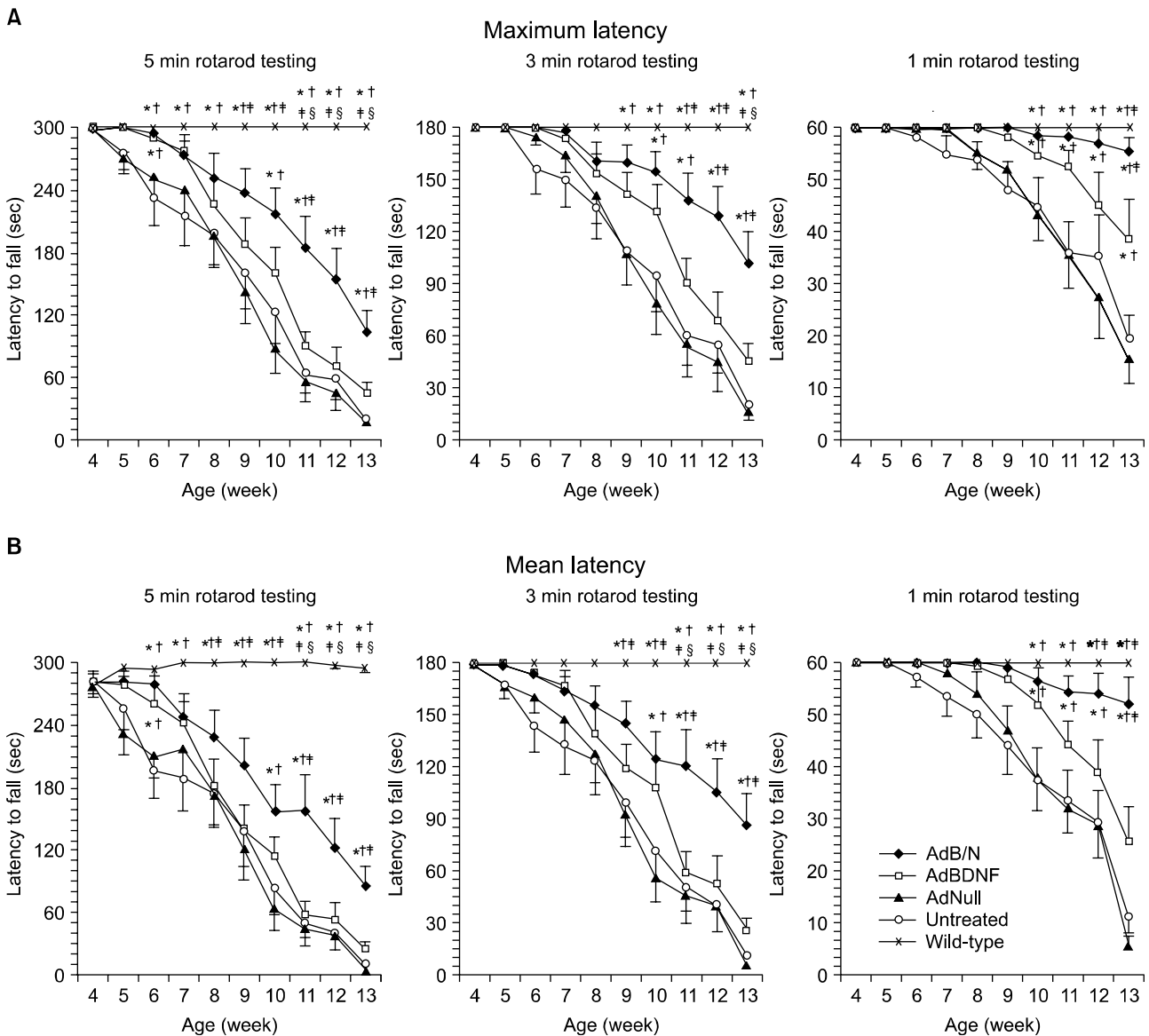


Fig. 1. AdB/N-treated R6/2s exhibited delayed disease progression after post-operative 6 weeks at various measurements of constant speed rotarod testing. * $p < 0.05$ vs AdNull group, † $p < 0.05$ vs untreated group, ‡ $p < 0.05$ vs AdBDNF group, § $p < 0.05$ vs AdB/N group.

후 13주부터는 병합 투여군과도 통계학적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$)(Fig. 1A). 또한 평균 지속 시간의 평가에서는 생후 9주부터 비 치료군, null 투여군 및 BDNF 투여군에 비해 유의한 차이를 보이기 시작하였고($p < 0.05$), 생후 11주부터는 모든 대상군에 비하여 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$)(Fig. 1B).

(3) 1분간 rotarod 지속 시간의 평가: 최대 지속 시간을 1분으로만 한정하여 최대 및 평균 rotarod 지속 시간을 평가하였을 때, BDNF 및 noggin 병합 투여군에서 생후 10주에 null 투여군 및 비 치료군에 비하여 rotarod 지속 시간이 유의하게 큰 소견을 보였고($p < 0.05$), 수술 9주 후인 생후 13주부터는 이들 대상군 뿐만 아니라, BDNF 단독 투여군에 비해서도 유의하게 큰 rotarod 지속 시간을 보였다($p < 0.05$)(Fig. 1A, 1B). 또한 5분 및 3분간의 평가와는 달리, 생후 13주에 최대 지속 시간의 평가 상 BDNF 단독 투여군에

서도 null 투여군 및 비 치료군에 비해 rotarod 지속 시간이 통계학적으로 유의하게 큰 소견을 보였다($p < 0.05$)(Fig. 1A).

그러나 정상 대조군은 최대 및 평균 rotarod 지속 시간의 평가 모두에서 생후 10주부터 비 치료군 및 null 투여군에 비해 유의한 차이를 보이기 시작하였고($p < 0.05$), 생후 13주(최대 지속 시간) 및 12주(평균 지속 시간)에 BDNF 단독 투여군에 비하여 유의한 차이를 보였으나($p < 0.05$), BDNF 및 noggin 병합 투여군과는 생존 말기인 생후 13주까지도 통계학적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 1A, B).

5) 가속력 Rotarod 검사

5분 동안 4 rpm에서 40 rpm까지의 가속력으로 시행한 rotarod 검사 결과, 최대 및 평균 rotarod 지속 시간 모두에서 신경생성 효과를 극대화한 BDNF 및 noggin 병합 투여가 다른 헌팅톤 대상군에 비해 통계학적으로 유의한 소견을 보

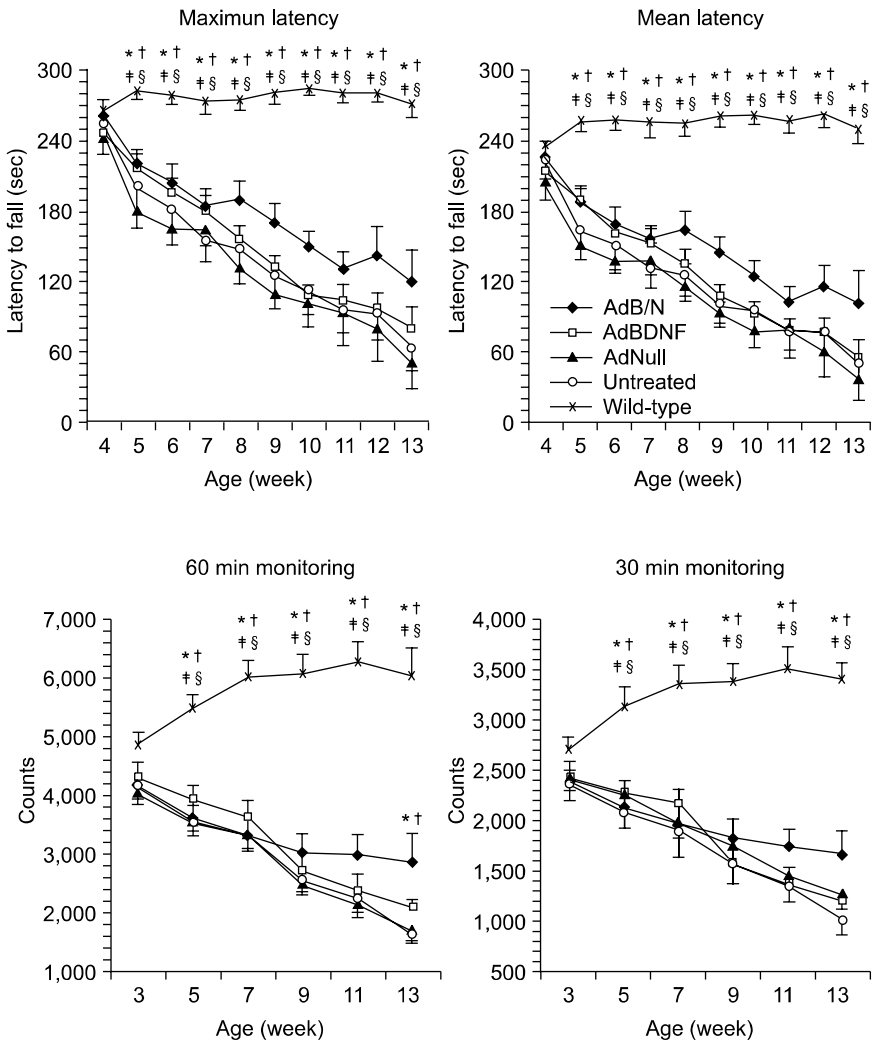


Fig. 3. AdB/N-treated R6/2s exhibited sustained horizontal locomotor activities in total 60 min-monitoring, but not in 30 min- or 10 min-monitoring. * $p < 0.05$ vs AdNull group, † $p < 0.05$ vs untreated group, ‡ $p < 0.05$ vs AdBDNF group, § $p < 0.05$ vs AdB/N group.

Fig. 2. AdB/N-treated R6/2 mice did not exhibit delayed disease progression at accelerating speed rotarod testing. * $p < 0.05$ vs AdNull group, † $p < 0.05$ vs untreated group, ‡ $p < 0.05$ vs AdBDNF group, § $p < 0.05$ vs AdB/N group.

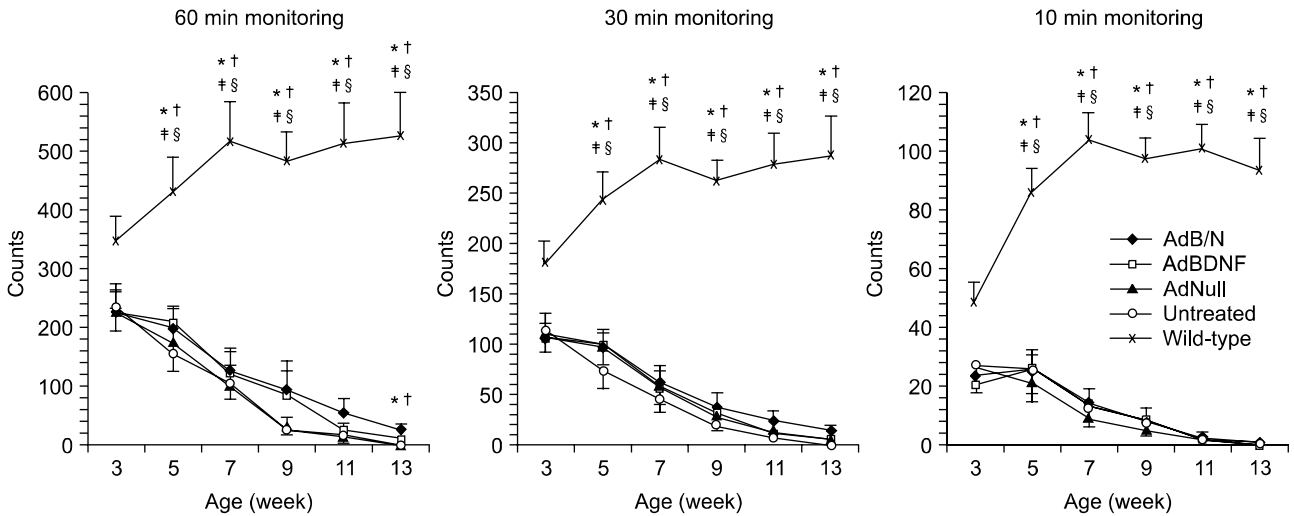


Fig. 4. AdB/N-treated R6/2s exhibited sustained vertical rearing activities in total 60 min-monitoring, but not in 30 min- or 10 min-monitoring. *p<0.05 vs AdNull group, †p<0.05 vs untreated group, ‡p<0.05 vs AdBDNF group, §p<0.05 vs AdB/N group.

여주지 못했다. 그러나 정상 대조군은 생후 5주부터 지속적으로 R6/2 헌팅톤 형질전환 쥐 모델의 모든 대상군보다 현저하게 큰 rotarod 지속 시간을 보였다(p<0.05)(Fig 2).

6) 운동 활동도 검사

(1) 이동 능력의 평가: 총 60분 동안 시행한 운동 활동도 검사 결과, BDNF 및 noggin 병합 투여군에서 수술 5주 이후 활동도의 감소가 지연되는 경향을 보이기 시작하여, 생후 13주에는 null 투여군 및 비 치료군에 비하여 유의하게 활동도 감소가 지연된 소견을 보였다(p<0.05). 그러나 처음 30분 및 10분 동안으로 한정하여 평가하였을 때, 모든 R6/2 헌팅톤 대상군 사이에 통계학적으로 의미 있는 차이가 없었다(Fig 3). 한편 정상 대조군은 60분, 30분 및 10분 동안의 평가 모두에서 생후 5주부터 지속적으로 모든 헌팅톤 대상군에 비해 현저하게 이동 능력 활동도 수치가 큰 소견을 보였다(p<0.05)(Fig 3).

(2) 직립 기능의 평가: 같은 방법으로 총 60분 동안 시행한 운동 활동도 검사 결과, BDNF 및 noggin 병합 투여군에서 이동 능력과 마찬가지로 생후 13주에 null 투여군 및 비 치료군에 비하여 통계학적으로 유의하게 직립 기능의 감소가 지연된 소견을 보였으나(p<0.05), 처음 30분 및 10분 동안으로 한정하여 평가하였을 때, 모든 R6/2 헌팅톤 쥐 모델 대상군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이가 없었다(Fig 4). 또한 정상 대조군은 이동 능력 결과와 마찬가지로 60분, 30분 및 10분 동안의 평가 모두에서 생후 5주부터 모든 헌팅톤 대상군에 비해 현저하게 직립 기능 활동도 수치가 큰 소견을 보였다(p<0.05)(Fig 4).

고찰

신경 줄기세포 및 전구세포(progenitor cell)들은 태아기 뿐만 아니라 성체 포유류의 신경계, 즉 뇌실하 부위(subventricular zone) 및 해마(hippocampus)에서 존재한다고 최근 보고되고 있다.²⁰ 이들 세포 자체로는 손상된 부위를 회복시키는 신경재생 능력이 미약하지만 BDNF, 포피 성장인자(epidermal growth factor; EGF), 섬유아세포 성장인자-2(fibroblast growth factor-2; FGF-2) 및 인슐린유사 성장인자(insulin-like growth factor-1; IGF-1)와 같은 인자에 의해서 신경세포 생성이 더욱 유도되거나 지속될 수 있다.²¹⁻²⁴ 특히 BDNF를 뇌실내로 투여시 뇌실하 부위의 내인성 신경 줄기세포로부터 후두구(olfactory bulb)로 신경세포 이주(migration)가 증가될 뿐만 아니라, 신경생성 부위가 아닌 기저핵의 선조체에도 신경세포 유입(recruitment)이 증가될 수 있다.²⁵

성체 신경계에서도 줄기세포가 존재하고, 특정 부위에서 일생 동안 새로운 신경세포 생성이 일어난다는 사실은 향후 내인성 신경 줄기세포 자극 치료를 통해, 한번 손상되면 재생이 불가능하다고 알고 있던 난치성 중추 신경계 질환을 치료할 수 있는 가능성을 제시한다고 하겠다. 그러나 이들 새로 생성된 신경세포들은 대부분 BDNF의 존재 하에서도 오래 생존하지 못하거나, 신경교세포로 분화하게 된다고 보고되고 있다.²⁶ 따라서 이러한 신경 줄기세포 및 전구세포들은 신경세포로의 생성 유도뿐만 아니라 신경교세포로의 분화를 억제해야 할 필요성이 대두되었다. 기존의 연구에서 골 형태발생 단백질(bone morphogenetic protein; BMP)은 성체 뇌에서 신경 전구세포의 신경교세포화(glio-

genesis)를 유도하였다.^{27,28} 이에 BMP의 길항제인 noggin을 함께 투여하여, 뇌실하 신경 줄기세포가 신경교세포로 분화되는 것을 억제하고, 이로 인하여 BDNF에 반응할 수 있는 뇌실하 신경 줄기세포를 최대한 유지하여 신경세포 생성 유도를 더욱 촉진시키도록 시도되었다.²⁹ 또한 정상 성인 쥐에서 상기 BDNF 및 noggin의 뇌실내 병합 투여시 선조체 내로 새로운 신경세포의 생성 및 유입이 현저하게 증가하는 소견을 관찰할 수 있었다.^{19,29} 새로 생성된 신경세포들은 대부분 DARPP-32 및 GAD67 면역조직 염색으로 표현하는 GABA성 중간가지 신경세포이며, fluorogold backfill 검사상 이들 세포의 신경 섬유는 정상적 신경통로의 표적인 담창구(globus pallidus)로 투사되어, 이들 신경세포가 기능적으로 연결될 수 있는 가능성을 제시하였다.¹⁹

상기 연구 결과에 기초하여 본 연구에서는 인간 헌팅톤 유전자의 첫 번째 엑손에서 약 145개의 CAG 반복염기서열을 포함하도록 조작된 R6/2 형질전환 쥐를 헌팅톤 병 동물 모델로 사용하였다.^{30,31} 이는 Mangiarini 등³¹에 의해 제조된 이후 현재까지 가장 광범위하게 연구되는 모델로, 이들의 신경병리학적 소견 및 임상 증상은 유년기형(juvenile) 헌팅톤 병과 매우 유사하다. 즉 이들은 매우 심하고 점진적인 임상 양상을 보이는데, 생후 5~6주에 운동기능 저하를 보이기 시작하고 생후 8~9주부터 진전 및 무도병 증상과 같은 불수의적 운동 양상 및 보행 장애 등의 전형적인 행동 장애 소견을 보이며, 생후 약 12~13주에 활동도의 심한 감소를 보이며 이후에는 대부분 사망하게 된다.^{32,33} 특히 생존 말기에 경련발작을 보이는데, 이는 생존 기간에 매우 큰 영향을 주게 된다.

본 연구에서는 헌팅톤 병 모델의 운동기능 평가 방법으로 rotarod 검사 및 운동 활동도 검사를 여러 방법으로 시행하여, 치료 효과의 판정에 가장 민감하며 신뢰성 있는 평가 방법을 확인하고자 하였다. 특히 rotarod 검사는 협조운동 기능 및 균형 능력을 평가하기 위해 보편적으로 많이 사용되는 평가법이지만, 연구자마다 고정속력 또는 가속력 검사, 평균 또는 최대 지속시간, 최대 평가 시간, 시행 횟수 등의 평가 방법이 다르며, 처음 rotarod 검사에 적응하기 위한 훈련 방법도 매우 다양하게 보고하고 있다. Ferrante 등^{8,13}은 연속적인 2일간의 훈련을 통한 적응 기간 후, 고정 속력 16 rpm으로 1분 평가를 3차례 시행하였고, Dedeoglu 등^{5,6}은 2차례의 훈련 시행 후, 고정 속력 16 rpm으로 최대 1분 평가를 3차례 시행하여 평균 지속시간을 보고하였으나, Andreassen 등⁴은 1주일간 2차례의 훈련 시행 후, 고정 속력 12 rpm으로 1분 평가를 3차례 시행하여 최대 지속시간을 검사 결과로 사용하였다. 또한 Carter 등³⁴ 및 Wood 등¹⁰은 3일간의 훈련 기간 후, 8가지의 다양한 고정 속력으로 최대 1분 평가를 2차례 시행하여 평균 지속시간을 보고하였으며, Luesse 등³⁵은 R6/2 형질전환 쥐를 대상으로 정상 대조군과의 비교에서 가속력 검사 방법이 고정 속력 방법에 비해

시도 횟수를 줄이면서도 신뢰성 있는 결과를 나타내므로 더 우수하다고 제안하였다.

상기 여러 연구^{3-6,8,13}에서 제시된 최소한의 적응 과정인 2차례 훈련 시행 후 다양한 rotarod 검사 방법을 비교하여 평가한 결과, 평균 지속시간을 측정하는 방법과 최대 지속시간을 측정하는 방법은 각 대상군 결과의 비교 시에 서로 간에 큰 차이가 없었다. 그러나 고정속력 rotarod 검사는 가속력 검사에 비하여, 헌팅톤 병의 각 치료 대상군 간의 차이를 보다 민감하게 구별해 주었으며, 가속력 rotarod 검사는 헌팅톤 병 대상군과 정상 대조군 간의 차이를 보다 현저하게 구별해 주었다. 이를 종합해 볼 때, Luesse 등³⁵의 보고와는 달리 비교하고자 하는 대상군의 성격에 따라 시행 방법을 올바르게 선택하여야 할 것으로 생각한다. 즉, 질병군과 정상 대조군 간의 비교와 같이 현저한 차이가 예상되는 연구인 경우 가속력 방법이 보다 신뢰성 있는 결과를 보여줄 수 있으나, 질병군에서 치료 방법에 따른 대상군 간의 비교, 특히 부분적인 효과만이 예상되는 치료인 경우 적절한 속도의 고정 속력 방법이 보다 민감하게 대상군 간의 차이를 나타낼 수 있다고 생각한다.

또한 rotarod 평가 시간을 1분으로 한정된 경우, 근력 및 지구력(endurance)을 배제하므로 보다 순수하게 운동협조 기능을 평가할 수 있으며, 생존 말기에 BDNF 및 noggin 병합 투여군 뿐만 아니라 BDNF 단독 투여군에서도 null 투여군 및 비 치료군과의 통계학적인 차이를 보이는 소견으로 보아, 질병군에서 치료 방법에 따른 효과의 차이를 가장 예민하게 나타내는 소견을 보였다. 그러나 rotarod 평가 시간을 1분과 3분으로 제한하는 경우에는, BDNF 및 noggin 병합 투여군 및 BDNF 단독 투여군에서 5분 rotarod 평가에서 보여주었던 치료 초기의 효과를 나타내지 못하는 것으로 보아, 대상군 간에 치료 효과의 차이가 예상되는 시점에 따라 적절한 평가 방법을 선택해야 할 것으로 생각한다. 즉, 본 연구에서 사용된 R6/2 헌팅톤 병 동물 모델에서 초기 치료 효과를 설명하고자 한다면 5분 rotarod 검사로 평가해야 하며, 생존 말기의 효과를 강조하고자 한다면 1분 rotarod 검사가 보다 민감한 평가 방법임을 알 수 있었다.

운동 활동도 검사 결과를 10분, 30분 및 60분으로 나누어 평가하였을 때, 정상 대조군은 모든 평가 방법에서 생후 5주부터 지속적으로 헌팅톤 질병군과 차이를 보였다. 그러나, R6/2 헌팅톤 쥐 모델만을 한정하여 각 치료 대상군 간의 결과를 분석하였을 때에는 총 60분 동안 검사를 시행한 경우에만 생존 말기에 BDNF 및 noggin 병합 투여군과 다른 대상군 간에 차이가 나타내기 시작하였다. 따라서 질병군에 부분적인 효과를 보이는 치료 후 이에 대한 적절한 활동도 평가를 위해서는 최소 60분 동안의 평가가 필요함을 알 수 있었다. 이는 Dunnett 등¹⁶의 연구에서 시행한 10분 동안의 평가 결과가 신뢰성을 얻기 위해서는 충분하지 못할 것으로 생각한다.

또한 헌팅톤 병 동물 모델의 운동 능력을 평가할 수 있는 다른 검사 방법으로 아포몰핀 주사 후 유도된 회전 행동의 정도를 평가하는 rotometry 검사,³⁶ 계단에서 앞발을 이용하여 턱이를 취하는 회수를 평가하는 staircase 검사,³⁶ 앞발의 근력을 평가하는 악력(grip strength) 검사,¹⁴ 보행 시 활보 길이(stride length)와 보폭(step width) 등을 측정하는 발자국(print) 검사³⁴가 있으며, 인지기능 평가법으로 공간적 학습(spatial learning) 능력을 측정할 수 있는 모리스 수중미로(Morris watermaze) 검사³⁵ 등이 있다. 상기 검사 방법 중에 rotometry 및 staircase 검사는 선조체 부위에 편측성 병변을 유발한 외부 독성(excitotoxic) 헌팅톤 병 동물 모델에서 주로 비대칭성을 관찰하는 평가법으로, 본 연구에서 사용된 형질전환 동물 모델에는 적합하지 않을 것으로 생각된다. 그러나 악력 및 발자국 검사는 실험동물의 근력 및 보행 기능과 같은 운동 능력을 다양하게 평가하기 위해 향후 헌팅톤 병 모델의 운동기능 평가에 추가하는 것이 바람직하며, 특히 신경퇴행성 질환은 운동기능 뿐만 아니라 인지 기능 장애가 동반되므로, 수중미로 검사와 같은 학습 능력의 평가 또한 필요할 것으로 생각한다.

본 연구의 제한점으로, BDNF 및 noggin 뇌실내 병합 투여가 선조체 내로 신경세포 생성 및 유입을 증가시킨다는 기존의 연구^{19,29}에 근거하여, 이 치료 방법에 의한 기능적 효과를 확인하고 효과적인 평가 방법을 살펴보는 것에 중점을 두었기 때문에, 상기 운동기능 평가와 조직해부학적 결과의 직접적인 연관성을 살펴보는 못하였다. 본 R6/2 동물 모델은 앞서 언급한 바와 같이 생존 말기에 경련발작 등을 통해 갑자기 사망하며 생존 말기 이전에는 본 치료 방법의 효과를 이론적으로 충분히 나타내지 못하므로, 헌팅톤 병 형질전환 쥐 모델 중에서 신경학적 증상이 비교적 양호한 동물 모델을 사용한다면 적절한 시기에 운동기능 평가 및 조직학적 평가 시점을 동시에 시행할 수 있을 것으로 생각한다. 또한 본 연구에서는 수술 및 바이러스 자체에 의한 세포 독성 또는 증식 자극에 의한 영향을 배제하기 위해 정위고정 수술을 통한 바이러스 주입을 시행하지 않은 비 치료군을 대상군에 포함시켰는데, 향후 이러한 신경 세포에 대한 독성 및 증식 자극, 신경재생 또는 신경보호 효과, 신경교세포의 기능적 역할 등에 대해 지속적으로 추가 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다.

결 론

헌팅톤 병 동물 모델에서 운동기능 악화를 지연시키기 위해 시행한 치료법에 대한 기능적 효과를 보다 민감하고 신뢰성 있게 측정하기 위해서는 연구 대상군의 성격 및 치료 효과의 정도와 치료 효과의 차이가 나타날 것으로 예상되는 시점 등을 종합적으로 고려하여, 각종 운동기능 검사의 평가 방법과 시행 시간 등이 적절하게 조절되어야 할

것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Margolis R, Ross C. Diagnosis of huntington disease. Clin Chem 2003; 49: 1726-1732
- 2) DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Davies S, Bates G, Vonsattel J, Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. Science 1997; 277: 1990-1993
- 3) Ferrante R, Andreassen O, Jenkins B, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus J, Kaddurah-Daouk R, Hersch S, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntingtons disease. J Neurosci 2000; 20: 4389-4397
- 4) Andreassen O, Dedeoglu A, Ferrante R, Jenkins B, Ferrante K, Thomas M, Friedlich A, Browne S, Schilling G, Borchelt D, et al. Creatine increases survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. Neurobiol Dis 2001; 8: 479-491
- 5) Dedeoglu A, Kubilus J, Yang L, Ferrante K, Hersch S, Beal MF, Ferrante R. Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. J Neurochem 2003; 85: 1359-1367
- 6) Dedeoglu A, Kubilus J, Jeitner T, Matson S, Bogdanov M, Kowall N, Matson W, Cooper A, Ratan R, Beal MF, et al. Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington disease. J Neurosci 2002; 22: 8942-8950
- 7) Karpuj M, Becher M, Springer J, Chabas D, Youssef S, Pedotti R, Mitchell D, Steinman L. Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. Nat Med 2002; 8: 143-149
- 8) Ferrante R, Andreassen O, Dedeoglu A, Ferrante K, Jenkins B, Hersch S, Beal MF. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington disease. J Neurosci 2002; 22: 1592-1599
- 9) Ryu J, Kim S, McLarnon J. Neuroprotective effects of pyruvate in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. Exp Neurol 2003; 183: 700-704
- 10) Wood N, Morton A. Chronic lithium chloride treatment has variable effects on motor behaviour and survival of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. Brain Res Bull 2003; 61: 375-383
- 11) Chen M, Ona V, Li M, Ferrante R, Fink K, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell L, Hersch S, et al. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. Nat Med 2000; 6: 797-801
- 12) Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya I, Cattaneo E, Ferrante R, Kristal B, Friedlander R. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial

- cell death pathways in models of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10483-10487
- 13) Ferrante R, Kubilus J, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall N, Ratan R, Luthi-Carter R, et al. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 2003; 23: 9418-9427
 - 14) Hockly E, Richon V, Woodman B, Smith D, Zhou X, Rosa E, Santhasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden P, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2041-2046
 - 15) Thoenen H, Sendtner M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 2002; 5: 1046-1050
 - 16) Dunnett S, Carter R, Watts C, Torres E, Mahal A, Mangiarini L, Bates G, Morton A. Striatal transplantation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 1998; 154: 31-40
 - 17) Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt B, Goffredo D, Conti L, MacDonald M, Friedlander R, Silani V, Hayden M, et al. Loss of Huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001; 293: 493-498
 - 18) Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt B, Hayden M, Timmusk T, et al. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 2003; 35: 76-83
 - 19) Chmielnicki E, Benraiss A, Economides A, Goldman S. Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci* 2004; 24: 2133-2142
 - 20) Goldman S. Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J Neurobiol* 1998; 36: 267-86
 - 21) Ahmed S, Reynolds B, Weiss S. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosci* 1995; 15: 5765-5778
 - 22) Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman S. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* 2001; 21: 6718-6731
 - 23) Kirschenbaum B, Goldman S. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 210-214
 - 24) Lindholm D, Carroll P, Tzimagiorgis G, Thoenen H. Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 1452-1460
 - 25) Morshead C, Van der Kooy D. Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* 1992; 12: 249-256
 - 26) Gross R, Mehler M, Mabie P, Zang Z, Santschi L, Kessler J. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 1996; 17: 595-606
 - 27) Lim D, Tramontin A, Trevejo J, Herrera D, Garcia-Verdugo J, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signalling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 2000; 28: 713-726
 - 28) Zimmerman L, Jesus-Escobar J, Harland R. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 1996; 86: 599-606
 - 29) Chmielnicki E, Goldman S. Induced neurogenesis by endogenous progenitor cells in the adult mammalian brain. *Prog Brain Res* 2002; 138: 451-464
 - 30) Davies S, Turmaine M, Cozens B, DiFiglia M, Sharp A, Ross C, Scherzinger E, Wanker E, Mangiarini L, Bates G. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 1997; 90: 537-548
 - 31) Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies S, et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996; 87: 493-506
 - 32) Menalled L, Chesselet M. Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sciences* 2002; 23: 32-39
 - 33) Rubinsztein D. Lesson from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet* 2002; 18: 202-209
 - 34) Carter R, Lione L, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates G, Dunnett S, Morton J. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 1999; 19: 3248-3257
 - 35) Luesse H, Schiefer J, Spruenken A, Puls C, Block F, Kosinski C. Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. *Behav Brain Res* 2001; 126: 185-195
 - 36) Emerich D, Lindner M, Winn S, Chen E, Frydel B, Kordower J. Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci* 1996; 16: 5168-5181