

코로나 감염 개의 뇌혈관 장벽 이상증상 발견

- 한국뇌연구원 김도근 · 건국대 최인수 공동연구팀, 美 CDC 발간 국제학술지 발표
- 코로나19에 감염 개의 후유증과 뇌 병리적 현상 밝혀
- 향후 인간 대상 퇴행성 뇌질환 중개연구 데이터로 활용 기대

한국뇌연구원(원장 서판길)은 치매 연구그룹 김도근 박사 연구팀이 건국대학교 수의과대학 최인수 교수 연구팀과의 공동연구로 코로나바이러스 감염 개에서 뇌 혈관 장벽과 관련된 신경 병리 현상을 발견했다고 9일 밝혔다.

최근 연구들에 따르면, 코로나19에 감염된 환자들에게서 브레인 포그, 두통 및 기억력 감퇴 등 인지기능 장애가 발생했고, MRI 영상분석을 통해 뇌의 가장 바깥쪽 표면 부위인 피질(Cortex)의 두께가 감소되었다고 한다.

공동연구팀은 중형동물인 개 모델을 활용하여 코로나바이러스(SARS-CoV-2) 감염에 따른 신경기계 병리현상, 뇌혈관 장벽 장애 및 면역세포의 활성화 등을 연구한 결과, 코로나19에 감염된 개가 다른 개들에게 바이러스를 전파하고, 감염된 개들의 뇌에서 병리학적 변화가 일어난다는 것을 확인하였다.

연구팀은 코로나바이러스를 직접 감염시킨 모델과 같은 공간에서 사육하여 간접 감염된 모델로 분류하여 감염 시기별 임상증상, 바이러스 검출, 면역 반응 및 폐 병변 등을 관찰하였다.

직접·간접감염 모델에서 모두 4일 이후부터 코와 입을 통해 바이러스가 배출되었다. 하지만, 항체가 검사에서 간접감염 모델이 직접감염 모델보다 약 3일 정도 늦게 혈청반응이 일어났고, 중화항체도 직접 감염 모델이 훨씬 먼저 형성되었다. 이를 통해, 직접감염 모델에서 간접감염 모델로 바이러스가 전염되었다는 것을 알 수 있었다.

추가적으로 수행된 신경의 조직학적 분석에서, 코로나바이러스에 감염

된 개는 뇌를 둘러싼 혈관을 뜻하는 뇌혈관 장벽에 변화가 생겼는데, 감염이 오래 지속 될수록 뇌혈관 장벽의 이상이 더욱 뚜렷하게 나타났다. 뇌혈관 장벽이 무너지면 혈액응고 인자인 섬유소원(fibrinogen)과 면역세포가 뇌실질 조직에 침윤되고, 뇌실질 조직에서 면역세포 역할을 하는 성상교세포(Astrocyte)와 미세아교세포(Microglia)가 활성화되어 뇌의 백색질에서 병리적 현상을 유도하였다. 이는, 바이러스 감염으로 신경기계 장애 또는 퇴행성 장애가 생길 수 있음을 시사한다.

또한, 코로나바이러스에 감염된 개의 백색질에서 신경세포 탈수초화 현상과 더불어 신경세포 축삭돌기의 병리적 현상이 나타났으며, 비정상적인 타우 단백질도 축적 되었다. 또한, 장기간 감염이 지속되면 신경세포의 수가 감소되는 현상도 나타났다.

김도근 박사와 최인수 교수는 “이번 연구를 통해 코로나바이러스 감염으로 퇴행성 뇌질환이 발병될 수 있다는 가능성을 제시하였으며, 향후 코로나 바이러스 감염 후 사람에게서 관찰될 수 있는 잠재적인 신경병리학적 변화를 연구하기 위한 중개연구 데이터로 활용될 수 있을 것”이라고 말했다.

이번 연구는 건국대학교 수의과대학 김동휘 박사 과정생, 김다운 석사, 한국뇌연구원 김규성 학생연구원 (DGIST 박사 과정)이 제1저자로 참여했으며, 국제학술지 ‘Emerging Infectious Diseases (IF:11.8)’ 최신호에 게재되었다.

* (논문명) 개 사이에 전염되는 SARS-CoV-2의 신경학적 영향 (원제: Neurologic Effects of SARS-CoV-2 Transmitted among Dogs)

* (저자) 김동휘(제1저자), 김다운(제1저자), 김규성(제1저자), 김도근(교신저자), 최인수(교신저자)

담당 부서	치매 연구그룹	담당자	선임연구원 김도근 (053-980-8364)
-------	---------	-----	--------------------------

붙임1

연구팀 사진

				
▲ 최인수 교수	▲ 김도근 선임연구원	▲ 김동휘 박사과정생	▲ 김다운 연구원	▲ 김규성 학생연구원

1. 연구의 주요 내용

□ 논문명, 저자정보

논문명	Neurologic Effects of SARS-CoV-2 Transmitted among Dogs
저널명	EMERGING INFECTIOUS DISEASES
저자정보	김동휘(제1저자), 김다운(제1저자), 김규성(제1저자), 한상훈, 고현정, 김재형, 임규범, 이동훈, 이중복, 박승용, 송창선, 이상원, 최창규, 신연경, 권오규, 김도근(교신저자), 최인수(교신저자)*

□ 논문의 주요 내용

1. 연구 배경

- 코로나바이러스 감염증 2019 (Coronavirus Disease 2019 Covid-19)의 발생하여 세계적으로 유행을 하게 되었다. 병원체는 제2형 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)로, 호흡기 비밀이나 작은 입자에 대한 밀접 접촉에 의해서 전파된다. 바이러스로 인한 호흡기 질환과 관련하여 다양한 연구가 진행되었으며, 차후 연구 주제로 다른 장기의 감염 및 코로나 감염 이후의 후유증 관련 연구가 진행되어지고 있다.
- SARS-CoV-2 감염 후 발생하는 후유증 증상에는 전신적 쇠약과 더불어, 신경기계 증상을 나타낼 수 있는 brain fog, 두통, 기억력 감퇴 등의 증상이 보고되고 있다. SARS-CoV-2 감염환자에서 상당수의 환자들은 신경 영상학적 병리 소견 등이 보고되었다. 또한 대규모 코호트 분석 결과, 감염환자들에게서 인지 기능 장애가 발생하였으며, MRI 영상 분석 결과를 통해서 Cortex의 두께가 감소되는 것이 통계학적으로 유의미하게 관찰되었다. 이러한 사례는 SARS-CoV-2의 감염이 신경기계 장애 또는 퇴행성 장애를 일으킬 수 있는 주요인자로 작용할 수 있음을 시사한다.
- 다수의 기초 연구 결과에 따르면, 마우스 동물 모델을 통해 SARS-CoV-2 감염에 의하여 뇌혈관 장벽의 파괴가 나타나는 것이 보고되었으며, 다수의 면역세포의 침윤 등이 관찰되는 등, 말초 혈행 인자의 유입 및 강한 면역 반응이 유도 되는 것이 보고되었다. 본 연구에서는 중형동물인 개 모델을 활용하여 SARS-CoV-2 감염에 따른 신경기계 병리 현상 및 뇌혈관 장벽 장애, 면역세포의 활성화 등을 검증하였다.
- 본 연구팀은 SARS-CoV-2 바이러스의 호흡기 감염을 통한 동물모델로 개를 사용하였으며, 직접 감염 모델과 간접감염 모델을 통해 감염 시기별 뇌에서의 바이러스 검출과 면역 항체의 생성 여부 및 뇌혈관 장벽 장애, 면역세포의 활성화, 신경세포의 병리현상을 통합적으로 연구했다.

2. 연구 내용

- 연구팀은 비글을 활용하여 SARS-CoV-2 delta 바이러스를 호흡기계를 통한 직접감염과 감염된 개와 같은 사육공간을 공유한 간접감염, 이 두 가지 모델을 만들어 각각의 감염 시기별 임상 증상 및 바이러스 검출, 면역반응, 폐 병변 등을 확인하였다.
- 연구팀은 감염모델을 통해 얻은 뇌 조직을 활용하여, 직접감염 모델과 간접감염 모델에서 시기별에 따른 뇌에서의 바이러스 검출 및 신경세포의 감염 여부를 확인하였다.
- 감염 동물에서는 4일 이후로 코인두 및 입인두를 통해 바이러스의 배출이 확인되었으며

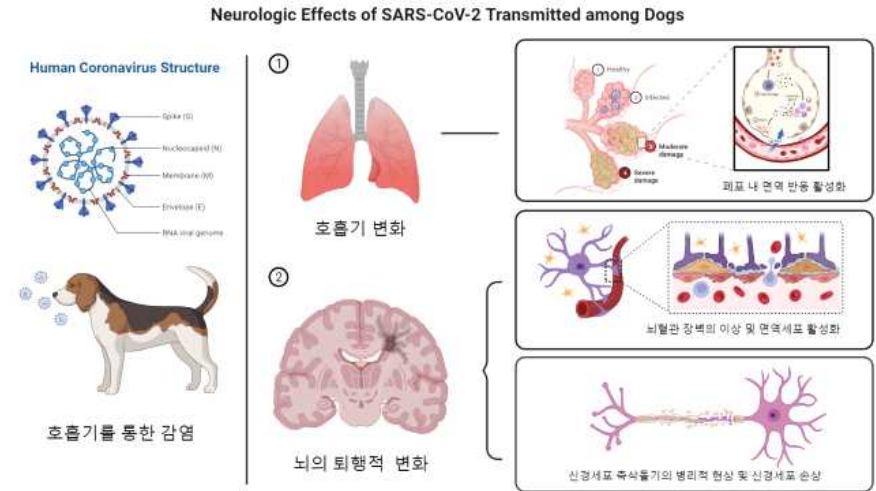
간접감염 모델에서도 동등하게 4일 이후로 바이러스의 배출이 확인되었다. 하지만 항체가 검사 결과 간접감염 모델에서 직접감염 모델에 비하여 약 2~3일 이후 혈청학적 반응이 일어난 점을 확인하였다. 중화항체가 역시 전반적으로 직접감염 모델에서 더 일찍 형성된 점이 확인되었다. 즉, 직접감염 모델 이후 간접감염 모델로의 전파가 이루어진 것으로 사료된다.

- 감염이 진행 된 후 뇌혈관 장벽의 변화가 나타났으며, 감염 후 비교적 장기적으로 감염이 지속된 동물 모델에서 뇌혈관 장벽의 이상이 더 뚜렷하게 나타났다. 또한 혈행 인자인 fibrinogen과 IgG의 뇌세포내의 침윤을 통해 뇌혈관 장벽의 파괴가 이루어짐을 확인하였다.
- SARS-CoV-2 바이러스의 감염으로 인하여 CD4 positive 면역세포의 뇌실질 조직으로 침윤을 확인하였으며, 뇌실질 조직에서 면역세포의 역할을 하는 성상교세포 (Astrocyte)와 미세아교세포 (Microglia)의 활성화는 특이적으로 백색질 (White matter)에서 특징적으로 나타나는 것을 확인하였다. 이를 통해 SARS-CoV-2 바이러스가 뇌의 백색질에서 병리적 현상을 유도하는 것을 확인하였다.
- 게다가 백색질에 위치한 신경세포의 탈수초화 현상과 신경세포의 액손의 병리적 변화를 확인하였으며, 병리적 형태의 타우 단백질의 축적을 시기별 및 감염 경로별로 비교하여 확인하였다. 또한 신경세포의 핵 수의 변화를 통해 간접적으로 신경세포의 양적 변화를 확인해본 결과 비교적 이른 시기에는 유의미한 변화가 없으나, 비교적 장기간의 감염이 지속될 경우 신경세포의 수가 줄어 듦을 확인하였다.

3. 연구 성과 및 기대효과

- 본 연구를 통한 중형동물에서의 감염 및 중간 감염에 따른 뇌 병리 현상을 확인하였으며, 뇌의 백색질에서의 특이적인 면역반응의 활성화와 신경세포의 병리적 변화를 통해 뇌의 부위별에 따른 퇴행성 뇌질환으로의 진행의 가능성을 제시하였다.
- 퇴행성 뇌질환의 발병원인에 있어 다양한 환경적 요인들 중 바이러스 감염에 의한 진행의 가능성을 제시 하였으며, 이를 통해 SARS-CoV-2 바이러스 감염 후 인간에서 관찰될 수 있는 잠재적인 신경 병리학적 변화를 해석하기 위한 중개연구 데이터로 사용될 수 있을 것이다.

2. 연구내용 그림 설명



홍보자료 설명 그림

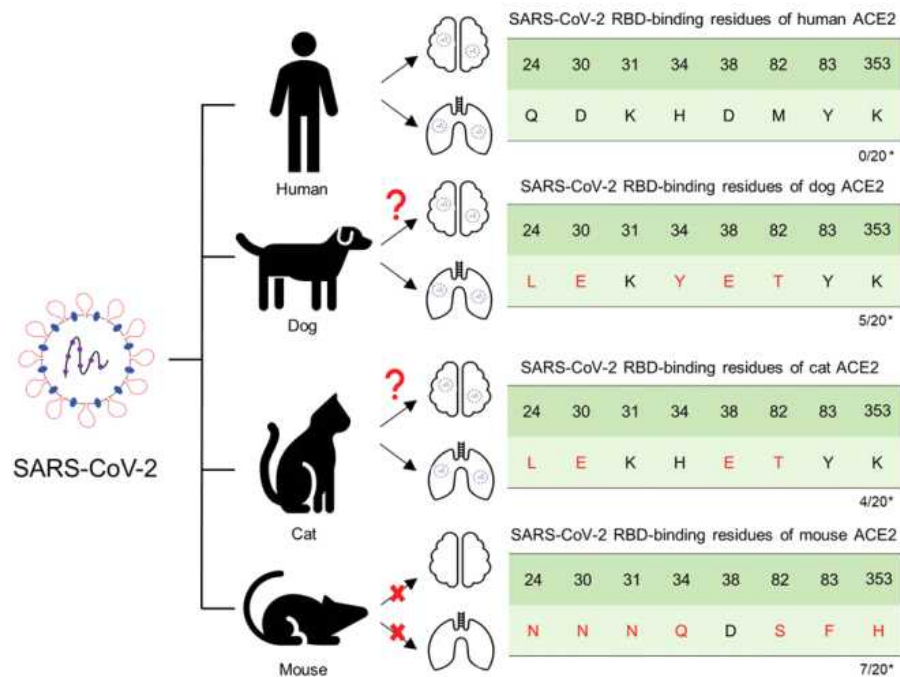
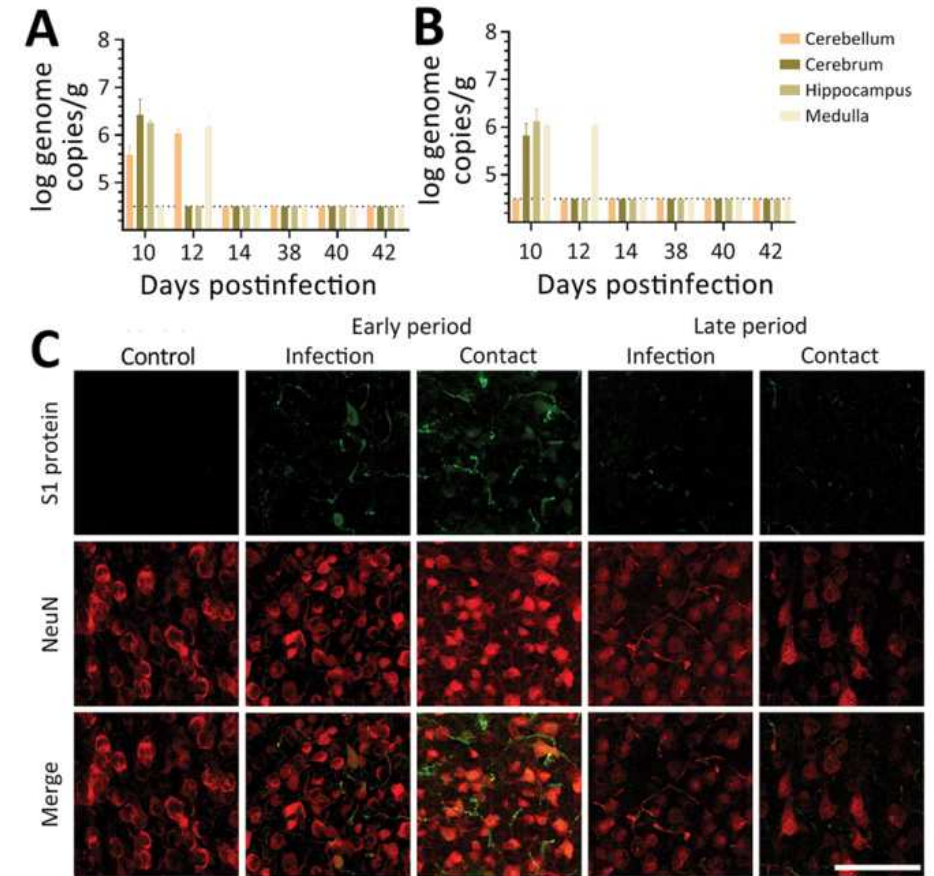
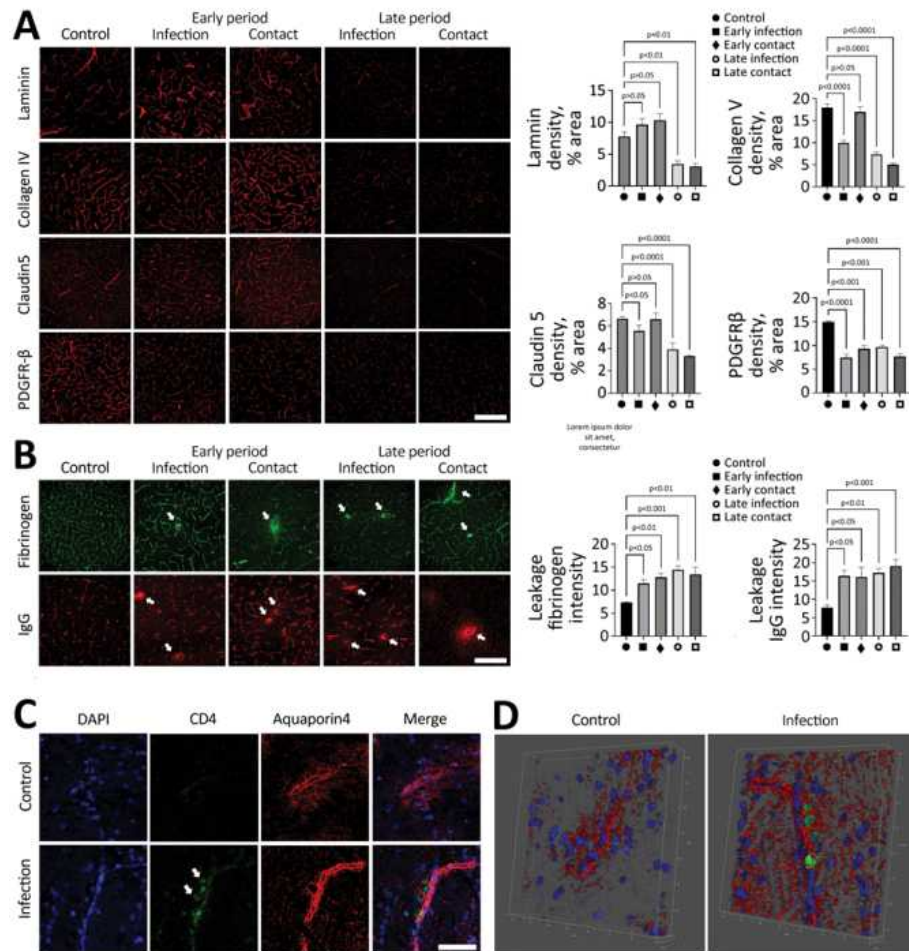


Figure 1. Schematic diagram representing susceptibility to SARS-CoV-2 infection in the lungs and brain of animals with potential for human transmission and homology of ACE2 amino acid sequences in study of the neurologic effects of SARS-CoV-2. *Number of mutations among the key 20 residues involved in interacting with the SARS-CoV-2 RBD. ACE2, angiotensin-converting enzyme 2; RBD, receptor-binding domain.

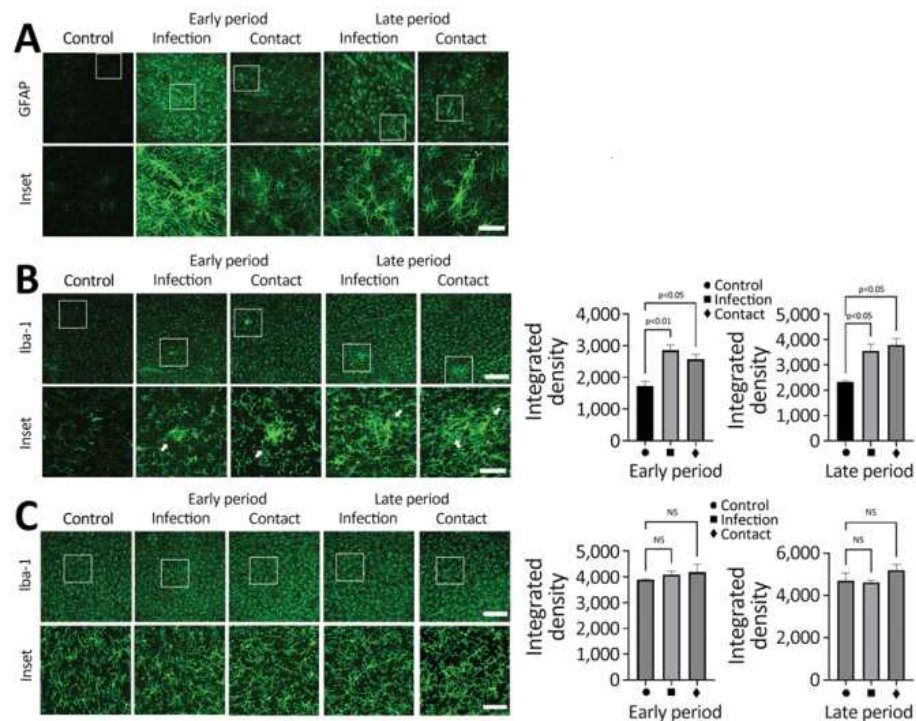


SARS-CoV-2 in the brain of dogs in study of the neurologic effects of SARS-CoV-2, showing transmission at an early stage of infection. A) Quantitative real-time PCR validation of the SARS-CoV-2 gene in the SARS-CoV-2-infected and contact groups of dogs, at each postinfection day. The dashed line indicates the regions where gene copy numbers of SARS-CoV-2 were considered negative. B) Representative fluorescent images of S1 protein (a marker of virus infection) and NeuN (a specific marker of neuronal cells) demonstrated SARS-CoV-2 infection in the canine brain sections of SARS-CoV-2-infected and contact dogs, at early and late days after infection. SARS-CoV-2-infected neuronal cells at the early stage of infection. At the late stage of infection, the presence of the virus appeared to diminish. Scale bars indicate 100 μ m.

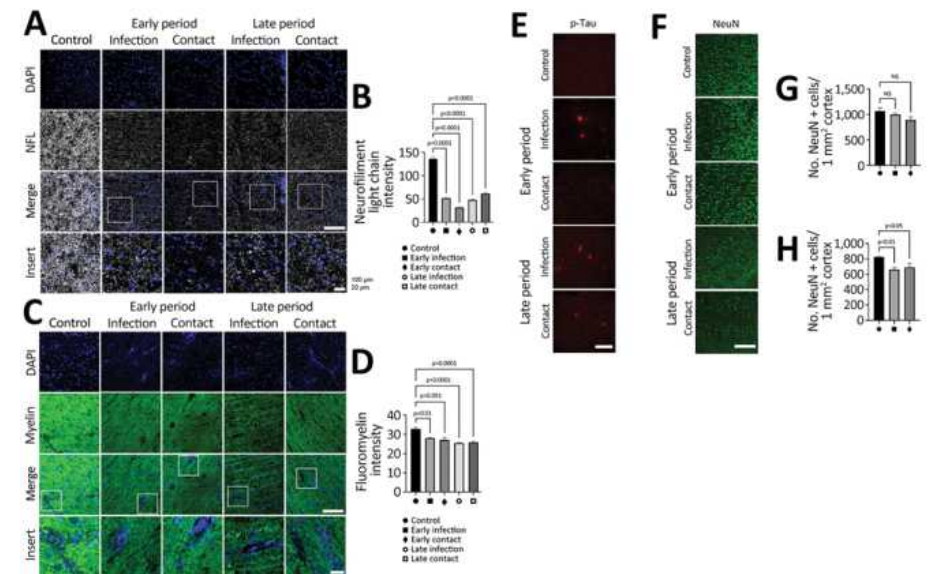


SARS-CoV-2 infection disrupting the blood-brain barrier (BBB) and immune cells infiltrating the brains of infected dogs in study of the neurologic effects of SARS-CoV-2 transmitted among dogs. A) Representative fluorescent images and statistical results of vascular markers including laminin, claudin 5, collagen IV, and PDGFR- β staining of canine brain sections derived from SARS-CoV-2-infected and contact dogs at early and late days after infection. Scale bar indicates 200 μ m. B) Brain sections from SARS-CoV-2-infected and contact dogs stained with fibrinogen (green) and IgG (red), which represent BBB leakage staining, at early and late days after infection. Scale bar indicates 200 μ m. (C) Representative fluorescent images of the brain sections stained with the CD4 (green) and aquaporin 4 (red), which are markers of CD4-positive

T cells and astrocytic end foot, respectively. The CD4-positive cells were infiltrated in the brain parenchyma (white arrows) in the SARS-CoV-2-infected group. Scale bar indicates 50 μ m. (D) Representative 3D images of CD4 (green) and aquaporin 4 (red). Statistical significance was determined using a 1-way analysis of variance. Data are presented as mean \pm SEM.



SARS-CoV-2 induces activation of microglial cells in the brain white matter in a region-specific manner in SARS-CoV-2-infected and contact dogs in study of the neurologic effects of SARS-CoV-2 transmitted among dogs. A) Representative fluorescent images of glial fibrillary acidic protein (activation astrocyte marker, green) staining of canine brain sections derived from SARS-CoV-2-infected and contact groups at early and late days after infection. Scale bars indicate 200 μ m; in insets, 50 μ m. B) Representative fluorescent images and statistical results of Iba-1 (a marker of microglia; green) staining of canine brain white matter sections derived from SARS-CoV-2-infected and contact dogs at early and late dpi. Scale bars indicate 200 μ m; in insets, 50 μ m. C) Representative fluorescent images and statistical results of Iba-1 (a marker of microglia, green) staining of canine brain gray matter sections derived from SARS-CoV-2-infected and contact dogs at early and late dpi. Scale bars indicate 200 μ m; in insets, 50 μ m. Statistical significance was determined using a 1-way analysis of variance. Data in graphs are presented as means \pm SEM.



SARS-CoV-2 infection causing perivascular demyelination in the brain in dogs in study of the neurologic effects of SARS-CoV-2 transmitted among dogs. A, B) Representative fluorescent images and statistical analysis results of NFL (a marker of neurofilament light chain; gray) staining of canine brain white matter sections derived from SARS-CoV-2 infected and contact dogs at early and late dpi. Scale bar indicates 200 μ m. Overall images from infected dogs demonstrate irregular axonal morphology compared with that of control dogs. Single-layer slice images. Scale bar indicates 20 μ m. C, D) Representative fluorescent images and statistical analysis results of myelin (fluoromyelin; green) and DAPI (blue) staining of canine brain white matter sections derived from SARS-CoV-2-infected and contact dogs at early and late dpi. Scale bar indicates 200 μ m. E) Representative fluorescent images of p-tau (red) staining of canine brain gray matter sections derived from SARS-CoV-2-infected and contact dogs at early and late dpi. Scale bar indicates 200 μ m. F-H) Representative fluorescent images (F) and statistical analysis results (G, H) of NeuN (a marker of neuron; green) staining of canine brain gray matter sections derived from SARS-CoV-2-infected and contact dogs at early (G) and late (H) infection. Scale bar indicates 200 μ m. Statistical significance was determined using a 1-way analysis of variance. Data are presented as mean \pm SEM. NS, not significant.

3. 연구자 이력사항

1. 인적사항

- 이 름 : 김 도 근 선임연구원
- 소 속 : 한국뇌연구원 치매연구그룹
- 전 화 : 010-3711-6820
- E - mail : kimvet0911@kbri.re.kr
- <https://sites.google.com/view/neuroimmunologylab/neuroimmunology-lab/on-going-project?authuser=0>

2. 학력 및 경력사항

- 2000-2008 건국대학교 수의과대학 수의학 학사
- 2008-2009 안전성 평가 연구소 연구원
- 2010-2015 코넬대학교 수의과대학 수의학 박사 (미생물/면역학)
- 2015-2016 코넬대학교 수의과대학 박사후 연수연구원
- 2016-현재 한국뇌연구원 치매연구그룹 선임연구원

3. 전문 연구분야

- 뇌혈관 장벽 물질 투과기전 연구
- 뇌혈관 장벽 손상에 의한 신경기계 병리 유도 기전 연구

3. 연구자(김규성 연구원, 제1저자) 이력사항

1. 인적사항

- 이 름 : 김규성
- 소 속 : 대구경북과학기술원 뇌과학과 통합과정생
- 전 화 : 010-3799-4589
- 전자우편 : kks9286@kbri.re.kr

2. 학력 및 경력사항

- 2020 ~ 현재 한국뇌연구원 학생연구원

3. 전문 연구분야

- 말초 혈액인자에 의한 신경면역 활성화 및 퇴행성뇌질환 기전 분석.