



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149593  
(43) 공개일자 2024년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/5091 (2013.01)

G01N 33/5038 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0045322

(22) 출원일자 2023년04월06일

심사청구일자 2023년04월06일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

한국기초과학지원연구원

대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)

(72) 발명자

박은미

서울특별시 양천구 목동동로 350 (목동, 목동신시가지아파트5단지) 531동 404호

이주은

경기도 부천시 소사구 소삼로 47 106동 1403호

(74) 대리인

특허법인한얼

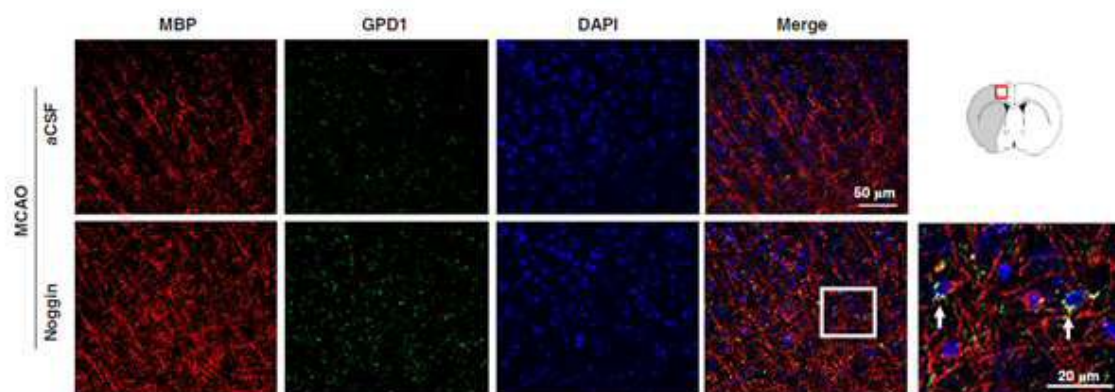
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 글리세롤 및 포름산 대사체 측정을 통한 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법

### (57) 요약

본 발명은 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법; 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체의 수초 손상 또는 회복 여부의 판단 방법; 및 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에 허혈성 뇌졸중 치료 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 처리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌졸중 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 2500/00 (2013.01)

G01N 2800/2871 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                |
|-------------|------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711184373                                     |
| 과제번호        | 2022R1A2C1003564                               |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                      |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                         |
| 연구사업명       | 개인기초연구(과기정통부)                                  |
| 연구과제명       | 말초성 철 대사 조절이 노령 마우스의 정상 및 허혈 손상 후 뇌내 철 수준과 수조화 |
| 에 미치는 영향    |                                                |
| 기 여 율       | 40/100                                         |
| 과제수행기관명     | 이화여자대학교                                        |
| 연구기간        | 2022.03.01 ~ 2024.02.29                        |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                              |
|-------------|----------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711133059                                   |
| 과제번호        | 2019R1A2C1087035                             |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                    |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                       |
| 연구사업명       | 개인기초연구(과기정통부)(R&D)                           |
| 연구과제명       | 여성의 노화성 시계 유전자 기능 변화가 염증 및 허혈성 뇌손상에 미치는 효과 및 |
| 그 기전 연구     |                                              |
| 기 여 율       | 20/100                                       |
| 과제수행기관명     | 이화여자대학교                                      |
| 연구기간        | 2021.03.01 ~ 2022.02.28                      |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                 |
|-------------|-------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711102078                                      |
| 과제번호        | C39526                                          |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                       |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국기초과학지원연구원                                     |
| 연구사업명       | 한국기초과학지원연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)                  |
| 연구과제명       | 소교세포의 표현형 조절 및 수복 작용에서 대사체 변화 및 hepcidin의 역할 규명 |
| 기 여 율       | 20/100                                          |
| 과제수행기관명     | 한국기초과학지원연구원                                     |
| 연구기간        | 2018.07.01 ~ 2019.12.31                         |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                           |
|-------------|---------------------------|
| 과제고유번호      | 1711177064                |
| 과제번호        | C270200                   |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국기초과학지원연구원               |
| 연구사업명       | 한국기초과학지원연구원연구운영비지원(주요사업비) |
| 연구과제명       | 대사체 빅데이터 플랫폼 구축           |
| 기 여 율       | 20/100                    |
| 과제수행기관명     | 한국기초과학지원연구원               |
| 연구기간        | 2022.01.01 ~ 2022.12.31   |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 허혈성 뇌졸중은 만성기 허혈성 뇌졸중인 것인, 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체는 허혈성 뇌질환 치료제가 투여된 개체인 것인, 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 시료는 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체의 뇌척수액, 혈액 또는 소변을 포함하는 체액인 것인, 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 허혈성 뇌졸중의 예후는 수초 손상 회복에 따른 신경손상 회복 여부인 것인, 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 예후 판단 방법은 대사체 분석을 통해 측정된 글리세롤 및 포름산의 수준을 통해 수초 손상의 회복을 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 수초 손상 회복 판단은 글리세롤의 수준이 증가하고 포름산이 감소한 경우 수초 손상이 회복되었다고 판단하는 것인, 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 수초 손상은 글리세롤 수준이 정상 대조군 대비 증가하거나, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체에 치료제를 투여하지 않은 대조군 대비 증가하거나, 포름산 수준이 정상 대조군 대비 감소하거나 또는 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체에 치료제를 투여하지 않은 대조군 대비 감소한 경우 회복되었다고 판단하는 것인, 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법.

#### 청구항 9

허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체의 수초 손상 또는 회복 여부의 판단 방법.

#### 청구항 10

제8항에 있어서, 상기 글리세롤 수준이 정상 대조군 대비 증가하거나, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체에 치료제를 투여하지 않은 대조군 대비 증가하거나, 포름산 수준이 정상 대조군 대비 감소하거나 또는 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체에 치료제를 투여하지 않은 대조군 대비 감소한 경우에 수초 손상 회복 여부를 판단하는 것인, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체의 수초 손상 또는 회복 여부의 판단 방법.

#### 청구항 11

허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에, 허혈성 뇌졸중 치료 후보물질을 처리하는 단계; 및  
상기 처리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 허혈성 뇌졸중 치료제 스크리닝 방법.

## 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 스크리닝 방법은 후보물질 처리에 의해 글리세롤의 수준이 증가하고 포름산이 감소한 경우 허혈성 뇌졸중 치료제로서 판단하는 것인, 허혈성 뇌졸중 치료제 스크리닝 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법; 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체의 수초 손상 또는 회복 여부의 판단 방법; 및 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에 허혈성 뇌졸중 치료 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 처리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌졸중 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 뇌조직은 평상시에도 많은 양의 혈류를 공급받고 있으나, 다양한 원인으로 인하여 뇌혈관이 막히는 폐색이 발생하여 뇌에 공급되는 혈액량이 감소하면 뇌조직이 기능을 제대로 하지 못하게 된다. 뇌졸중은 크게 뇌출혈이라고 부르는 출혈성 뇌졸중과 뇌경색이라고 부르는 허혈성 뇌졸중으로 분류할 수 있으며, 허혈성 뇌졸중은 단일 질환 사망원인 1위로, 생존 환자에서는 다양한 정도의 신경 손상으로 인한 후유증으로 신체 장애를 남기는 주요 뇌질환이다. 허혈성 뇌졸중의 가장 흔한 원인으로는, 고혈압, 당뇨, 고지혈증 등으로 인해 뇌에 혈액을 공급하는 혈관에 동맥경화증이 발생하고, 이로 인해 뇌혈류가 차단되는 경우이다.

[0004] 뇌졸중 유형은 크게 초급성기-급성기-아급성기-만성기의 4단계로 나눌 수 있으며, 구체적으로 뇌졸중 발생 후 24시간 이내를 초급성기라고 부르며, 이 시기는 사망률을 낮추고 후유증을 최소화하기 위해 결정적으로 중요한 시기이다. 뇌졸중이 발생하고 1일에서 7일 사이의 기간을 급성기라고 부르며, 재활치료가 필요한지 여부를 확인한 후 실제 재활 치료가 시작되는 시기이다. 급성기가 끝난 후부터 발병 후 3개월(또는 6개월)까지의 기간을 아급성기라고 하며, 재활 훈련을 받으면서 뇌가 새롭게 재조직화되는 뇌 가소성이 왕성하게 일어나는 시기이다. 뇌졸중이 발생한 후 6개월이 지난 이후부터 24개월까지의 기간을 만성기 또는 유지기라고 부른다.

[0005] 뇌졸중은 고령층에서의 급격한 발생률 증가와 우리 사회의 급속한 노령화 추세 등을 고려한다면 가까운 장래에 매우 심각한 사회적 문제로 대두될 가능성이 높다. 의료전달체계의 개선과 급성기 혈전용해술, 혈전제거술의 비약적 발전으로 치료율이 개선되고 있으나, 인구노령화와 맞물려 뇌졸중 실진료 인원은 지속적으로 증가하고 있으며, 사망률은 감소하는 추세를 보이는 반면에 재발률, 후유장애율이 증가하고 있어 의료적, 사회적 부담을 가중시키고 있다.

[0006] 그러나, 증상 발생 4시간 이내로 사용할 수 있는 혈전 용해제외에는 급성기 치료제가 없고, 특히 급성기 이후 신경 손상을 회복시키는 약물 치료 방법은 없으며, 임상적 증상과 뇌 이미지 영상이외에는 신경 손상 후 회복을 예측할 수 있는 방법이 부재하다.

[0007] 한편, 수초(myelin sheath)는 신경세포의 축삭(axon)을 둘러싸고 있는 절연물질이며, 수초가 벗겨져 탈락될 경우 신경신호의 전도에 이상이 생기고, 해당 신경세포가 죽게 된다. 뇌의 빠른 신경 신호 전달은 희소돌기아교세포(oligodendrocytes)에서 만들어진 수초에 의해 전달되며, 이러한 세포는 뇌졸중과 같은 상태에서 혈액 신호 공급 차단과 다른 혈액 순환 이상에 의해 손상 받을 수 있다.

[0008] 대사체학(Metabolomics)은, 오믹스(-omics)의 한 분야로서, 유전자나 단백질의 기능을 밝히는 유전체학(genomics), 전사체학(transcriptomics)이나 단백질체학(proteomics)과 더불어 중요한 연구 분야일 뿐만 아니라, 대사과정을 연구하고, 대사적 특징과 관련된 중요한 생체 표지자와 같은 바이오마커를 동정함으로써, 유전

적, 생리적, 병리적 또는 환경적인 조건에서 일어나는 저분자 대사체군(metabolome)(100-1000 Da)의 패턴과 농도 등의 분석을 통해 생명현상의 변화와 원인을 규명해 나가는 연구 분야이다.

[0009] 최근에는, 포름산을 포함한 혈장 대사산물 변화를 통해 뇌종양 유형간의 차이를 확인하거나, 다발성 경화증(MS) 및 시신경 척수염 스펙트럼 장애(NMOSD)와 같은 탈수초질환 환자의 뇌척수액의 대사체 특성화 및 비교 분석 등을 통해 질병을 구별하거나, 혈액 대사체 분석에서 글리세롤 및 포름산 대사체의 변화에 대한 연구가 보고된 바 있으나(IUBMB Life. 2019 Dec;71(12):1994-2002; PLoS One. 2017 Jul 26;12(7)), 글리세롤 또는 포름산 대사체 변화가 만성기 허혈성 뇌졸중 후 수초 손상 및 회복과 관련한 연구에 대해서는 보고된 바 없다.

[0011] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 만성기 허혈성 뇌졸중의 뇌 대사체 분석을 통한 신경 손상 회복을 예측할 수 있는 방법을 개발하고자 연구노력한 결과, 허혈성 뇌졸중 유도 뇌세포주의 세포 내/외 및 마우스에 노킨을 처치한 뇌에서 대사체 분석을 통해 공통적인 변화 양상을 보이는 글리세롤과 포름산 대사체를 확인함으로써 수초 손상 정도를 예측하고, 상기 글리세롤과 포름산의 증감 측정을 통해 허혈성 뇌졸중 치료제 후보물질 처치에 대한 수초 회복 여부 및 예후를 판단하는데 활용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 하나의 목적은, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 하나의 목적은, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체의 수초 손상 또는 회복 여부의 판단 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에, 허혈성 뇌졸중 치료 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 처리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌졸중 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0017] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0019] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌졸중의 예후 판단 방법을 제공한다.

[0020] 또한, 상기 방법은 대사체 분석을 통해 측정된 글리세롤 및 포름산의 수준을 통해 수초 손상의 회복을 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 용어, "허혈성 뇌졸중(ischemic stroke)"은, 뇌경색과 일과성 허혈성 발작을 모두 통틀어 일컫는 용어로, 뇌혈류 감소가 일정 시간 이상 지속되면 뇌조직의 괴사가 시작되며, 뇌조직이 괴사되어 회복 불가능한 상태에 이르렀을 때 이를 뇌경색(cerebral infarction)이라고 한다. 또한, 뇌혈류 감소에 의해 뇌기능에 이상이 생겼지만, 적절한 치료를 통해 충분한 뇌혈류가 다시 공급되어 뇌조직의 괴사 없이 뇌기능이 회복되었을 때를 일과성 허혈성 발작(transient ischemic attack)이라고 부른다.

[0022] 상기 허혈성 뇌졸중은 발생 시간에 따라 크게 초급성기-급성기-아급성기-만성기의 4단계로 나눌 수 있으며, 본 발명의 목적상, 상기 허혈성 뇌졸중은 만성기 허혈성 뇌졸중을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 상기 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체는 구체적으로, 허혈성 뇌질환 치료제가 투여된 개체를 의미할 수 있다.

- [0024] 상기 시료는 뇌척수액, 혈액 또는 소변을 포함하는 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체의 체액을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 글리세롤 및 포름산은, 노긴(noggin) 처리된 마우스 유래 미세아교세포주인 BV2 세포, 사람 유래 희소돌기아교세포인 MO3.13 세포 및 허혈성 뇌졸중 유도 마우스 뇌조직에서 대사체 분석으로 공통적 변화양상을 보인 대사체를 의미할 수 있다.
- [0026] 상기 용어, "대사체(metabolites)"는 대사과정에서 생성되는 다양한 생성물을 지칭하는 것으로 숙주 생물뿐만 아니라 외인성 요소(예를 들어, 감염 미생물)로부터 생산되기도 하며, 광범위한 생리/생화학적 작용에 영향을 미친다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 대사체는 만성기 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체의 뇌척수액, 혈액 또는 소변에서 측정할 수 있으며, 구체적으로, 뇌척수액에서 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 대사체를 분석하는 방법으로는, 고분해능 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 분광분석기 및 질량 분석기(mass spectrometry, MS) 시스템 같은 분석기기를 통해 정량화하여 분석할 수 있으며, 상기 MS에서 가장 많이 사용되는 분석법은 GC-MS(Gas Chromatograph-MS), LC-MS(Liquid Chromatograph-MS) 및 CE-MS(Capillary Electrophoresis-MS)를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 허혈성 뇌졸중 치료제는 노긴(noggin)을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 상기 노긴(noggin)은, NOG라고도 알려져 있으며, 신경 조직, 근육 및 뼈를 포함한 많은 신체 조직의 발달에 관여하는 단백질이다. 또한, 뼈형성 단백질(bone morphogenetic proteins, BMPs)의 내성적 길항제이며, 최근에는 노긴 처리가 미세아교세포의 대체 활성화를 증가시켜 허혈성 뇌졸중을 회복하는 동안 뇌조직 복구에 기여함이 보고된 바 있다(KR 10-1734934 B1).
- [0031] 본 발명의 용어, "예후"는, 본 발명의 용어 "예후"란, 의학적 귀추(예컨대, 장기 생존 가능성, 무병생존율 등)에 대하여 예상하는 일체의 행위를 의미하며, "예후예측"과 동일한 의미로 사용된다. 대체로, 상기 예후는 양성적 예후(긍정적 예후) 또는 음성적 예후(부정적 예후)를 포함하며, 상기 음성적 예후는 재발, 종양 성장, 전이, 약 저항성 등의 병의 진행 또는 치명성(mortality)을 포함하고, 양성적 예후는 질병이 없는 상태등의 질병의 차도, 종양 퇴행 등의 질병의 개선 또는 안정화(stabilization)를 포함한다.
- [0032] 본 발명의 목적상, 상기 예후는 허혈성 뇌졸중으로 진단받은 환자의 병의 경과(병의 진행, 개선, 허혈성 뇌졸중의 재발, 허혈성 뇌졸중의 의학 저항성 등)를 미리 짐작하는 일체의 행위로 해석될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 용어, "수초(myelin sheath)"는, 신경세포의 축삭(axon)을 둘러싸고 있는 절연물질이며, 수초가 벗겨져 탈락될 경우 신경신호의 전도에 이상이 생기고, 해당 신경세포가 죽게 된다. 뇌의 빠른 신경 신호 전달은 희소돌기아교세포에서 만들어진 수초에 의해 전달되며, 이러한 세포는 뇌졸중과 같은 상태에서 혈액 산소 공급 차단과 다른 혈액 순환 이상에 의해 손상 받을 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 수초는 허혈성 뇌졸중에 의해 손상될 수 있으며, 손상된 수초의 회복 또는 형성에 따라 허혈성 뇌졸중 예후를 판단할 수 있으며, 보다 구체적으로, 허혈성 뇌졸중 치료 물질 투여에 의해 상기 글리세롤의 수준이 증가하고, 포름산 수준이 감소한 경우, 수초 손상이 회복되었다고 판단할 수 있다.
- [0035] 구체적으로, 상기 글리세롤 수준의 증가는 정상 대조군 대비 증가한 경우를 의미할 수 있고, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체에 치료제를 투여하지 않은 대조군(vehicle) 대비 증가한 경우를 의미할 수 있다. 또한, 상기 포름산 수준의 감소는 정상 대조군 대비 감소한 경우를 의미할 수 있고, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체에 치료제를 투여하지 않은 대조군(vehicle) 대비 감소한 경우를 의미할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에서는, 노긴 처리가 뇌허혈 및 재관류 (ischemia and reperfusion, I/R)에 의해 자극된 미세아교세포(microglia) 대사를 변화시키는지 알아본 결과, 노긴 처리는 비히클(vehicle) 세포에서 증가된 포도당 수치, 젖산 및 피로글루타메이트 수치를 역전시켰을 뿐만 아니라(모두  $p < 0.01$  vs. 비히클), 대조군 수준( $p < 0.05$ , 표 1)보다 글루코스 및 피로글루타메이트 수준을 추가로 감소시켰고, 라이신(비히클 대비  $p = 0.04$ ), 류신, 이소류신, 티로신, 트레오닌, 발린 및 타우린(모두  $p < 0.05$  대 대조군; 표 1)을 포함한 여러 아미노산의 수준을 유의하게 감소시켰으며, 포도당 및 아미노산(알라닌, 페닐알라닌, 글루타민, 세린, 트립토판, 히스티딘 및 발린)을 포함하는 8가지 대사체의 수준을 증가시켰다(도 1 및 표 1).

- [0037] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 희소돌기아교세포의 세포 내 대사가 노긴 CM에 의해 영향을 받는지 알아보기 위해, 대조군인 MO3.13 세포와 비히클 CM 또는 노긴 CM에 노출된 세포의 대사체를 분석한 결과, 노긴 CM에 노출된 세포 내 이들 대사체의 수준은 비히클 CM- 및 노긴 CM-노출된 세포 모두에서 증가된 글루코스를 제외하고는 대조군 세포 수준(모두  $p < 0.01$  vs. 비히클 CM)으로 되돌아갔으며, 또한 막 인지질 합성의 전구체인 글리세롤은 노긴 CM에 의해 대조군 세포에서 관찰된 수준보다 유의하게 증가하였다(도 2 및 표 2).
- [0038] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 희소돌기아교세포에서 비히클 CM 및 노긴 CM에 의해 유의하게 변경된 대사 경로를 확인한 결과, TCA 회로, 피루브산 대사, 글리세롤리피드 대사 및 여러 아미노산 대사 경로는 비히클 CM 및 노긴 CM에 의해 교란되는 주요 대사 경로임을 확인하였다(도 3).
- [0039] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 노긴이 허혈성 뇌 대사를 변화시켰는지 여부를 확인하기 위해 노긴 처리된 마우스 뇌에 대해 대사체학 분석을 실시한 결과, 노긴에 의해 유도된 가장 현저한 변화는 콜린 수준의 증가를 나타냈고, 글리세롤의 증가 및 포름산염 수준의 감소를 나타냈다(도 4 및 표 3).
- [0040] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 노긴 처리된 허혈성 뇌에서의 글리세롤 증가가 희소돌기아교세포에서 일어나는지 확인한 결과, 수초단백인 MBP로 둘러싸인 세포질에서 글리세롤 대사에 필요한 GPD1의 발현 증가를 확인하였다(도 5).
- [0042] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체의 수초 손상 또는 회복 여부의 판단 방법을 제공한다.
- [0043] 상기 허혈성 뇌졸중 및 수초는 상술한 바와 같다.
- [0045] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체로부터 분리된 시료에, 허혈성 뇌졸중 치료 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 처리된 시료에서 글리세롤 및 포름산의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 허혈성 뇌졸중 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0046] 상기 허혈성 뇌졸중은 상술한 바와 같다.
- [0047] 본 발명의 용어, "후보물질"은 허혈성 뇌졸중을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질 또는 그 예후를 개선시킬 수 있을 것으로 기대되는 물질로서, 직접 또는 간접적으로 허혈성 뇌졸중을 호전 또는 개선시킬 수 있을 것으로 예상되는 물질이면 제한되지 않는다. 상기 후보물질의 예로는 화합물, 유전자 또는 단백질 등의 모든 치료 가능 예상 물질을 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 스크리닝 방법은, 상기 후보물질 투여 후 대사체 분석을 통한 글리세롤 및 포름산 수준을 측정하는 한편, 상기 글리세롤이 정상 대조군 대비 증가하거나, 후보물질이 투여되지 않은 대조군 대비 증가한 경우, 해당 후보물질을 허혈성 뇌졸중에 대한 치료제로 판단할 수 있다. 또한, 포름산이 정상 대조군 대비 감소하거나, 후보물질이 투여되지 않은 대조군 대비 감소한 경우, 해당 후보물질을 허혈성 뇌졸중에 대한 치료제로서 판단할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 허혈성 뇌졸중에 대한 치료제로서 노긴(noggin)을 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

## 발명의 효과

- [0051] 본 발명에 따른 허혈성 뇌졸중이 발병한 개체에 대한 글리세롤 및 포름산 증감 측정을 포함하는 예후 판단 방법에 의해 새로운 치료제 후보물질에 대한 수초 회복 여부 및 허혈성 뇌졸중의 예후를 판단할 수 있음을 확인하였다.

## 도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 산소-포도당 박탈/재관류(OGD/R) 후 BV2 미세아교세포내 및 세포외 대사체 수준에 대한 노킨 효과를 나타낸 것이다.

도 2는 희소돌기아교세포 MO3.13 세포내 대사체 수준에 대한 노킨 CM의 효과를 나타낸 것이다.

도 3은 희소돌기아교세포에서 비히클 CM 및 노킨 CM에 의해 변경된 대사 경로를 확인한 것이다.

도 4는 허혈성 뇌의 대사체에 대한 노킨 효과를 나타낸 것이다.

도 5는 노킨 처리된 허혈성 뇌에서 GPD1 발현 증가 여부를 확인한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

#### [0056] 실험예 1. 세포배양

[0057] 허혈성 뇌졸중 환자의 노킨 투여에 의한 수초 형성 증가 여부 및 대사 작용을 관찰하기 위해, 마우스 유래 불멸화 뮤린 BV2 미세아교세포주 및 일차 희소돌기아교세포의 표현형 특성을 발현하는 불멸화 인간 희소돌기 아교세포 MO3.13 세포주를 사용하였다. 수초의 주요 단백질은 인간과 마우스 사이에서 보존되기 때문에, MO3.13세포 연구를 통해 다른 배양 배지 사용에 따른 영향을 최소화하여 배양하였다.

[0058] 구체적으로, 이들 세포는 10% 태아 소 혈청, 100 U/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium에서 개별적으로 배양하였으며, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기 하의 무습 인큐베이터에서 배양하였다. 세포는 웰당  $5.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$  세포의 씨딩 밀도로 배양하였다. 재조합 인간 노킨을 PBS(phosphate-buffered saline)에 용해하여 100 µg/mL의 스톡 용액을 준비하고, 비히클(PBS/mL 1µL) 또는 노킨(최종 농도 100 ng/mL)을 산소-포도당 박탈/재관류(oxygen-glucose deprivation reperfusion, OGD/R) 3 시간 후 BV2 세포에 첨가하였다.

#### [0060] 실험예 2. 산소-포도당 박탈/재관류(OGD/R)

[0061] OGD/R는 컨플루언트 BV2 세포를 신선한 배지로 2회 세척하고, 94% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/1% O<sub>2</sub> 하에서 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>로 미리 가스 처리된 글루코스가 없는 Earle's 용액으로 2시간 동안 배양하였다. 재관류는 10% 태아 소 혈청, 100 U/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신이 보충된 새로운 정상 DMEM에 세포를 넣고 95% 공기/5% CO<sub>2</sub> 분위기에서 유지함으로써 유도하였다.

[0062] 재관류 3시간 후, 비히클 또는 노킨(100 ng/mL)을 3시간 동안 첨가하고 배양 배지를 CM(비히클 CM 또는 노킨 CM, 도 1A)으로 수집하였다. 상기 채취한 배양액을 15 mL 코니컬 튜브에 옮긴 후, MO3.13 세포를 준비하면서 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 조건의 인큐베이터에 보관하였다. 대사체 분석을 위해 세포도 수집하였다.

[0063] 다음으로, 정상 조건에서 배양된 MO3.13 세포의 배양 배지를 제거하고, 세포를 희석하지 않고 비히클 CM 또는 노킨 CM과 함께 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 비히클 CM 또는 노킨 CM을 일반 배지로 교체하고 48시간 동안 유지하였다(도 2A).

[0064] 대조군 세포는 OGD/R과 동일한 방식으로 95% 공기/5% CO<sub>2</sub> 하에서 새로운 정상 배지와 함께 배양하였다.

[0065] 산소-포도당 박탈/재관류 후 활성화된 BV2 세포에서 노킨 처리에 의해 유도된 세포내 및 세포외 대사산물 수준의 변화는 하기 표 1에 나타내었다. 또한, MO3.13 세포에서 noggin 조절 배지에 의해 유도된 세포내 대사산물의 변화는 표 2에 나타내었다.

표 1

| Metabolites            | Fold changes   |                | P values    |             |
|------------------------|----------------|----------------|-------------|-------------|
|                        | vs. Control    | vs. Vehicle    | vs. Control | vs. Vehicle |
| Intracellular          |                |                |             |             |
| Glucose                | 0.78<br>± 0.07 | 0.66<br>± 0.02 | 0.02        | < 0.01      |
| Lactate                | 0.86<br>± 0.03 | 0.74<br>± 0.03 | —           | < 0.01      |
| Pyroglutamate          | 0.81<br>± 0.04 | 0.79<br>± 0.01 | 0.01        | < 0.01      |
| Lysine                 | 0.81<br>± 0.04 | 0.80<br>± 0.01 | —           | 0.04        |
| Leucine                | 0.83<br>± 0.03 | 0.89<br>± 0.01 | 0.02        | —           |
| Isoleucine             | 0.80<br>± 0.01 | 0.87<br>± 0.04 | < 0.01      | —           |
| Taurine                | 0.86<br>± 0.01 | 0.99<br>± 0.04 | 0.04        | —           |
| Threonine              | 0.86<br>± 0.02 | 0.97<br>± 0.04 | 0.03        | —           |
| Tyrosine               | 0.72<br>± 0.02 | 0.83<br>± 0.07 | 0.03        | —           |
| Valine                 | 0.81<br>± 0.02 | 0.87<br>± 0.02 | 0.01        | —           |
| Extracellular          |                |                |             |             |
| Glucose                | 1.09<br>± 0.03 | 1.11<br>± 0.03 | 0.03        | 0.02        |
| Alanine                | 1.12<br>± 0.04 | 1.15<br>± 0.05 | 0.03        | 0.02        |
| Phenylalanine          | 1.09<br>± 0.03 | 1.09<br>± 0.03 | 0.02        | 0.02        |
| Glutamine              | 1.07<br>± 0.02 | 1.07<br>± 0.03 | 0.03        | 0.04        |
| Serine                 | 1.14<br>± 0.03 | 1.14<br>± 0.03 | 0.01        | 0.02        |
| Tryptophan             | 1.08<br>± 0.01 | 1.09<br>± 0.00 | < 0.01      | < 0.01      |
| Pyroglutamate          | 1.07<br>± 0.03 | 1.12<br>± 0.02 | —           | < 0.01      |
| 2-oxoisocaproate       | 1.00<br>± 0.01 | 1.12<br>± 0.04 | —           | 0.01        |
| 3-methyl-2-oxovalerate | 0.99<br>± 0.03 | 1.15<br>± 0.07 | —           | 0.03        |
| Histidine              | 1.07<br>± 0.02 | 1.06<br>± 0.02 | 0.04        | —           |
| Valine                 | 1.13<br>± 0.03 | 1.10<br>± 0.04 | 0.02        | —           |

[0066]

표 2

| Metabolites            | Fold changes   |                | P values    |                |
|------------------------|----------------|----------------|-------------|----------------|
|                        | vs. Control    | vs. Vehicle CM | vs. Control | vs. Vehicle CM |
| Glycerol               | 1.96<br>± 0.03 | 2.61 ± 0.11    | < 0.01      | < 0.01         |
| Glucose                | 1.20<br>± 0.00 | 1.04 ± 0.02    | < 0.01      | —              |
| Pyruvate               | 1.31<br>± 0.07 | 1.69 ± 0.24    | —           | < 0.01         |
| Creatine               | 0.95<br>± 0.01 | 0.69 ± 0.02    | —           | < 0.01         |
| Creatine Phosphate     | 0.94<br>± 0.01 | 2.02 ± 0.04    | —           | < 0.01         |
| ADP                    | 1.07<br>± 0.07 | 0.66 ± 0.04    | —           | 0.01           |
| Acetate                | 1.01<br>± 0.02 | 0.73 ± 0.02    | —           | < 0.01         |
| 2-oxoglutarate         | 1.01<br>± 0.01 | 1.27 ± 0.03    | —           | < 0.01         |
| Fumarate               | 0.95<br>± 0.02 | 0.78 ± 0.02    | —           | < 0.01         |
| Succinate              | 0.98<br>± 0.01 | 0.79 ± 0.01    | —           | < 0.01         |
| Choline                | 0.86<br>± 0.03 | 0.21 ± 0.01    | —           | < 0.01         |
| Formate                | 0.92<br>± 0.07 | 0.69 ± 0.05    | —           | 0.01           |
| 3-methyl-2-oxovalerate | 0.92<br>± 0.03 | 1.30 ± 0.07    | —           | 0.02           |

[0067]

[0069]

실험예 3. 대사체 분석을 위한 시료 준비

[0070]

세포 외 대사체 추출을 위해 대조배지, 비히클 CM, 노킨 CM 1 mL을 각각 냉메탄올 2 mL와 혼합하고, -20℃에서 30분간 유지하여 단백질을 침전시켜 제거하였다. 각 혼합물을 12,500 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하고 상등액을 동결건조하였다.

[0071]

세포 내 대사체 추출을 위해, BV2 세포(대조군 및 OGD/R 후 비히클 또는 노킨 처리) 및 MO3.13 세포(대조군 및 비히클 CM 또는 노킨 CM 처리)  $5.0 \times 10^6$  를 Dulbecco's PBS로 2회 빠르게 세척하고, 1 mL의 메탄올/물(8:2, v/v) 혼합물에 넣어 5 mL 에펜도르프 튜브로 옮겼다. 상기 추출을 두 번 반복하였다. 이후, 각 세포 추출액을 1분간 볼텍싱 후 -20℃에서 30분간 유지하고, 12,500 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 동결건조하였다.

[0072]

배지 및 세포 추출물 모두 570  $\mu$ L의 100 mM 인산나트륨 완충 중수소 산화물(pH 7.0)에서 재용해하고, 30  $\mu$ L의 6 mM 및 1 mM 3-(트리메틸실릴)프로피온산-2,2,3,3-d4 산(TSP-d4)과 각각 혼합하였다. 이후, 12,500 rpm, 4℃에서 20분 동안 원심분리하고, 시료 600  $\mu$ L를 5 mm 핵자기공명(NMR) 튜브로 옮겼다.

[0073]

뇌조직의 대사체 추출을 위해 2.8 mm 지르코늄 옥사이드 비드를 포함한 1 mL의 균질화 튜브에 우측 반구 뇌조직 120g mg을 넣고 350  $\mu$ L 메탄올-d4와 150  $\mu$ L의 200 mM 인산나트륨 완충 중수소 산화물(pH 7.0)를 첨가하였다. 5,000 rpm에서 20초 동안 균질화 한 뒤 시료 튜브에 210  $\mu$ L 메탄올-d4, 90  $\mu$ L의 200 mM 인산나트륨 완충 중수소 산화물(pH 7.0), 400  $\mu$ L의 클로로폼-d1을 첨가하여 1분동안 섞어주었다. 시료 혼합물을 12,500 rpm, 4℃에서 20분 동안 원심분리하고, 540  $\mu$ L의 상등액과 60  $\mu$ L의 5 mM 3-(트리메틸실릴)프로피온산-2,2,3,3-d4 산(TSP-d4)과 섞어준 뒤 5 mm 핵자기공명(NMR) 튜브로 옮겼다.

[0075]

실험예 4.  $^1\text{H}$  핵자기공명 분광 분석기 기반 대사체 분석

[0076]

Bruker 5mm CPTCI Z-GRD 프로브가 장착된 Bruker Avance III HD 800-MHz NMR spectrometer와 NOESYPRESAT 펄스 시퀀스를 사용하여, BV2 세포 외 대사체 및 뇌 대사체의 128개 스캔과 BV2 및 MO3.13 세포의 세포 내 대사체

256개를 스캔하여 298K에서  $^1\text{H}$  핵자기 공명(NMR) 스펙트럼을 각각 획득하였다.

[0077] NMR 스펙트럼 측정변수 설정은 다음과 같다: 이완 지연(relaxation delay), 2.0; 스펙트럼 폭, 20 ppm; 획득 시간, 2.0.

[0078] 획득한 모든 NMR 스펙트럼은 각각 TopSpin(버전 3.1, Bruker BioSpin) 및 AMIX(버전 3.9.7, Bruker BioSpin) 소프트웨어를 사용하여 위상 조정 및 베이스라인 보정을 실시하였다.

[0079] 세포외 및 세포내 대사체의 화학적 이동(chemical shift, ppm)은 Chenomx NMR 소프트웨어 버전 7.1을 사용하여 제시하였으며, Chenomx의 800MHz NMR 라이브러리, 2D NMR 스펙트럼( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, total correlation spectroscopy;  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) 및 스카이킹 실험을 기반으로 각 대사체를 확인하였다.

[0080] 각 대사체의 수준에 대한 정량화는 Chenomx NMR 소프트웨어 버전 7.1을 사용하여 개별 화합물의 농도를 결정하기 위해 알려진 참조 신호(TSP-d4)의 영역에 상대적인 대사체의 피크 영역을 적분하고, 이를 비교하여 결정하였다. 또한, MetaboAnalyst 소프트웨어 버전 5.0을 활용하여 도 3의 대사경로 분석을 수행하였다.

[0081] 노긴 처리된 마우스의 허혈성 뇌에서의 대사체 변화는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

| Metabolites     | Fold changes |             | P values    |          |
|-----------------|--------------|-------------|-------------|----------|
|                 | vs. Control  | vs. aCSF    | vs. Control | vs. aCSF |
| Choline         | 7.94 ± 1.32  | 4.50 ± 0.75 | < 0.01      | < 0.01   |
| Glycerol        | 2.41 ± 0.18  | 3.30 ± 0.17 | < 0.01      | < 0.01   |
| 4-Aminobutyrate | 1.68 ± 0.07  | 1.32 ± 0.06 | < 0.01      | 0.02     |
| Lysine          | 1.57 ± 0.05  | 1.20 ± 0.04 | < 0.01      | —        |
| Alanine         | 1.49 ± 0.06  | 1.49 ± 0.06 | 0.01        | 0.01     |
| Lactate         | 1.37 ± 0.06  | 1.10 ± 0.05 | < 0.05      | —        |
| Fumarate        | 1.36 ± 0.03  | 1.27 ± 0.03 | 0.02        | 0.04     |
| Glutamate       | 0.69 ± 0.06  | 0.88 ± 0.08 | < 0.01      | —        |
| Formate         | 0.48 ± 0.01  | 0.43 ± 0.01 | < 0.01      | < 0.01   |

[0082] 대사 경로 분석은 MetaboAnalyst 5.0 데이터베이스를 사용하여 수행하였다.

### [0083] 실험예 5. 동물실험 및 일시적 중대뇌 동맥 폐색

[0084] 동물실험은 C57Bl/6 10-11주령 수컷 마우스(Orient Bio Inc., Seongnam, Republic of Korea)을 사용하여 수행하였다. 모든 절차는 이화여자대학교 의과대학 동물실험심의위원회의 승인을 받았으며, 실험실 동물의 관리 및 사용에 대한 국립 보건원 가이드에 따라 실시하였다. 사용되는 동물의 수는 동물의 고통을 줄이기 위해 최소화하였다.

[0085] 상기 동물 모델을 이용하여, 일시적 중뇌동맥 결찰(middle cerebral artery occlusion, MCAO)을 유도하였다.

[0086] 구체적으로, 이소플루란으로 마취된 마우스의 내부 경동맥을 통해 중대뇌 동맥의 기원을 차단하기 위해 6-0 실리콘 코팅된 검은색 모노필라멘트 외과 봉합사를 윌리스환에 끼워 넣었다. 이후, 필라멘트를 30분 동안 두었다가 빼내어 뇌혈류(CBF)를 재설정하고 레이저 도플러 유량계로 모니터링하였다.

[0087] 상기 모니터링 결과, MCAO 동안 CBF가 85% 이상 감소하고 재관류 10분 후 CBF가 80% 이상 회복된 동물만 포함하였으며, 직장 온도는 마우스가 의식을 회복할 때까지 수술 및 회복하는 동안 온도 조절 장치로 조절되는 가열 패드를 사용하여  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

### [0088] 실험예 6. 뇌실내 주입

[0089] 인공 뇌척수액(aCSF)에 용해된 재조합 인간 노긴 또는 aCSF 단독은 ALZET 삼투압 펌프를 사용하여 동측 측뇌실로 전달하였다. 삼투 펌프에 연결된 캐놀라는 bregma 전방 0.5 mm, 정중선에서 측면 1 mm 두개골 표면 아래 3 mm에 이식하였다.

[0093] 마우스는 MCAO 후 2주부터 시작하여 2주 동안 aCSF 또는 매일 1  $\mu$ g의 노킨을 처치하였다. 그 후, MCAO 4주 후에 주입 펌프를 외식하였다. 전산화된 난수 생성기를 사용하여 동물을 각 치료에 무작위로 할당하였다.

## [0095] 실험예 7. 면역형광염색법

[0096] 허혈성 뇌졸중 후 8주에 뇌조직의 면역형광염색법을 실시하였다.

[0097] 구체적으로, 뇌절편을 0.1% Triton X-100, 5% 정상 혈청 및 1% 소 혈청 알부민을 함유하는 TBS에서 1시간 동안 배양하고, 글리세롤-3-인산 탈수소효소 1(GPD1, 1:250) 및 MBP (1:500)에 대한 일차 항체와 함께 밤새 배양하였다. 다음날, 상기 뇌절편을 플루오레세인 이소티오시아네이트(1:1000) 및 Alexa Fluor®555(1:1000)에 접합된 2차 항체와 함께 1시간 동안 배양하였다. 상기 절편을 모든 단계 사이에 TBS로 세척하고, 핵 염색 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)을 포함하는 Vectashield 장착 매체로 장착하였다. 이후, 공초점 현미경을 사용하여 형광 이미지를 얻었다.

## [0099] 실험예 8. 통계방법

[0100] 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 평균값의 집단 간 비교는 Tukey's multiple comparisons test를 이용하여 ANOVA 단방향 분석으로 수행하였다. Principle component analysis (PCA)는 SIMCA-P 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.  $P < 0.05$ 의 값은 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다.

## [0102] 실시예 1. OGD/R 후 미세아교세포의 대사 변화에 대한 노킨 효과

[0103] 노킨 처리가 뇌허혈 및 재관류 (ischemia and reperfusion, I/R)에 의해 자극된 미세아교세포 대사를 변화시키는 지 알아보기 위해, naive control의 BV2 세포와 OGD/R 후 3시간 동안 비히클 또는 노킨으로 처리한 세포의 세포내 대사체를 분석하였다.

[0104] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, PCA 스코어 플롯 (2D(왼쪽 패널) 및 3D(오른쪽 패널))은 대조군, 비히클 및 노킨 그룹 간에 강력한 분리를 보여 OGD/R 및 노킨 처리 후 상당한 대사 변화를 나타냈으며(도 1B), 확인된 41개의 대사체 중 14개의 대사체는 OGD/R 후 대조군 세포와 비히클 처리된 세포 사이에 차이가 있었고, 대부분 아미노산인 6개의 대사체의 수준은 노킨 처리된 세포에서 감소하였다(도 1C 및 표 1). 구체적으로, 노킨 처리는 비히클 처리 세포에서 증가된 포도당 수치, 젖산 및 피로글루타메이트 수치를 역전시켰을 뿐만 아니라(모두  $p < 0.01$  대 비히클), 대조군 수준( $p < 0.05$ , 표 1)보다 글루코스 및 피로글루타메이트 수준을 추가로 감소시켰고, 라이신(비히클 대비  $p = 0.04$ ), 류신, 이소류신, 티로신, 트레오닌, 발린 및 타우린(모두  $p < 0.05$  대 대조군; 표 1)을 포함한 여러 아미노산의 수준을 유의하게 감소시켰다.

[0105] 다음으로, OGD/R 후 BV2 대조군 세포, 비히클 또는 노킨 처리된 세포의 배양 배지에서 I/R 후 미세아교세포로부터 방출된 대사체에 대한 노킨의 효과를 추가로 조사한 결과, PCA 스코어 플롯(2D(왼쪽 패널) 및 3D(오른쪽 패널))은 대조군, 비히클 및 노킨 처리된 세포 간에 상당한 차이를 보였다(도 1D). 확인된 23개의 대사체 중 아미노산 대사와 관련된 대사체(2-oxoisocaproate 및 3-methyl-2oxovalerate)의 수준은 대조군 세포 배지와 비교하여 비히클 처리된 세포 배지에서 유의하게 감소하였으나(둘 다  $p = 0.02$ ), 이는 노킨 처리에 의해 역전되었다(도 1E 및 표 1).

[0106] 이와 대조적으로, 포도당 및 아미노산(알라닌, 페닐알라닌, 글루타민, 세린, 트립토판, 히스티딘 및 발린)을 포함하는 8가지 대사체의 수준은 대조군 세포 배지에서의 수준보다 더 높은 노킨 처리된 세포의 배지에서 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ; 도 1E 및 표 1).

[0107] 상기 결과는, 노킨이 반응성 미세아교세포에서 세포내 대사를 감소시켜 세포외 영양소 수준을 증가시킨다는 것을 의미한다.

## [0109] 실시예 2. 노킨 조절 배지에 노출된 희소돌기아교세포의 세포내 대사체의 변화

[0110] 희소돌기아교세포의 세포 내 대사가 노킨 CM에 의해 영향을 받는 지 알아보기 위해, 대조군인 MO3.13 세포와

vehicle CM 또는 노킨 CM에 노출된 세포의 대사체를 분석하였다.

[0111] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, PCA 스코어 플롯(2D(왼쪽 패널) 및 3D(오른쪽 패널))은 대조군, 비히클 CM 및 노킨 CM 처리 세포 간에 강력한 분리를 보임으로써, 비히클 CM 및 노킨 CM에 노출된 MO3.13 세포에서 상당한 대사 변화가 있음을 나타낸다(도 2B). 비히클 CM에 노출된 세포 내 확인된 46개의 대사체 중 7개의 대사체(choline, ADP, creatine, acetate, formate, succinate, fumarate)의 수치가 대조군 세포와 비교하여 증가한 반면, 4개의 대사체(2-oxoglutarate, glycerol, 3-methyl-2-oxovalerate, creatine phosphate)의 수치는 감소하였다(모두  $p \leq 0.01$ , 도 2C).

[0112] 노킨 CM에 노출된 세포 내 이들 대사체의 수준은 비히클 CM 및 노킨 CM에 노출된 세포 모두에서 증가된 글루코스를 제외하고는 대조군 세포 수준(모두  $p < 0.01$  vs. 비히클 CM)으로 되돌아갔으며(도 2C 및 표 2), 또한 막 인지질 합성의 전구체인 글리세롤은 노킨 CM에 의해 대조군 세포에서 관찰된 수준보다 유의하게 증가하였다(1.96배,  $p < 0.01$ ; 도 2C 및 표 2).

### [0114] 실시예 3. 회소돌기아교세포의 대사 경로 분석

[0115] 회소돌기아교세포에서 비히클 CM 및 노킨 CM에 의해 유의하게 변화된 대사 경로를 확인하기 위해 대사 경로 분석을 수행하였다.

[0116] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, TCA 회로, 피루브산 대사, 글리세로리피드 대사 및 여러 아미노산 대사 경로는 비히클 CM 및 노킨 CM에 의해 교란되는 주요 대사 경로임을 확인하였다( $p < 0.05$ ).

[0118] 상기 실시예 2 및 3에서 확인된 결과는, 활성화된 미세아교세포의 노킨 CM이 비히클 CM에 의해 유도된 에너지 대사(즉, 해당작용 및 TCA 주기)의 변화를 방지할 뿐만 아니라, 회소돌기아교세포의 글리세롤 수준을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

### [0120] 실시예 4. 허혈성 뇌의 대사 변화에 대한 노킨 효과

[0121] 다음으로, 노킨이 허혈성 뇌 대사를 변화시켰는지 여부를 조사하기 위해, MCAO 4주 후 naive 대조군 마우스의 우측 반구 및 aCSF 또는 노킨으로 처리된 마우스의 동측 반구에서 대사체 농도를 측정하였다. 대사체 분석 시점은 MO3.13 세포에서 노킨 CM 노출의 종료 시점과 일치하며, 각 그룹에 3마리의 마우스가 할당되었습니다. 그러나, 노킨 처리된 뇌 중 하나에서 대사체가 검출되지 않았기 때문에, 노킨 처리된 2마리의 마우스에 대해 대사체학 분석을 수행하였다.

[0122] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 25개의 확인된 대사체 중에서 트레오닌, 라이신 및 4-아미노부티레이트의 수준이 aCSF 처리로 인해 대조군과 비교하여 유의하게 증가한 반면(모두  $p < 0.05$ ), 글루타메이트 수준은 대조군 마우스의 뇌에 있는 것과 비교하여 aCSF로 처리된 마우스의 허혈성 뇌에서 감소함을 확인하였다( $p = 0.02$ ). 또한, 노킨 처리한 마우스의 허혈성 뇌에서 9개 대사체(콜린, 글리세롤, 4-아미노부티레이트, 라이신, 알라닌, 락테이트, 푸마레이트, 글루타메이트, 포름산)과 6개 대사체(콜린, 4-아미노부티레이트, 포름산, 푸마르산, 글리세롤 및 알라닌)의 수준은 각각 대조군 뇌 및 aCSF로 처리된 허혈성 뇌의 상응하는 수준과 비교하여 상당한 변화를 보였다(모두  $p < 0.05$ ; 도 4B 및 표 3).

[0123] 그중, 노킨에 의해 유도된 가장 현저한 변화는 콜린 수준의 증가(대조군 및 aCSF에 대해 각각 7.94배 및 4.50배, 모두  $p < 0.01$ )였으며, 이는 노킨 CM을 처리한 MO3.13 세포의 감소와 반대였으나, 글리세롤의 증가 및 포름산 수준의 감소는 노킨 CM으로 처리된 MO3.13 세포에서 관찰된 바와 같이, 노킨으로 처리된 허혈성 뇌에서 일관되게 검출되었다(각각 3.30배 및 0.43배, 모두  $p \leq 0.01$ ; 도 4B 및 표 3).

[0124] 이러한 결과를 통해, 노킨 처리 허혈성 뇌에서 글리세롤과 포름산 수준 변화는 노킨의 뇌보호 효과와 관련이 있음을 시사한다.

### [0126] 실시예 5. 노킨 처리 허혈성 뇌에서 GPD1(glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1) 발현 증가

[0127] 글리세롤은 수초의 주요 지질 성분인 인지질의 기본 구성 분자로서, 세포질 GPD1에 의한 글리세롤-3-포스페이트

(G3P)의 합성에서 과생되며, 이는 뉴런이나 정상세포가 아닌 희소돌기아교세포에서만 발현된다.

[0128] 이에, MO3.13 세포 및 노킨 처리된 허혈성 뇌에서 글리세롤 수준의 증가가 생체 내 희소돌기아교세포에서의 GPD1 발현과 관련이 있는지 여부를 결정하기 위해, MBP에 대한 항체로 이중 면역 형광 염색을 사용하여 MCAO 8 주 후 aCSF 또는 노킨 처리된 마우스의 허혈 주위 피질에서 GPD1 발현을 조사하였다.

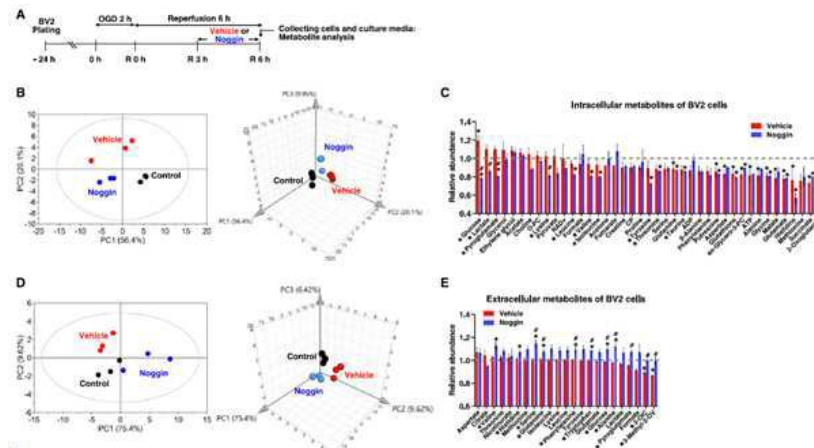
[0129] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, MBP 면역반응성은 aCSF로 처리한 마우스에 비해 노킨 처리한 마우스의 뇌에서 질적으로 증가하였으며, 노킨 처리한 마우스의 허혈성 뇌의 MBP 양성 세포 세포질에서 GPD1 발현도 증가됨을 관찰하였다.

[0131] 상기 결과는, 노킨에 의해 글리세롤 생성이 증가하고, 이의 생성은 희소돌기아교세포의 수초 생성과 관련이 있음을 시사한다.

[0133] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

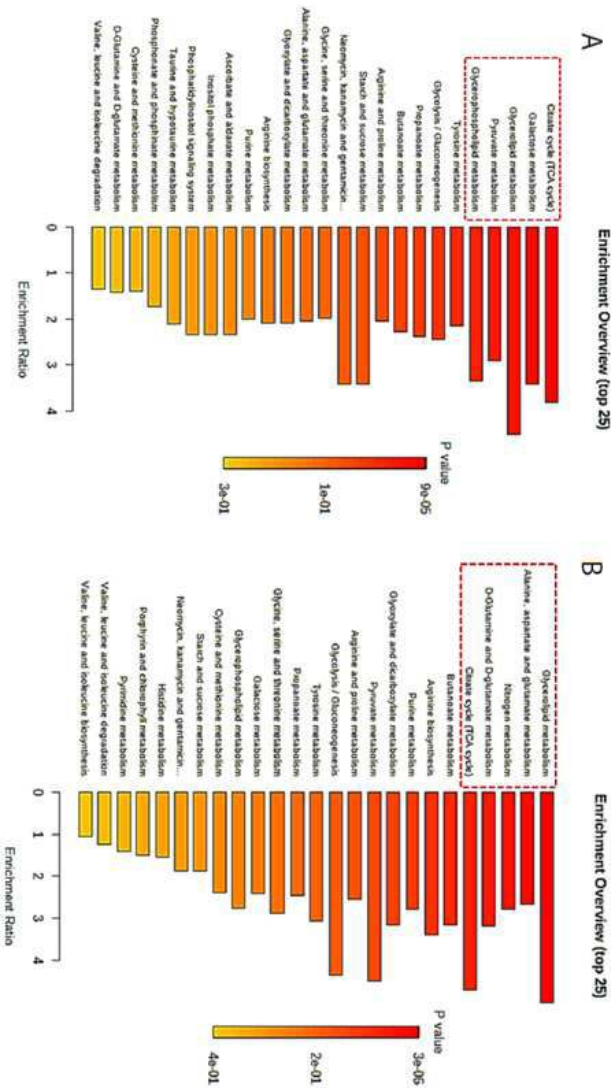
## 도면

### 도면1

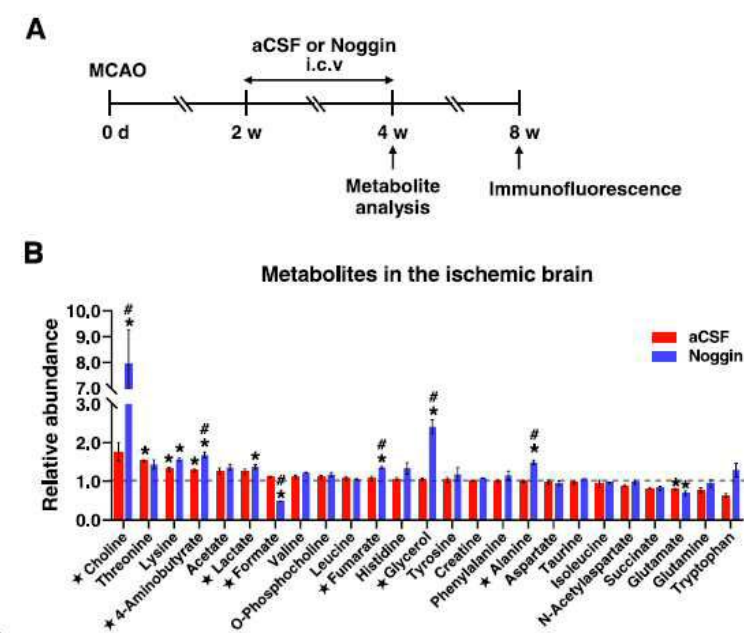




도면3



도면4



도면5

