



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월28일
(11) 등록번호 10-2775899
(24) 등록일자 2025년02월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) C12Q 1/6851 (2018.01)
G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
G16H 50/20 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/543 (2013.01)
C12Q 1/6851 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2023-0185904
(22) 출원일자 2023년12월19일
심사청구일자 2023년12월19일
- (56) 선행기술조사문헌
JP2022547948 A
He Wei et al, Journal of Neuroimmunology
(2023.06.01.), vol 381: 578118, pp 1-8.
Wu Shouyi et al, The Journal of Headache and
Pain (2022.09.30.), vol 23.1: 128, pp 1-15.
Martami Fahimeh et al, Neurological Sciences
(2018.07.15.), vol 39, pp 1741-1749.
- (73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
- (72) 발명자
손중희
강원특별자치도 춘천시 영서로 2169, 106-1002(퇴
계동, 퇴계이안아파트)
박송이
강원특별자치도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교
의료바이오융합연구원 3층 (옥천동)
- (74) 대리인
특허법인본

전체 청구항 수 : 총 12 항

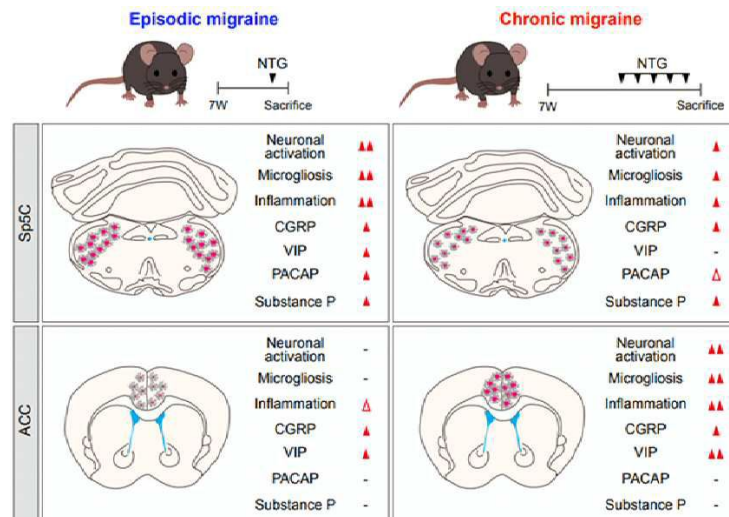
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법, 장치 및 컴퓨터 프로그램

(57) 요약

본 발명은 편두통이 의심되는 동물로부터 얻은 시료를 기반으로 면역형광법, 실시간 중합효소 연쇄 반응, 웨스턴 블롯의 일련의 단계를 통해 얻은 결과를 분석하여 삽화성 편두통(Episodic migraine, EM) 또는 만성 편두통(Chronic migraine, CM) 질환을 구별하는 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법, 장치 및 컴퓨터 프로그램을 제공한다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 21/6428 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

G16H 50/20 (2018.01)

G01N 2800/2807 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711196002
과제번호	00223501
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	뇌신경계 임상현장 난제 해결을 위한 융합형 의사과학자 육성 및 현장맞춤형 미래의
료선도기술 실용화 사업	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교산학협력단
연구기간	2023.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

편두통 진단을 필요로 하는 대상체로부터 얻은 시료를 이용하여 면역형광 검사를 진행하여 c-Fos, NeuN의 공동형광염색 및 Iba1, VIP 마커의 발현 수준을 측정하는, 면역형광 검사 단계;

전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 증가하는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제1 만성 편두통 판단 단계; 및

전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 나타나지 않는 경우 삼화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제1 삼화성 편두통 판단 단계;를 포함하며,

상기 면역형광 검사 단계에서 시료는 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C) 및 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서 얻은 동물의 조직인, 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시료에 트리플 시약에 넣어 처리한 후 역전사 효소 및 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하는, 실시간 중합효소 연쇄 반응 단계;

상기 시료의 단백질을 소듐 도데실 황산-폴리아크릴아마이드 겔(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(Membrane)으로 전기영동을 통해 전달한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 NF- κ B, TNF α 및 Iba1 마커의 발현 수준을 측정하는, 웨스턴 블롯 단계; 및

척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 NF- κ B, Iba1, TNF α 및 VIP 마커의 발현 수준에 따라 삼화성 편두통 또는 만성 편두통을 판단하는, 편두통 판단 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 동물의 조직은 포유류의 조직인 것을 특징으로 하는 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 나타나지 않는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제2 만성 편두통 판단 단계; 및

척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 증가하는 경우 삼화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제2 삼화성 편두통 판단 단계;를 추가로 포함하는, 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 5

편두통 진단을 필요로 하는 대상체로부터 얻은 시료를 이용하여 면역형광 검사를 진행하여 c-Fos, NeuN의 공동형광염색 및 Iba1, VIP 마커의 발현 수준을 측정하는, 면역형광 검사부;

전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 증가하는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제1 만성 편두통 판단부; 및

전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 나타나지 않는 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제1 삽화성 편두통 판단부;를 포함하며,

상기 면역형광 검사 단계에서 시료는 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 얻은 동물의 조직인, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 장치.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 시료에 트리졸 시약에 넣어 처리한 후 역전사 효소 및 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하는, 실시간 중합효소 연쇄 반응부;

상기 시료의 단백질을 소듐 도데실 황산-폴리아크릴아마이드 겔(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(Membrane)으로 전기영동을 통해 전달한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 NF- κ B, TNF α 및 Iba1 마커의 발현 수준을 측정하는, 웨스턴 블롯 수행부; 및

척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 NF- κ B, Iba1, TNF α 및 VIP 마커의 발현 수준에 따라 삽화성 편두통 또는 만성 편두통을 판단하는, 편두통 판단부;를 포함하는 것을 특징으로 하는 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 장치.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 동물의 조직은 포유류의 조직인 것을 특징으로 하는 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 장치.

청구항 8

제6항에 있어서,

척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 나타나지 않는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제2 만성 편두통 판단부; 및

척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 증가하는 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제2 삽화성 편두통 판단부;를 추가로 포함하는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 장치.

청구항 9

편두통 진단을 필요로 하는 대상체로부터 얻은 시료를 이용하여 면역형광 검사를 진행하여 c-Fos, NeuN의 공동형광염색 및 Iba1, VIP 마커의 발현 수준을 측정하는, 면역형광 검사 단계;

전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 증가하는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제1 만성 편두통 판단 단계; 및

전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 나타나지 않는 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제1 삽화성 편두통 판단 단계;를 포함하며,

상기 면역형광 검사 단계에서 시료는 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 얻은 동물의 조직인, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법을 수행하기 위한 기록 매체에 저장된 컴퓨터 프로그램.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 시료에 트리졸 시약에 넣어 처리한 후 역전사 효소 및 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하는, 실시간 중합효소 연쇄 반응 단계;

상기 시료의 단백질을 소듐 도데실 황산-폴리아크릴아마이드 겔(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)

에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(Membrane)으로 전기영동을 통해 전달한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 NF- κ B, TNF α 및 Iba1 마커의 발현 수준을 측정하는, 웨스턴 블롯 단계; 및

척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 NF- κ B, Iba1, TNF α 및 VIP 마커의 발현 수준에 따라 삼화성 편두통 또는 만성 편두통을 판단하는, 편두통 판단 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법을 수행하기 위한 기록 매체에 저장된 컴퓨터 프로그램.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 동물의 조직은 포유류의 조직인 것을 특징으로 하는 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법을 수행하기 위한 기록 매체에 저장된 컴퓨터 프로그램.

청구항 12

제10항에 있어서,

척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 나타나지 않는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제2 만성 편두통 판단 단계; 및

척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 증가하는 경우 삼화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제2 삼화성 편두통 판단 단계;를 추가로 포함하는, 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법을 수행하기 위한 기록 매체에 저장된 컴퓨터 프로그램.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법, 장치 및 컴퓨터 프로그램에 관한 것으로, 편두통이 의심되는 동물로부터 얻은 시료를 기반으로 면역형광법, 실시간 중합효소 연쇄 반응, 웨스턴 블롯의 일련의 단계를 통해 얻은 결과를 분석하여 삼화성 편두통(Episodic migraine, EM) 또는 만성 편두통(Chronic migraine, CM) 질환을 구별하는 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법, 장치 및 컴퓨터 프로그램에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 편두통은 신경 질환 중에서 가장 흔한 질환 중 하나로, 성인의 약 20%가 편두통 환자이다. 일반적으로, 편두통은 뇌의 기능성 장애로서, 삼각 혈관계를 활성화시키는 대뇌피질 확장 우울증(CSD)을 가질 수 있는 과민한 두뇌 상태이다. 그러나 편두통은 발생의 복잡성때문에 그 기전이 명확하게 밝혀지지 않았다.

[0003] 다만, 전문가들은 편두통의 이행 과정에 대해 편두통 없음, 저빈도 삼화성 편두통(Episodic migraine, EM), 만성 편두통(Chronic migraine, CM)의 증상으로 나누고 있다.

[0004] 편두통의 발생 요인과 관련하여, 다수의 체액성 물질들이 이에 관여할 것으로 추측되고 있다. 여기에는 세로토닌, 히스타민, 프로스타글란딘류, 혈소판 인자들, 엔돌핀류 및 혈관작용성 신경펩타이드들이 포함된다.

[0005] 편두통의 전조증상은 일시적인 시각장애 또는 감각장애를 포함하고, 그 증상으로는 강렬한 두통, 메스꺼움, 빛과 소리에 대한 감수성 증가와 같은 다른 증상을 포함한다. 그러나, 편두통을 진단할 수 있는 객관적인 검사방법이 없어 편두통에 대한 병태 생리학적 이해나 편두통 치료제의 개발이 제한적이다.

선행기술문헌

[0006] 대한민국 공개특허공보 제10-2019-0099486호(공개일 2019.08.27.)

[0007] 대한민국 등록특허공보 제10-1982923호(공고일 2019.05.27.)

[0008] 대한민국 등록특허공보 제10-2464415호(공고일 2022.11.04.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 편두통이 의심되는 동물로부터 얻은 시료를 기반으로 일련의 단계를 통해 얻은 결과를 분석하여 삼화성 편두통(Episodic migraine, EM) 또는 만성 편두통(Chronic migraine, CM) 질환을 구별하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타난 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 편두통 진단을 필요로 하는 대상체로부터 얻은 시료를 이용하여 면역형광 검사를 진행하여 c-Fos, NeuN의 공동형광염색 및 Iba1, VIP 마커의 발현 수준을 측정하는, 면역형광 검사 단계; 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 증가하는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제1 만성 편두통 판단 단계; 및 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 나타나지 않는 경우 삼화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제1 삼화성 편두통 판단 단계;를 포함하며, 상기 면역형광 검사 단계에서 시료는 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 얻은 동물의 조직인, 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [0012] 상기 시료에 트리졸 시약에 넣어 처리한 후 역전사 효소 및 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하는, 실시간 중합효소 연쇄 반응 단계; 상기 시료의 단백질을 소듐 도데실 황산-폴리아크릴아마이드 겔(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(Membrane)으로 전기영동을 통해 전달한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 NF- κ B, TNF α 및 Iba1 마커의 발현 수준을 측정하는, 웨스턴 블롯 단계; 및 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 NF- κ B, Iba1, TNF α 및 VIP 마커의 발현 수준에 따라 삼화성 편두통 또는 만성 편두통을 판단하는, 편두통 판단 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0013] 상기 동물의 조직은 포유류의 조직인 것일 수 있다.
- [0014] 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 나타나지 않는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제2 만성 편두통 판단 단계; 및 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 증가하는 경우 삼화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제2 삼화성 편두통 판단 단계;를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0015] 편두통 진단을 필요로 하는 대상체로부터 얻은 시료를 이용하여 면역형광 검사를 진행하여 c-Fos, NeuN의 공동형광염색 및 Iba1, VIP 마커의 발현 수준을 측정하는, 면역형광 검사부; 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 증가하는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제1 만성 편두통 판단부; 및 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 나타나지 않는 경우 삼화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제1 삼화성 편두통 판단부;를 포함하며, 상기 면역형광 검사 단계에서 시료는 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 얻은 동물의 조직인, 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 장치를 제공한다.
- [0016] 상기 시료에 트리졸 시약에 넣어 처리한 후 역전사 효소 및 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하는, 실시간 중합효소 연쇄 반응부; 상기 시료의 단백질을 소듐 도데실 황산-폴리아크릴아마이드 겔(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(Membrane)으로 전기영동을 통해 전달한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 NF- κ B, TNF α 및 Iba1 마커의 발현 수준을 측정하는, 웨스턴 블롯 수행부; 및 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 NF- κ B, Iba1, TNF α 및 VIP 마커의 발현 수준에 따라 삼화성 편두통 또는 만성 편두통을 판단하는, 편두통 판단부;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 나타나지 않는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제2 만성 편두통 판단부; 및 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 증가하는 경우 삼화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제2 삼화성 편두통 판단부;를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0018] 편두통 진단을 필요로 하는 대상체로부터 얻은 시료를 이용하여 면역형광 검사를 진행하여 c-Fos, NeuN의 공동형광염색 및 Iba1, VIP 마커의 발현 수준을 측정하는, 면역형광 검사 단계; 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커

발현이 증가하는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제1 만성 편두통 판단 단계; 및 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 나타나지 않는 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제1 삽화성 편두통 판단 단계;를 포함하며, 상기 면역형광 검사 단계에서 시료는 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 얻은 동물의 조직인, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법을 수행하기 위한 기록 매체에 저장된 컴퓨터 프로그램을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 편두통이 의심되는 동물로부터 얻은 시료를 기반으로 일련의 단계를 통해 얻은 결과를 분석하여 삽화성 편두통(Episodic migraine, EM) 또는 만성 편두통(Chronic migraine, CM) 질환을 구별함으로써, 향후 편두통 증상에 따른 효과적인 약물 치료를 진행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1a는, 니트로글리세린의 주입에 따른 삽화성 편두통의 유발 기전을 모식도로 나타낸다.

도 1b는, 니트로글리세린의 주입에 따른 만성 편두통의 유발 기전을 모식도로 나타낸다.

도 2a는, 니트로글리세린의 주입에 따른 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델을 제조하는 과정을 모식도로 나타낸다.

도 2b는, 본프레이 필라멘트(Von frey filament)를 이용한 행동 테스트 과정을 모식도로 나타낸다.

도 2c는, 니트로글리세린을 투여한 실험군(Nitroglycerin, NTG)과 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 대조군(Vehicle control, VEH) 간의 삽화성 편두통의 통증 임계값(paw mechanical threshold)을 그래프로 나타낸다.

도 2d는, 니트로글리세린을 투여한 실험군(Nitroglycerin, NTG)과 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 대조군(Vehicle control, VEH) 간의 만성 편두통의 통증 임계값(paw mechanical threshold)을 그래프로 나타낸다.

도 3a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 c-Fos 및 NeuN 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 3b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 c-Fos+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.

도 3c는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 c-Fos+ NeuN+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.

도 3d는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 c-Fos 및 NeuN 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 3e는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 c-Fos+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.

도 3f는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 c-Fos+ NeuN+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.

도 4a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 Iba1 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 4b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 Iba1+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.

도 4c는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 Iba1 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 4d는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 Iba1+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.

도 5a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal

trigeminal nucleus, Sp5C)의 염증성 사이토카인 발현량을 그래프로 나타낸다.

도 5b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 염증성 사이토카인 발현량을 그래프로 나타낸다.

도 5c는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 염증성 사이토카인 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다.

도 6a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 신경펩타이드(Neuropeptide) 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 6b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 신경펩타이드(Neuropeptide) 발현량을 그래프로 나타낸다.

도 7a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 신경펩타이드(Neuropeptide) 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 7b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 신경펩타이드(Neuropeptide) 발현량을 그래프로 나타낸다.

도 8은, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델의 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C) 및 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역에서의 차이를 모식도로 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 용어의 정의

[0022] 본 명세서에서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 편두통의 의심 대상에게 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 "약학 조성물"은 하나 이상의 본원에 따른 화합물 또는 이의 생리학적/약학적으로 허용 가능한 염 또는 전구약물과 기타 화학 성분을 함유하는 혼합물, 및 기타 성분을 의미한다. 예를 들어 생리학적/약학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제가 있다. 약학 조성물의 목적은 유기체에 대한 투여를 촉진하고, 활성 성분의 흡수에 유리하도록 하여 생물학적 활성을 발휘시키는 데에 있다.

[0024] 상기 약학 조성물은 주사기(syringe), 펜 전달 장치, 자동주입 전달 장치, 유리 바이알 (glass vial), 또는 미세주입기 (microinfuser) 중에 포함되는 것일 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 "유의한" 또는 "유의하게"는 값들 사이에 통계적으로 유의한 차이를 지칭한다.

[0026] 본 명세서에서 "편두통"은 한쪽으로 치우치는 일측성, 박동성 통증이 일정 시간 이상 지속되고, 구역이나 구토 및 눈부심 등이 나타나는 특징적인 두통을 의미한다.

[0027] 본 명세서에서 "삽화성 편두통"은 의약 부재 하에 3개월 기간 동안 15일 미만으로 두통을 앓는 대상체를 의미한다.

[0028] 본 명세서에서 "만성 편두통"은 의약 부재 하에 3개월 기간 동안 15일 이상의 두통을 앓는 대상체를 의미한다.

[0030] 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단

[0031] 본 발명의 한 구현예는 편두통 진단을 필요로 하는 대상체로부터 얻은 시료를 이용하여 면역형광 검사를 진행하여 c-Fos, NeuN의 공동형광염색 및 Iba1, VIP 마커의 발현 수준을 측정하는, 면역형광 검사 단계; 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 증가하는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제1 만성 편두통 판단 단계; 및 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 나타나지 않는 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제1 삽화성 편두통 판단 단계;를 포함하며, 상기 면역형광 검사 단계에서 시료는 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 얻은 동물의 조직인, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0032] 상기 면역형광 검사 단계에서는 추가로 PACAP 마커의 발현 수준을 측정할 수 있다.

- [0033] 상기 척수 삼차신경핵(Spinal trigeminal nucleus)은 연수(Medulla oblongata)에 위치한 핵으로서, 악안면부의 온도 및 통증을 느끼는 온각, 통각을 전하는 신경섬유들이 모이는 곳이다.
- [0034] 척수 삼차신경핵(Spinal trigeminal nucleus)은 구강하핵, 꼬리핵, 간극하핵의 세개의 하위핵으로 구성되며, 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)은 통각수용 및 머리로부터의 열감 전달에 관여한다.
- [0035] 상기 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)은 뇌량의 전방 부분을 둘러싸고 있는 부분으로서, 신체적인 고통에 반응하고 통증 정보를 처리하는 뇌 영역이다.
- [0036] 상기 동물의 조직은 포유류의 조직인 것일 수 있다.
- [0037] 상기 정보제공 방법은, 상기 시료에 트리졸 시약에 넣어 처리한 후 역전사 효소 및 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하는, 실시간 중합효소 연쇄 반응 단계; 상기 시료의 단백질을 소듐 도데실 황산-폴리아크릴아마이드 겔(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(Membrane)으로 전기영동을 통해 전달한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 NF- κ B, TNF α 및 Iba1 마커의 발현 수준을 측정하는, 웨스턴 블롯 단계; 및 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 NF- κ B, Iba1, TNF α 및 VIP 마커의 발현 수준에 따라 삽화성 편두통 또는 만성 편두통을 판단하는, 편두통 판단 단계;를 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 편두통 판단 단계는 추가로 PACAP 마커의 발현 수준에 따라 삽화성 편두통 또는 만성 편두통을 판단할 수 있다.
- [0039] 상기 정보제공 방법은, 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 나타나지 않는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제2 만성 편두통 판단 단계; 및 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 증가하는 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제2 삽화성 편두통 판단 단계;를 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 정보제공 방법은, 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 PACAP 마커 발현 증가량이 적은 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제3 만성 편두통 판단 단계; 및 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 PACAP 마커 발현 증가량이 높은 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제3 삽화성 편두통 판단 단계;를 추가로 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 한 구현예는, 편두통 진단을 필요로 하는 대상체로부터 얻은 시료를 이용하여 면역형광 검사를 진행하여 c-Fos, NeuN의 공동형광염색 및 Iba1, VIP 마커의 발현 수준을 측정하는, 면역형광 검사부; 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 증가하는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제1 만성 편두통 판단부; 및 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 나타나지 않는 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제1 삽화성 편두통 판단부;를 포함하며, 상기 면역형광 검사 단계에서 시료는 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 얻은 동물의 조직인, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 장치를 제공한다.
- [0042] 상기 장치는, 상기 시료에 트리졸 시약에 넣어 처리한 후 역전사 효소 및 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하는, 실시간 중합효소 연쇄 반응부; 상기 시료의 단백질을 소듐 도데실 황산-폴리아크릴아마이드 겔(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(Membrane)으로 전기영동을 통해 전달한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 NF- κ B, TNF α 및 Iba1 마커의 발현 수준을 측정하는, 웨스턴 블롯 수행부; 및 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서 NF- κ B, Iba1, TNF α 및 VIP 마커의 발현 수준에 따라 삽화성 편두통 또는 만성 편두통을 판단하는, 편두통 판단부;를 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 장치는, 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 나타나지 않는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제2 만성 편두통 판단부; 및 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 VIP 마커 발현이 증가하는 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제2 삽화성 편두통 판단부;를 추가로 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 한 구현예는, 편두통 진단을 필요로 하는 대상체로부터 얻은 시료를 이용하여 면역형광 검사를 진행하여 c-Fos, NeuN의 공동형광염색 및 Iba1, VIP 마커의 발현 수준을 측정하는, 면역형광 검사 단계; 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 증가하는 경우 만성 편두통(CM)으로 판단하는, 제1 만성 편두통 판단 단계; 및 전대상 피질(ACC)에서의 Iba1 마커 발현이 나타나지 않는 경우 삽화성 편두통(EM)으로 판단하는, 제1 삽화성 편두통 판단 단계;를 포함하며, 상기 면역형광 검사 단계에서 시료는 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전

대상 피질(ACC)에서 얻은 동물의 조직인, 삼화성 편두통 및 만성 편두통 진단을 위한 정보제공 방법을 수행하기 위한 기록 매체에 저장된 컴퓨터 프로그램을 제공한다.

[0045] 상기 컴퓨터는 일반적인 퍼스널 컴퓨터뿐만 아니라, 스마트폰이나 태블릿 PC와 같은 스마트 기기를 포함하는 컴퓨팅 장치를 의미한다.

[0046] 상기 컴퓨터 프로그램은 별도의 기록 매체에 저장되어 제공될 수 있으며, 상기 기록 매체는 본 발명을 위하여 특별히 설계되어 구성된 것들이거나 컴퓨터 소프트웨어 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 사용 가능한 것일 수 있다.

[0047] 예를 들면, 상기 기록 매체는 하드 디스크, 플로피 디스크 및 자기 테이프와 같은 자기 매체, CD, DVD와 같은 광 기록 매체, 자기 및 광 기록을 결합할 수 있는 자기-광 기록 매체, 롬, 램, 플래시 메모리 등 단독 또는 조합에 의해 프로그램 명령을 저장하고 수행하도록 특별히 구성된 하드웨어 장치일 수 있다.

[0048] 또한, 상기 컴퓨터 프로그램은 프로그램 명령, 로컬 데이터 파일, 로컬 데이터 구조 등이 단독 또는 조합으로 구성된 프로그램일 수 있고, 컴파일러에 의해 만들어지는 것과 같은 기계어 코드뿐만 아니라, 인터프리터 등을 사용하여 컴퓨터에 의해 실행될 수 있는 고급 언어 코드로 짜여진 프로그램일 수 있다.

[0050] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명한다.

[0051] 실시예

[0052] 실험 방법: 삼화성 편두통 및 만성 편두통 간의 신경병리학적 차이 검증

[0053] 도 1a는, 니트로글리세린의 주입에 따른 삼화성 편두통의 유발 기전을 모식도로 나타낸다.

[0054] 도 1b는, 니트로글리세린의 주입에 따른 만성 편두통의 유발 기전을 모식도로 나타낸다.

[0055] 특정 병원균이 없는 7주 정도된 C57BL/6 마우스 모델을 4개의 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다.

[0056] C57BL/6 마우스 모델에 니트로글리세린 10mg/kg을 1회 투여하여 삼화성 편두통이 유발된 그룹을 제1 그룹, C57BL/6 마우스 모델에 프로필렌글리콜이 포함된 식염수 10mg/kg를 1회 투여한 대조군(Vehicle control, VEH)을 제2 그룹, C57BL/6 마우스 모델에 니트로글리세린 10mg/kg을 9일 동안 5회 투여하여 만성 편두통이 유발된 그룹을 제3 그룹, C57BL/6 마우스 모델에 프로필렌글리콜이 포함된 식염수 10mg/kg를 9일 동안 5회 투여한 대조군(Vehicle control, VEH)을 제4 그룹으로 나누었다.

[0057] 앞서 나눈 4개의 그룹 간의 삼화성 편두통 및 만성 편두통의 신경병리학적 차이를 검증하기 위해 하기한 실험을 진행하였다. 삼화성 편두통 및 만성 편두통의 유발 영역 및 신경병리학적 차이를 비교하기 위해 (i) 기계적 통각과민 테스트, (ii) 활성화된 세포를 확인하기 위한 면역형광법(Immunofluorescence staining) 분석, (iii) 유전자 발현을 비교 분석하기 위한 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석, (iv) 웨스턴 블롯(Western blot) 분석, (v) 신경펩타이드(Neuropeptide)의 발현 패턴을 확인하기 위한 면역형광법(Immunofluorescence staining) 분석을 진행하였다.

[0059] 실험 1: 기계적 통각과민 테스트

[0060] 도 2a는, 니트로글리세린의 주입에 따른 삼화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델을 제조하는 과정을 모식도로 나타낸다.

[0061] 도 2b는, 본프레이 필라멘트(Von frey filament)를 이용한 행동 테스트 과정을 모식도로 나타낸다.

[0062] C57BL/6 마우스 모델을 4개의 그룹으로 나누어 니트로글리세린 및 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 각각 투여한 다음, 2시간 후에 각 그룹별로 본프레이 필라멘트(Von frey filament)를 이용한 행동 분석을 진행하였다.

[0063] 상기 본프레이 필라멘트(Von frey filament)는 0.008g, 0.02g, 0.04g, 0.07g, 0.16g, 0.4g, 0.6g, 1g, 1.4g, 2g, 4g, 6g, 8g, 10g, 26g, 60g, 100g, 180g 및 300g을 사용하였다.

[0064] 각 그룹의 마우스 모델 발바닥 표면을 본프레이 필라멘트(Von frey filament)로 눌러 발 움츠림 반응을 확인했으며, 상기 발 움츠림 반응에 대한 임계값은 분산 분석(ANOVA)으로 분석하였다.

[0065] 도 2c는, 니트로글리세린을 투여한 실험군(Nitroglycerin, NTG)과 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 대조군(Vehicle control, VEH) 간의 삼화성 편두통의 통증 임계값(paw mechanical threshold)을 그래프로 나타낸다.

- [0066] 도 2d는, 니트로글리세린을 투여한 실험군(Nitroglycerin, NTG)과 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 대조군(Vehicle control, VEH) 간의 만성 편두통의 통증 임계값(paw mechanical threshold)을 그래프로 나타낸다.
- [0067] 발 움츠림 반응에 대한 임계값 분산 분석(ANOVA) 결과, C57BL/6 마우스 모델에 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹의 임계값이 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 크게 감소했음을 확인하였다. 이러한 결과는 니트로글리세린의 투여 횟수 및 기간에 관계없이 통각과민(Hyperalgesia)을 유발한다는 것을 알 수 있다.
- [0069] **실험 2: 활성화된 세포를 확인하기 위한 면역형광법(Immunofluorescence staining) 분석**
- [0070] 도 3a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 c-Fos 및 NeuN 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.
- [0071] 도 3b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 c-Fos+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.
- [0072] 도 3c는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)의 c-Fos+ NeuN+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.
- [0073] 도 3d는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 c-Fos 및 NeuN 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.
- [0074] 도 3e는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 c-Fos+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.
- [0075] 도 3f는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 c-Fos+ NeuN+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.
- [0076] 면역형광법을 수행하기 위해, 2.5% 트리브로모에탄올(Tribromoethanol, avertin)을 복강 내 주사하여 C57BL/6 마우스 모델을 마취시킨 후, 인산염 완충 식염수 또는 식염수 50ml를 심장 좌심실을 통해 관류시켰다.
- [0077] C57BL/6 마우스 모델의 뇌를 4% 파라포름알데히드(Paraformaldehyde)로 16시간 동안 고정한 후 15% 수크로스 용액에서 탈수시킨 다음 용기 바닥에 가라앉을 때까지 30% 수크로스 용액에 두었다. C57BL/6 마우스 모델의 뇌 조직은 저온 유지 장치를 사용하여 20 내지 30 μ m 두께로 절단하였다. 5 내지 7개의 슬라이스 중 하나를 수집하여 -80° C에 보관하였다.
- [0078] 먼저, 뉴런 활성화를 확인하기 위해 뇌 조직 절편을 트라이톤 X-100(Triton X-100)이 포함된 0.5% 인산염 완충 식염수에 5분 동안 투과하고 실온에서 c-Fos 및 NeuN 마커와 함께 배양한 후, 형광현미경으로 관찰하였다.
- [0079] 뇌 조직 절편의 c-Fos 및 NeuN 발현 패턴을 형광현미경으로 관찰한 결과, 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹과 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹의 각 뇌 영역에서 c-Fos+ 세포와 c-Fos+NeuN+ 세포의 분포에 유의미한 차이가 있는 것을 확인하였다.
- [0080] 먼저, 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)에서의 형광 분포는 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 늘어난 것을 확인하였다. 이는 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 신경 활성화가 증가하였음을 알 수 있다.
- [0081] 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)에서의 c-Fos+ 세포의 수는 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹에 비해 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹이 많음을 확인하였다.
- [0082] 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)에서의 c-Fos+NeuN+ 세포의 수는 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹에 비해 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹이 많음을 확인하였다.
- [0083] 그 다음, 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서의 형광 분포는 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 늘어난 것을 확인하였다. 이는 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 신경 활성화가 증가하였음을 알 수 있다.
- [0084] 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서의 c-Fos+ 세포의 수는 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹

룹에 비해 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹이 많음을 확인하였다.

- [0085] 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서의 c-Fos+NeuN+ 세포의 수는 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹에 비해 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹이 많음을 확인하였다.
- [0086] 도 4a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵(Spinal trigeminal nucleus) 꼬리핵(Sp5C) 영역의 Iba1 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.
- [0087] 도 4b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵(Spinal trigeminal nucleus) 꼬리핵(Sp5C) 영역의 Iba1+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.
- [0088] 도 4c는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 Iba1 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.
- [0089] 도 4d는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 Iba1+ 세포 수를 그래프로 나타낸다.
- [0090] 뇌의 면역을 담당하는 소교세포(Microglia)의 활성화를 확인하기 위해 뇌 조직 절편을 트라이톤 X-100(Triton X-100)이 포함된 0.5% 인산염 완충 식염수에 5분 동안 투과하고 실온에서 Iba1 마커와 함께 배양한 후, 형광현미경으로 관찰하였다.
- [0091] 뇌 조직 절편의 Iba1 발현 패턴을 형광현미경으로 관찰한 결과, 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹과 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹 간의 신경 활성화에 차이가 있음을 확인하였다. 이는 신경 활성화가 소교세포와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.
- [0092] 먼저, 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)에서의 형광 분포는 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 늘어난 것을 확인하였다. 이는 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 신경 활성화가 증가하였음을 알 수 있다.
- [0093] 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C)에서의 Iba1+ 세포의 수는 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹에 비해 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹이 많음을 확인하였다.
- [0094] 그 다음, 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서의 형광 분포는 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 늘어난 것을 확인하였다. 이는 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 신경 활성화가 증가하였음을 알 수 있다.
- [0095] 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서의 Iba1+ 세포의 수는 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹에 비해 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹이 많음을 확인하였다.
- [0096] 이를 통해 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹과 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹 간의 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC) 영역의 신경 활성화 및 소교세포 패턴의 차이를 확인하였다.
- [0098] **실험 3: 유전자 발현을 비교 분석하기 위한 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석**
- [0099] 도 5a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵(Spinal trigeminal nucleus) 꼬리핵(Sp5C) 영역의 염증성 사이토카인 발현량을 그래프로 나타낸다.
- [0100] 도 5b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 염증성 사이토카인 발현량을 그래프로 나타낸다.
- [0101] 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 수행하기 위해, C57BL/6 마우스 모델의 뇌 조직을 트리졸(Trizol) 시약으로 처리한 후, -80° C에서 보관하였다.
- [0102] 상기 트리졸 시약을 이용하여 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(caudal part of spinal trigeminal nucleus, Sp5C) 및 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서 RNA를 추출하였다.
- [0103] 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)는 마우스 백혈병 바이러스 유래 역전사효소(Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase) 및 올리고-dT 프라이머(Oligo-dT primer)를 사용하여 합성하였다.
- [0104] 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)은 cDNA 주형, 프라이머, dNTP, 10X 완충액 및 Taq 중합효소를 사용하여 수행

하였다.

[0105] 본 발명에서 측정하기 위한 타겟 물질 및 타겟 물질 검출에 사용된 프라이머를 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

명칭	염기서열
IL-1 β	5' -TTCACCATGGAATCCGTGTC-3'
	5' -GTCTTGCCGAGGACTAAGG-3'
IL-6	5' -CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC-3'
	5' -ACTCCTTCTGTGACTCCAGC-3'
TNF- α	5' -TTCGAGTGACAAGCCTGTAG-3'
	5' -CTTTGAGATCCATGCCGTTG-3'
IL-4	5' -CAGCTAGTTGTCATCCTGCT-3'
	5' -ACCTCGTTCAAAATGCCGATG-3'
IL-10	5' -CTCTGATACCTCAGTTCCCA-3'
	5' -GTCCCAATGGAACAGCTT-3'
GAPDH	5' -CCTGTTGCTGTAGCCGTAT-3'
	5' -ACTCTTCCACCTTCGATGC-3'

[0107] 전염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α) 및 항염증성 사이토카인(IL-4 및 IL-10)이 포함된 염증 관련 활성화 마커를 이용하여 RT-PCR를 수행한 결과는 아래와 같다.

[0108] 먼저, 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 전염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)의 발현량이 증가한 것을 확인하였다.

[0109] 또한, 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹이 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹보다 발현량이 높음을 확인하였다.

[0110] 다만, 항염증성 사이토카인(IL-4 및 IL-10)의 발현량은 그룹 간 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

[0111] 그 다음, 전대상 피질(ACC)에서 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 전염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)의 발현량이 증가한 것을 확인하였다.

[0112] 또한, 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹이 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹보다 발현량이 높음을 확인하였다.

[0114] 실험 4: 웨스턴 블롯(Western blot) 분석

[0115] 도 5c는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 염증성 사이토카인 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다.

[0116] 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하기 위해, C57BL/6 마우스 모델의 뇌 조직 중 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC) 조직을 20 μ g 추출한 후, 전기영동을 통해 5%~20%(w/v) SDS-PAGE에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막으로 옮겼다.

[0117] 1시간 동안 5% 소 혈청 알부민으로 차단한 후, TNF- α , NF- κ B, Iba1 및 β -actin에 대한 발현량을 확인하기 위해 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하였다.

[0118] 웨스턴 블롯(Western blot) 결과, 앞서 실험을 수행한 면역형광 분석 및 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석과 유사한 패턴을 보이는 것으로 확인하였다.

[0119] 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 TNF- α , NF- κ B 및 Iba1의 발현 수준은 아래와 같다.

[0120] 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 TNF- α , NF- κ B 및 Iba1의 발현량이 증가한 것을 확인하였다.

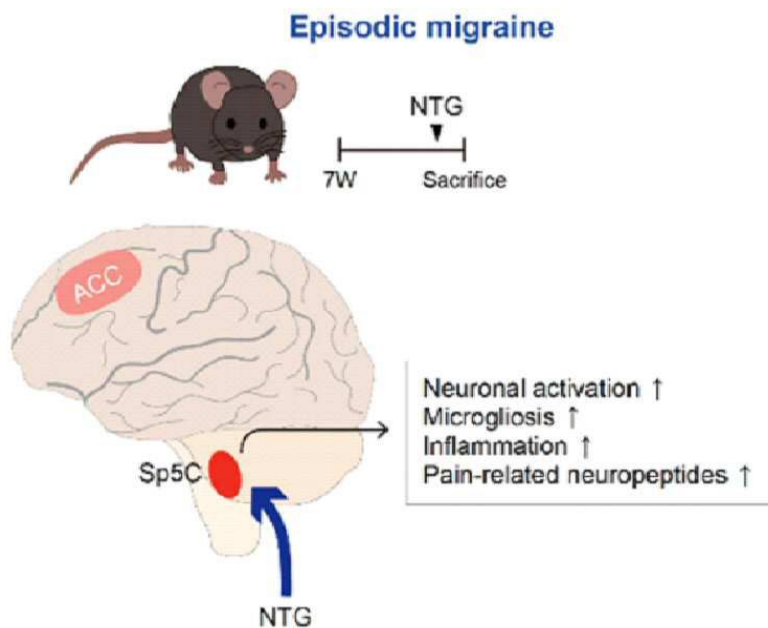
[0121] 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서의 TNF- α , NF- κ B 및 Iba1의 발현 수준은 아래와 같다.

- [0122] 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 TNF- α , NF- κ B 및 Iba1의 발현량이 증가한 것을 확인하였다.
- [0123] 특히 염증 반응 및 면역체계를 조절하는 NF- κ B의 경우, 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서는 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹이 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹보다 발현량이 높음을 확인하였다. 또한, 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서는 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹이 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹보다 발현량이 높음을 확인하였다.
- [0124] 소교세포 마커인 Iba1의 경우, 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서는 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹이 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹보다 발현량이 높음을 확인하였다. 또한, 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC)에서는 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹이 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹보다 발현량이 높음을 확인하였다.
- [0125] 염증 반응 및 면역체계를 조절하는 NF- κ B와 소교세포 마커인 Iba1의 발현량이 동일한 패턴을 보이고 있어, 신경염증과 소교세포 사이의 밀접한 관계를 확인하였다.
- [0127] **실험 5: 신경펩타이드(Neuropeptide)의 발현 패턴을 확인하기 위한 면역형광법(Immunofluorescence staining) 분석**
- [0128] 도 6a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵(Spinal trigeminal nucleus) 꼬리핵(Sp5C) 영역의 신경펩타이드(Neuropeptide) 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.
- [0129] 도 6b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 척수 삼차신경핵(Spinal trigeminal nucleus) 꼬리핵(Sp5C) 영역의 신경펩타이드(Neuropeptide) 발현량을 그래프로 나타낸다.
- [0130] 도 7a는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 신경펩타이드(Neuropeptide) 발현 패턴을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.
- [0131] 도 7b는, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델에서 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역의 신경펩타이드(Neuropeptide) 발현량을 그래프로 나타낸다.
- [0132] 도 8은, 삽화성 편두통 및 만성 편두통 동물 모델의 척수 삼차신경핵(Spinal trigeminal nucleus) 꼬리핵(Sp5C) 영역 및 전대상 피질(Anterior cingulate cortex, ACC) 영역에서의 차이를 모식도로 나타낸다.
- [0133] C57BL/6 마우스 모델의 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC) 영역에서 신경전달물질 변화를 비교하기 위해 4가지 마커를 사용했다.
- [0134] 상기 4가지 마커는 칼시토닌 유전자 관련 펩타이드(Calcitonin gene-related peptide, CGRP), 혈관활성 장 펩타이드(Vasoactive intestinal peptide, VIP), 뇌하수체 아데닐산 사이클라아제 활성화 폴리펩타이드(Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP) 및 물질 P(Substance P)이다.
- [0135] 실험 5는 니트로글리세린으로 유도된 삽화성 편두통(EM)과 만성 편두통(CM) 간의 신경펩타이드 발현의 동적 차이를 확인하기 위해 면역형광 염색을 통해 CGRP, VIP, PACAP 및 물질 P의 발현 수준을 평가하였다.
- [0136] 먼저, 면역형광법을 수행하기 위해, 앞선 실험 2에서 C57BL/6 마우스 모델의 뇌 조직 절편에 CGRP, VIP, PACAP 및 물질 P를 4° C에서 16시간 동안 보관한 다음, 슬라이드를 세척한 후 2차 결합 항체를 주입하고 실온에서 1시간 동안 배양을 하였다. 그 다음, 핵 염색을 위해 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)을 주입한 후, 20분 동안 염색을 진행하였다.
- [0137] 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C)에서의 CGRP, VIP, PACAP 및 물질 P의 발현 수준은 아래와 같다.
- [0138] CGRP 발현 수준은 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹보다 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 높게 나타났으며, 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹이 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹보다 더 높은 발현이 나타난 것을 확인하였다.
- [0139] VIP 발현 수준은 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹에서만 상당히 증가하였음을 확인하였다.
- [0140] PACAP 발현 수준은 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 높게 나타났으며, 삽화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹이 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹보다 높게 나타났다.

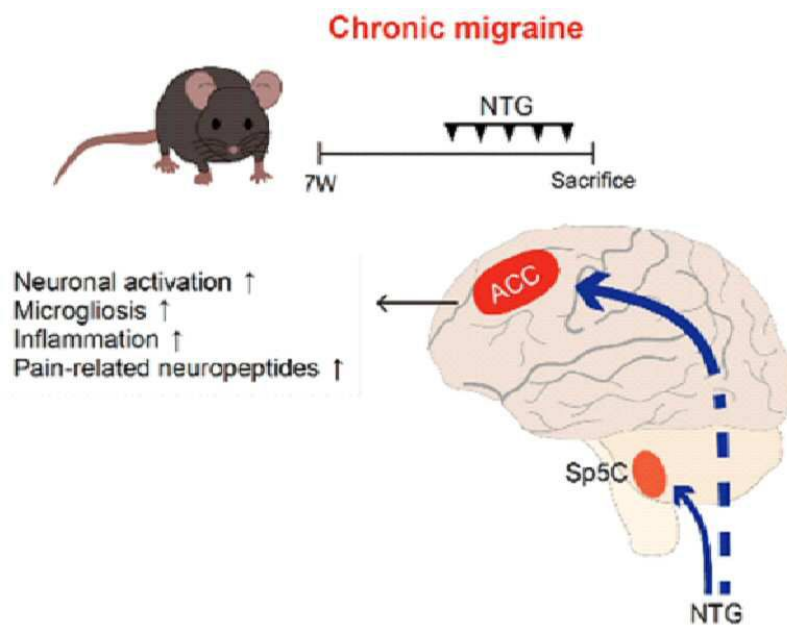
- [0141] 물질 P 발현 수준은 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 높게 나타났으며, 삼화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹과 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹 간에는 유의한 차이가 없음을 확인하였다.
- [0142] 전대상 피질(ACC)에서의 CGRP, VIP, PACAP 및 물질 P의 발현 수준은 아래와 같다.
- [0143] CGRP 발현 수준은 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 높게 나타났으며, 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹이 삼화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹보다 더 높은 발현이 나타난 것을 확인하였다.
- [0144] VIP 발현 수준은 프로필렌글리콜이 포함된 식염수를 투여한 제2 그룹 및 제4 그룹에 비해 니트로글리세린을 투여한 제1 그룹 및 제3 그룹에서 높게 나타났으며, 만성 편두통(CM)이 유발된 제3 그룹이 삼화성 편두통(EM)이 유발된 제1 그룹보다 더 높은 발현이 나타난 것을 확인하였다.
- [0145] PACAP 발현 수준은 제1 그룹 내지 제4 그룹간 유의미한 차이가 없음을 확인하였다.
- [0146] 물질 P 발현 수준은 제1 그룹 내지 제4 그룹간 유의미한 차이가 없음을 확인하였다.
- [0147] 척수 삼차신경핵의 꼬리핵 부분(Sp5C) 및 전대상 피질(ACC)에서의 CGRP, VIP, PACAP 및 물질 P의 발현 수준을 통해 편두통의 단계에 따라 4개의 신경펩타이드의 뇌 영역 간 유도 수준이 서로 다른 것을 확인하였다.

도면

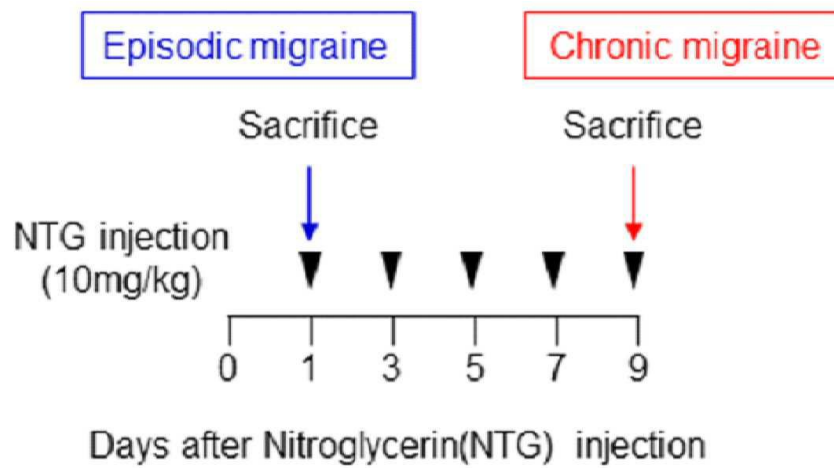
도면1a



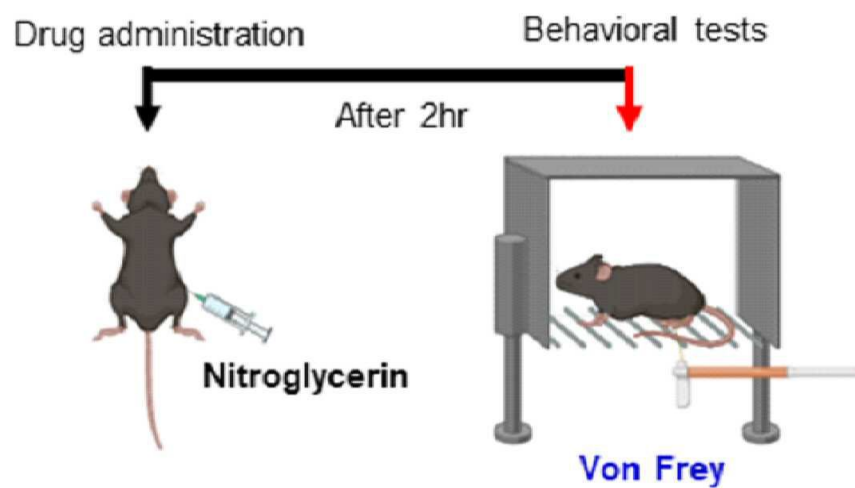
도면1b



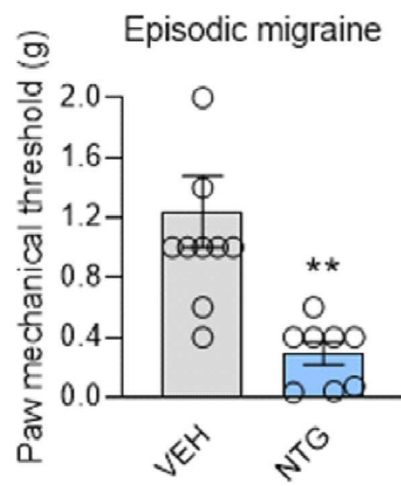
도면2a



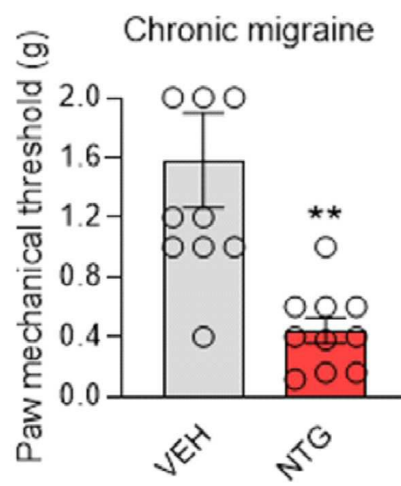
도면2b



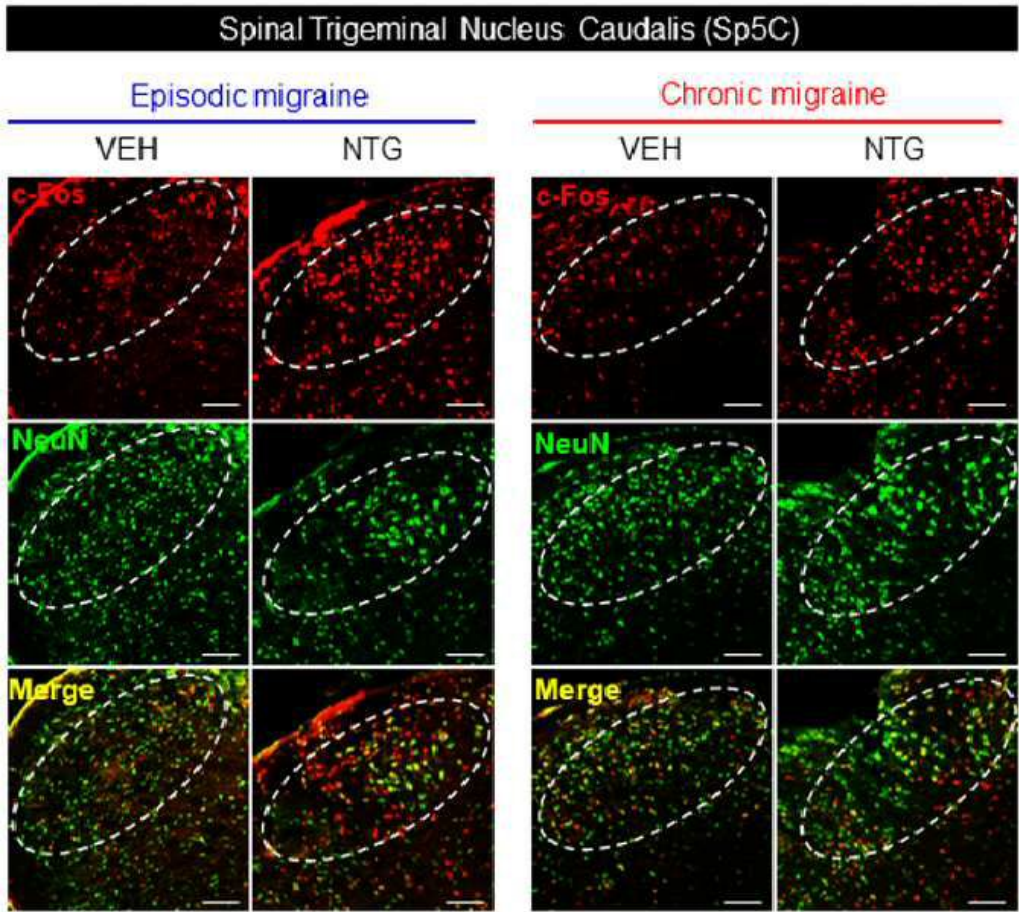
도면2c



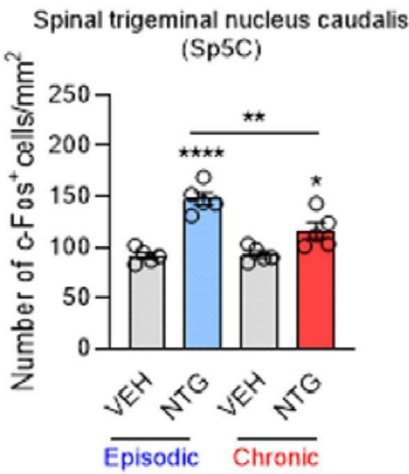
도면2d



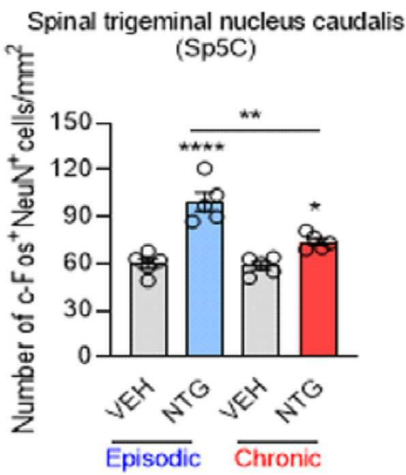
도면3a



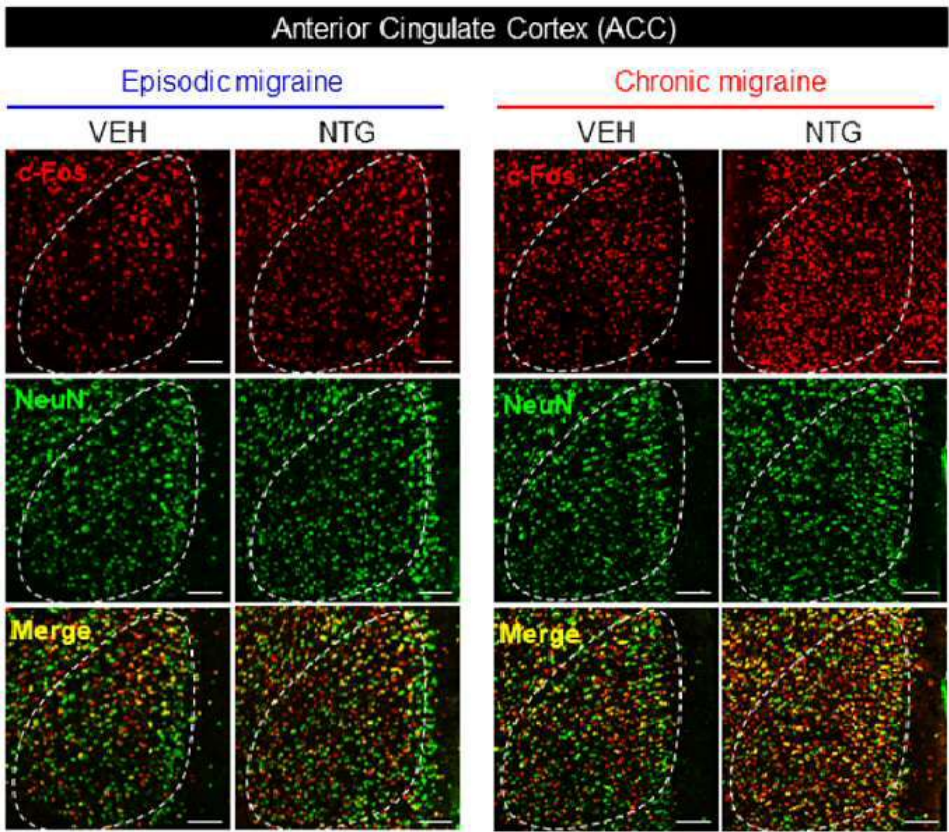
도면3b



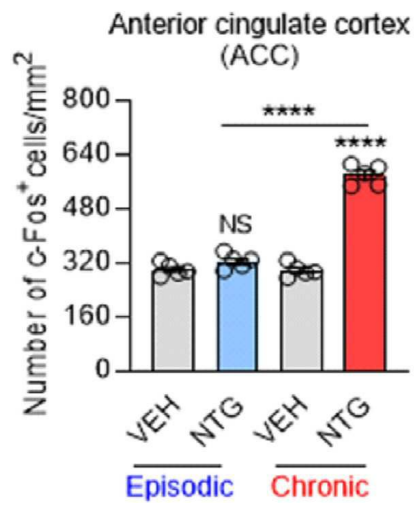
도면3c



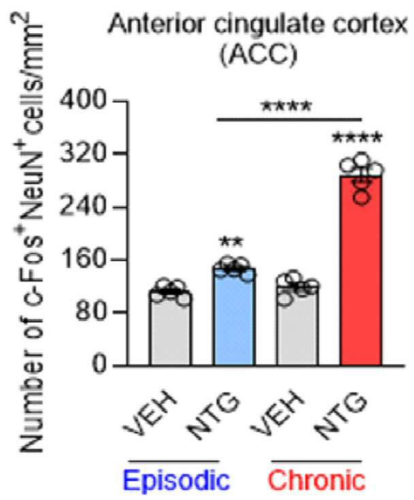
도면3d



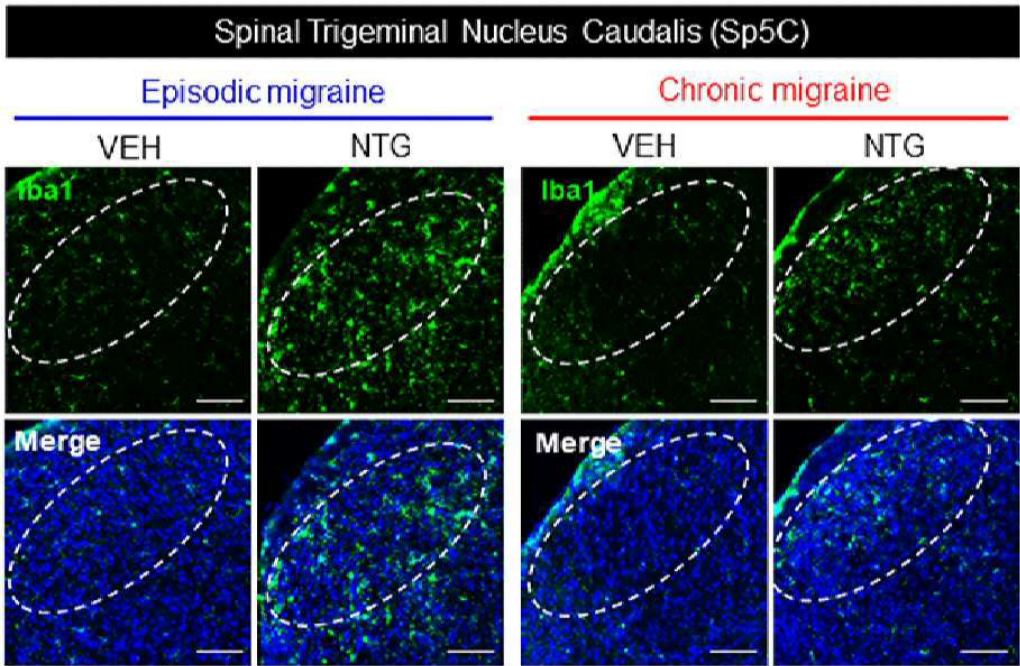
도면3e



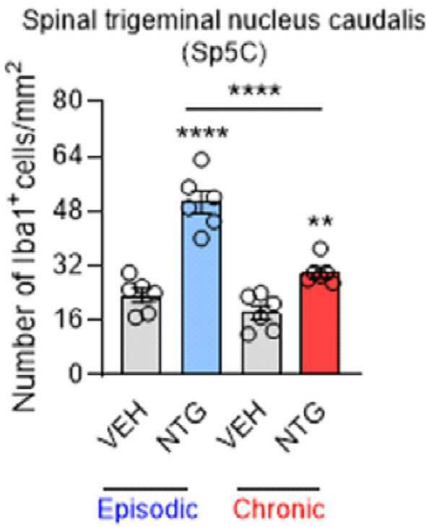
도면3f



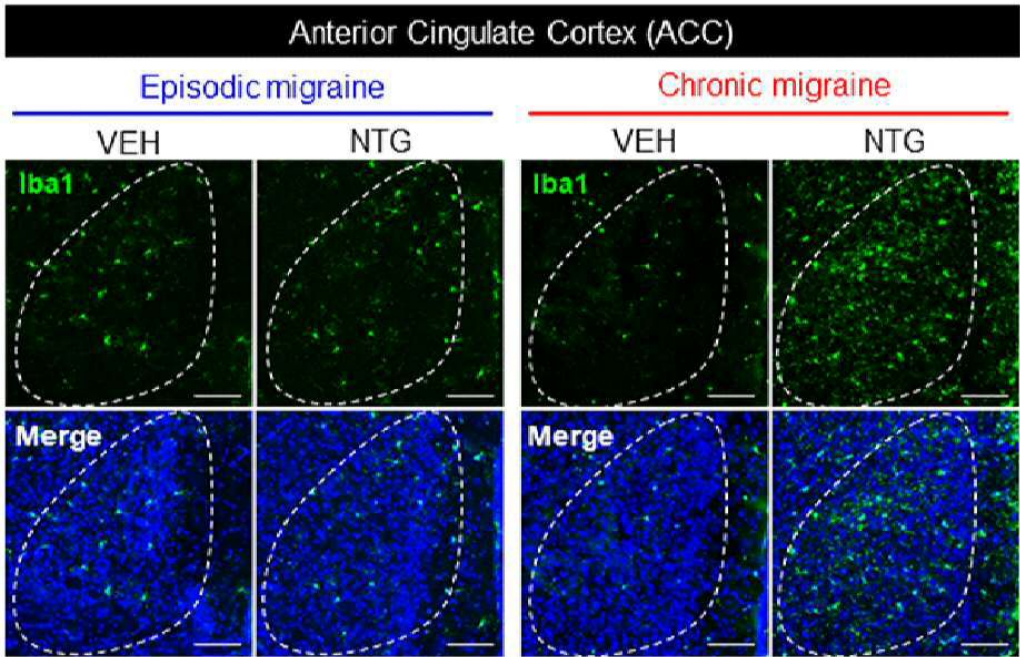
도면4a



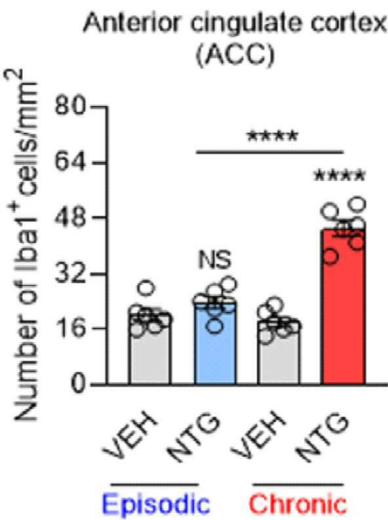
도면4b



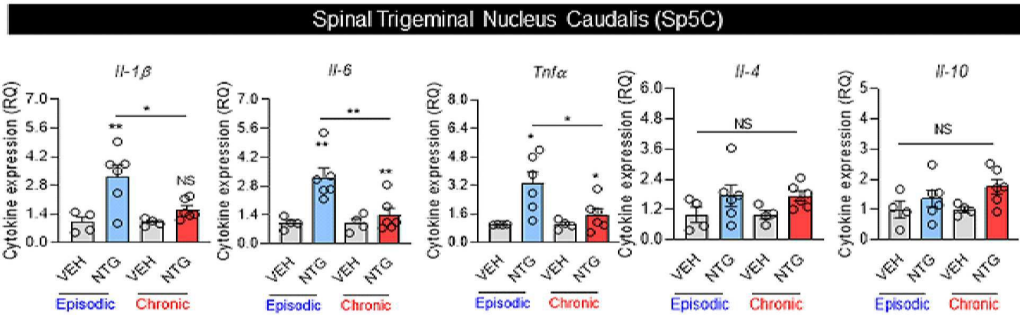
도면4c



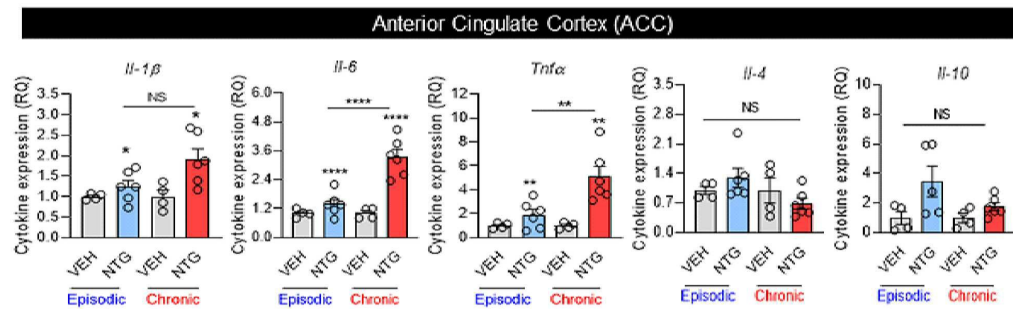
도면4d



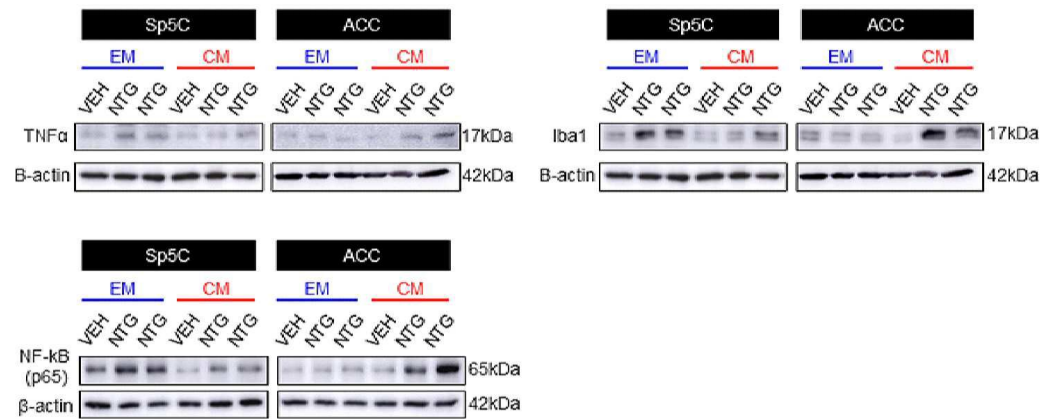
도면5a



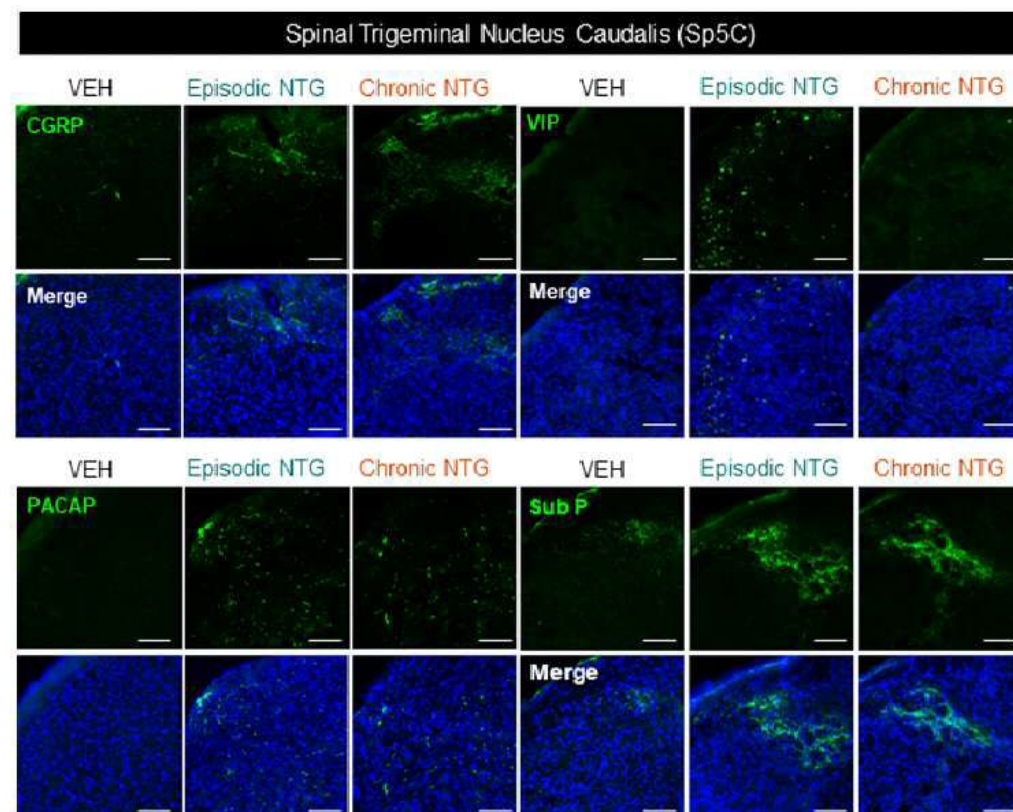
도면5b



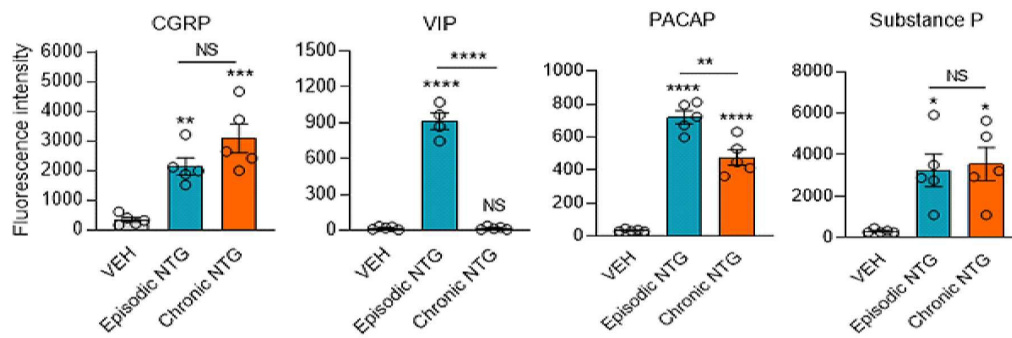
도면5c



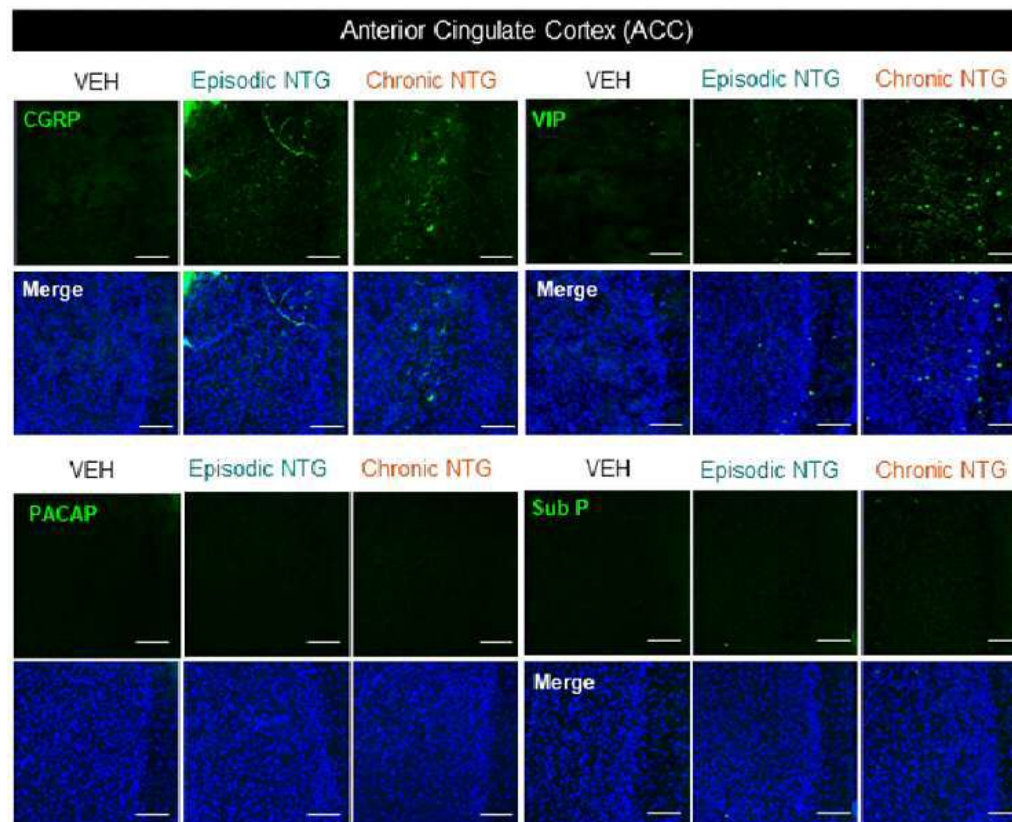
도면6a



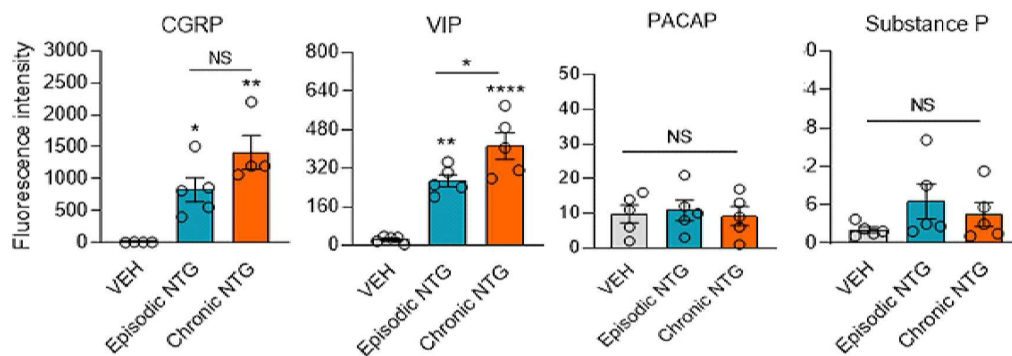
도면6b



도면7a



도면7b



도면8

