



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

비만 치료 백신에 의한
대식세포 재분극과 지방분해능 억제

Regression of macrophage repolarization and
lipolysis activity by anti obesity therapeutic
vaccine

심 명 성

한양대학교 대학원

2017년 8월

석사학위논문

비만 치료 백신에 의한
대식세포 재분극과 지방분해능 억제

Regression of macrophage repolarization and
lipolysis activity by anti obesity therapeutic
vaccine

지도교수 김 효 준

이 논문을 이학 석사학위논문으로 제출합니다.

2017년 8월

한양대학교 대학원

분자생명과학과

심 명 성

이 논문을 심명성의 석사학위 논문으로 인준함

2017년 8월

심 사 위 원 장 : 채영규
심 사 위 원 : 김효준
심 사 위 원 : 양철수



한양대학교 대학원

목차

목차	I
그림 목차	III
표 목차	IV
약 어 표	V
국 문 요 지	VI
1. 서론	1
1.1. 비만과 비만치료제	1
1.2. 비만의 진행과 지방조직에서의 대식세포 변화	1
1.3. 지방세포의 지방대사	2
1.4. Low density lipoprotein(LDL)에 의한 HSL 활성화	2
1.5. 연구 목적	3
2. 실험 재료 및 방법	6
2.1. 실험 재료	6
2.1.1. 실험동물 및 사육	6
2.1.2. 사용시약	6
2.1.3. 사용기기	7
2.2. 실험방법	8
2.2.1. 인공항원 B4T 정제	8
2.2.2. SJ-POV vaccine formulation	9
2.2.3. C57BL/6 mouse 실험	9
2.2.3.1. C57BL/6 마우스 사육	9
2.2.3.2. C57BL/6 면역접종	9
2.2.4. Indirect ELISA를 이용한 antibody titer 측정	11
2.2.5. C57BL/6 mouse 지방조직에서 지방세포 및 대식세포 분리	11
2.2.6. 지방세포 지방분해능 측정	13
2.2.7. 지방세포 크기 비교	13
2.2.8. 대식세포 분극화 FACS 분석	13

3. 실험 결과	14
3.1. C57BL/6 mouse 그룹별 체중변화 측정	14
3.2. Indirect ELISA를 이용한 antibody titer 측정	17
3.3. 지방세포 지방분해능 측정	19
3.4. 지방세포 크기비교	21
3.5. 대식세포 분극화 FACS 분석	23
3.6. C57BL/6 mouse 혈청학적분석	26
4. 토의	28
5. 결론	30
6. 참고문헌	32
Abstract	35



그림 목차

Fig. 1. Overview of adipocyte lipolysis regulation	4
Fig. 2. Phenotypic modulation of adipose tissue	5
Fig. 3. Body Weight Curve	15
Fig. 4. Titration of anti-B4T antibody from the sera	18
Fig. 5. Comparison of HSL lipolytic activities	20
Fig. 6. Fluorescent images of adipocytes from experimental groups	22
Fig. 7. FACS analysis of adipose tissue macrophages	24
Fig. 8. Polarization of adipose tissue macrophages according to M1- and M2-typing	25
Fig. 9. Analysis of serum lipid profile	27

표 목차

Table 1. Immunization of groups	10
Table 2. Comparison of the body weight and organ weight between experimental groups at 17th weeks	12
Table 3. Statistical body weights at the indicated weeks of age	15



약 어 표

BMI : Body mass index

VLDL : Very low density lipoprotein

LDL : Low density lipoprotein

LDLR : Low density lipoprotein receptor

ApoB : Apolipoprotein B

TG : Triacylglycerol

FFA : Free fatty acid

HSL : Hormone sensitive lipase

SVF : Stromal vesicular fraction

HFD : High fat diet

FACS : Fluorescence activated cell sorter

FSC : Forward scatter

SSC : Side scatter

국문요지

비만은 잉여 에너지의 지방형태의 축적으로 일어난 대사성 질환이다. 이러한 비만은 전세계적으로 유행하고 있으며 심혈관계질환, 당뇨병, 지방간 및 암 등 생명을 위협하는 심각한 동반질환의 유발원인임이 밝혀지고 있다. 이러한 비만은 과거 단순 지방의 축적으로 인한 대사성 질환으로만 알려졌지만 최근 면역세포들이 관여하고 있는 것이 밝혀졌으며, 이러한 면역세포들은 전신성 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 ApoB-100 mimetic 펩타이드인 SJ-POV를 백신으로 사용하여 면역 반응을 유도하였을 때 나타나는 체중 증가 억제 효과를 면역계의 변화 양상과 연계하여 분석하고자 하였다.

SJ-POV 접종 시험군의 체중변화는 고지방식을 시작한 고지방식이 비만유도군, 위약 투여시험군에 비해 그 증가량이 현저히 억제 되었으며 백신 접종 시 그 체중이 유지되는 것을 확인하였고 boosting시 체중유지기간이 길어짐을 보였다. 지방세포에서 hormone sensitive lipase(HSL)의 지방분해능은 정상식이 대조군에 비해 고지방식이 비만유도군, 위약 투여시험군은 무게당 지방분해능이 50% 이하로 떨어지는 것을 확인하였다. 또한 SJ-POV 접종 시험군의 HSL의 지방분해능은 정상식이 대조군과 차이가 없는 것을 확인하였다. 이런 결과로 SJ-POV접종에 의해 LDL에 의한 지방분해능 억제를 정상적으로 회복시키는 것을 확인하였다. 지방조직에서의 대식세포 분극화 확인 결과 정상식이 대조군은 M1에 비해 M2가 3배 우세하였다. 고지방식이 비만 유도군과 위약 투여시험군은 M1이 M2에 비해 약 2배 우세하였다. SJ-POV 접종 시험군은 M1과 M2의 비율이 같았다. 이러한 결과를 확인하였을 때 SJ-POV 접종 시험군의 백신에 의한 대식세포가 재분극이 일어남을 확인하였다. 이상의 결과로부터 SJ-POV는 비만백신으로써 체중증가 억제효과가 탁월 하였고 국소 염증성 면역반응의 현저한 억제로 대사성 질환으로의 이행을 억제하는 메커니즘이 예상되는 결과를 확인하였으며, 따라서 면역세포 분비 cytokine profile 과 지방조직에서 분비되는 adipokine profile을 비교분석하여 면역계의 비만 및 대사성 질환에 대한 역할 규명에 대한 연구가 필요시 된다.

제1장 서론

1.1 비만과 비만치료제

비만은 잉여 지방의 과다한 축적을 의미하며 에너지 섭취량이 에너지 사용량을 초과하면서 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 비만은 전 세계적으로 급속도로 확산되고 있는데, 2014년 World Health Organization (WHO)의 보고에 따르면 19억 명의 성인 인구가 과체중 (Body Mass Index (BMI)>25)이며, 6억 이상의 성인 인구가 비만 (BMI>30)으로 보고되었다. 이러한 비만은 직접적인 위험보다 심혈관계 질환, 지방간, 2형 당뇨병 그리고 암 등과 같은 동반 질환이 위험한 질병이다[1]. 비만을 치료하기 위해 현재 여러 약물들이 개발되고 있으며, 대부분의 약물 기전은 장내에서 에너지 흡수 효율을 낮추거나, 신경계에 작용하여 식욕을 억제시키는 방법 등을 사용하고 있다. 이러한 약물 기전은 신경계통 부작용과 몸의 에너지 효율적응으로 인해 오랜 시간 사용이 불가능하며[2-4], 이러한 문제점으로 인해 새로운 형태의 비만치료제가 절실히 필요한 상황이다.

1.2 비만의 진행과 지방조직에서 대식세포 변화

비만이 유도되면 지방조직에서의 대식세포가 증가한다[5]. 이런 대식세포는 2가지 아형으로 존재하는데, 염증반응을 유도하는 M1 형태의 대식세포와 체액성면역을 유도하는 M2 형태의 대식세포가 존재한다. 정상일 때의 지방조직에는 약 10%의 M2 대식세포가 존재하지만, 비만이 진행되면 M1 type의 대식세포가 40%까지 증가한다[6,7]. 정상 상태의 지방조직에서는 M2 형태의 대식세포가 항염증 사이토카인인 IL-10을 배출하여 M2 대식세포로 분극화시켜 염증반응을 조절하고 있다. 하지만 비만이 진행되면 지방 세포의 지방축적이 증가하고 지방 세포의 죽음을 유도하게 되며 이를 제거하기 위해 염증반응을 유도하는 M1 대식세포가 증가하게 된다. 이런 증가된 M1 대식세포는 염

증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1등을 분비하고 이러한 사이토카인들은 염증반응을 계속해서 증가시킨다. 증가된 M1 대식세포로 인한 염증성 반응은 결과적으로 인슐린 저항성을 갖게 한다.[8-11].

1.3 지방세포의 지방대사

지방세포는 에너지를 triacylglycerol (TAG)의 형태로 저장하고 있으며 에너지가 필요할 때 지방을 분해하여 에너지로 사용하게 된다. TAG는 간에서 VLDL(very low-density lipoprotein)의 형태로 변환이 되어 혈액에 의해 말초조직까지 순환하게 된다[12]. 지방세포에서 지방분해는 adipose triglyceride lipase(ATGL), hormone sensitive lipase(HSL), monoglyceride lipase(MGL)에 의해 조절된다[13]. HSL은 catecholamine에 의해 활성화가 되는데, β -adrenergic receptor와 catecholamine이 결합하면 adenylyl cyclase가 활성화되어 cAMP를 형성하게 되고 이는 PKA를 활성화시킨다. PKA는 lipid droplet의 perilipin과 cytosol의 HSL을 phosphorylation 시켜 HSL을 lipid droplet으로 이동시킨다. 이동한 HSL은 lipid droplet의 TAG를 분해해 세포 밖으로 내보내게 한다. 그와 반대로 insulin은 cAMP의 합성을 막아 HSL의 활성을 억제하는 역할을 한다[14].

1.4 Low density lipoprotein(LDL)에 의한 HSL 활성화저하

Very low density lipoprotein (VLDL)은 간에서 생성되어 혈액으로 분비되며, 혈액으로 분비된 VLDL은 lipoprotein lipase (LPL)에 의해 분해되어 free fatty acids (FFAs)를 분비하여 작아지며 LDL을 만들고 분비된 FFAs는 지방조직에 흡수된다[15]. Apolipoprotein B-100 (ApoB-100)은 LDL에 존재하는 550 kDa의 거대한 단백질로써 지방의 수송 및 타겟팅을 도와주는 단백질이다. LDL의 apoB-100 C-말단부위의 도메인은 지방세포의 LDL 수용체와 결합을 하여 지방세포내로 LDL을 들어가는 역할을 한다[16]. 또한 최근 연구에 따르면 이러한 apoB-100을 가진 LDL은 지방세포의 LDL 수용체와 결합하여 지방세포의 catecholamine 유도 지방분해능을 억제하는 것으로 알

려져 있다[17]. 이러한 LDL은 비만이 유도됨에 따라 더욱 증가하게 되고 증가된 LDL은 지방분해 유도를 더욱 억제시켜 악순환이 반복된다.

1.5 연구목적

본 연구실의 선행 연구에서 보여진 비만환자군의 특이적으로 나타나는 ApoB-100에 대한 자가항체의 발현이 우연한 자가면역반응 현상이 아닐 수 있으므로 비만성 대사와 면역의 상호 연관성을 규명하고자한다.

본 연구는 ApoB-100의 LDL 수용체 결합 부위에 대한 구조적 모조 항원 (pB1)을 이용한 항비만 치료백신 SJ-POV를 사용하여 비만을 치료하였을 때 지방조직 특이적인 hormone sensitive lipase의 활성 변화와 지방조직내의 면역 담당 세포 특히 대식세포의 특성 변화 양상을 대조군, 비만군, 비만치료군에 대하여 정성 및 정량적으로 비교 분석하여 대사성 질환으로서의 비만과 생체의 면역계와의 직간접적인 상호 연관성을 규명하는 것을 대전제로 하고 있다.

이에 대조군, 비만군, 위약투여군 및 비만치료군을 설정하여 그룹 간 체중 변화, HSL lipolysis activity 및 macrophage repolarization을 측정했다.

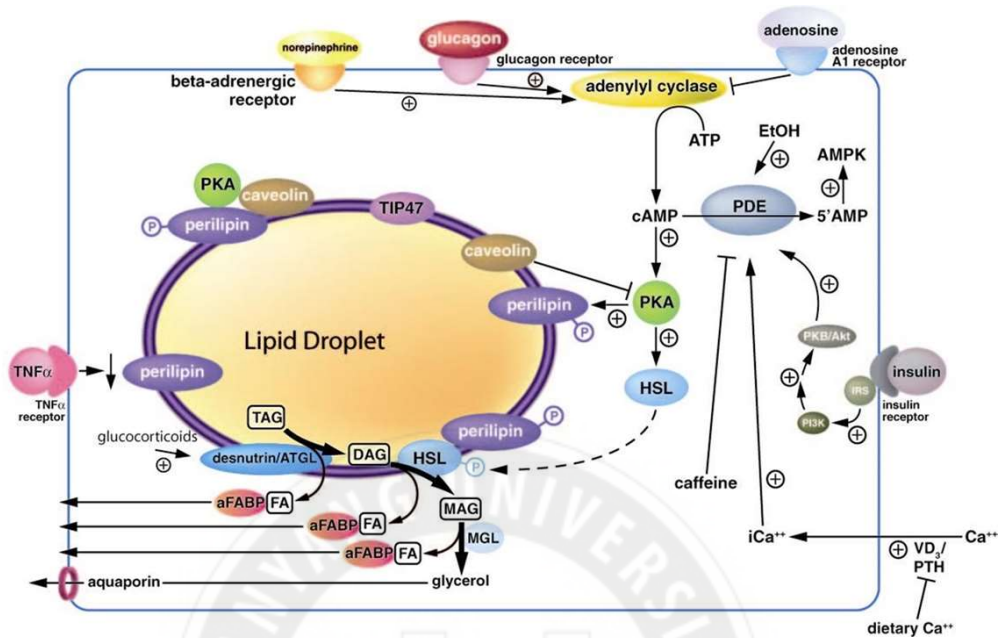


Fig. 1. Overview of adipocyte lipolysis regulation

The breakdown of triglycerides into glycerol and three fatty acid. In adipocyte, three lipase enzymes are involved in lipolysis; ATGL, HSL, MGL. Catecholamines induce lipolysis by binding beta-adrenergic receptor. This results in increased production of cAMP, which activates PKA, which phosphorylate HSL. Phosphorylated HSL hydrolyze lipids in adipocyte lipid droplet. Duncan RE, *et al.* Annu. Rev. Nutr. 27:79–101 (2007).

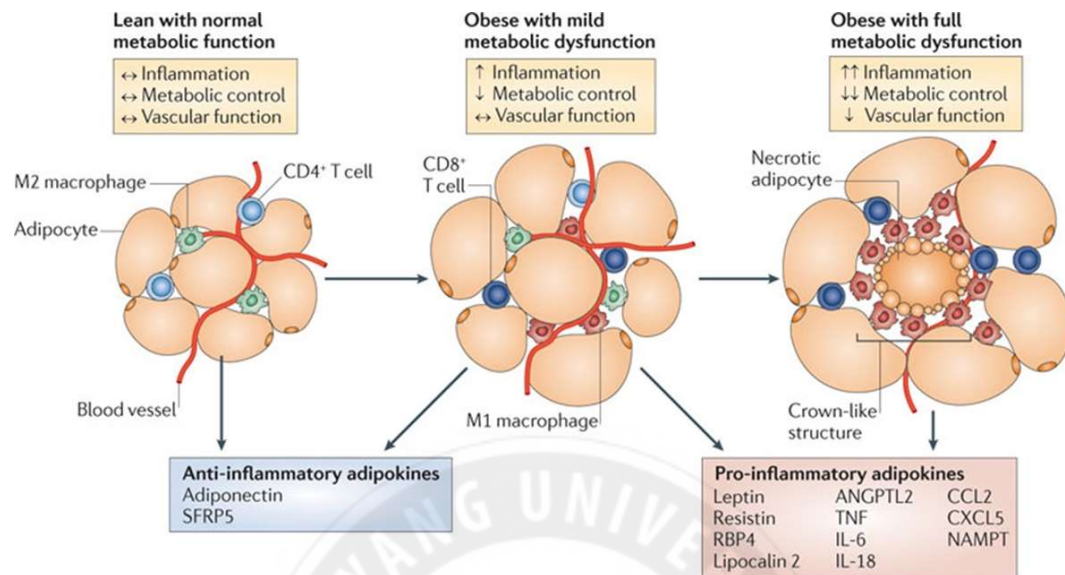


Fig. 2. Phenotypic modulation of adipose tissue

Adipose tissue can be described by at least three structural and functional classifications: lean with normal metabolic function, obese with mild metabolic dysfunction and obese with full metabolic dysfunction. As obesity develops, adipocytes undergo hypertrophy owing to increased triglyceride storage. With limited obesity, it is likely that the tissue retains relatively normal metabolic function and has low levels of immune cell activation and sufficient vascular function. However, qualitative changes in the expanding adipose tissue can promote the transition to a metabolically dysfunctional phenotype. Macrophages in lean adipose tissue express markers of an M2 or alternatively activated state, whereas obesity leads to the recruitment and accumulation of M1 or classically activated macrophages, as well as T cells, in adipose tissue. Obese individuals with adipose tissue in a metabolically intermediate state have improved metabolic parameters, diminished inflammatory marker expression and better vascular function compared with individuals that have metabolically dysfunctional adipose tissue. Metabolically dysfunctional adipose tissue can be associated with higher levels of adipocyte necrosis, and M1 macrophages are arranged around these dead cells in crown-like structures. Oachi *et al.* Nature Reviews immunology 11, 85–97 (2011).

2. 실험 재료 및 방법

2.1 실험 재료

2.1.1 실험동물 및 사육

7주령의 C57BL/6 (Koatech, Korea)을 구입하여 1주간의 순화기간을 거친 후 실험에 사용 하였다. 동물사육실은 온도 25℃, 습도 50%로 유지되된 SPF 시설이며, 사료는 설치류 일반사료 (우정bsc, Korea)를 사용하였고, 비만 유도를 위한 사료는 Rodent Diet with 60%Kcal Fat (Researchdiets, USA)를 사용하였다. 실험동물의 사육은 한양대학교 ERICA 제1과학기술관 동물실험실에서 진행하였다. (2016-0252A)

2.1.2 사용시약

B4T정제를 위한 대장균의 배양에 사용된 시약은 LB, kanamycin, ampicillin (USB, USA), IPTG (Sigma, USA)를 사용하였다. 단백질 정제에 사용된 시약은 histidine tag Ni-NTA (GE Healthcare, UK), urea (Sigma, USA), imidazole (USB, USA), dialysis membrane MWCO 3500 (Spectrum labs, USA)을 사용하였다. 단백질 정량을 위해 BCA protein kit (Thermo, USA)를 사용하였다.

지방세포 분리에 사용된 Krebs Riger Bicarbonate(KRB) buffer는 0.5 mM magnesium chloride, 4.56 mM potassium chloride, 120 mM sodium chloride, 1.5 mM sodium phosphate monobasic, 0.7 mM sodium phosphate dibasic, 15 mM sodium bicarbonate, 20mM HEPES를 사용하였으며, 사용전 2 mM D-glucose, 2% fetal bovine serum (Welgene, Korea), collagenase (Sigma, USA) 을 첨가하여 사용하였다. 지방분해능비교

실험에는 norepinephrine (Sigma, USA), free glycerol reagent (Sigma, USA)과 glycerol standard solution (Sigma, USA)을 사용하였다.

그룹별 지방세포 크기 비교 실험에는 핵을 염색하기 위하여 DAPI (Sigma, USA)를 사용하였고, 지방세포에서 지방을 염색하기 위해 HCS LipidTOX (life technologies corporation)를 사용하였다.

대식세포 분극화 실험은 Alexa 647 Anti-CD206, FITC anti-F4/80, PE anti-CD11c (Biolegend, USA)를 사용하였다.

Antibody titer 측정은 B4T를 coating antigen으로 사용하였으며 coating buffer (50 mM sodium carbonate, 50 mM sodium bicarbonate), washing buffer로 PBS-T (0.05% tween 20), blocking solution으로 0.5% casein in PBS-T를 사용하였고, 2nd antibody는 anti-mouse IgG (Fc specific)-peroxidase antibody (Sigma, USA)를 사용하였다.

2.1.3 사용기기

B4T 정제 시 대장균의 흡광도 측정을 위해 분광광도계는 Genesys20 (Thermo, USA)을 사용하였으며 단백질 정제를 위해 AKTA prime plus (GE Healthcare, UK)를 사용하였다.

Ab titer 측정, Glycerol 측정 및 단백질 정량을 위한 microplate reader기는 BIO-TEK사의 KC4를 사용하였다.

대식세포 분극화 분석을 위해 FACS Calibur (BD, USA)를 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 인공항원 B4T 정제

B4T는 ApoB-100의 LDL 수용체 결합 부위에 대한 구조적 모조 항원인 pB1 펩타이드 4개가 결합된 펩타이드로써 antibody titer 측정시 항원으로 사용하기 위하여 정제하였다. 기존의 실험실에서 M15 *E.Coli*에 histidine tagging된 B4T를 pQE30 Plasmid로 transformation 한 균주를 사용하였다. Pre-culture는 Ampicillin (50 ug/ml), Kanamycin (50 ug/ml)의 LB에서 배양하였다. 동일한 조성의 배지에 pre-culture한 cell을 배양하여 현탁액이 600nm에서 흡광도가 0.4~0.6이 될 때 1 mM의 IPTG를 넣어준 후 4시간 더 배양을 하였다. 배양이 끝난 후 8000 rpm, 4℃, 20분간 원심분리하여 cell pellet을 모았다. 모은 cell pellet에 sonication buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.9)를 첨가하여 10분간 sonication을 진행하였다. sonication후 다시 8000 rpm, 4℃, 20분간 원심분리하여 cell pellet을 모았다. 모은 cell pellet에 binding buffer(5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 8 M urea, pH 7.9)를 첨가하여 15분간 sonication을 한 후 10000rpm, 4℃, 30분간 원심분리하여 상층액만 모았다.

단백질 정제는 Ni-NTA resin을 이용하여 affinity chromatography를 하였다. Ni-NTA resin을 column에 넣은 후 증류수를 흘려주어 resin의 에탄올을 제거한 후 binding buffer를 흘려주어 흡광도의 base line을 잡아준 후 sample을 흘려주어 column을 통과시켜주었다. Sample을 column에 흘려 준 후 washing buffer (50 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 8 M urea pH 7.9)를 흘려주어 resin과 결합하지 않은 단백질을 씻어 준 후에 elution buffer(400 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 8 M urea, pH 7.9)를 흘려주어 B4T를 얻어내었다. 정제된 B4T는 6 M urea부터 dialysis를 하여 차례로 농도를 낮추어 dialysis를 진행하여 PBS까지 dialysis를 진행하였다.

2.2.2. SJ-POV vaccine formulation

SJ-POV vaccine은 항원으로써 45개의 아미노산으로 이루어진 apob-100 mimetic 펩타이드를 사용하였고, 펩타이드를 alhydrogel (Invivogen), PHAD (Avanti)를 사용하여 SJ-POV 백신제제로 만들었다. SJ-POV 1 dose 당 펩타이드 100 ug/100 ul로 계산하여 총 5 mg의 펩타이드를 50 ul의 DMSO에 녹인 후 이를 PBS에 넣고 10 mg/ml aluminium hydroxide인 alhydrogel 1 ml와 1 mg/ml의 PHAD를 1 ml를 넣고 부피를 총 10 ml까지 PBS로 채워 주었다. 이후에 4℃에서 overnight rotation을 한 후 1500 rpm 15 min centrifuge하여 상층액은 UV spectrometer로 정량을 통해 항원이 모두 흡착됨을 확인하였다. 원심분리 침전물은 3회 PBS를 이용하여 세척하여 DMSO 성분을 제거 하고 필요한 농도로 PBS로 최종부피를 맞추었다.

2.2.3. C57BL/6 mouse 실험

2.2.3.1. C57BL/6 mouse 사육

7주령의 C57BL/6를 1주간의 순화기간을 거친 후 실험에 사용 하였다. 동물사육실은 온도 25℃, 습도 50%로 유지되어 있으며, 사료는 설치류 일반사료 (우정bsc, Korea)를 사용하였고, 비만 유도를 위한 사료는 Rodent Diet with 60%Kcal Fat (Researchdiets, USA)를 사용하였다. 마우스의 무게는 순화기간이 지난 후 2일 간격으로 측정하였고, 마우스 무게 측정시 식이량도 함께 측정하였다.

2.2.3.2. C57BL/6 mouse의 면역접종

실험군은 정상식이 대조군(lean), 고지방식이 비만유도군(obese), 위약 투여 시험군(mock), SJ-POV 접종 시험군(SJ-POV) 총 4개로 나누어 진행하였다.

7주령의 마우스를 1주간 순화기간을 거친 후 8주령에 첫 번째 면역접종을 시작하여 격주로 면역접종을 하여 총 4번의 면역접종을 하였다. Boosting이 시되는 10주령부터 lean을 제외한 그룹에 60% high fat diet (HFD)를 먹여 비만을 유도하였다.

주사는 근육 주사로 마우스의 양쪽 허벅지에 50 ul 씩 총 100 ul를 넣어 주사하였다. Lean, Obese 그룹은 PBS를 접종하였고 Mock 그룹은 PBS+ Alum을 접종, SJ-POV 그룹은 SJ-POV를 주사하였다.(Table 1)

Table 1. Immunization of groups

Group	Treatment	Diet	Route
Lean	PBS (n=6)	Normal	Intramuscular
Obese	PBS (n=6)	High fat diet	
Mock	Alum+ PBS (n=6)		
SJ-POV	SJ-POV vaccine (n=6, 100ug/100ul/dose)		

2.2.4. Indirect ELISA를 이용한 antibody titer 측정

혈청학적 분석을 위한 채혈은 heprinized capillary tube(Kimble Chase Life Science and Research Products, USA)를 이용하여 안와채혈을 진행하였다. 혈액은 11,000 rpm, 4℃, 10 min간 원심분리하여 혈청만 분리하여 antibody titer 측정에 사용하였다. Antibody titer 측정은 96well immunoplate (SPL)에 B4T를 coating buffer에 녹여 well당 1 ug/ml의 농도로 100 ng을 4℃에서 overnight coating하였다. 다음 blocking solution으로 37℃, 2 hrs 반응시켰다. 혈청을 1/100에서 1/1600까지 dilution하여 plate에 100 ul씩 loading하여 37℃, 1 hr 반응시켰다. 이후 Goat anti-mouse IgG-HRP 1:10000으로 dilution하여 100 ul씩 loading한 후 37℃, 1 hr 반응시켰다. 이후에 OPD 반응을 진행하여 450 nm에 대한 흡광도를 측정하였다. 각 과정 사이에 PBS-T를 이용하여 3번씩 washing 해주었다.

2.2.5. C57BL/6 mouse 지방조직에서 지방세포 및 대식세포 분리

17주차 mouse를 경추 탈골하여 Epididymal fat pad, mesenteric fat, 심장, 간, 신장, 비장, 근육을 적출하여 무게를 측정하였다(Table 2.). Epididymal fat pad를 가위로 잘게 찢어준 후 2% FBS, 2 mM glucose, 1 mg/ml collagenase가 첨가된 KRB buffer를 1 g당 4 ml를 넣어주어 37℃, 1 hr, shaking 하여 반응시켰다. 반응이 완료되면 300 µm nylon mesh를 통과시켜 지방조직 찌꺼기들을 걸러주고, 지방조직을 걸러준 후 통과한 부분을 40 µm nylon mesh를 다시 통과시켜 지방세포와 대식세포를 분리하였다. 지방세포 부분은 10% FBS, 1% AA가 첨가된 DMEM을 첨가하여 하층액을 주사기로 제거하는 방식으로 washing하여 collagenase를 제거시켜 지방세포를 얻었다. 대식세포는 500 g, 15 min 원심분리를 하여 상층액 5 ml를 남겨두고 Red blood cell (RBC)을 없애주기 위해 RBC lysis buffer 10 ml를 첨가하여 RT, 5 min 반응시킨 후, DMEM을 10 ml 넣어 500 g, 5 min 원심분리하여 상층액을 제거하여 Stromal vascular fraction (SVF)을 얻었다.

Table 2. Comparison of the body weight and organ weight between experimental groups at 17th weeks

	Wiegth	BMI	Liver	Heart	Kidney	Spleen	Muscle	Epididymal	Mesenteric
Lean (n=6)	26.68±0.95	0.30±0.01	1.15±0.07	0.13±0.01	0.28±0.01	0.06±0.01	0.25±0.02	0.48±0.04	0.56±0.03
Obese (n=6)	37.10±2.95	0.41±0.01	1.31±0.05	0.13±0.00	0.32±0.01	0.07±0.00	0.34±0.02	2.57±0.16	1.22±0.17
Mock (n=6)	41.30±4.41	0.46±0.05	1.26±0.1	0.13±0.01	0.31±0.01	0.07±0.01	0.36±0.03	2.39±0.18	1.36±0.14
SJ-POV (n=5)	31.36±2.14	0.37±0.02	1.33±0.07	0.13±0.01	0.33±0.01	0.08±0.01	0.34±0.04	1.42±0.35	0.99±0.17

2.2.6. 지방세포 지방분해능 측정

2.2.5.에서 얻은 지방세포 1.0×10^5 개를 48 well에 seeding하여 배양을 위해 DMEM (10% FBS, 1% AA)를 총 1 ml을 넣어 37℃ 5% CO₂ 2 hr 배양하였고, HSL 활성을 유도할 well은 norepinephrine을 최종 10^{-5} M이 되도록 넣어주었다. 반응이 끝나면 상층액 100 ul 와 free glycerol reagent 100 ul를 반응시켜 540 nm에 대한 흡광도를 측정하였다.

2.2.7. 지방세포 크기비교

2.3.5.에서 얻은 지방세포를 48 well plate에 well당 1.0×10^5 cells/ml로 seeding하여 DAPI를 10 uM 처리하여 2hr 반응시킨 후 현미경으로 관찰하였다. DAPI 염색된 세포가 지방세포임을 확인하기 위해 Lipid와 핵을 같이 염색하여 관찰하였다. 이때 DAPI를 10 uM, HCS LipidTOX를 1:1000으로 처리하여 24hrs 반응 시킨 후 현미경으로 관찰하였다.

2.2.8. 대식세포 분극화 FACS 분석

2.2.3.4에서 얻은 SVF를 상층액 100 ul만 남긴 후 대식세포 10^6 개당 Alexa 647 Anti-CD206 1 ul, FITC Anti-F4/80 0.5 ul, PE Anti-cd11c 1.25 ul를 넣어 4℃ 1hr 반응시켰다. 이후 PBS 1ml을 첨가하여 500 g, 5 min 원심분리를 하여 상층액을 제거하는 과정의 washing을 2회 진행하였다. 이후 PBS를 넣어 sample 준비하였다.

FACS는 기존의 지방조직 대식세포의 일반적인 FSC, SSC와 대식세포에 특이적인 FITC Anti-mouse F4/80의 gating으로 대식세포의 수를 측정하고, PE Anti-CD11c로 M1 대식세포, Alexa647 Anti-CD206으로 M2 대식세포의 수를 측정하였다.

FACS 조건은 FSC: E00 Amp gain 2.47 (Lin) SSC: 493 Amp gain: 1.35(Lin) FL-1 631 (Log), FL-2 377 (Log), FL-4 618 (Log)로 진행하였다.

3. 실험 결과

3.1. C57BL/6 mouse 그룹별 체중변화 측정

7주령의 C57BL/6를 표 1에 보인 것처럼 Lean, Obese, Mock, SJ-POV으로 나누어 8주령때 첫 면역접종을 시작하여 격주로 면역접종을 진행하여 총 4회의 면역접종을 하였다. 2번째 면역접종인 10주령부터 Lean 그룹을 제외한 나머지 그룹의 HFD를 시작하였다.

모든 그룹의 체중은 7주령부터 10주령까지 약 23 g 으로 시작하여 25 g 까지 비슷하게 증가한다. 하지만 2번째 면역접종을 하고 HFD를 시작한 1주일간 Obese와 Mock 그룹은 2.8 g, 3.2 g의 체중이 증가하였지만 SJ-POV 그룹의 체중은 평균 1 g 이 증가하였다. 또한 3번째 면역접종 후 1주일간 Obese와 Mock 그룹 1.7 g, 1.5 g의 체중이 증가하였지만 SJ-POV 그룹은 0.2 g 증가하였다. 4번째 면역접종 후 2주간 Obese와 Mock 그룹은 1.9 g, 2.1 g 증가하였지만 SJ-POV 그룹은 0.6 g 증가하였다. 면역접종이 진행될수록 체중 유지기간이 길어짐을 보여주고 있다 (Fig.3, Table 3.). 이는 SJ-POV에 의한 boosting 효과로 사료된다.

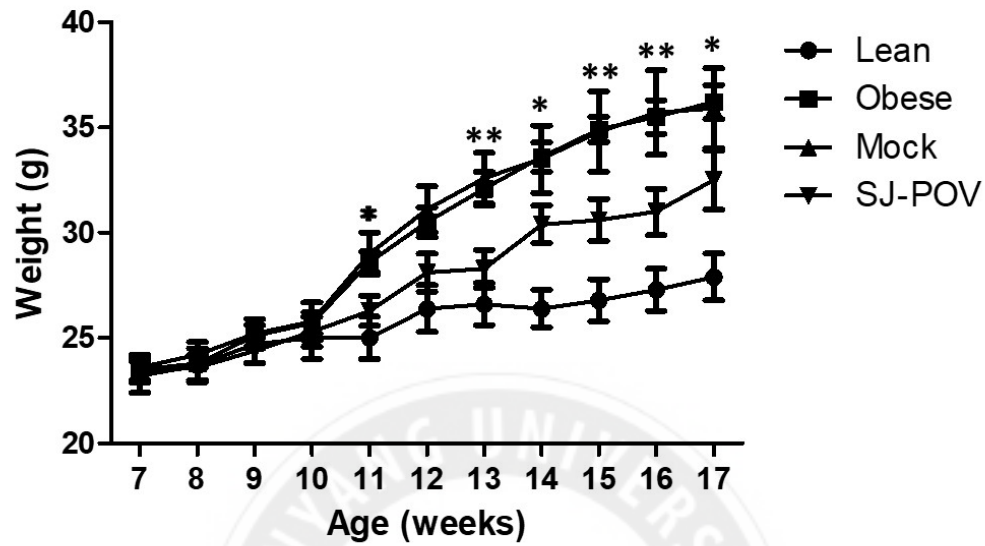


Fig. 3. Body Weight Curve

Body weights changes were traced for 10 weeks from 7th to 17th weeks. Lean group; chow fed with PBS injection (n=6), obese group; HFD fed with PBS injection (n=6), mock group; HFD fed with mock injection of mock vaccine without peptide antigen (n=6), SJ-POV group; HFD fed with vaccine injection (n=5). Injections were done at 8w, 10w, 12w, 14w, and HFD was fed from 10th week of age. *p<0.05, ** p<0.01 statistically significant difference between obese and SJ-POV

Table 3. Statistical body weights at the indicated weeks of age.

	Lean (n=6)	Obesity (n=6)	Mock (n=6)	SJ-POV (n=5)	Treatment
8W	23.66±0.79	23.76±0.33	24.22±0.60	23.65±0.64	1st injection
10W	24.99±1.01	25.74±0.53	25.78±0.87	25.25±0.73	2nd injection
12W	26.43±1.08	30.47±0.69	31.11±1.10	28.12±0.85	3rd injection
14W	26.38±0.92	33.57±0.71	33.53±1.55	30.35±0.88	4th injection
16W	27.32±1.00	32.49±0.80	35.66±1.98	30.97±1.09	
17W	27.92±1.06	36.17±0.80	35.90±1.93	32.52±1.35	Sacrifice



3.2. Indirect ELISA를 이용한 antibody titer 측정

Antibody titer는 7주령부터 격주로 채혈하여 혈청을 Indirect ELISA를 이용하여 측정하였다.(Fig. 4.) B4T를 coating antigen으로 사용하여 ELISA를 진행하였으며, 450nm에서 흡광도가 0.5 OD 가 되는 값의 dilution factor를 antibody titer 값으로 정하였다. Lean 그룹에선 titer가 측정되지 않았다. 17주령의 obese, mock 그룹은 titer가 18 ± 13 , 1 ± 1 로써 항체가 거의 생성되지 않는 것을 확인 할 수 있었다. 그에 비해 SJ-POV 그룹의 titer는 780 ± 493 으로 SJ-POV에 의한 항체유도가 이루어짐을 확인 할 수 있다.



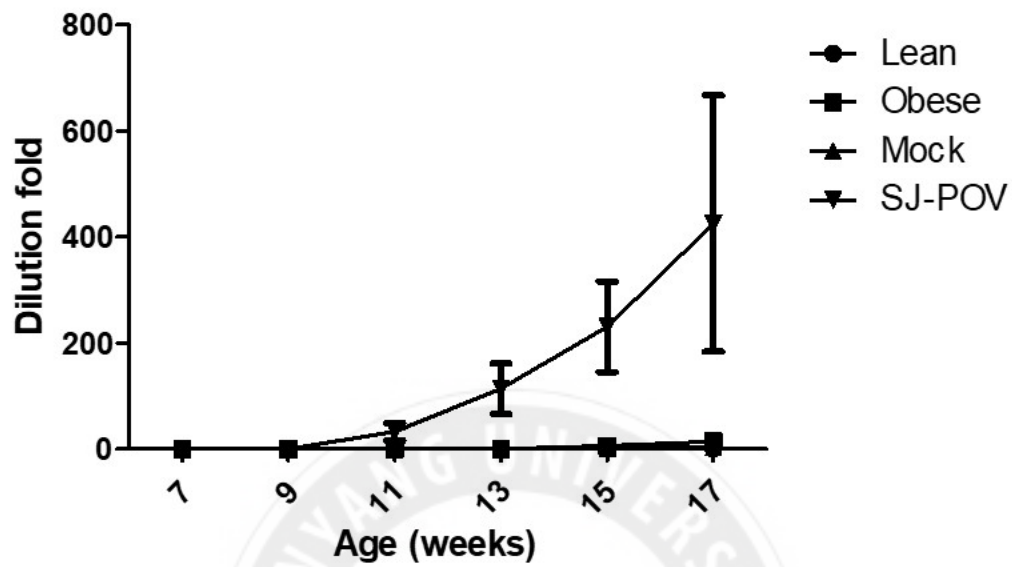


Fig 4. Titration of anti-B4T antibody from the sera.

Antibody titer was measured for the antisera. Arbitrary unit was determined as dilution fold of serum that showed the absorbancy of 0.5 OD at 450 nm with indirect ELISA.

3.3. 지방세포 지방분해능 측정

17주령의 C57BL/6의 epididymal fat pad에서 지방세포를 분리하여 지방세포 1.0 x 10⁵개의 2시간동안 지방분해능을 확인하였다(Fig. 5A).

지방세포는 비만이 유도되더라도 세포의 수가 늘어나는 것이 아니라 세포가 무거워 지는 것이므로, 그룹별 glycerol 분비량의 값을 그룹별 epididymal fat pad의 무게로 나누어 단위무게 당 glycerol 분비량을 기준으로 비교하여 분석하였다(Fig. 5B). 각 그룹별로 비교하였을 때, 단위 지방조직 무게 분비량은 obese와 mock 그룹이 lean의 50%의 lipolysis activity를 보이고 있으며, SJ-POV 그룹의 lipolysis activity는 lean 과 거의 동일하게 나타나고 있음을 확인하였다. 또한 norepinephrine으로 지방분해를 유도하여 glycerol 분비량을 확인하였을 때 lean과 동일하게 SJ-POV 접종군에서 증가하는 것을 확인하였으며, obese와 mock 그룹은 lean 그룹과 비교하여 감소하는 것을 확인하였다. SJ-POV 그룹의 단위 무게 glycerol 분비량의 회복 결과를 통해 SJ-POV 접종은 HSL의 지방분해능 저하를 차단하여 정상화시키는 것을 확인하였다.

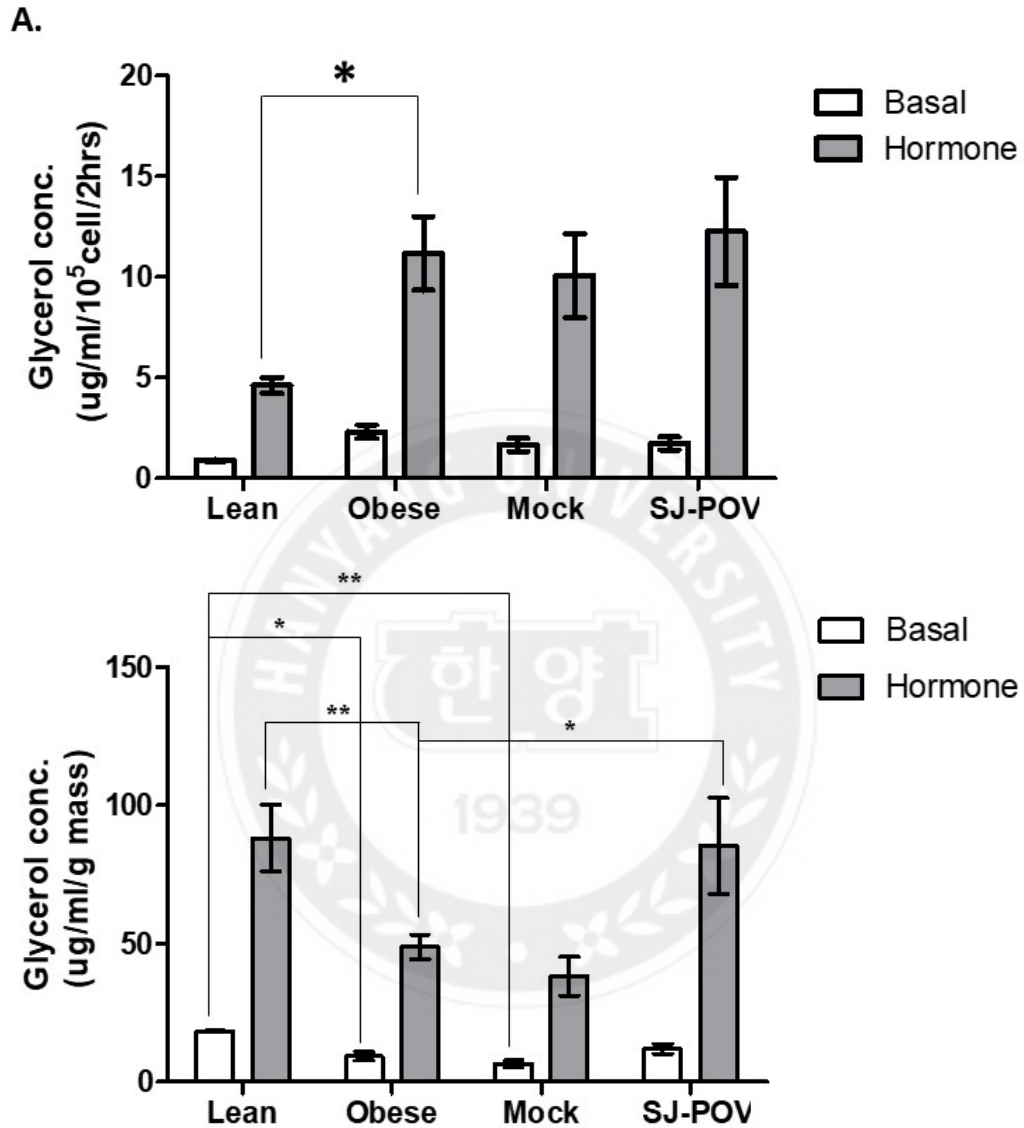


Fig. 5. Comparison of HSL lipolytic activities.

Hormone sensitive lipase activities of isolated adipocytes in the absence (blank bar) and in the presence (grey bar) of 10^{-5} M norepinephrine were measured. A; secreted glycerol concentration per 10^5 adipocyte B; secreted glycerol concentration per unit tissue mass. Lean(n=2), Obese(n=6), mock(n=5), SJ-POV(n=3). *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$.

3.4. 지방세포 크기 비교

17주령의 C57BL/6 mouse 각 그룹의 epididymal fat pad에서 지방 세포를 분리하여 DAPI 염색과 LipidTOX 염색을 통하여 그룹별 지방 세포 크기를 비교하였다.

Lean 그룹의 지방 세포는 대부분 100 μ m 이하인 것을 확인하였으며, 그에 비해 obese와 mock 그룹은 지방세포의 크기가 2배 이상 커진 것을 확인할 수 있었다. 하지만 SJ-POV 접종군은 지방 세포의 크기가 lean보다는 커졌지만, obese, mock 그룹보다는 작아진 것을 통해 SJ-POV에 의해 지방 조직의 지방 축적이 감소한 것을 확인하였다.



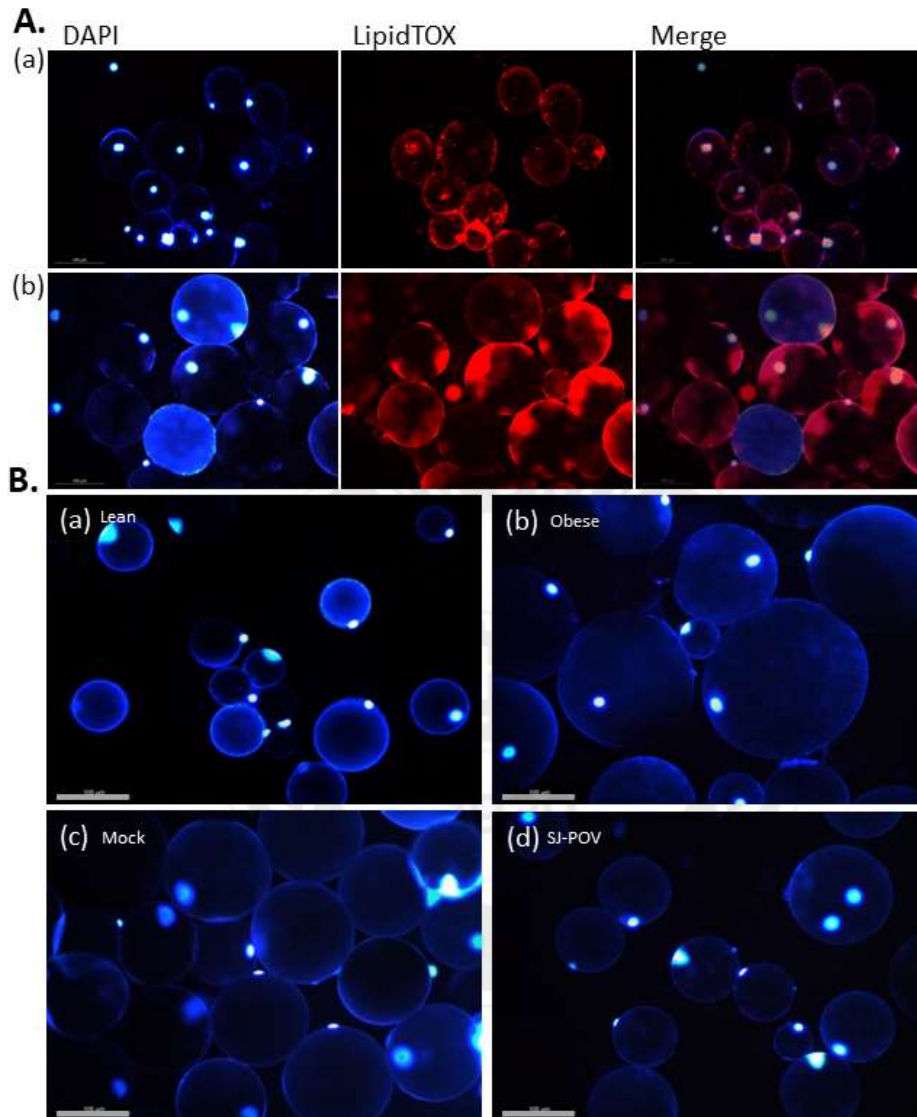


Fig. 6. Fluorescent images of adipocytes from experimental groups

A. Mouse adipocyte stained with DAPI, LipidTOX, and DAPI and LipidTox co-stained image. (a) lean mouse adipocytes and (b) lower pannel ; obese mouse adipocytes. Because of all the isolated cells were identified as adipocytes, single staing with DAPI was done in pannel B.

B. Mouse adipocyte stained with 10 uM DAPI during 2hrs. (a) Lean adipocyte diameter is lower than 100 um. Compared to lean adipocyte, the size of obese(b), mock(c) adipocyte is more than double. (d) SJ-POV adipocyte size is smaller than that of obese and mock

3.5. 대식세포 분극화 FACS 분석

Mouse epididymal fat pad에서 얻은 SVF를 FSC와 SSC를 이용하여 gate를 설정하였고, 그중에서 FITC anti-F4/80을 이용하여 macrophage만 gating 하였다. 이렇게 gating을 한 부분에서 각각 PE anti-CD11c, Alexa647 anti-CD206으로 M1 대식세포와 M2 대식세포의 비율을 확인하였다.

각 그룹의 대식세포 비율을 비교한 결과 lean에서 obese로 진행되는 동안 지방조직 세포의 단위 무게당 개체수를 비교한 결과 정상군의 10% 미만이던 대식세포가 비만군에서는 30%까지 증가하였고, SJ-POV 접종군에서 대식세포는 25%로 다소 비중이 감소하였다(Fig 8a), 대식세포의 아형을 비교한 결과 lean; M1 : M2 = 1.04 : 3.23, obese; M1 : M2 = 11.38 : 6.24, mock; M1 : M2 = 11.19 : 6.37, SJ-POV; M1 : M2 = 8.74 : 8.44 의 비율인 것으로 분석되었다. 정상군의 경우 M2 type이 M1 type에 비해 3배 많았고, 이것이 obese 혹은 mock 의 경우 M1 type이 M2 type보다 2배 많은 것을 확인하였다. 이는 대식세포가 M1 type으로 polarization 된 것을 확인할 수 있다(5). SJ-POV 접종에 의해 비만 억제를 유도한 결과 대식세포의 증가는 15% 감소되었으며(Fig 8a), M2 type이 M1 type보다 우세한 분율을 보여 원상태로의 재분극이 유도 된 것으로 확인되었다(Fig 8b).

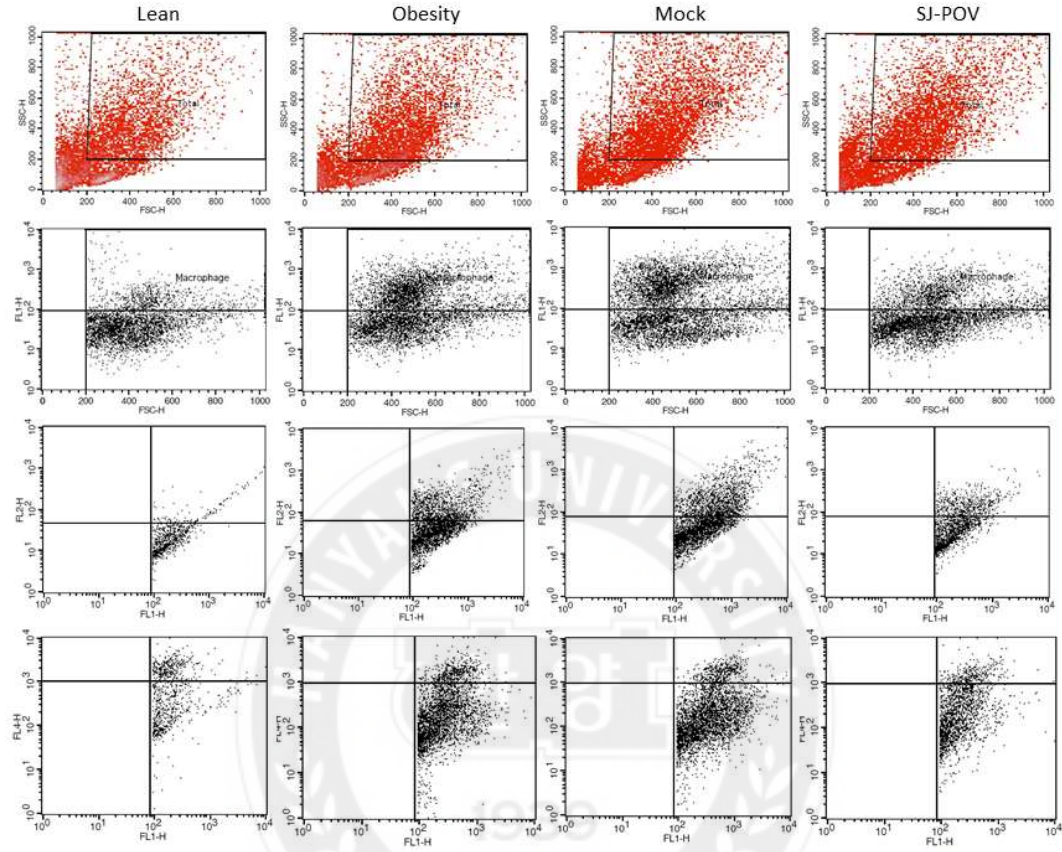


Fig. 7. FACS analysis of adipose tissue macrophages.

For the subtyping of macrophages fluorescent labeled monoclonal antibodies used were FITC-anti-F4/80 for monocytic macrophages, PE-anti-CD11c for M1-type macrophages, and Alexa 647 anti-CD206 for M2-type macrophages (FL-1H : FITC anti-F4/80, FL-2H : PE anti-CD11c, FL-4H : Alexa 647 anti-CD206). A; SSC-H,FSC-H analysis for gating total cell in SVF. B; Macrophage population analysis with FITC anti-F/80 antibody for gating macrophage in total cell. C; M1 macrophage population analysis using PE anti-CD11c in gated total macrophage. D; M2 macrophage population analysis using Alexa 647 anti-CD206 in gated total macrophage.

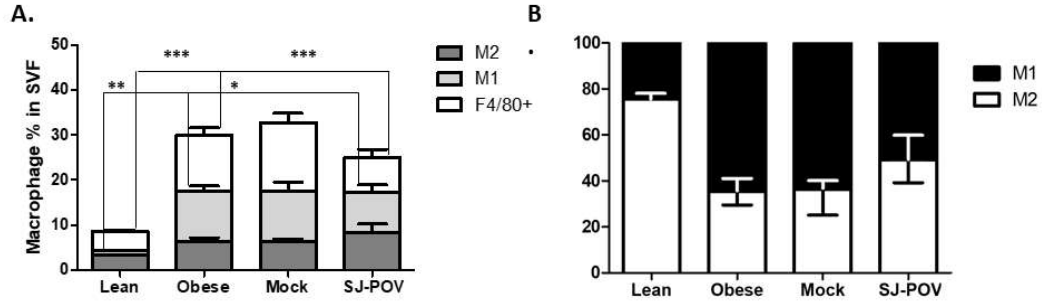


Fig. 8. Polarization of adipose tissue macrophages according to M1- and M2-typing.

Total macrophage % population in adipose tissues were 8.62, 29.9, 32.7 and 24.9 for lean, obese, mock and SJ-POV group, respectively. Among macrophages, the ratio of M2/M1 population is 3.1, 0.55, 0.57 and 0.97 for lean, obese, mock and SJ-POV group, respectively. A; Comparison of total cellular density of SVF macrophages for experimental groups. Lean; M1:M2 = 1.04 : 3.23 (total= 8.62) (n=2), Obese; M1 : M2 = 11.38 : 6.24 (total= 29.93) (n=4), Mock; M1 : M2 = 11.19 : 6.37 (total= 32.71) (n=3), SJ-POV M1 : M2 = 8.74 : 8.44 (total= 24.94) (n=3). *; p<0.05. **;p<0.01. ***;P<0.005. B; Relative population ratio of polarized macrophages were different between experimental groups. The relative percentage of M1, M2 type in total macrophage for the lean group was M1 : M2 = 24.36 : 75.64 (n=2), obese group was M1 : M2 = 64.59 : 35.41 (n=4), and the mock group was M1 : M2 = 63.72 : 36.28 (n=3), SJ-POV M1 : M2 = 50.87 : 49.13 (n=3), respectively.

3.6. C57BL/6 mouse 혈청학적분석

Mouse Sacrifice 시 얻은 혈청에 대한 Triacylglycerol(TG), LDL, HDL, Cholesterol(CHOL), FFA(NEFA) 분석을 (주)라운바이오에 의뢰하였다. 혈청 분석 결과 lean 그룹은 TG 80 ± 10 mg/dl, LDL 14 ± 2 mg/dl, HDL 65 ± 4 mg/dl, CHOL 106 ± 5 mg/dl, FFA 1.51 ± 0.05 mEq/L. obese 그룹은 TG 113 ± 47 mg/dl, LDL 20 ± 2 mg/dl, HDL 113 ± 11 mg/dl, CHOL 212 ± 32 mg/dl, FFA 1.44 ± 0.10 mEq/L. mock 그룹은 TG 91 ± 11 mg/dl, LDL 18 ± 2 mg/dl, HDL 105 ± 12 mg/dl, CHOL 193 ± 29 mg/dl, FFA 1.53 ± 0.04 mEq/L. SJ-POV 그룹은 TG 92 ± 17 mg/dl, LDL 17 ± 2 mg/dl, HDL 98 ± 6 mg/dl, CHOL 172 ± 14 mg/dl, FFA 1.57 ± 0.06 mEq/L 이다. SJ-POV 접종 군에서 lean 그룹보다 높은 혈중 지방을 가지고 있지만, obese보다 적은 양의 혈중 지방을 가진 것을 확인하였으며, 이는 혈중 지방이 SJ-POV 접종에 의해 개선이 된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 9).

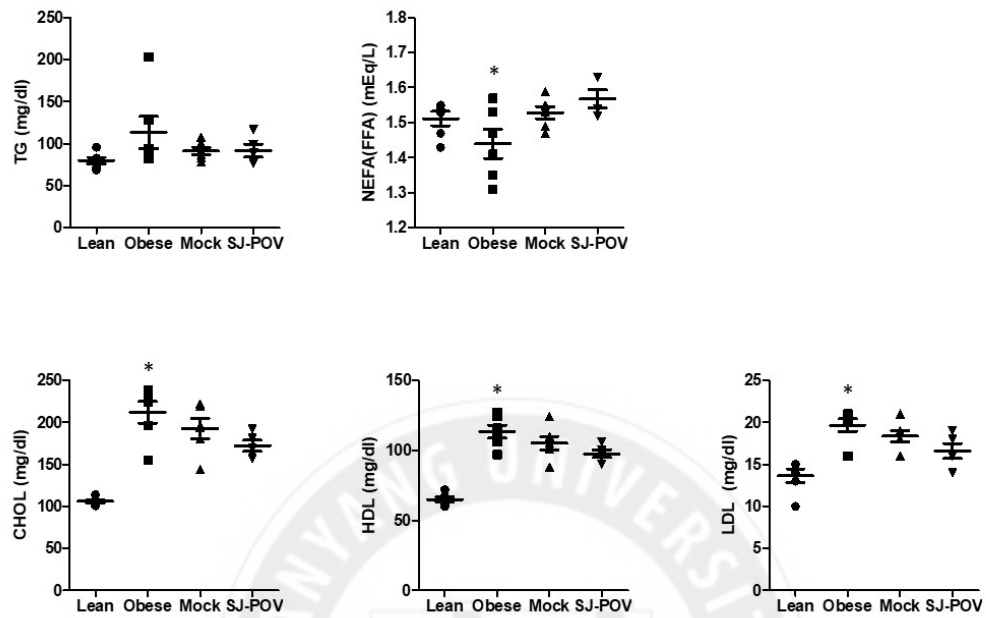


Fig. 9. Analysis of serum lipid profile.

Serological analysis with serum. A; Triacylglycerol B; NEFA(FFA) C; Cholesterol D; High density lipoprotein E; Low density lipoprotein. *p<0.05, statistically significant difference between obese and SJ-POV

4. 토의

기존의 비만은 단순 지방의 축적에 의한 에너지 대사의 불균형을 유도하여 대사성 질환을 유발한다고 알려졌지만 최근 연구결과에 따르면 비만은 단순히 지방조직에 지방을 축적하는 것이 아니라 면역계와 많은 연관이 있는 것이 밝혀졌다[23]. 그렇기 때문에 이번 연구는 SJ-POV 접종을 통해 비만을 억제 및 치료 하였을 때 지방세포의 지방분해능과 지방조직의 대식세포 분율을 비교분석하여 에너지 대사계와 면역계의 상호연관성을 규명하고자 하였다.

SJ-POV의 접종은 비만을 효과적으로 억제하며(Fig. 3), 지방세포 특이적 hormone sensitive lipase(HSL)의 지방분해능 또한 회복하는 것을 확인하였다(Fig. 5). 또한 지방조직에서 대식세포의 수가 줄어든 것을 확인하였으며, 지방조직에서 대식세포를 재분극에 도움을 주어 M2 대식세포의 비율이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 8). 이러한 결과는 SJ-POV에 의한 체중증가의 억제가 지방조직에서 LDL에 의한 지방세포의 지방분해능 억제를 차단하고, 대식세포의 아형변화에 영향을 미침을 확인할 수 있었다.

지방조직에서 지방분해능을 각 그룹별로 비교하였을 때, 비만이 유도됨에 따라 HSL의 지방분해능이 저하되는것을 확인하였으며, 이러한 결과는 여러 논문들에서 이미 밝혀진 바[19,24]와 동일한 결과였다. 하지만 지방조직의 무게증가 배율이 지방분해능의 저하보다 더욱 크므로 실질적인 지방분해량은 비만이 유도될수록 더욱 많아지게 된다. 비만이 유도됨에 따라 HSL 효소활성이 감소하는 것은 혈중 지방산 농도의 항상성을 유지하기 위한 하나의 메커니즘으로 사료된다.

또한, SJ-POV에 의한 체중증가의 억제가 지방조직에서 염증성 면역반응을 유도하는 M1 대식세포의 수를 줄이고, 체액성 면역반응을 유도하는 M2의 수를 증가 시킨 결과로 예상된다. 기존의 연구에 의하면 대식세포의 fatty acid oxidation(FAO)가 M2 activation에 중요한 역할을 하며[25,26], 항체가 결합된 LDL이 대식세포 내에서 분해가 되는 것이 보고되었다[20]. 이러한 결과들과 비교하였을 때, 항체가 결합된 LDL이 M2 activation에 중요한 역할을 할 것이라 예상되므로 대식세포 내에서 항체가 결합된 LDL의 분해와 이러한 과정이 M2 activation에 어떠한 역할을 하는지를 더 연구해야 할 필요가 있다.

또한 기존의 여러 연구를 통해 M1 대식세포가 M2 대식세포로 변할 수 있다는 것과 M1 대식세포가 M2 대식세포로 재분극 되었을 때, 인슐린 저항성을 개선시키는 것이 알려져 있다[27-29]. 이런 결과들과 비교하여 보았을 때, SJ-POV의 접종에 의한 M1 대식세포의 감소와 M2 대식세포의 증가는 지방 조직에서 염증성 면역반응을 억제하고 체액성 면역을 유도하여 인슐린 저항성 개선에 직접적인 관련이 있음을 예상할 수 있다. 이러한 결과들은 지방조직에서 염증성 면역반응의 변화와 대사성 질환의 상관성을 보여주는 결과로 사료되며, 이러한 결과를 더욱 확실히 확인하기 위해서 대식세포가 분비하는 염증성 사이토카인의 변화를 측정하고, 지방조직에서 분비되는 아디포카인의 변화를 비교분석하여 확인을 해보아야 할 것이라 예상된다.



5. 결론

본 연구로부터 SJ-POV 접종에 의해 비만군 및 위약투여군과 대조적으로 백신접종 시 체중이 유지되는 것을 확인하였다. 또한 접종이 진행될수록 백신 접종군의 antibody titer가 증가되는 것을 확인하였다.

비만군, 위약투여군은 정상군의 50%의 지방분해능을 가지는 것을 확인하였고 SJ-POV 접종군의 지방분해능은 정상군과 거의 차이가 없음을 확인하였다. 각 그룹별 지방세포의 크기는 비만군, 위약투여군, SJ-POV 접종군, 정상군 순이었다.

지방조직에서의 대식세포 분극화를 관찰하였을 때, M2/M1 비율은 정상군은 3.1 비만군과 위약투여군은 0.5, SJ-POV 접종군은 1의 비율을 확인하였다.

그룹별 혈청학적분석 통해 비만군에 비해 SJ-POV 접종군의 혈중 지방이 개선된 것을 확인하였다.

비만과 염증성 면역반응의 상관관계가 확인되었으며, 이들의 정성적 및 정량적 연계는 향후 대사관련 adipokines와 염증성 면역 cytokines 및 이들의 조절인자에 대한 광범위한 유도 발현관계를 real-time PCR등의 기법을 이용한 분자생물학적연구를 통해 정립해 나갈 것이다.

6. 참고문헌

1. WHO. World Health Organization. Obesity and Overweight, 2016 [Online] (2016)
2. Tseng, Y.H., A.M. Cypess, and C.R. Kahn, Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010. 9(6): p. 465-481.
3. Mujeeb, M.M.A. and S.A. Divhare, Anti-Obesity Drugs: Present and Future. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences-Jemds*, 2015. 4(77): p. 13489-13500.
4. Fragkiadakis, G.A., M. Toutoudaki, and A. Tsatsakis, Anti-obesity drugs: The role of dieticians in monitoring side effects and toxicity. *Toxicology Letters*, 2010. 196: p. S101-S101.
5. Lumeng, C. N., DeYoung, S. M., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*, 2007. 56(1), 16-23
6. Castoldi, A., et al., The macrophage switch in obesity development. *Frontiers in Immunology*, 2016. 6.
7. Weisberg, S.P., et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. 112(12): p. 1796-1808.
8. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, 2007. 117(1): p. 175-184.
9. Xu, H.Y., et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of*

- Clinical Investigation*, 2003. 112(12): p. 1821-1830.
10. Huh, J.Y., et al., Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in Obesity. *Molecules and Cells*, 2014. 37(5): p. 365-371.
 11. Permana, P.A., C. Menge, and P.D. Reaven, Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006. 341(2): p. 507-514
 12. Ahmadian, M., Y.H. Wang, and H.S. Sul, Lipolysis in adipocytes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010. 42(5): p. 555-559.
 13. Zechner, R., et al., Lipolysis: pathway under construction. *Current Opinion in Lipidology*, 2005. 16(3): p. 333-340.
 14. Duncan, R.E., et al., Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual Review of Nutrition*, 2007. 27: p. 79-101.
 15. Olofsson, S.O. and J. Boren, Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, 2005. 258(5): p. 395-410.
 16. Johs, A., et al.,(2006). Modular structure of solubilized human apolipoprotein B-100 - Low resolution model revealed by small angle neutron scattering. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19732-19739.
 17. Skogsberg, J., et al., ApoB100-LDL acts as a metabolic signal from liver to peripheral fat causing inhibition of lipolysis in adipocytes. *Plos One*, 2008. 3(11).
 18. 이희중, 비만 억제 기능성 펩티드의 지방질대사 조절기작, 2011, 陽大學

校 大學院: 서울.

19. 김지영, 비만 치료에 따른 지방세포의 hormone sensitive lipase의 활성 변화, 2015, 漢陽大學校 大學院: 서울
20. 최정순, 비만 백신에 의한 대식세포의 native LDL의 탐식작용에 대한 연구, 2008, 漢陽大學校 大學院: 서울.
21. 나현균, 지방조직에서LDL항체에 의한 hormone 의존성 방분해효소의 활성 저하 억제에 대한 연구, 2014, 漢陽大學校 大學院: 서울.
22. 김형일, 항비만 면역치료에 의한 지방조직내 대식세포 분극화 양상 연구, 2016, 漢陽大學校 大學院: 서울.
23. Osborn, O., and J. M. Olefsky. 2012. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease, *Nature Medicine*, 18: 363-74
24. Cifuentes, M., Albala, C., & Rojas, C. V. 2008. Differences in lipogenesis and lipolysis in obese and non-obese adult human adipocytes. *Biological Research*, 41(2), 197-204.
25. Huang, S. C. C., Everts, B., Ivanova, Y., O'Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A. M., Pearce, E. J. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nature Immunology*, 15(9), 846-855.
26. Rios, F. J., Koga, M. M., Pecenin, M., Ferracini, M., Gidlund, M., & Jancar, S. (2013). Oxidized LDL induces alternative macrophage phenotype through activation of CD36 and PAFR. *Mediators of Inflammation*.
27. Bouhrel, M. A., et al. Ppar gamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metabolism* 6, no. 2 (Aug 2007): 137-43.

28. Li, P. P., et al. Functional heterogeneity of cd11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *Journal of Biological Chemistry* 285, no. 20 (May 14 2010): 15333-45.
29. Oh, D. Y., et al. Gpr120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, no. 5 (Sep 3 2010): 687-98.



Abstrat

Regression of macrophage repolarization and lipolysis activity by anti therapeutic vaccine

Myungsung Shim

Dept. of Molecular & Life science

The Graduate School

Hanyang University

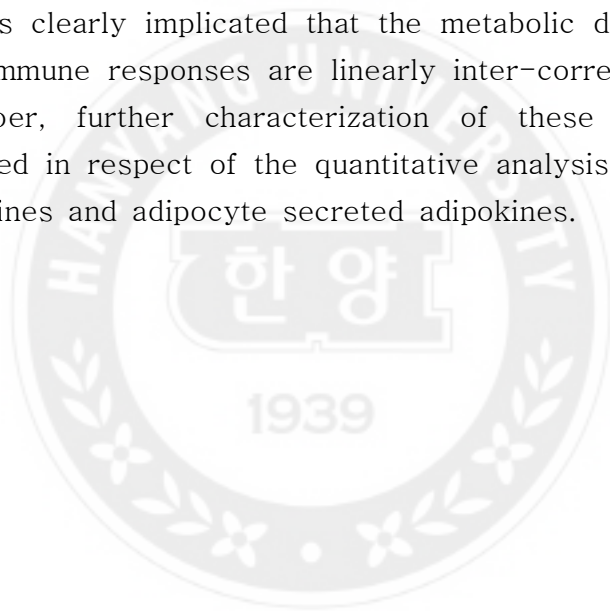
Obesity is a prevalent metabolic disease caused by excess accumulation of lipids. It is well known that the obesity is a causative agent of serious life-threatening comorbidities not only metabolic diseases but also cardiovascular diseases, cancers and so on. It has recently been shed light on the inflammatory immune responses in the pathophysiology of obesity for the further metabolic syndromes such as diabetes and non-alcoholic fatty liver disease.

In this study, co-relationship between obesity and M1-type inflammatory macrophage was evaluated by the treatment of anti-obesity vaccine SJ-POV using high fat diet fed obese mice system.

By the treatment of SJPOV, the weight gains were significantly suppressed compared with mock and obese group during the experimental period. The hormone sensitive lipase (HSL) activity of the adipocytes from SJPOV treated group was comparable to that of the normal chow fed control group adipocytes. The lipolysis activities of the adipocytes from mock or obese groups were diminished to ~ 50%

of that of lean group adipocytes. However, this lowered HSL activity in mock and obese groups were compensated by the enlarged volume of the adipocytes and therefor maintain the homeostasis of lipid levels in circulation, likely. Previously it was reported that obese adipose tissues recruited M1-type macrophages up to 50% of population. In our study, M2/M1 macrophage ratios at the adipose tissues from normal-chow fed lean group, HFD fed obese group, HFD-fed mock injected group and HFD-fed, SJPOV treated group were 3.1, 0.5, 0.5 and 1 respectively.

These results clearly implicated that the metabolic disorder and the inflammatory immune responses are linearly inter-correlated with each other. Therefoer, further characterization of these co-relationship should be traced in respect of the quantitative analysis of macrophage secreted cytokines and adipocyte secreted adipokines.



연구 윤리 서약서

본인은 한양대학교 대학원생으로서 이 학위논문 작성 과정에서 다음과 같이 연구 윤리의 기본 원칙을 준수하였음을 서약합니다.

첫째, 지도교수의 지도를 받아 정직하고 엄정한 연구를 수행하여 학위논문을 작성한다.

둘째, 논문 작성시 위조, 변조, 표절 등 학문적 진실성을 훼손하는 어떤 연구 부정행위도 하지 않는다.

셋째, 논문 작성시 논문유사도 검증시스템 "카피킬러"등을 거쳐야 한다.

2017년06월20일

학위명 : 석사

학과 : 분자생명과학과

지도교수 : 김효준

성명 : 심명성

심명성

한 양 대 학 교 대 학 원 장 귀 하

Declaration of Ethical Conduct in Research

I, as a graduate student of Hanyang University, hereby declare that I have abided by the following Code of Research Ethics while writing this dissertation thesis, during my degree program.

"First, I have strived to be honest in my conduct, to produce valid and reliable research conforming with the guidance of my thesis supervisor, and I affirm that my thesis contains honest, fair and reasonable conclusions based on my own careful research under the guidance of my thesis supervisor.

Second, I have not committed any acts that may discredit or damage the credibility of my research. These include, but are not limited to : falsification, distortion of research findings or plagiarism.

Third, I need to go through with Copykiller Program(Internet-based Plagiarism-prevention service) before submitting a thesis."

JUNE 20, 2017

Degree : Master

Department : DEPARTMENT OF MOLECULAR & LIFE SCIENCE

Thesis Supervisor : KIM HYO JOON

Name : Shim Myung Sung


(Signature)