



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](#)

박사학위논문

비만에 의해 유도되는 아포지단백-B100 자가
항체의 특성 분석 및 치료 효과에 대한 연구

Study on the characteristics and therapeutic effects
of an ApoB100 autoantibody induced by obesity

최문경

한양대학교 대학원

2021년 8월

박사학위논문

비만에 의해 유도되는 아포지단백-B100 자가 항체의 특성
분석 및 치료 효과에 대한 연구

Study on the characteristics and therapeutic effects of an ApoB100
autoantibody induced by obesity

지도교수 Bert Binas, 김효준

이 논문을 이학 박사학위논문으로 제출합니다.

2021년 8월

한양대학교 대학원

분자생명과학과

최문경

이 논문을 최문경의 박사학위 논문으로 인준함

2021년 8월

심사위원장 : 서혜명



심사위원 : 정동탁

심사위원 : 박용식



심사위원 : 김효준



심사위원 : Bert Binas



한양대학교 대학원

목차 (Contents)

목차 (Contents)	I
그림 목차 (List of figures)	III
표 목차 (List of tables)	V
약어표 (Abbreviation)	VI
국문 요지	VII
제1장: 비만에 의해 유도되는 아포지단백-B100 자가항체 특성에 대한 연구	
1. 서론	1
1.1. 비만과 면역 반응의 상관성	1
1.1.1. 비만과 면역 반응	1
1.1.2. 비만과 자가면역 질환	4
1.2. 연구 배경	7
1.2.1. 동맥경화와 아포지단백-B100 자가항체	7
1.2.2. 비만과 아포지단백-B100 자가항체	9
1.2.3. 연구 목적	9
2. 재료 및 방법	10
3. 결과 및 토의	19
3.1. 비만 마우스에서 아포지단백-B100에 대한 자가항체 생성 패턴 분석	19
3.2. 인간에서 아포지단백-B100에 대한 자가항체 생성 패턴 분석	27

3.3. 아포지단백-B100 자가항체의 특성 분석	33
4. 결론	37
제2장: 3HOTP로 유도된 아포지단백-B100 항체의 비만 예방 및 치료 효과 연구	
1. 서론	41
1.1. 비만 치료제	41
1.1.1. 최신 비만 치료제 시장	41
1.1.2. 비만면역치료제 3HOTP 개발	41
1.2. 연구 목적	44
2. 재료 및 방법	45
3. 결과 및 토의	49
3.1. 마우스 주령에 따른 3HOTP 접종에 의한 항 비만 효과 확인 (연구-1)	49
3.2. 주사 량과 횟수에 따른 3HOTP 접종에 의한 항 비만 효과 확인 (연구-2)	62
3.3. 비만 유도 이후의 3HOTP 접종에 의한 항 비만 효과 확인 (연구-3)	69
3.4. 면역결핍 마우스에서의 3HOTP 접종에 의한 항 비만 효과 확인 (연구-4)	76
4. 결론	83
참고 문헌	85
영문 요지 (Abstract)	96
연구윤리 서약서	98

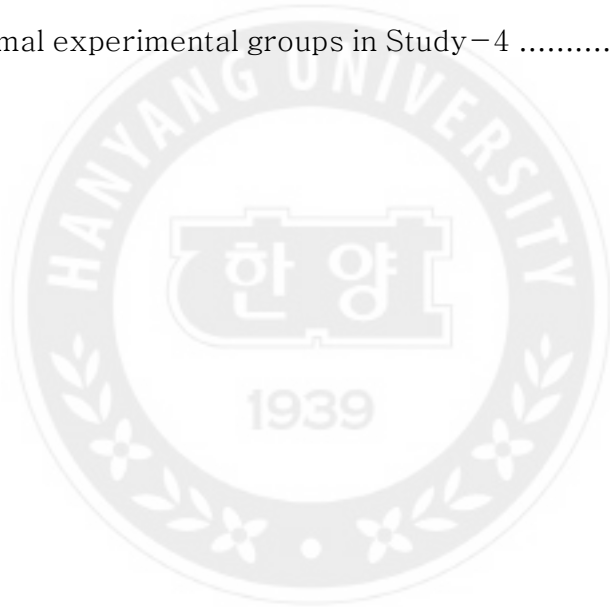
그림 목차 (List of figures)

Figure 1.	Inflammation response caused by Obesity	3
Figure 2.	The main mechanisms by which autoimmune diseases are promoted in obesity	5
Figure 3.	Mechanism of production of autoantibodies by AIM in obesity	6
Figure 4.	Establishing criteria for true positive of ApoB100 autoantibody	15
Figure 5.	Scatterplots the relations between body weight and Ab (antibody) units in mouse	20
Figure 6.	Animal experimental plan	23
Figure 7.	3D graph of the relations between antibody against pB4, body weight and age	25
Figure 8.	Analysis of relations between Ab (antibody) units and body weight in obese mouse	26
Figure 9.	Scatterplots the relations between body weight and Ab (antibody) units in human	29
Figure 10.	Analysis of relations between Ab (antibody) units and BMI in human	31
Figure 11.	Pattern of positive population of autoantibody along BMI	32
Figure 12.	Isotype analysis of anti-ApoB100 autoantibody in mouse and human	34
Figure 13.	Epitope analysis of anti-ApoB100 autoantibody in mouse and human using dot blot	36
Figure 14.	I Inhibition mechanism of fat accumulation by 3HOTP, an obesity immunotherapeutic drug	43

Figure 15.	Animal experimental plan of Study-1	50
Figure 16.	Inhibition effect of weight gain by 3HOTP injection according to mouse age (Study-1)	53
Figure 17.	Titration of anti-pB1 antibody in Study-1	55
Figure 18.	Serum lipid profile in Study-1	57
Figure 19.	Comparative analysis of the size of adipocytes in Study-1	59
Figure 20.	Analysis of the M1/M2 macrophages polarization of adipose tissue in Study-1	61
Figure 21.	Animal experimental plan of Study-2	63
Figure 22.	Inhibition effect of weight gain by 3HOTP injection according to injection dose and cycle (Study-2)	66
Figure 23.	Titration of anti-pB1 antibody in Study-2	68
Figure 24.	Animal experimental plan of Study-3	70
Figure 25.	Inhibition effect of weight gain by 3HOPT injection after obesity induction (Study-3)	73
Figure 26.	Analysis of whole-body fat mass in Study-3	75
Figure 27.	Animal experimental plan of Study-4	77
Figure 28.	Weight gain in Study-4	80
Figure 29.	Titration of anti-pB1 antibody in Study-4	82

표 목차 (List of tables)

Table 1.	Animal experimental groups	24
Table 2.	Baseline characteristics of Human subjects	28
Table 3.	Animal experimental groups in Study-1	51
Table 4.	Animal experimental groups in Study-2	64
Table 5.	Animal experimental groups in Study-3	71
Table 6.	Animal experimental groups in Study-4	78



약어표 (Abbreviation)

ApoB100: Apolipoprotein B-100
BMI: Body mass index
FACS: Fluorescence activated cell sorter
FFA: Free fatty acid
FPS: Fasting plasma glucose
FSC: Forward scatter
HBV: Hepatitis B virus
HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol
HFD: High fat diet
HRP: Horse radish peroxidase
hsCRP: High-sensitivity C-reactive protein
LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol
OPD: o-Phenylenediamine
oxLDL: Oxidized low-density lipoprotein
PBS: Phosphate buffered saline
PVDF: Polyvinylidene fluoride blotting membrane
SBP: Systolic blood pressure
SSC: Side scatter
SVF: Stromal vesicular fraction
TBS: Tris buffered saline
TBST: Tris buffered saline tween-20
TG: Triacylglycerol
VLDL: Vary low density lipoprotein
WC: Waist circumference

국 문 요 지

비만은 에너지의 불균형에 의한 단순한 생리적 현상이 아니라 생체 신진대사, 내분비 교란, 유전자 발현 및 후생학적 요인, 장내 세균의 변화 등과 같은 다양한 병인으로 유발되며, 고혈압, 심근경색증, 당뇨병과 같은 질환을 야기시킨다. 또한 비만에 의해 지방조직에서 염증 반응과 특정 면역세포들이 증가하면서 만성적 면역반응이 일어나고 다양한 자가 항체를 유도 생산한다. 선행 연구를 통해 비만 마우스에서 아포지단백-B100 을 인식하는 자가 항체가 존재함을 확인하였다.

본 연구에서는 마우스와 인간에서 아포지단백-B100 을 인식하는 자가 항체의 특성 분석 및 아포지단백-B100 항체 유도에 의한 치료 효과를 확인하였다. 먼저, 비만 마우스에서 아포지단백-B100 을 인식하는 자가 항체가 유도 생성되어 혈중 내 농도가 증가한 후 고도 비만으로 이행될 때 감소하는 것을 확인하였으며, 인간에서도 비만이 진행됨에 따라 자가 항체의 농도가 증가한 후 고도 비만으로 이행될 때 감소하는 2 상 패턴의 양상을 확인하였다. 이는 과도한 지방 흡수로 체내 축적된 지방 입자를 제거하기 위한 자연 치유적 메커니즘으로 아포지단백-B100 을 인식하는 자가 항체가 생성되고 소모되는 것을 의미한다. 또한 이들 자가 항체는 IgG 형태로 특이적으로 아포지단백-B100 의 p210 부분을 인식하는 것을 확인하였다. 동맥경화 환자에서 다양한 에피토프를 가지는 자가 항체가 생성되는 것과 다르게 비만 환자에서 특이적으로 p210 을 인식하는 자가 항체만 생성되는 것은 선행적으로 체내에서 (초)저밀도 지단백질을 제거하기 위해 아포지단백-B100-p210 에 대한 자가 항체가 생성된 후 고도 비만으로 악화되면서 추가적으로 체내에 축적된 자연적/변형된 (초)저밀도 지단백질에 의해 다양한 에피토프를 가지는 자가 항체가 생성되는 것을 의미한다. 이를 이용하여 3HOTP 접종을 통해 인위적으로 아포지단백-B100 을 인식하는 항체 생성을 유도하였을 경우 3HOTP

접종에 의해 효과적으로 체중 억제가 되는 것을 확인하였으며, 혈중 항체 농도에 따라 접종 주기를 조절하여 지속적인 접종에 의해 비만을 효과적으로 차단하는 것을 확인하였다.

결론적으로 비만이 유도되면 체내에서 치료를 위해 특이적으로 아포지단백-B100의 p210 부분을 인식하는 자가 항체가 생성되어 증가하지만 고도 비만에서 더 이상 증가하지 않으며, 3HOTP의 접종은 생체 내 면역체계를 자극하여 아포지단백-B100을 인식하는 항체 생성을 인위적으로 유도 증가시켜 체내 지방의 축적을 차단하여 체중 증가를 효과적으로 억제하며, 이는 새로운 기전의 백신 형태의 비만 치료의 가능성이 있음을 보여준다.



제1장: 비만에 의해 유도되는 아포지단백-B100 자가항체 특성에 대한 연구

1. 서론

1.1. 비만과 면역 반응의 상관성

1.1.1. 비만과 면역 반응

비만은 대사성질환으로 암, 에이즈 등의 치명적인 질환과 함께 보건 및 사회 복지 측면에서 해결해야만 하는 중대하고 절박한 질환이다 (Guilherme, Virbasius et al. 2008, Kanneganti and Dixit 2012, Tateya, Kim et al. 2013). 비만은 WHO에서 질병으로 간주하였으며, 현재 전세계적으로 비만 인구는 급격하게 증가하고 있는 추세이며, 아프리카 및 아시아 몇몇 국가를 제외하고는 약 40% 이상이 과체중 및 비만인구이다. 최근까지도 비만을 치료하고자 하는 생명과학, 의약학, 대체의학 분야에서 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Costantino and Barlocco 2015, Saltiel 2016). 기존의 비만은 영양의 불균형으로 인한 질병으로 알려져 있었는데, 비만이 유도되면 염증 반응이 증가하는 것이 2000 년대 연구를 통해 알려지면서 비만이 단순한 대사성질환이 아니라 면역 체계와 밀접한 연관이 있다는 것이 보고되고 있다 (Schipper, Prakken et al. 2012, Odegaard and Chawla 2013, Arai and Miyazaki 2014). 정상 마우스의 지방조직에 약 10% 면역세포가 존재하며, 지방조직에서 면역 반응의 항상성을 조절하지만, 비만 마우스의 지방조직에서는 과도한 지방 섭취를 통해 지방조직에 지방이 쌓이면서 지방세포가 깨지면서 염증조절복합체 (inflammasome)를 형성하고 만성적 면역 반응이 일어난다 (Weisberg, McCann et al. 2003). 이들 지방조직에 세포독성 T 세포, B 세포, 대식세포 등과 같은 면역 세포들이 모여 염증성 면역 반응에 관여하는 것으

로 알려져 있다 (Figure 1) (Liu, Divoux et al. 2009, Nishimura, Manabe et al. 2009, Winer, Winer et al. 2011, Grant, Youm et al. 2013, Ivanov, Merlin et al. 2018). 특히, 비만일 때 지방조직에서 대식세포의 개체수가 정상보다 3 배 이상 증가하며 (Takahashi, Mizuarai et al. 2003, Weisberg, McCann et al. 2003, Kanda, Tateya et al. 2006, Appari, Channon et al. 2018), 활성화된 지방조직 대식세포 (adipose-tissue macrophages, ATMs)는 염증성 사이토카인을 지속적으로 분비하고 비만과 염증성 면역 반응을 활성화하여 다른 염증성 세포들이 모여들어 계속해서 염증 반응이 악화되면서, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화 등의 대사성질환의 원인이 되며, 나아가 암 유발까지 진행되게 된다 (Lumeng, DelProposto et al. 2008, Fujisaka, Usui et al. 2009, Biswas and Mantovani 2010, Tateya, Kim et al. 2013, Haase, Weyer et al. 2014, Appari, Channon et al. 2018).

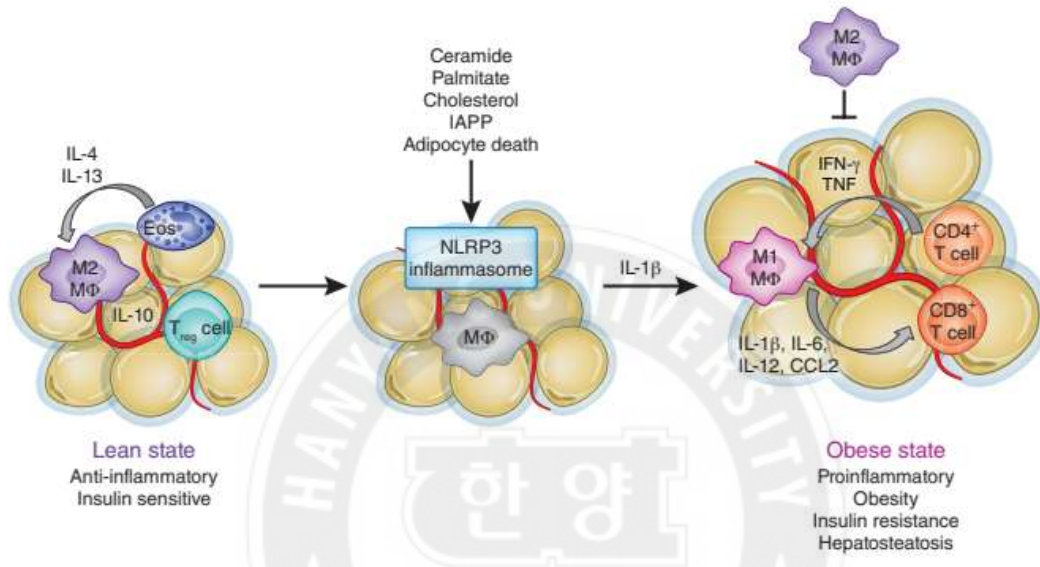


Figure 1. Inflammation response caused by obesity. In the lean state, M2 macrophages and Treg cells play a role in inhibiting the inflammatory response of adipose tissue and maintaining metabolic homeostasis. IL-4 and IL-13 secreted from eosinophils maintain M2 macrophages in adipose tissue, and IL-10 secreted from Treg cells and M2 macrophage inhibits the inflammatory response. Accumulation of lipids and death of adipocytes activate NLRP3 (NOD-like receptor 3) inflammasome and promote the secretion of IL-1 β . In obese state, IL-1 β induces macrophage into adipose tissue and promotes M1 macrophage phenotype. Inflammatory cytokines secreted from M1 macrophages activate T cells, and IFN- γ and TNF secreted from T cells again activate M1 macrophages, causing an inflammatory response continuously. (Kanneganti et al. 2012)

1.1.2. 비만과 자가면역 질환

비만이 자가면역 질환과 깊은 관계가 있으며, 다양한 자가항체가 유도 생성된다고 보고되고 있다 (Figure 2) (Arai, Maehara et al. 2013, Versini, Jeandel et al. 2014). 이들 자가항체들 중에는 췌장 β 세포를 인식하여 공격하는 당뇨 관련 항체, 갑상선염과 관련 있는 항체, 불임과 관련 있는 항체 등이 있다고 알려져 있다 (Arai and Miyazaki 2014, Versini, Jeandel et al. 2014, Frasca, Diaz et al. 2018). 이러한 자가항체의 유도 메카니즘은 최근 연구에서 대식세포 사멸억제제 (apoptosis inhibitor of macrophage, AIM)가 비만 관련 자가면역 질환의 병인으로 알려졌으며, AIM은 $\text{TNF-}\alpha$ 와 같은 여러 세포 사멸 유도 자극에서 대식세포의 생존을 촉진시키는 단백질로 초기 발견되었으며, 비만이 유도된 지방조직에서 염증 반응이 진행되면서 조직 대식세포에 의해서 생성되는 것으로 밝혀졌다 (Miyazaki, Hirokami et al. 1999, Kurokawa, Arai et al. 2010, Arai, Maehara et al. 2013, Arai and Miyazaki 2014). AIM은 자가항원과 결합한 IgM과 면역 복합체를 형성하고 비장의 여포성 B 림프구에 자가항원의 제시를 유도하여 IgG 자가항체의 생성을 유도한다 (Figure 3). 또한, T-helper 17 세포 (Th17)에 의해 분비되는 IL-17이 자가면역 질환의 병인에 관여한다고 알려져 있으며 (Noack and Miossec 2014), 최근에는 비만이 IL-6 의존 과정에서 초기에 Th17 세포의 생성을 유도하므로 자가면역 질환을 악화시키는 것으로 보고되었다 (Winer, Paltser et al. 2009, Noack and Miossec 2014).

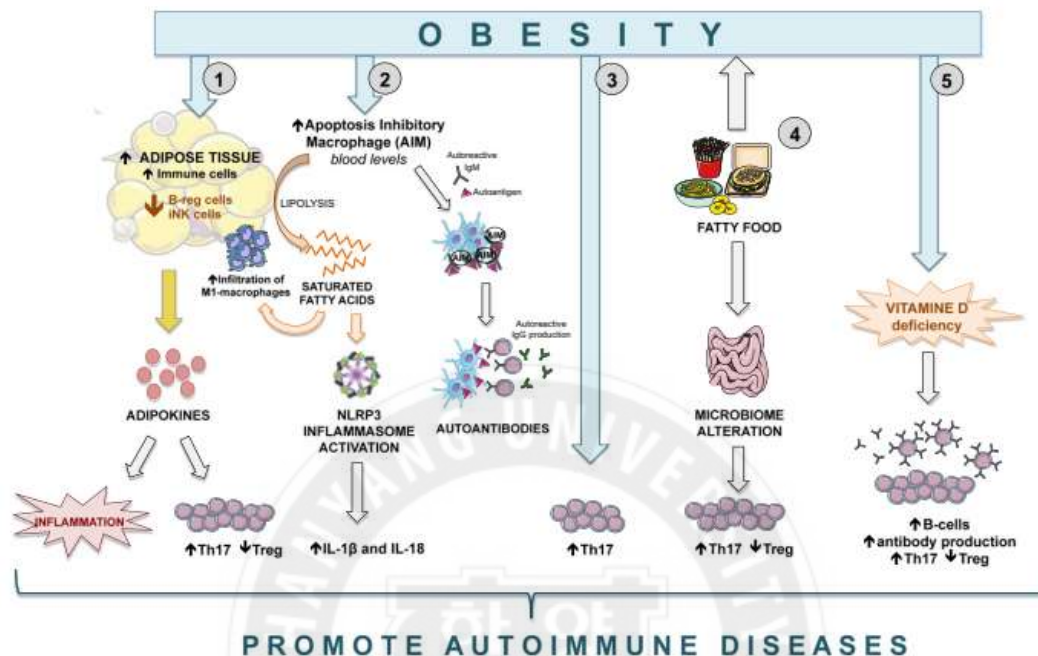


Figure 2. The main mechanisms by which autoimmune diseases are promoted in **obesity**. 1) Adipose tissue increases due to obesity. Immune cells that infiltrate adipose tissue secrete adipokines to induce an inflammatory reaction and increases Th17 cells. 2) AIM in the blood increases due to obesity. AIM induces lipolysis and produces saturated fatty acids. This activates the invasion of M1 macrophages into adipose tissue. Saturated fatty acids induce inflammatory reactions by activating NLRP3–inflammasome. In addition, AIM forms an immune complex with IgM, which reacts with an autoantigen, and presents an autoantigen to follicular B cells to produce an IgG autoantibody. 3) Obesity aggravates autoimmune disease by increasing Th17 cells. 4) Fatty food diet changes the intestinal microbiome and inhibits the regulation of the Th17/Treg balance, which regulates the intestinal immune response. 5) Vitamin D deficiency increase in obese patients. Low level of vitamin D increase the secretion of Th17 cells, B cells, and antibodies and decrease Treg cells (Versini et al., 2014).

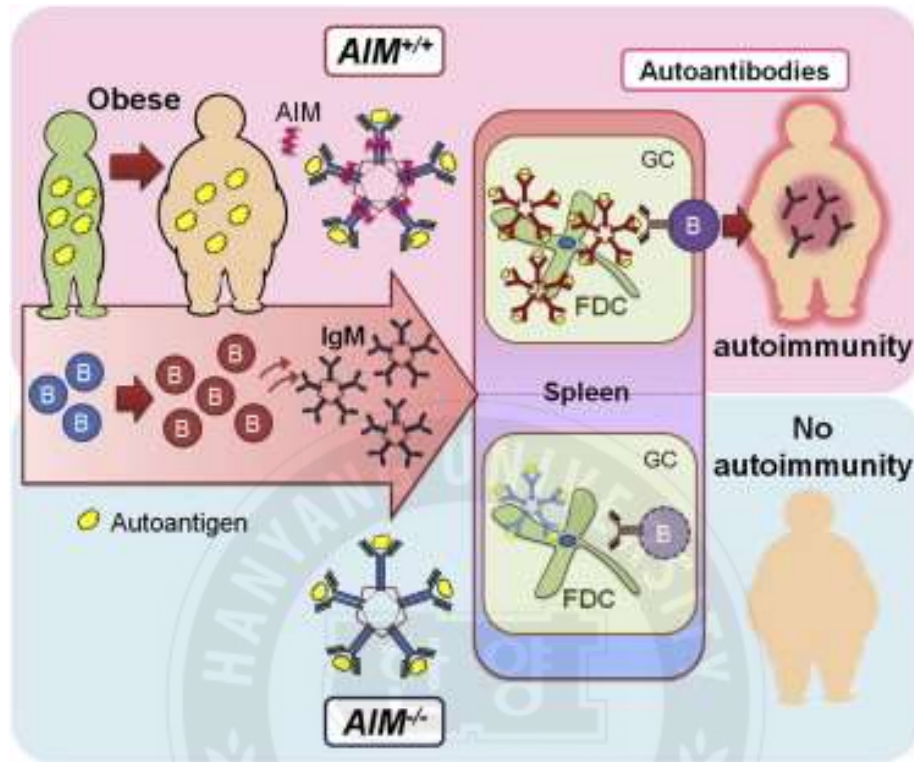


Figure 3. Mechanism of production of autoantibodies by AIM in obesity. Induction of obesity increases the level of AIM in the blood. These AIMS form an immune complex with IgM that binds to autoantigens. In AIM deficiency, the immune complex is endocytosis into splenic FDC through $Fc\alpha/\mu$ receptor, and autoantibodies are not formed. On the other hand, in normal, the immune complex cannot be endocytosis into splenic FDC and binds to the Complement R to present the antigen. Follicular B cells recognize the presented antigen and autoantibodies are produced (Arai et al., 2013).

1.2. 연구 배경

1.2.1. 동맥경화와 아포지단백-B100 자가항체

면역 반응은 선천성과 후천성 면역으로 이루어져 있으며, 외부 항원으로부터 우리 몸을 지켜내는 방어 작용이다. 이때, 면역 체계가 신체의 정상적인 성분 중 하나 이상을 “자기 (self)” 로 인식하지 못하면 자가항체가 생성된다. 자가항체 (natural antibody)는 대부분 IgM 이소타입으로 자가항원과 결합할 수 있다 (Coutinho, Kazatchkine et al. 1995, Boes 2000, Elkon and Casali 2008). 특히 자가항체는 다양한 자가항원을 인식하여 결합하므로 B 세포 레퍼토리의 활성화와 면역 반응의 항상성을 유지하는 역할을 수행한다 (Yurasov and Nussenzweig 2007). 또한, 세포 사멸 후 염증 반응에서 생성된 자연적 자가항체는 세포 파편을 제거하는데 유용하며, 염증성 사이토카인을 인식하는 자가항체는 잘못된 염증 반응을 예방할 수 있다 (Wildbaum, Nahir et al. 2003). 반대로 자가면역 질환에서 대부분의 자가항체는 신체의 건강한 세포, 조직 및 기관을 공격하여 염증과 손상을 일으킨다. 일부 자가항체는 면역 복합체를 형성하여 보체 (complement)나 $Fc\gamma$ 수용체 경로를 통해 염증을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Boes 2000, Elkon and Casali 2008). 비만이 진행되면 염증성 면역 반응이 유발되며 동맥경화와 같은 심혈관 질환이 유발되는 것으로 알려졌는데 (Glass and Witztum 2001, Hansson and Libby 2006, Gistera and Hansson 2017, Wolf and Ley 2019), 특히 지방질 대사 중 생성된 저밀도 지단백질 (LDL)의 대사 이상에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다 (Ylitalo, Jaakkola et al. 1999, Hayek, Kaplan et al. 2007, Thorne, Mhaidat et al. 2007). 음식물로 섭취된 지방은 간으로 운반되며, 간에 흡수된 지방은 초 저밀도 지단백질 (VLDL)의 형태로 배출된다. 혈중에서 저밀도 지단백질로 이행하는 과정에서 그 구성 단백질인 아포지단백-B100의 N-말단의 특정 부위가 활성 산소와 만나 산화 과정이 진행된다 (Olofsson and Boren 2005, Luan and Griffiths 2006). 이때 변형된 산화형 저밀도 지단백질은 대식세포의 스캐빈저 수용체에

의해 탐식이 되지만 대식세포는 지방 성분을 분해하지 못하고 병든 세포 (foam cell)로 변하게 된다 (Thorne, Mhaidat et al. 2007). 이 병든 세포들은 동맥에 쌓이게 되며, 이후 이를 처리하기 위하여 면역 세포들이 모여들게 되고 계속해서 염증 반응을 유발하여 동맥경화로 이행되게 된다 (Ricciarelli, Zingg et al. 2000). 1990년대 초기에 동맥경화 환자에서 아포지단백-B100을 인식하는 자가항체가 존재한다는 것이 밝혀졌고 (Yla-Herttuala, Palinski et al. 1994, Wick and Xu 1999, Grundtman and Wick 2011, Iseme, McEvoy et al. 2017), 이들 동맥경화 환자에서 아포지단백-B100을 인식하는 자가항체들은 다양한 에피토프를 가지는 것으로 알려졌다 (Fredrikson, Hedblad et al. 2003, Fredrikson, Berglund et al. 2006, Fredrikson, Schiopu et al. 2007). 이를 바탕으로 동맥경화를 치료하기 위한 백신 연구가 활발히 진행되었는데 (Kimura, Tse et al. 2015, Kobiyama, Saigusa et al. 2019, Amirfakhryan 2020). 고지혈증 마우스에 자연 또는 변형된 아포지단백-B100의 펩타이드를 주사하였더니 동맥경화가 감소하는 것을 확인하였다 (Fredrikson, Soderberg et al. 2003, Fredrikson, Bjorkbacka et al. 2008, Goncalves, Nitulescu et al. 2009, Klingenberg, Lebens et al. 2010, Chyu, Zhao et al. 2012, Herbin, Ait-Oufella et al. 2012). 또한 변형된 저밀도 지단백질의 모방 펩타이드 접종을 통해 항체를 유도하여 산화형 저밀도 지단백질이 되는 것을 억제하면 대식세포의 병든 세포로의 유도를 줄이는 것으로 보고되었다 (Chyu, Zhao et al. 2005). 최근에는 아포지단백-B100을 인식하는 자가항체가 낮은 수준으로 존재할 때 관상동맥 질환의 위험을 증가시키는 것을 확인하여 이는 생체 내 자연치유 메커니즘으로 심혈관 질환에서 아포지단백-B100 자가항체가 보호 역할을 하는 것으로 제안하고 있다 (Nilsson and Hansson 2008, Sjogren, Fredrikson et al. 2008, Nilsson, Bjorkbacka et al. 2012, McLeod, Silveira et al. 2014, Bjorkbacka, Alm et al. 2016).

1.2.2. 비만과 아포지단백-B100 자가항체

본 연구실에서는 아포지단백-B100 모조 펩타이드 (peptide pB1)를 마우스에 주입하여 생체 내에서 pB1과 함께 아포지단백-B100을 교차 인식하는 항체 생성을 유도하여 고지방식으로 인한 비만을 억제하는 면역 요법 연구를 진행하고 있다. 연구 과정에서 펩타이드 pB1을 주입하지 않은 고지방식을 섭취한 비만 마우스 실험군에서 체중 증가가 느려지고 pB1과 아포지단백-B100을 모두 인식하는 자가항체가 유도 생산되는 것을 확인하였다. (박하늘 2011).

1.3. 연구 목적

이 연구에서는 비만에 의해 유도되는 아포지단백-B100을 인식하는 자가항체의 특성을 분석하고자 하였다. 고지방식으로 비만이 유도된 C57BL/6 마우스에서 아포지단백-B100 자가항체의 생성 패턴과 체중 사이의 상관 관계를 추적하였으며, 또한 한국인에서 BMI와 아포지단백-B100 자가항체의 상관 관계를 확인하였다. 그리고 마우스와 인간의 혈액에 존재하는 아포지단백-B100 자가항체의 특성을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 동물 실험

본 실험에 사용한 동물은 C57BL/6로 7 주령 수컷의 마우스를 중앙 실험동물 (서울, 한국)에서 구입하여 1 주간 순화 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 마우스 사육을 위해 온도 및 조명 조절실 (25°C, 12 시간 조명 및 12 시간 암 주기)에 보관하고 물과 음식에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다. 비만을 유도하지 않는 11 마리의 실험 동물 (정상 실험군, Normal=11)은 일반 사료 (칼로리 기준 10% 지방, #D1250B, “Chow”, 중앙실험동물(주))를 사용하였으며, 비만을 유도하는 16 마리의 실험동물 (비만 실험군, Obese=16)은 생후 11 주령부터 고지방식이 (칼로리 기준 60% 지방, #D12492, “HFD”, Research diet Inc., 뉴저지, 미국)를 먹였다. 체중과 먹이 섭취량은 주당 3 회, 오후 3~5 시 사이에 측정하였으며, 체중 데이터는 각 실험 그룹별로 평균을 계산하여 주령별 체중으로 표시하였다. 9 주령부터 33 주령까지 3 주마다 헤파린 처리된 모세관 (Kimble Chase Life Science and Research Products, 미국)를 이용하여 안와 채혈로 진행하였다. 혈청 준비를 위해 혈액을 튜브에 채취하여 실온에서 30 분 동안 방치한 다음 원심 분리 (11,000 rpm, 10 분, 4°C) 하여 혈청만 분리하여 실험에 사용하였다. 모든 동물 절차는 한양 대학교 실험 동물 과학 센터와 기관 심의위원회 (HY-IACUC-19-0048)의 승인을 받았다.

2.2. 임상 실험

본 실험에 사용된 사람 혈청 샘플은 2015~2016 년도에 준비되었으며, 사용할 때까지 -80°C에 보관되었다. 고려대학교 안산 병원 건강 증진 센터 정기 건강 검진에서 30~70 세 사이의 자원 봉사자 148 명 (남자 80 명, 여자 68 명)을 모집했다. 모든 참가자는 면담자가 관리하는 설문지에 응답하고 포괄적인 신체 검사를 받았다. 생활 습관 특성에는 흡연 상

태와 알코올 소비가 없음, 이전 및 현재로 분류되었다. 당뇨병, 고혈압 또는 심혈관 질환을 포함한 만성 질환의 병력이 있는 피험자는 제외되었다. 밤새 단식 후 혈청 분리기 튜브 (BD Vacutainer, 뉴저지, 미국)를 사용하여 생화학 분석을 위해 혈액을 채취했다. 참가자는 다른 연구를 위해 저장된 샘플 사용에 대한 사전 동의 양식에 서명했다. 본 연구는 세계 의사 협회 헬싱키 선언 원칙에 따라 수행되었으며, 고려 대학교 안산 병원 기관 심의위원회 (IRB, AS17011)의 승인을 받았다.

2.3. 펩타이드 합성

실험을 위해 사용된 펩타이드 p45 (IEIGLEGKGFEP TLEALFGK), p210 (KTTKQSF DLSVKAQYKKNKH), p240 (FPDLGQEVALNANTK NQKIR), 펩타이드 pB1 (RNVPPIFNDVYWIAF)은 펩트론 (대전, 한국)에서 화학 합성하였다 (Fredrikson, Hedblad et al. 2003, Kim, Lee et al. 2016).

2.4. 재조합 단백질 (B4T) 정제

재조합 단백질 B4T는 pQE30 플라스미드에 삽입된 B4T 유전자를 M15 대장균에 삽입하여 배양 후 정제하였다 (Kim, Lee et al. 2016). M15 대장균은 암피실린 (Ampicillin, 50 ug/ml, 웰진, 경산, 한국), 카나마이신 (Kanamycin, 50 ug/ml, 웰진, 경산, 한국)이 첨가된 배지에서 배양한 후 세포 현탁액이 600 nm에서 흡광도가 0.4~0.6이 될 때 1 mM의 IPTG (씨그마알드리치코리아, 서울, 한국)를 첨가하여 4 시간을 더 배양하였다. 배양이 끝난 후 8,000 rpm, 4℃, 20 분간 원심분리하여 세포 펠렛을 모은 후 sonication buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.9)를 첨가하여 10 분간 초음파로 세포를 분쇄하였다. 초음파 처리 후 다시 8,000 rpm, 4℃, 20 분간 원심분리하여 세포 구성분의 펠렛을 모았다. 모은 펠렛에 binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 8 M urea, pH 7.9)를 첨가하여 15 분간

초음파 처리 후 10,000 rpm, 4℃, 30 분간 원심분리하여 상층액만 모았다. 단백질 정제는 Ni-NTA 수지 (씨그마알드리치코리아, 서울, 한국)를 이용하여 친화성 크로마토그래피를 수행하였다. Ni-NTA 수지를 컬럼에 넣은 후 증류수를 흘려주어 에탄올을 제거한 후 binding buffer를 흘려주어 흡광도의 기준을 잡아주고 샘플을 컬럼에 3 번 반복 통과시킨 후 washing buffer (50 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 8 M urea pH 7.9)를 흘려주어 수지와 결합하지 않은 단백질을 제거하고 elution buffer(400 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 8 M urea, pH 7.9)를 흘려주어 B4T를 얻었다. 정제된 B4T는 6 M urea부터 차례로 농도를 낮추어 PBS까지 투석을 진행하였다. 이 후 단백질의 농도는 BCA법 (씨모피셔 사이언티픽 코리아, 서울, 한국)을 이용하여 측정하였다.

2.5. 저밀도 지단백질 분리 및 정제

실험에 사용할 저밀도 지단백질 (LDL)은 인간 혈청을 이용하여 밀도차를 이용한 초원심분리기로 분리하였다. 인간 혈청 양에 따라 EDTA (final conc.=0.04%), NaN_3 (final conc.=0.05%), PMSF (final conc.=0.015%)를 첨가하고 최종 양을 측정하였다. 먼저 초 저밀도 지단백질 (VLD)을 분리하기 위해 NaBr 용액을 첨가하여 $d=1.019$ g/ml 로 맞추고 40,000 rpm, 20 시간, 4℃로 초원심분리기를 수행한 후 상층액에 뜬 초 저밀도 지단백질을 분리하였다. 이 후 남은 용액에 NaBr 용액을 첨가하여 $d=1.063$ g/ml 로 맞추고 40,000 rpm, 20 시간, 4℃로 초원심분리기를 수행한 후 상층액에 뜬 저밀도 지단백질을 분리하였다. 분리한 저밀도 지단백질을 PBS 로 투석한 후 BCA 법을 이용하여 정량하여 실험에 사용하였다.

2.6. 혈액 내 성분 분석

혈중 내 트라이글리세라이드 (TG), 저밀도 지단백질 (LDL), 초저밀도 지단백질 (VLDL), 콜레스테롤 (CHOL), 유리 지방산 (free fatty acid, FFA, NEFA), 아스파르테이트아미노전달효소 (AST), 알라닌아미노전이효소 (ALT), 공복 인슐린 (fasting insulin) 함량 분석을 가천대 길병원의 이길여 암당뇨연구원에서 분석하였다.

2.7. 혈액 내 항체 분석

모든 혈청 샘플은 보체 (complement)를 파괴하기 위해 56℃에서 30분 동안 열을 가하여 비활성화하였다. indirect ELISA는 96-웰 면역플레이트 (#32296, (주)에스피엘, 포천, 한국)에서 표준 실험법으로 수행되었다. 아포지단백-B100 (씨그마알드리치코리아, 서울, 한국)/저밀도 지단백질 (1차 분석) 또는 pB4 (2차 분석)를 coating buffer에 녹여 각 웰 당 100 ng을 4℃에서 밤새 반응시켜서 코팅한 다음 PBS-T (0.05% Tween-20이 포함된 PBS)로 세척하였다. 그리고 각 웰 당 0.05% casein solution 300 ul를 첨가하여 37℃에서 2 시간 동안 반응하였다. 그런 다음 각 웰에 희석된 마우스 또는 인간 혈청을 100 ul 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 반응시키고 세척하였다. 그 후 각 웰에 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (0.1 μ g/ml, A0168, 씨그마알드리치코리아, 서울, 한국) 또는 HRP-conjugated goat anti-human IgG, IgM, IgA (H + L) 2차 항체 (#31418, 씨모피서 사이언티픽 코리아, 서울, 한국)를 1:10,000으로 희석하여 100 ul를 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 항체 역가를 계산하기 위하여 OPD 용액을 사용하여 37℃에서 10 분간 발색 반응을 시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 과정 사이에 PBS-T로 세척을 3 번씩 반복하여 비특이적 결합을 제거하였다. 특히 인간 혈청의 높은 거짓 신호로 거짓 양성 신호와 참 양성 신호를 구별하기 위하여 2 단계의 ELISA 과정을 거쳤다. 1차 분석 단계에서는 인간 아포지단백-B100을 분석물로 사용하여 100 배 희석된 혈청을 사용

하였고, 2차 분석 단계에서는 혈청을 100 배, 200 배, 400 배, 800 배 연속 희석하고 분석물로 pB4를 사용하였다.

2.8. 인간 혈청에서 자가항체 음성과 양성 판별

인간 혈청의 양성 및 음성 신호 (거짓 양성 포함)는 항원으로 아포지 단백-B100 대신 pB4를 사용하는 2차 분석 ELISA 단계에 의해 구별하였다 (Figure 4).

1) 2 차 분석 ELISA 는 연속 희석된 (x100, x200, x400 및 x800) 혈청을 사용하여 수행하였다. 각 샘플에서 얻은 흡광도 값 (A)에 대한 희석 배수(D)의 그래프를 통해 다음과 같은 최적의 실험식을 얻었다. 식 (1):

$$A = S \times \ln (1/D) + b \quad ; \quad \text{식 (1)}$$

(A: 흡광도, S: 기울기, D: 희석 배수, b: 절편 상수)

2) 신호가 양수로 간주되도록 다음 기준을 설정하였다. (i) $S < 0$; (ii) 희석되지 않은 샘플의 최소 흡광도는 0.5 보다 커야 한다. 0.5 흡광도를 갖는 모든 샘플의 개별 $\ln(D)$ 및 $(-S)$ 값 (편의상 기울기가 모두 < 0 이기 때문에)에 대한 최적의 공식은 다음과 같이 얻어졌다 (Figure 4B).

$$\ln(D) = 4.93 \ln(X) + 12.84 b \quad ; \quad \text{식 (2)}$$

(X: -기울기, D: 희석 배수)

3) $D < 1$ 은 무의미한 혈청 농축을 의미한다. 희석 배수 = 1 (즉, $y = 0$)을 설정하면 $X = 0.074$ (기울기는 -0.074)가 된다. 따라서 기울기 (X 값) > 0.074 를 나타내는 샘플만 자가 항체 양성으로 간주하였다.

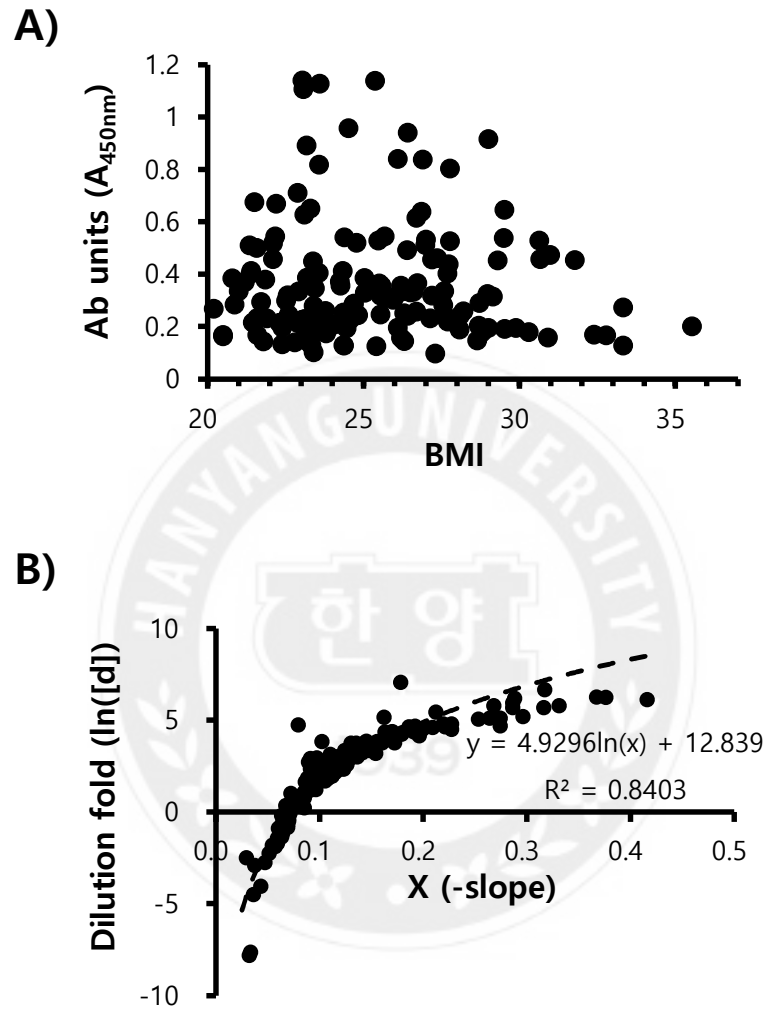


Figure 4. Establishing criteria for true positive of ApoB100 autoantibody. (A) Scatterplot showing the read-outs of the human serum samples (n=148) by pB1 ELISA screening. Ab (antibody) units indicate the absorbances of 100-fold diluted sera at 450nm. (B) Using equation, a standard curve was plotted based on the relationship between X and $\ln[D]$ at an absorbance of '0.5' of each sample.

2.9. 아포지단백-B100 자가항체의 정제

아포지단백-B100을 인식하는 자가항체를 정제하기 위하여 고지방식이 먹인 16 마리의 마우스 (15~33 주령) 또는 148 명의 인간으로부터 혈청을 모두 모았다. 각각의 인간과 마우스의 자가항체는 인간 아포지단백-B100을 결합시킨 Affigel-15 수지 (#1536052, Bio-Rad, 캘리포니아, 미국)를 이용한 친화성 크로마토그래피 방법으로 정제하였다. 3 mg의 Affigel-15 수지를 0.1M HEPES buffer로 세척한 후 인간 아포지단백-B100 (1 mg/ml)을 3 ml을 4℃에서 10 rpm으로 4 시간 동안 반응시켜 결합시켰다. 0.1 M ethanolamine-HCl (pH 8.0) 0.3 ml을 첨가하여 1 시간 동안 반응시켜 결합 반응을 중지시킨 후 PBS로 세척하였다. 아포지단백-B100이 결합된 Affigel-15 수지를 오픈 컬럼(\varnothing 1.0 cm x 3 cm)에 채운 뒤 마우스 또는 인간의 혈청을 3 회 반복하여 수지 상단에 중력 흐름으로 흘려주었다. 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 비결합 또는 비특이적 혈청 단백질을 세척하고, 아포지단백-B100 특이적 항체를 0.1M Glycine-HCl buffer (pH 2.5)로 용출하였다. 용출액을 2M Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 중화한 후 VIVASPIN 500 (#VS0101, 싸토리우스 코리아㈜, 성남, 한국)을 이용하여 농축하였다. 마지막으로 농축시킨 용출액을 PBS 1 L로 4℃에서 분자량 3,000 Da 크기의 막으로 밤새 투석한 후 VIVASPIN을 이용하여 3회 반복 농축하여 1 mg/ml 농도 (총 1 ml)의 아포지단백-B100 특이적 항체를 얻었다. 일반식이를 먹인 마우스 (11 마리, 15~33 주령)로부터의 항체는 아포지단백-B100 친화성 크로마토그래피보다는 protein A (20333, 써모피셔 사이언티픽 코리아, 서울, 한국)를 사용하여 정제하였다.

2.10. 이소타입 분석

분리 정제한 아포지단백-B100 자가항체의 이소타입을 확인하기 위하여 Iso-Gold rapid mouse 또는 human antibody isotyping kit (마우스 #MISOT-010, 인간 #HISOT-010, BioAssay Works LLC, 메릴랜드,

미국)를 사용하여 분석하였다.

2.11. 도트 블롯 (Dot blot)

분리 정제한 아포지단백-B100 자가항체의 에피토프 분석을 위하여 도트 블롯 실험을 수행하였다. 합성 펩타이드와 단백질을 10% DMSO에 1 mg/ml로 용해하고 PBS에 희석하여 사용하였다. 0.2 μ m PVDF 막 (#1620177, Bio-Rad, 캘리포니아, 미국)을 메탄올로 미리 적신 다음 증류수로 세척하고 96-웰 Bio-Dot microfiltration apparatus (#1706545, Bio-Rad, 캘리포니아, 미국)에 조립하였다. 농도별 펩타이드 또는 단백질 용액을 각 웰에 첨가하고 30 분 동안 흡수 패드에 여과하도록 두었다. 면역 블롯팅을 위해, 5% (w/v) 무 지방 건조 탈지 우유 용액 (non-fat dried skimmed milk-TBS-T) 용액 300 μ l를 첨가하여 실온에서 3 시간 동안 반응시켰다. 이 후 정제한 각각의 항체를 0.2 μ g 단백질/웰이 되도록 TBS-T로 희석하여 100 μ l 첨가하고 4°C에서 밤새 반응시켰다. TBS-T로 3 회 세척하고 HRP-conjugated goat IgG (Fc) (A0168, 씨그마알드리치코리아) 또는 HRP-conjugated goat anti-human IgG/IgM/IgA (H+L) (#31418, 씨모피셔 사이언티픽 코리아)을 well당 100 μ l 첨가하고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 세번 세척하였다. 마지막으로 ECL prime Reagent (RPN2232, 씨그마알드리치코리아)로 반응시킨 후 암실에서 필름을 전개하였다.

2.12. 통계 분석

마우스 실험에서는 항체 역가 변화에 따라 마우스 주령을 4 단계로 나누었다. 단계는 다음과 같이 표시되었다: 단계 I, 과체중 (9~12 주령); 단계 II, 경도 비만 (13~18 주령); 단계 III, 중등도 비만 (19~25 주령); 단계 IV, 고도 비만 (26~33 주령). 항체 역가 값이 정규성 (Shapiro-Wilk 테스트, 단계 I 대 단계 II의 경우 $p=0.012$, 단계 I 대 단계 III의 경우 $p=0.0062$, 단계 I 대 단계 IV의 경우 $p=0.0011$) 및 구형도

($p < 0.001$)를 위반하므로 Wilcoxon signed-rank test를 사용한 Friedman test를 이용하여 사후 분석하였다. 인간 데이터의 경우 항체 역가가 정규 분포를 충족하지 못했으므로 (Shapiro-Wilk 테스트, $p < 0.001$) 항체 역가를 자연 로그로 변환한 후 항체 역가에 대한 BMI와의 상관성을 SAS 9.4 프로그램 (SAS Institute Inc., 노스캐롤라이나, 미국)의 PROC GLM (일반 선형 모델)를 이용하여 이차 추세 (Quadratic Trend)를 분석하였다. 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.



3. 결과 및 토의

3.1. 비만 마우스에서 아포지단백-B100에 대한 자가항체 생성 패턴 분석

선행 연구에 따르면, 고지방식을 섭취한 마우스에서 pB4를 인식하는 자가항체가 생성된다. 즉 고지방식을 시작하여 비만이 유도되면 자연적으로 pB4를 인식하는 자가항체가 생성되며, 동시에 아포지단백-B100을 인식하였다. 본 연구에서는 비만 유도 후 주령에 따른 혈액 내 자가항체의 생성 패턴을 분석 및 확인하고자 하였다.

3.1.1. 비만 마우스 혈액 내에서 pB4 / 아포지단백-B100 / 저밀도 지단백질 인식 자가항체 유무 확인

비만 마우스 혈액 내 각각의 pB4 / 아포지단백-B100 / 저밀도 지단백질을 인식하는 자가항체의 유무를 확인하기 위해 이전 실험의 마우스 혈액을 이용하여 각각의 pB4 / 아포지단백-B100 / 저밀도 지단백질을 항원으로 코팅된 Indirect ELISA를 수행하였다. 실험 결과 각각의 항원에 따라 정도의 차이는 있지만 체중이 30 g 이상의 비만 마우스에서 혈액 내 각각의 항원을 인식하는 자가항체가 존재하는 것을 확인하였다 (Figure 5). 특히, pB4를 인식하는 자가항체의 증가 양상이 뚜렷하게 나타남을 확인하였다 (Figure 5A). 이후 자가항체 역가 분석을 위해 pB4를 분석 단백질로 결정한 후 다음 실험들을 진행하였다.

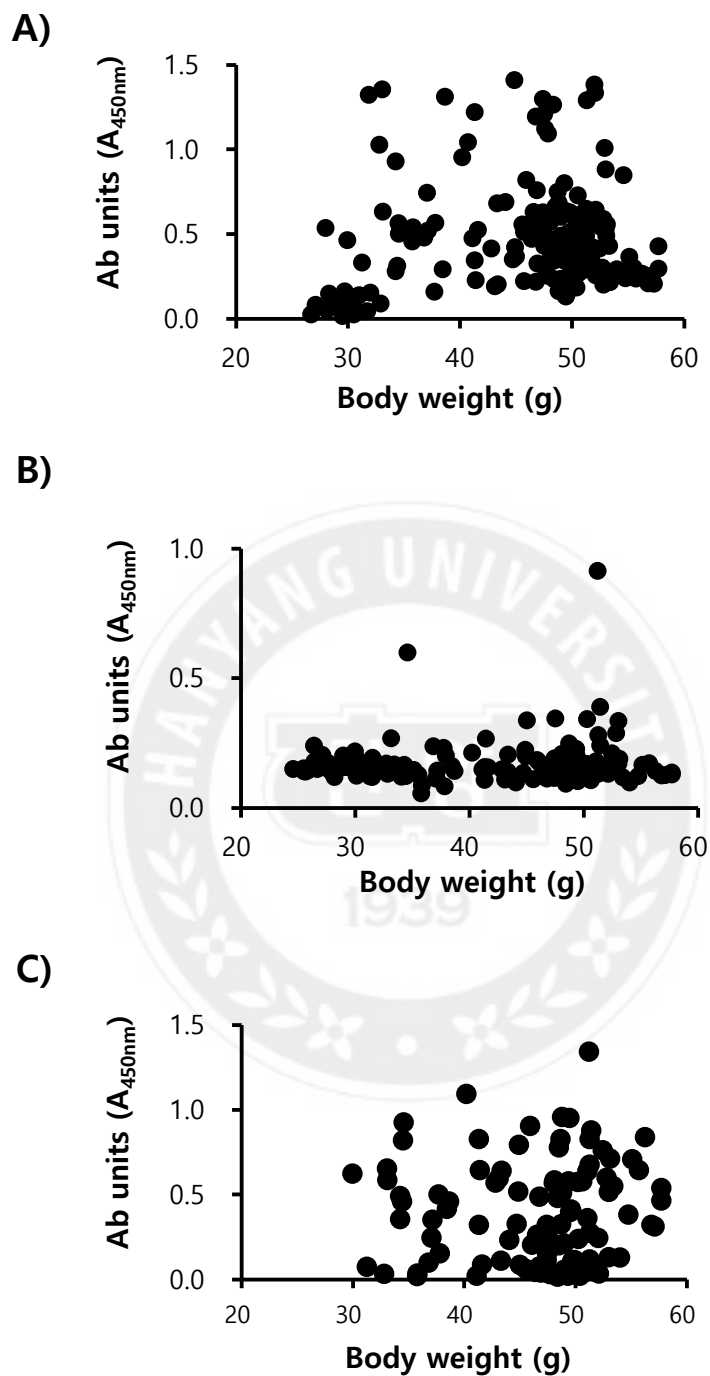


Figure 5. Scatterplots the relations between body weight and Ab (antibody) units in mouse. A) pB4, B) ApoB100, C) LDL. Ab (antibody) units indicate the absorbances of 100-fold diluted sera at 450nm, n=27.

3.1.2. 비만 유도에 따른 자가항체 생성 패턴 분석

마우스가 비만이 유도됨에 따른 주령별 체중 변화에 따른 아포지단백-B100 자가항체의 생성 변화를 분석하기 위해 7 주령부터 실험을 시작하여 11 주령부터 고지방식 군에 60% 고지방식이 (HFD) 사료로 비만 유도를 시작하였고 매주 2회 체중을 측정하고 주령별 평균 무게를 계산하였다. 9 주령부터 33 주령까지 3 주 간격으로 채혈을 진행하여 모조 펩타이드 pB1를 인식하는 자가항체의 흡광도를 측정하였다. (Figure 6). 실험 그룹은 일반식이 군 (정상군) 11 마리와 고지방식이 군 (비만군) 16 마리로 나누어서 수행하였다 (Table 1).

먼저 정상군과 비만군 각각의 개체별로 주령, 체중, 항체 흡광도를 이용하여 3 차원 그래프를 만들어 분석하였다 (Figure 7). 그 결과, 정상군에서는 모든 개체에서 체중은 30 g 미만으로 유지되며 주령이 변함에도 아포지단백-B100 자가항체가 생성되지 않음을 확인하였다 (Figure 7A). 이와 다르게 비만군에서는 개체별 차이는 있지만, 초기에는 항체가 형성되지 않고 비만이 진행됨에 따라 모든 개체에서 자가항체가 형성되어 증가함을 확인하였으며, 체중이 50 g 이상될 때 즉 고도 비만이 되면 자가항체가 점차 감소함을 확인하였다 (Figure 7B).

다음은 각 그룹별 체중 및 항체 흡광도 값의 평균을 구하여 분석하였다 (Figure 8). 정상군은 일반 마우스의 성장 패턴과 동일하게 최대 체중이 약 30 g으로 유지되며 (Figure 8A, solid square), 혈액 내 pB1를 인식하는 아포지단백-B100 자가항체가 검출되지 않은 것을 확인하였다 (Figure 8A, empty square). 이와는 대조적으로 비만군은 11 주령 고지방식이 이후 (Figure 8A, black arrow) 21 주령까지 급격하게 체중 증가가 진행되었으며, 24~27 주령 사이에 최종 체중이 50 g에 도달한 후 유지되는 것을 확인하였다 (Figure 8A, solid circle). 항체 흡광도 값은 11 주령 고지방식이 이후 15 주령까지 가파르게 증가한 후 점차적으로 감소하였지만, 실험이 끝날 때까지 유지되는 것을 확인하였다 (Figure 8A, empty circle). 아포지단백-B100 자가항체의 생성 패턴

분석을 위해 Friedman test 알고리즘을 사용하여 주령을 4 단계로 나누어 단계별 통계 분석을 진행하였다 (Figure 8B). I 단계 (9~12 주령, 과체중)에서 항체 유도가 감지되었으며, II 단계 (13~18 주령, 경도 비만)에서 항체가 급격하게 증가하였다. III 단계 (19~25 주령, 중등도 비만)에서 항체는 더 이상 증가하지 않았지만 감소하는 것처럼 보였으며, IV 단계 (26 주령 이후, 고도 비만)에서 항체 수치가 II 단계 및 III 단계에 비해 현저히 감소한 것을 확인하였다. 이는 비만이 유도되면서 아포지단백-B100 자가항체가 생성되어 농도가 증가한 후 감소하는 2 상 패턴을 보여준다. 또한 아포지단백-B100 자가항체가 최고 농도를 도달할 때 체중도 최고로 도달한 후 자가항체 농도가 소모되어 감소하면서 체중이 유지되는 것을 확인하였다.

이는 고지방식이에 의해 체내 축적된 많은 지방 입자를 제거하기 위해 아포지단백-B100 자가항체가 자연적으로 생성, 증가되기 시작하여 체중 증가를 막아 체중을 유지시키지만, 지속된 고지방식의 섭취는 아포지단백-B100 자가항체의 빠른 소모로 효과적인 체중 감소로는 이뤄지지 않는 것을 확인하였다.

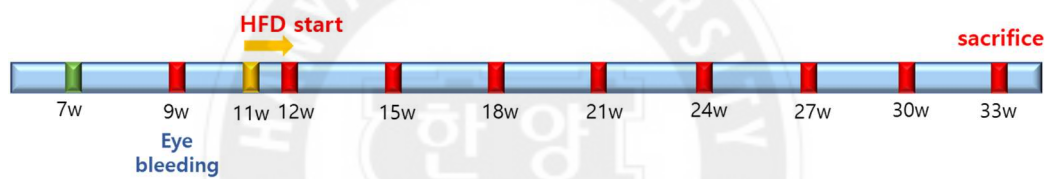


Figure 6. Animal experimental plan.

Table 1. Animal experimental groups

Group	Diet
Normal (n=11)	Normal diet
Obese (n=16)	60% High fat diet

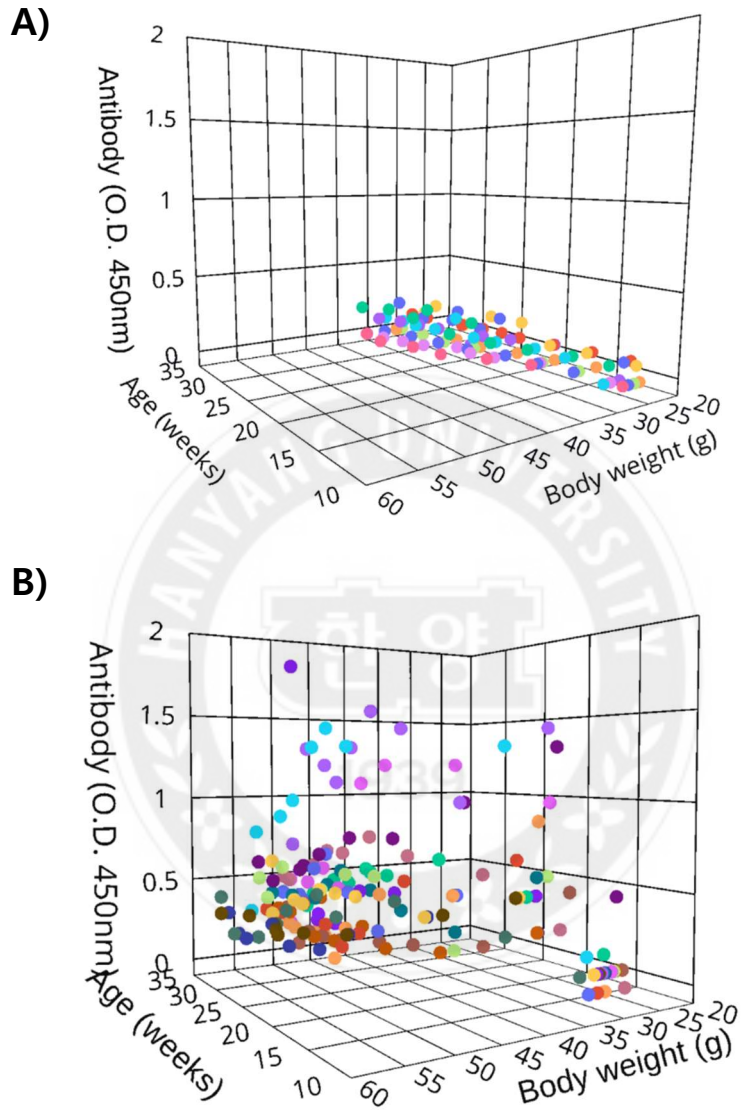


Figure 7. 3D graph of the relations between antibody against pB4, body weight and age (weeks). **A)** Chow-fed group (n=11), **B)** 60% HFD-fed group (n=16)

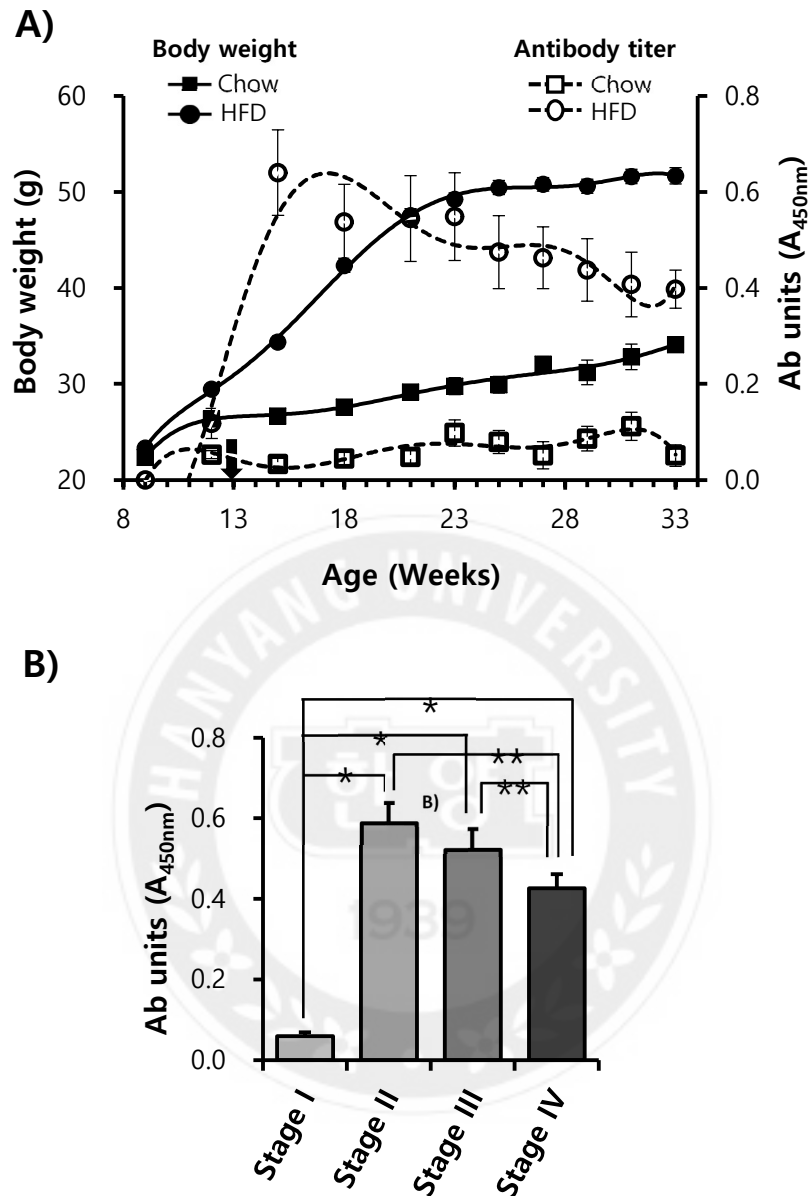


Figure 8. Analysis of relations between Ab (antibody) units and body weight in mice. **A)** Body weight and Ab (antibody) unit curves. Squares: Chow-fed group (n=11), circles: HFD-fed group (n=16). Male C57BL/6 mice were maintained on Chow or switched (black arrow) at 11 weeks of age to a 60% HFD. Solid symbols: body weight, empty symbols: Ab (antibody) units (absorbance of 100-fold diluted sera at 450 nm). **B)** Cluster analysis of data A. Stage I: 9~12 weeks of age (overweight), stage II: 13~18 weeks of age (mildly obese), stage III: 19~25 weeks of age (moderately obese), stage IV: 26~33 weeks of age (severely obese). Error bars in A and B indicate means \pm s.e.m. *p<0.0001, **p<0.01.

3.2. 인간에서 아포지단백-B100에 대한 자가항체 생성 패턴 분석

인간에서도 비만 마우스와 동일하게 아포지단백-B100 자가항체가 존재하는지 확인하기 위해 고대 안산병원에서 총 148 명의 혈액을 받았으며, 당뇨병, 동맥경화와 같은 만성 질환이 없는 개체로 실험을 진행하였다 (Table 2). 마우스 실험에서는 인위적으로 고지방식을 하여 비만 진행 정도를 추적하는 실험이 가능하지만, 인간의 경우에는 마우스와 동일한 실험이 불가능하므로 ~20 (정상)에서 ~36 (고도 비만) 범위의 BMI 값에 대한 아포지단백-B100 자가항체와의 상관성에 대한 단면적인 연구를 수행하였다.

3.2.1. 인간 혈액 내에서 pB4 / 아포지단백-B100 / 저밀도 지단백질 인식 자가항체 유무 확인

인간 혈액 내 아포지단백-B100 자가항체의 유무를 확인하기 위해 각각의 pB4 / 아포지단백-B100 / 저밀도 지단백질이 코팅된 Indirect ELISA를 수행하였다. 실험 결과 정도의 차이는 있지만 pB4 / 아포지단백-B100 / 저밀도 지단백질 각각의 항원을 인식하는 자가항체가 인간 혈액 내에도 존재함을 확인하였다 (Figure 9). 하지만 BMI에 따른 산점도에서는 패턴을 쉽게 확인할 수 없었다. 마우스와 동일하게, pB4를 인식하는 자가항체의 증가 양상이 뚜렷하게 나타남을 확인하였으며 (Figure 9A), 이후 자가항체의 역가 분석을 위해 pB4를 분석 단백질로 결정한 후 다음 실험들을 진행하였다.

Table 2. Baseline characteristics of Human subjects

Characteristics	Total (n=148)	Men (n=80)	Women (n=68)
Age (years)	53.6 ± 0.8	51.5 ± 1.1	56.1 ± 1.0
Hight (cm)	164.0 ± 0.8	170.5 ± 0.7	156.2 ± 0.6
Weight (kg)	68.5 ± 0.9	74.2 ± 1.1	61.6 ± 1.1
BMI (kg/m ²)	25.4 ± 0.3	25.5 ± 0.3	25.2 ± 0.4
Diabetes (%)	1 (0.7)	1 (1.2)	0 (0.0)
Hypertension (%)	32 (21.5)	19 (23.5)	13 (19.1)
Dyslipidemia (%)	15 (10.1)	9 (11.1)	6 (8.8)
Smoking (%)	27 (18.1)	27 (33.3)	0 (0.0)
Alcohol (%)	69 (46.3)	56 (69.1)	13 (19.1)
Exercise (%)	71 (47.7)	34 (42.0)	37 (54.4)
WC (cm)	85.7 ± 0.6	87.3 ± 0.7	83.7 ± 0.9
SBP (mmHg)	119.9 ± 1.1	120.5 ± 1.3	119.2 ± 1.7
FPS (mg/dL)	95.6 ± 1.0	95.0 ± 1.3	96.4 ± 1.5
HbA1c (%)	5.5 ± 0.0	5.4 ± 0.0	5.5 ± 0.1
Total cholesterol (mg/dL)	200.2 ± 2.8	194.8 ± 3.8	206.7 ± 4.2
Triglyceride (mg/dL)	159.7 ± 8.5	186.0 ± 13.1	128.5 ± 8.9
LDL-C (mg/dL)	121.5 ± 2.7	118.2 ± 3.6	126.7 ± 4.3
HDL-C (mg/dL)	47.1 ± 1.0	44.4 ± 1.3	51.2 ± 1.4
hsCRP (mg/L)	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.6	0.5 ± 0.1

Data are presented as the mean ± SD

Abbreviations: BMI, body mass index; WC, waist circumference; SBP, systolic blood pressure; FPS, fasting plasma glucose; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein

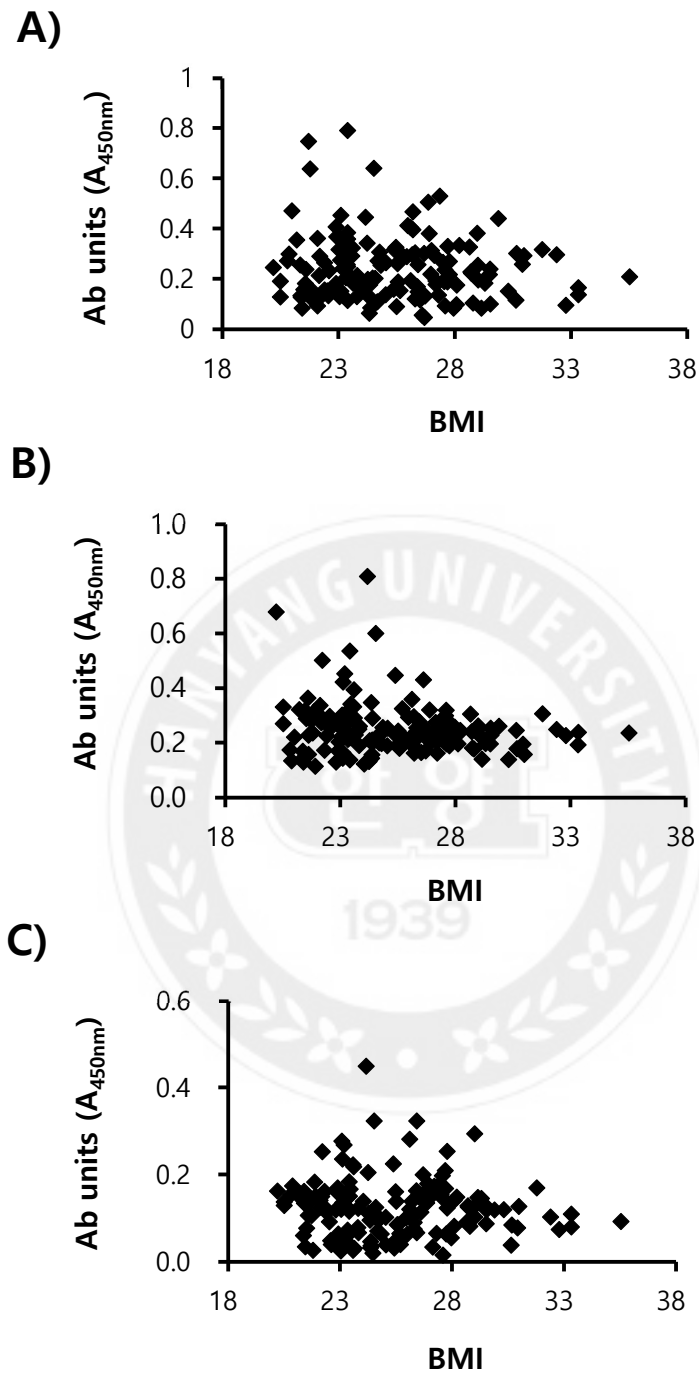


Figure 9. Scatterplots the relations between body weight and Ab (antibody) units in human. A) pB4, B) ApoB100, C) LDL. Ab (antibody) units indicate the absorbances of 100-fold diluted sera at 450 nm, n=148.

3.2.2. BMI 에 따른 자가항체 생성 패턴 분석

인간에서 혈액 내 아포지단백-B100을 인식하는 자가항체와 BMI와의 상관성을 분석하기 위해서 각각 개체의 혈액을 100, 200, 300, 400 배 희석하여 Indirect ELISA를 수행하였다. 100, 200, 300, 400 배 희석이 증가함에 따라 ELISA 흡광도 값이 선형적으로 감소하는 것을 이용하여 거짓 양성 샘플을 제거하였다. 2차 분석 Indirect ELISA 실험을 통해 각 샘플의 흡광도가 0.5 값을 가지는 개별 희석 배수 값 ($\ln[D]$)과 기울기 값 ($-S$)을 구하였으며, 이를 통해 최적의 공식인 $\ln(D)=4.93\ln(X)+12.84$ 를 구하였다 (Figure 4B). 여기서 희석 배수 값이 1로 설정하면 $X=0.074$ 값이 나오는데, 이 기울기 값을 샘플 자가항체의 참 양성 판정의 기준으로 간주하였다 (실험 방법 2.8. 참고).

이 실험의 결과로 107 개의 샘플이 참 양성으로 확인되었으며, 참 양성으로 판정된 107 개 샘플을 BMI 별 (한국인 기준, $BMI<23$: 정상, $23\leq BMI<25$: 과체중, $25\leq BMI<27$: 비만, $27\leq BMI$: 고도 비만)로 나누어 분석하였다 (Figure 10). 그 결과, BMI가 증가함에 따라 자가항체가 증가한 후 감소하는 2상 패턴임을 확인하였으나 유의미한 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 10A). 이후 자가항체의 생성 패턴 분석을 위해 데이터를 성별과 연령으로 조정한 후, 2차 추세 분석 (quadratic trend)을 수행하였다. 그 결과, 항체 역가가 BMI 최대 27 kg/m^2 까지 상승하지만 그 후 급격히 하강하는 역 U 자 모양 ($P<0.05$)의 2 상 패턴을 확인하였다 (Figure 10B). 또한 자가항체 양성/음성 집단을 나누어 분석한 결과, 비만이 진행됨에 따라 자가항체에 양성을 띠는 개체가 증가하였다가 고도 비만으로 진행되면 감소하는 2상 패턴을 보이는 것을 확인하였다 (Figure 11).

즉 마우스와 동일하게 인간에서도 자연적으로 체내에 아포지단백-B100을 인식하는 자가항체가 유도 생성되어 존재하며, 비만이 진행됨에 따라 자가항체가 증가한 후 감소하는 것을 확인하였다.

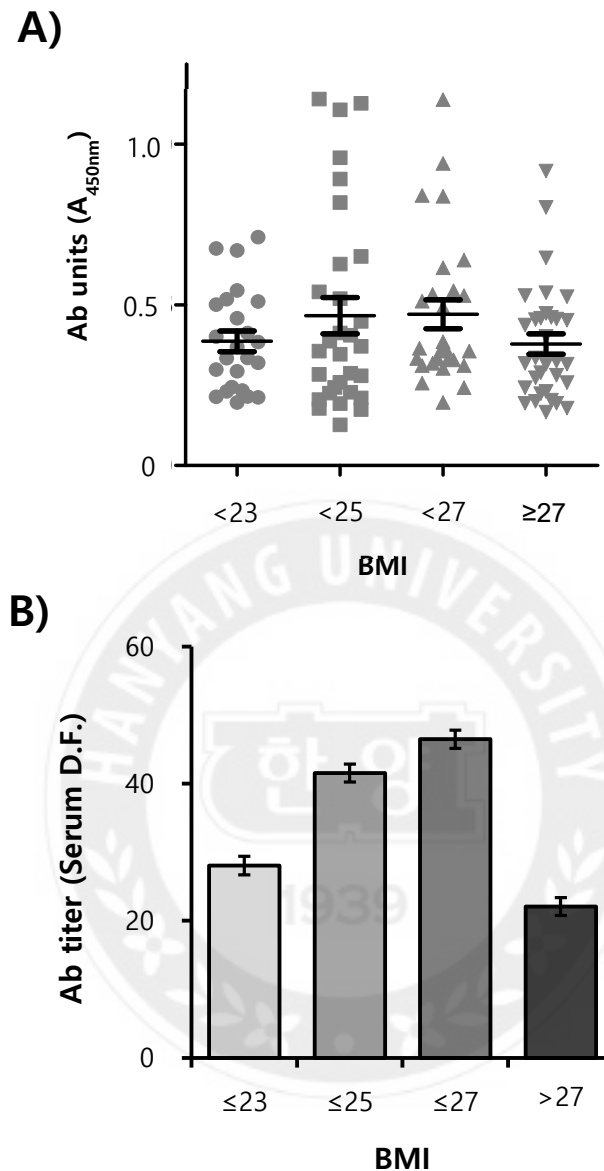


Figure 10. Analysis of relations between Ab (antibody) units and BMI in human. **A)** Scatterplot of 107 positive sample according to the BMI group. BMI<23: lean, $23 \leq \text{BMI} < 25$: overweight, $25 \leq \text{BMI} < 27$: obese, $27 \leq \text{BMI}$: severely obese. n=23, 26, 27 and 31, respectively. Ab (antibody) units indicate the absorbance of 100-fold diluted serum at 450 nm. Error bars indicate means \pm s.e.m. **B)** Quadratic trend Analysis of data A. The association between autoantibody titers and the BMI was adjusted for age and sex. $P < 0.05$. Error bars indicate geometric means \pm s.e.m.

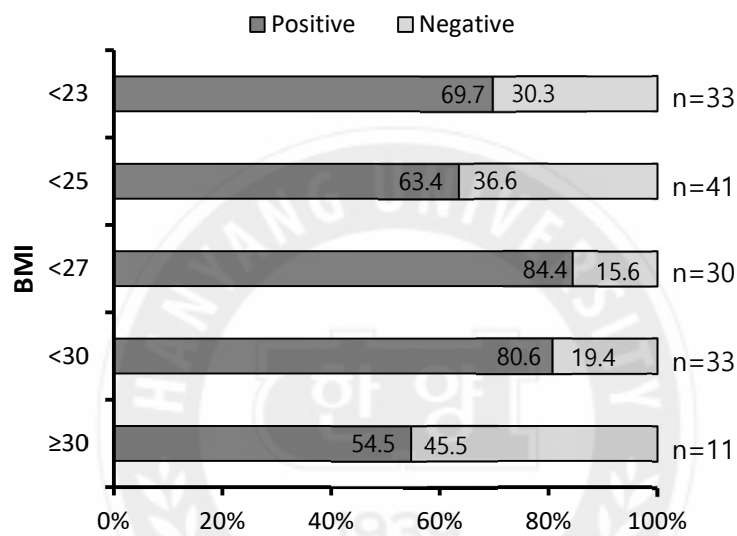


Figure 11. Pattern of positive population of autoantibody along BMI. The percentage ratios of the Anti-ApoB100 autoantibody positive vs. negative populations showed a biphasic pattern by BMI. BMI<23: lean, $23 \leq \text{BMI} < 25$: overweight, $25 \leq \text{BMI} < 27$: mildly obese, $27 \leq \text{BMI} < 30$: moderately obese, $30 \leq \text{BMI}$: severely obese. n, number of total serum samples in each BMI group.

3.3. 아포지단백-B100 자가항체의 특성 분석

인간과 마우스에서 아포지단백-B100 자가항체가 존재함을 확인하였다. 이후 이들 아포지단백-B100 특이적 자가항체의 특성을 분석하기 위하여 16 마리의 비만 마우스 (고지방식이 15 주령 이후)와 148 명의 인간 피험자의 혈청을 모아 아포지단백-B100이 결합된 Affi-gel 15 수지를 이용하여 친화성 크로마토그래피 방법으로 아포지단백-B100 특이적 자가항체를 정제하여 다음 실험을 수행하였다.

3.3.1. 아포지단백-B100 자가항체의 이소타입 분석

마우스와 인간 혈액 내 존재하는 아포지단백-B100 특이적 자가항체의 이소타입을 분석하기 위해 마우스는 Iso-Gold rapid mouse antibody isotyping kit 를 이용하였으며, 카파 경쇄가 있는 IgG1, IgG2b 및 IgM 유형의 이소타입을 확인하였다. 인간은 Iso-Gold rapid human antibody isotyping kit 를 이용하였으며, 카파 및 람다 경쇄가 있는 IgG1 및 IgG2 유형의 이소타입을 확인하였다 (Figure 12). 자연적으로 생성되는 자가항체는 대부분이 기본적으로 IgM 유형을 띠는 반면, 비만에 의해 생성되는 아포지단백-B100 자가항체는 IgG 형을 띠는 것을 확인하였다. 이는 서론에서 언급했듯 비만에 의해 혈중 내 AIM 단백질이 증가하면서 항원과 결합한 IgM 과 면역 복합체를 형성하고 비장의 FDC 에서 자가항원의 제시를 유도하여 IgG 자가항체의 생성을 유도하는 것으로 사료된다.



Figure 12. Isotype analysis of anti-ApoB100 autoantibody in mouse and human. Blue arrows indicate positive reactions. C; control, G3; IgG3, 2b; IgG2b, 2a; IgG2a, G1; IgG1, G4; IgG4, G2; IgG2, A; IgA, M; IgM, λ ; lambda light chain, κ ; kappa light chain.

3.3.2. 아포지단백-B100 자가항체의 에피토프 분석

아포지단백-B100 자가항체가 동맥경화 연구에서 알려진 인간 아포지단백-B100 자가항체 에피토프인 p45, p210, p240을 인식하는지 여부를 명확히 하기 위해 도트 블롯 (dot blot) 실험을 수행하였다. 인간 아포지단백-B100의 펩타이드 p45, p210, p240는 마우스 아포지단백-B100의 단백질 서열과 각각 95%, 90% 및 60% 유사성이 있음을 확인하였다 (UniProtKB/Swiss-Prot accession no. 마우스는 P04114.2, 인간은 E9Q414.1).

정상식을 한 마우스에서 정제된 항체는 반응이 없는 반면, 인간 및 비만 마우스 혈액에서 정제된 아포지단백-B100 자가항체는 p210을 인식하는 것을 확인하였으며, 아포지단백-B100의 모조 펩타이드인 pB1도 인식하는 것을 확인하였다 (Figure 13). 마우스와 인간의 동맥경화 환자에서는 p45, p210, p240 모두를 인식하는 자가항체가 존재하는 반면, 이번 연구에서는 비만 마우스 및 인간에서 p45과 p240의 반응성이 발견되지 않았다. 중요한 것은 pB1의 단클론 항체인 22B4에서도 인간 및 비만 마우스와 동일한 패턴을 나타내는 것을 확인하였다.

즉 비만 마우스와 인간의 혈액에는 아포지단백-B100의 p210 부분을 인식하는 자가항체가 존재하며, 이러한 자가항체는 합성 모조 펩타이드인 pB1도 인식하는 것을 확인하였다. 이는 비만이 유도되면 자연적으로 체내에서 특이적으로 아포지단백-B100 단백질의 p210 부위를 인식하는 자가항체가 형성되기 시작하여 증가한 후 고도 비만으로 이행되면서 감소하는 것을 의미한다.

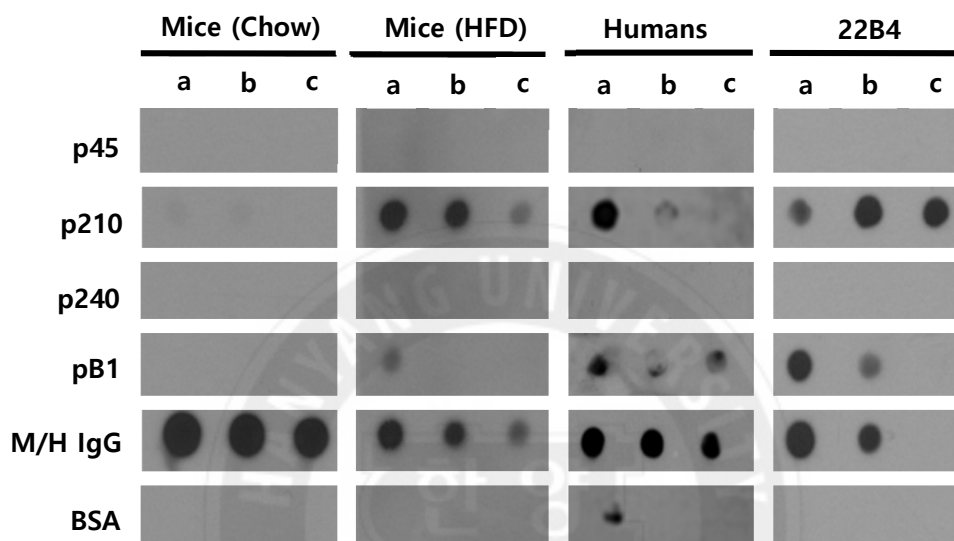


Figure 13. Epitope analysis of anti-ApoB100 autoantibody in mouse and human using dot blot. The mouse and human serum used for affinity purification were harvested and pooled. a, b and c indicate the amounts of the peptides or proteins spotted per well. a, b and c = 5, 2.5 and 1 μ g for p45, p210, p240, pB1 and BSA (bovine serum albumin: negative control). a, b and c = 5, 2.5 and 1 ng for immunoglobulins (M/H IgG = mouse or human IgG: positive control), respectively.

4. 결론

비만은 유전적, 환경적, 정신적 요인 등 여러 요인들에 의해 발병하며, 최근 생활 습관의 변화, 섭취 영양분의 불균형, 현대인의 사회적 스트레스 등으로 인하여 비만 환자의 수가 지속적으로 증가하는 추세이며, 세계보건기구 (WHO)에 의해 질병으로 규정되었다 (Guilherme, Virbasius et al. 2008, Kanneganti and Dixit 2012, Tateya, Kim et al. 2013).

최근 여러 연구들을 통해 비만의 원인은 에너지원의 섭취와 소모의 불균형에 의한 단순한 생리적 현상이 아니라 생체 신진 대사, 내분비 교란, 유전자 발현 및 후생학적 조절 요인, 장내 세균 분포의 변화 등과 같은 다양한 병인이 보고되고 있다 (Kissebah, Videlund et al. 1982, Hartz, Rupley et al. 1983). 특히 지방조직 내의 염증성 대식세포와 이들이 분비하는 사이토카인에 의한 면역학적 요인들과 비만과의 관계가 밝혀졌다 (Kanneganti and Dixit 2012, Schipper, Prakken et al. 2012). 지방조직에는 지방세포 외에도 호산구, NKT 세포, Treg 세포, M2 대식세포 등과 같은 다양한 면역 세포들이 존재하는데, 비만이 유도되면 지방조직에서 만성적 면역 반응이 일어나며, 이들 지방조직에 세포독성 T 세포, B 세포, 대식세포 등과 같은 면역 세포들이 모여 면역 반응에 관여하여 염증 반응을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Schipper, Prakken et al. 2012, Odegaard and Chawla 2013, Arai and Miyazaki 2014). 또한 비만일 때 지방 조직에 M1 대식세포의 침윤 증가로 대식세포의 개체수가 정상보다 3배 이상 증가한다고 알려져 있다 (Takahashi, Mizuarai et al. 2003, Weisberg, McCann et al. 2003, Kanda, Tateya et al. 2006, Appari, Channon et al. 2018). 활성화된 지방조직 대식세포 (ATMs)는 Th1 세포, B 세포, 호중구 등의 특정 면역 세포와 $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, MCP-1, $INF-\gamma$ 등의 염증성 사이토카인들의 분비를 증가시켜 염증성 면역 반응을 촉매하고, 이들 반응이 악화되면 제2형 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화, 암 유발 등 2차 합병증이 발병하게 된다 (Lumeng, DelProposto et al. 2008, Fujisaka, Usui et al. 2009, Biswas and Mantovani 2010, Haase, Weyer et al. 2014).

특히, 여러 연구들을 통해 비만과 자가면역 질환이 깊은 관계가 있으며, 비만 환자에게서 다양한 자가항체가 증가한다고 알려져 있다 (Arai, Maehara et al. 2013, Versini, Jeandel et al. 2014). 최근 연구에서 대식세포 사멸 억제제 (AIM)가 비만에 의한 자가면역 질환에 관련이 있다고 알려졌다. AIM은 조직 대식세포에 의해서 생성되어 분비되며, 대식세포의 세포사멸 억제제로 알려졌으며, 마우스에서 비만이 진행됨에 따라 증가하는 것이 확인되었다 (Miyazaki, Hirokami et al. 1999, Arai, Shelton et al. 2005). 고지방식이에 의한 비만이 유도되면 B 세포의 TLR4 자극을 통해 IgM의 생성이 증가하고, AIM과 IgM은 면역 복합체를 형성하여 Fc α/μ R의 결합을 억제하여 IgM의 FDC 세포 내로의 흡수를 억제한다. 이는 비장 FDC 세포 표면에 IgM 면역 복합체가 침착되어 여포성 B 세포에 대한 IgM 의존성 항원 제시를 유발하여 IgG 자가항체 생성을 유도한다 (Kurokawa, Arai et al. 2010, Arai, Maehara et al. 2013, Arai and Miyazaki 2014). 또한 혈액 내 AIM-IgM 면역 복합체의 형성은 AIM이 소변으로 배설되는 것을 막아 혈액에 축적되게 된다 (Arai, Maehara et al. 2013). 즉 비만에서 증가된 AIM은 FDC에서 IgM 면역 복합체를 증가시키게 되면서 IgG 형태의 자가항체의 생성이 증가되는 것이다 (Winer, Winer et al. 2011).

본 연구는 비만에 의해 생성되는 여러 자가항체 중 비만과 관련이 있는 자가항체를 규명하고자 하였다. 먼저 선행 연구를 통해 비만이 유도된 마우스에서 아포지단백-B100을 인식하는 자가항체가 생성되는 것을 확인하였으며, 이들 자가항체는 본 연구실에서 제작한 아포지단백-B100의 모조 펩타이드인 pB1을 교차 인식하는 것을 확인하였다 (박하늘 2011). 기존 연구에서는 아포지단백-B100 자가항체는 동맥경화와 관련되어 있다고 알려져 있었으며, 다양한 에피토프를 가지는 것으로 보고되어 있다 (Wick and Xu 1999, Fredrikson, Hedblad et al. 2003, Fredrikson, Berglund et al. 2006). 하지만 동맥경화 환자에서는 자연 저밀도 지단백질과 변형된 저밀도 지단백질의 다양한 에피토프를 가지는 자가항체가 형성되므로 동맥경화에 직접적으로 관련된 자가항체를 특성화 하는데 어려움이 있었다. 본 연구에서는 먼저

비만 마우스와 인간에서 각각의 아포지단백-B100, 저밀도 지단백질, pB1을 인식하는 자가항체가 존재하는지 확인하였으며, 그 결과 일반식이를 수행한 정상 마우스 혈액에서는 자가항체가 존재하지 않는 반면, 고지방식이를 수행한 비만 마우스 혈액에서는 아포지단백-B100, 저밀도 지단백질, pB1을 인식하는 자가항체가 존재하는 것을 확인하였다. 또한 인간의 혈액에서도 마찬가지로 아포지단백-B100, 저밀도 지단백질, pB1을 인식하는 자가항체가 존재하는 것을 확인하였다. 특히 이들 자가항체가 아포지단백-B100의 미토프 펩타이드인 pB1을 더 잘 인식하는 것을 확인하였다. 또한 고지방식이를 수행한 마우스에서 비만화가 진행됨에 따라 아포지단백-B100 자가항체가 초기 고지방식이를 시작하는 시점부터 과체중일 때 농도가 최고로 증가한 후 고도 비만으로 이행될 때 항체의 농도는 서서히 감소하는 것을 확인하였다. 또한 인간의 경우에도 마찬가지로 BMI에 따라 과체중 및 비만으로 진행될 때 자가항체의 농도가 증가한 후 고도 비만으로 이행되면서 다시 감소되는 2상 패턴을 보이는 것을 확인하였다. 비만 마우스와 인간 혈액에서 생성되는 자가항체를 인간의 아포지단백-B100을 이용하여 정제한 후 특성을 확인한 결과, 이들 자가항체는 마우스와 인간에서 모두 IgG 형태로 특이적으로 아포지단백-B100의 p210 부분만을 인식하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 과도한 지방 섭취에 의해 체내 아포지단백-B100을 가지는 (초)저밀도 지단백질과 같은 저장형 지방 입자의 함량이 증가하면서 이에 결합하는 아포지단백-B100을 인식하는 자가항체가 유도 생성되기 시작하며, 지속적인 지방 섭취에 의해 생성된 항체가 소진되어 감소하는 것으로 생각되어진다. 특히 동맥경화에서 확인된 아포지단백-B100 자가 항체는 p45, p210, p240 등 여러 에피토프를 가지는 반면, 본 연구에서는 특이적으로 비만에 의해 유도된 아포지단백-B100 자가항체는 p210만을 인식한다는 것을 확인하였다. 이는 동맥경화 연구에서 단핵구/대식세포와 죽상경화성 플라크에서 염증 반응을 유발하는 독특한 활성을 가지는 ApoBDS-1 펩타이드가 존재하며, 이는 아포지단백-B100에서 유래된 ‘위험 신호’로 작용하는 것이 밝혀졌다 (Ketelhuth, Rios et al. 2011). ApoBDS-1 펩타이드는 p216을 포함하여 다

양한 분자량을 가지는데, 자가항원으로 p216을 갖는 ApoBDS-1이 지방조직에서 IgM에 결합하고 FDC 면역 복합체에서 항원이 유도된 후 p210에 대한 IgG형 항체가 생성될 때 여포성 B 세포가 p216에 인접한 p210을 인식함을 의미한다. 즉 지방식이에 의한 비만에서 p210을 인식하는 아포지단백-B100 자가항체가 먼저 유도 생성된 후 소진되다가 비만이 진행됨에 따라 이후에 자연/변형된 p45, p210, p240 등 여러 에피토프를 가지는 자가항체가 생성되는 것으로 생각되어진다.



제2장: 3HOTP 접종에 의해 유도된 아포지단백-B100 항체의 비만 치료 효과 연구

1. 서론

1.1. 비만 치료제

1.1.1. 최신 비만 치료제 시장

비만의 치료 방법으로는 식이요법, 운동요법, 약물치료, 위절제술 등이 있으며, 그 중 약물치료로 비만치료제를 사용하는 방법이 가장 활기를 띠고 있다. 대부분의 약물치료는 신경계에 작용하여 식욕을 억제시키는 식욕억제제, 장내에서 에너지 흡수 효율을 낮추는 지방질 소화 억제제 등이 사용되고 있다 (Costantino and Barlocco 2015, Rankin and Wittert 2015, Saltiel 2016, Srivastava and Apovian 2018). 이러한 약물의 작용 타겟은 대부분이 호르몬 수용체로 조직 및 세포에 따라 다양하고 심각한 부작용이 나타나며, 오랜 시간 사용이 불가능하다는 문제점이 남아 있다. 전세계 비만 시장의 50% 이상을 차지하는 GLP-1 작용제 (agonist) 약물인 삭센다 역시 마찬가지로 부작용으로부터 자유로울 수 없으므로 (Filippatos, Panagiotopoulou et al. 2014) 새로운 타겟 및 기전의 비만치료제가 절실히 필요한 상황이다.

1.1.2. 비만면역치료제 3HOTP 개발

비만면역치료제 3HOTP의 원리는 백신 형태로 약물을 체내에 주사하여 면역 체계를 활성화시켜 생체 내 3HOTP에 대한 항체를 만들도록 하는 것이다. 3HOTP의 작용기전은 3HOTP 접종에 의해 아포지단백-B100에도 결합할 수 있는 pB1의 항체를 유도하여 1) 항체는 아포지단백-B100에 교차 결합하여 지방 입자의 지방세포 내의 흡수를 차단하고

2) 결합된 항체에 의해 M2 대식세포의 $\text{Fc}\gamma$ receptor를 통해 내부로 흡수, 분해되어 지방의 축적을 차단한다. 또한 3) 말초조직과 4) 간조직에서는 항체에 의해 각각의 수용체와 결합이 차단되어 지방의 세포 내로 흡수가 차단된다 (Figure 14).

먼저 아포지단백-B100을 인식하는 항체의 에피토프를 파지 디스플레이 랜덤 펩타이드 라이브러리 시스템을 이용하여 규명하였으며, 이들 에피토프를 각각 pB1과 pB2라 하였다 (김치훈 1997). 이들 서열은 15개 아미노산으로 아포지단백-B100에는 존재하지 않는 미모토프임을 확인하였다. 초기 비만면역치료제는 재조합 단백질 형태로 면역원성을 높이기 위해 기본이 되는 pB1 서열을 4번 반복된 다량체 pB4를 만들었으며, helper T 세포를 활성화시킨다고 보고된 B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus, HBV)의 preS2 서열을 추가로 삽입하여 1세대 비만면역치료제인 재조합단백질 형태의 pB4T를 만들어 사용하였다 (이진일 2004). 이 백신 형태의 비만면역치료제로 마우스 동물 실험을 수행한 결과, 체중 억제 효과가 있음을 확인하였으나 (정해중 1999, 이희중 2011, Kim, Lee et al. 2016), 이 재조합단백질 형태의 pB4T는 단백질 생산 및 정제 과정이 복잡하고 비용이 많이 들며, 단백질의 정제, 구조 문제로 체중 억제 효과가 단백질의 구조에 따라 달라지는 문제점이 있었다.

이후 2세대 비만면역치료제를 합성 펩타이드 형태로 만들기 위해 pB1 서열에 helper T 세포를 활성화시킨다고 보고된 PADRE 서열을 삽입하였으며 (Alexander, del Guercio et al. 2000, Ghaffari-Nazari, Tavakkol-Afshari et al. 2015), 뒤에 펩타이드의 안전성과 면역원성을 높이기 위해 pB2를 추가 삽입하였다. pB1-PADRE-pB2 서열을 OTP3로 명명하고 면역보조제인 수산화 알루미늄 보조제 (Aluminum hydroxide adjuvant)와 면역증강제인 PHAD를 추가하여 최종적으로 비만면역치료제 3HOTP를 만들었다. 펩타이드형 비만면역치료제 3HOTP로 마우스 동물 실험을 수행한 결과, 체중 억제 효과가 있음을 확인하였다 (심명성 2017, 김정운 2018).

1.2. 연구 목적

비만이 유도된 사람과 마우스에서 아포지단백-B100 자가항체가 형성되며, 고도 비만으로 이행될 때 자가항체가 감소하는 것을 확인하였다. 이를 이용하여 본 연구에서는 비만면역치료제 3HOTP를 이용하여 인위적으로 아포지단백-B100을 인식하는 항체 생성을 유도하였을 때 체중 억제제의 효과에 대해 확인하고자 하였다. 또한 백신 투여 시점, 간격, 펩타이드 양에 따른 항 비만 효과를 확인하여 가장 효과적인 치료 방법을 확인하고자 하였으며, 이 연구 결과를 통해 비만 치료의 새로운 기전인 백신 형태의 비만면역치료제로 기존의 호르몬 조절에 의한 일시적인 치료가 아닌 장기간 치료가 가능한 효과적이고 간편한 치료법을 제시할 수 있을 것이라 사료된다.



2. 재료 및 방법

2.1. 동물 실험

본 실험에 사용한 동물은 C57BL/6 로 7 주령 수컷의 마우스를 중앙실험동물 (서울, 한국)에서 구입하여 1 주간 순화 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 면역 결핍 마우스 실험에는 C57BL/6J-*Rag2^{em1hwi}*/Kor1 마우스를 식품의약품안전평가원에서 분양 받아 1 주간 순화 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 비만을 유도하지 않는 실험 동물은 모두 일반 사료 (칼로리 기준 10% 지방, 중앙실험동물(주))를 사용하였으며, 비만을 유도하는 동물은 고지방식이 (칼로리 기준 60% 지방, #D12492, Research diet Inc., 뉴저지, 미국)를 먹였다. 체중과 먹이 섭취량은 주당 3 회, 오후 3~5 시 사이에 측정하였으며, 체중 데이터는 각 그룹별로 평균을 계산하여 주령별 체중으로 표시하였다. 항체 역가를 확인하기 위해 접종 이후 일주일 째에 헤파린 처리된 모세관 (Kimble Chase Life Science and Research Products, 미국)를 이용하여 안와 채혈을 진행하였다. 혈청 준비를 위해 혈액을 튜브에 채취하여 실온에서 30 분 동안 방치한 다음 원심분리 (11,000 rpm, 10 분, 4℃)하여 혈청만 분리하여 실험에 사용하였다. 모든 동물 절차는 한양 대학교 실험 동물 과학 센터와 기관 심의위원회 (HY-IACUC-19-0045, HY-IACUC-19-0046, HY-IACUC-19-0047, HY-IACUC-19-0048)의 승인을 받았다.

2.2. 비만면역치료제 3HOTP 제조

비만면역치료제 3HOTP 는 아포지단백-B100 특정 부위가 유사한 15 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 B 세포를 자극할 수 있는 B 세포 에피토프로 사용하였고, PADRE 펩타이드를 T helper 세포를 자극할 수 있는 T 세포 에피토프로 사용하였다. 이를 조합하여 45 개의 아미노산의 OTP3 를 애니젠(주) (대전, 한국)에서 화학 합성으로

제작하였다. OTP3 펩타이드에 2% alhydrogel 보조제 (Invivogen, 캘리포니아, 미국), PHAD (699800P, Avanti, 앨라배마, 미국)를 첨가하여 3HOTP 백신 제제를 만들었다. 3HOTP 1 회 주사 당 펩타이드 50 ug/100 ul 로 계산하여 총 5 mg 의 펩타이드를 50 ul 의 DMSO 에 녹인 후 이를 PBS 에 넣고 면역보조제인 2% alhydrogel 보조제 1 ml 과 면역증강제인 1 mg/ml 의 PHAD 1 ml 를 넣고 부피를 총 10 ml 까지 PBS 로 채워 주었다. 이후에 4℃에서 밤새 회전으로 반응시킨 후 1500 rpm 15 분간 원심분리하여 상층액은 UV 분광계로 정량을 통해 항원이 모두 흡착됨을 확인하였다. 원심분리한 침전물에 PBS 를 10 ml 첨가한 후 1,500 rpm 15 분간 원심분리하여 상층액을 제거하는 방법으로 3 회 반복 수행으로 DMSO 성분을 제거하고 필요한 농도로 PBS 로 최종 부피를 맞추어 사용하였다.

2.3. 접종

비만면역치료제 3HOTP의 주사는 근육 주사로 1회 주사는 실험 조건에 따라 마우스 1 마리 당 30 ug/100 ul 또는 50 ug/100 ul로 각각 마우스의 양쪽 허벅다리 근육에 50 ul씩 2번 주사하였다. 실험 방법에 따라 2주 간격 또는 3주 간격 주사를 실시하였다. 3HOTP 접종에 의한 혈청 내 항체 유도를 확인하기 위해 주사 후 7 일째에 헤파린 처리된 모세관을 이용하여 안와 정맥으로 채혈을 실시하였으며, 4℃에서 10 분간 반응시킨 후 11,000 rpm, 4℃, 10 분간 원심분리하여 혈청만 분리하여 다음 실험까지 -70℃에서 보관하였다.

2.4. Indirect ELISA

비만면역치료제 3HOTP 주사에 따른 항체 역가를 측정하기 위해 indirect ELISA를 수행하였다. pB4가 100 ng/웰이 되도록 coating buffer에 희석하여 96-웰 면역플레이트에 첨가하고 4℃에서 밤새 반응시킨 다음

PBS-T (0.05 % Tween-20이 포함된 PBS)로 세척하였다. 그리고 각 웰 당 0.05% casein solution 300 μ l를 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 반응하였다. 마우스 혈청을 항체 역가에 따라서 연속 희석하여 각 웰에 100 μ l씩 로딩한 후 37℃에서 1 시간 동안 반응시키고 PBS-T 300 μ l를 첨가하여 3 회 반복 세척하였다. 그 후 각 웰에 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (0.1 μ g/ml, A0168, 씨그마알드리치코리아, 서울, 한국)를 1:10,000 으로 희석하여 100 μ l를 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 반응시킨 후 PBS-T 300 μ l를 첨가하여 3 회 반복 세척하였다. 항체 역가를 계산하기 위하여 OPD 용액을 웰 당 100 μ l씩 첨가하여 37℃에서 10 분간 발색 반응을 시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 혈액 내 지방 함량 분석

비만면역치료제 3HOTP에 의한 혈중 내 트라이글리세라이드 (TG), 저밀도 지단백질 (LDL), 초 저밀도 지단백질 (VLDL), 콜레스테롤 (CHOL), 유리 지방산 (free fatty acid, FFA, NEFA) 함량은 (주)라온바이오 (용인, 한국)에 의뢰하여 분석하거나 가천대 길병원의 이길여 당뇨병연구원 (인천, 한국)에서 분석하였다.

2.6. 마우스 지방 조직에서 지방세포 및 대식세포 분리

실험을 완료한 마우스는 경추 탈골하여 부고환 지방조직 (Epididymal fat pad), 장간막 지방조직 (mesenteric fat), 심장, 간, 신장, 비장, 근육 등을 적출하여 무게를 측정하였다. 부고환 지방조직은 가위로 잘게 찢어준 후 2% FBS, 2 mM glucose, 1 mg/ml collagenase가 첨가된 KRB buffer를 1 g당 4 ml를 넣어주어 37℃, 1 시간 동안 흔들어주며 반응시켰다. 반응이 완료되면 300 μ m 나일론 메쉬를 통과시켜 지방조직 찌꺼기들을 걸러주고, 지방조직을 걸러준 후 통과한 부분을 40 μ m 나일론 메쉬를 다시 통과시켜 지방세포와 대식세포를 분리하였다. 지방세포 부분은 10% FBS, 1% 항생제가 첨가된 DMEM을 첨가하여 하층액을 주사기로 제거하는 방식으로 세

척한 후 지방세포를 얻었다. 대식세포는 500 g, 15 분간 원심분리를 하여 상층액 5 ml을 남겨둔 후 적혈구 (Red blood cell, RBC)을 없애기 위해 RBC lysis buffer 10 ml을 첨가하여 상온에서 5 분간 반응시키고 DMEM을 10 ml 넣어 500 g에서 5 분간 원심분리한 후 상층액을 제거하여 대식세포가 포함된 기질 혈관 분획 (Stromal vascular fraction, SVF)을 얻었다.

2.7. 지방세포 크기 분석

지방조직에서 분리한 지방세포를 48웰 플레이트에 웰 당 1.0×10^5 cells/ml로 첨가한 후 먼저 지방세포임을 확인하기 위해 세포핵과 지방을 염색하였다. 세포핵의 염색을 위해 DAPI (D9542, 씨그마알드리치코리아, 서울, 한국)를 10 uM, 지방을 염색하기 위해 HCS LipidTOX (H34477, 씨모피셔 사이언티픽 코리아, 서울, 한국)를 1:1,000으로 처리하여 24 시간 반응시킨 후 형광 현미경으로 관찰하였다. 이후 실험에서는 DAPI 염색만으로도 지방세포 확인이 가능하여 DAPI만 10 uM 처리하여 2 시간 동안 반응시킨 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

2.8. FACS 를 이용한 대식세포의 분극 분석

지방조직에서 분리한 기질 혈관 분획 (Stromal vascular fraction, SVF)을 상층액 100 ul만 남긴 후 세포 10^6 개당 Alexa 647 Anti-CD206 1 ul, FITC Anti-F4/80 0.5 ul, PE Anti-cd11c 1.25 ul를 첨가하고 4℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS 1 ml을 첨가하여 500 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS로 세척하는 과정을 2번 반복하였다. FACS 분석은 먼저 FSC와 SSC로 기본 분석을 진행한 후 FITC Anti-F4/80을 기준으로 대식세포의 수를 먼저 측정하고, PE Anti-cd11c로 M1 대식세포를 Alexa 647 Anti-CD206로 M2 대식세포의 수를 측정하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. 마우스 주령에 따른 3HOTP 접종에 의한 항 비만 효과 확인 (연구-1)

연구-1의 효능 분석은 마우스 주령에 따른 비만면역치료제 3HOTP에 의한 비만 억제 효능을 확인하였다. 청소년기에서 청년에 해당하는 마우스 주령에 비만면역치료제 3HOTP를 접종하는 초기-단계 그룹 (Young-stage group)과 20주령 이후에 3HOTP를 추가 접종하는 후기-단계 그룹 (Old-stage group)으로 나누어 실험을 진행하였다. 초기-단계 그룹에서는 8 주령부터 2 주 간격으로 총 4 번의 접종을 진행하였으며, 10 주령부터 정상군을 제외한 모든 그룹에 60% 고지방식이를 먹여 비만을 유도하였다. 후기-단계 그룹에서는 초기-단계 그룹과 동일하게 실험을 진행한 후 20 주령 이후에 2 주 간격으로 총 3 번의 추가 접종을 진행하였다 (Figure 15). 마우스 실험군은 정상식이 대조군 (정상군, Lean), 고지방식이 비만유도군 (비만군, Obese), 위약 투약 실험군 (위약군, Mock), 3HOTP 접종군 (3HOTP 군) 총 4 개로 나누어 진행하였다. 주사는 근육 주사로 1 회 주사 당 50 ug/100 ul로 각각 마우스의 양쪽 허벅다리 근육에 50 ul씩 접종하였다. 정상군과 비만군은 PBS를 접종하였고, 위약군은 OTP3 펩타이드를 제외한 PBS+Alum+PHAD을 3HOTP 접종군은 3HOTP 비만면역치료제 (PBS+Alum+PHAD+OTP3)를 접종하였다 (Table 3).

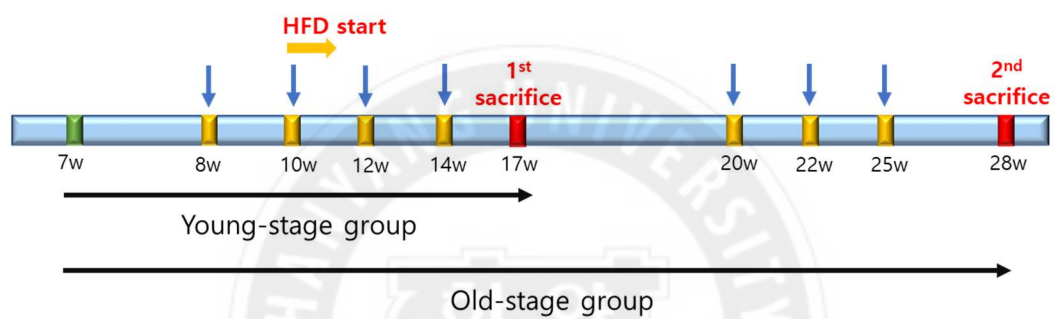


Figure 15. Animal experimental plan of Study-1

Table 3. Animal experimental groups in Study-1

Group	Diet	Injection
Lean (n=12)	Normal diet	Only PBS
Obese (n=12)		Only PBS
Mock (n=12)	60% High fat diet	PBS+Alum+PHAD
3HOTP (n=12)		PBS+Alum+PHAD+OTP3

3.1.1. 체중 증가 억제 효능 확인

마우스의 체중 변화를 확인하기 위하여 7 주령부터 매주 2 회 체중을 측정하였다. 8 주령부터 2 주 간격 총 4 번 접종을 진행 후 17 주령에서 실험을 완료한 초기-단계 그룹 (Young-stage group)과 8 주령부터 2 주 간격 총 4 번 접종 후 20 주령 이후 2 주 간격 총 3 번 추가 접종한 후 28 주령에서 실험을 완료한 후기-단계 그룹 (Old-stage group)으로 나누어 3HOTP 접종에 따른 체중 변화를 확인하였다.

먼저 초기-단계 그룹 (Young-stage group)에서는 10 주령까지 모든 그룹의 체중이 동일하게 증가한 후 고지방식을 시작한 후 16 주령에서 비만군과 위약군에서 약 35 g까지 체중이 증가하였다. 반면, 3HOTP 접종군은 약 30 g까지 체중이 증가한 것을 확인하였다. 이후 3HOTP 접종이 진행될수록 계속해서 체중 증가가 억제되는 것을 확인하였다 (Figure 16A). 이는 3HOTP에 의한 접종 효과로 항체 형성이 증가하여 체중 증가 억제 효능이 증가한 것으로 사료된다.

후기-단계 그룹 (Old-stage group)에서는 초기 17 주령까지는 초기-단계 그룹과 동일한 패턴을 가지는 것을 확인하였다. 이후 20 주령까지는 추가 접종을 진행하지 않아 계속된 고지방식이 섭취에 의해 3HOTP 접종군의 체중이 37 g까지 증가하였다. 이는 3HOTP 접종에 의해 생성된 항체가 소진됨에 따라 체중 증가를 억제하던 기능이 손실된 결과로 사료된다. 또한 후기-단계 그룹에서 노령 때 2 차 추가 접종 기간 동안에는 전체적으로 체중 증가 억제 효능이 약하게 나타나는 것을 확인하였다 (Figure 16B). 이는 노화가 진행됨에 따라 면역 활성의 저하로 접종 효과가 감소되었기 때문이라 사료된다.

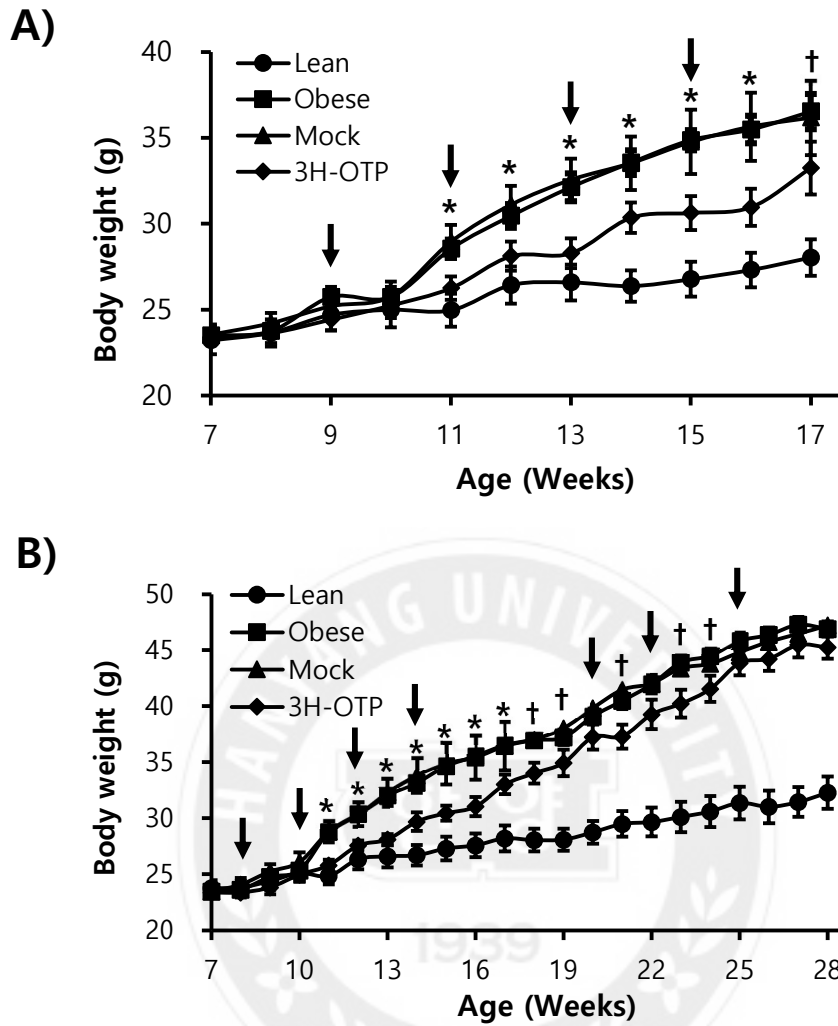


Figure 16. Inhibition effect of weight gain by 3HOTP injection according to mouse age (Study-1). **A)** Body weight curve of young-stage group. Lean group: chow-fed with PBS injection (n=6), Obese group: HFD-fed with PBS injection (n=6), Mock group: HFD-fed with mock injection without peptide (n=6), 3HOTP: HFD-fed with 50 ug 3HOTP injection (n=6). Injections (arrows) were given at 8, 10, 12, 14 weeks of age and HFD was started at 10 weeks of age. **B)** Body weight curve of old-stage group. 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 without peptide (n=6), 3HOTP: HFD-fed with 50 ug 3HOTP injection (n=6). Injections (arrows) were given at 8, 10, 12, 14, 20, 22, 25 weeks of age and HFD was started at 10 weeks of age. Error bars in A and B indicate means \pm s.e.m. *, $p < 0.001$, †; $p < 0.05$ statistically significant difference between obese and 3HOTP.

3.1.2. Indirect ELISA 법을 이용한 항체 역가 측정

항체 역가는 7 주령부터 2 주 간격으로 안와 정맥을 통해 채혈하여 혈청 분리 후 Indirect ELISA법을 이용하여 측정하였다. pB4를 항원으로 사용하여 ELISA를 수행하였으며, 450 nm에서 흡광도가 0.5 OD값이 되는 희석 배수 값을 항체 역가 값으로 정하였다.

먼저 초기-단계 그룹 (Young-stage group)에서는 정상군에서는 항체 역가 값이 측정되지 않았으며, 비만군과 위약군에서는 적은 양의 항체 역가 값이 나오는 것을 확인하였다 (Figure 17A). 이는 이전 연구에서 설명한 대로 고지방식이에 따른 아포지단백-B100을 인식하는 자가 항체가 교차로 pB4 단백질을 인식하였기 때문이라 사료된다. 3HOTP 접종군은 접종이 진행될수록 항체 역가가 계속해서 증가함을 통해 3HOTP에 의해 항체 유도가 이루어짐을 확인하였다 (Figure 17A).

후기-단계 그룹 (Old-stage group)에서는 동일하게 정상군에서는 항체 역가 값이 측정되지 않았다. 3HOTP 접종군의 경우 초기 접종 때는 3HOTP를 접종할수록 항체 역가가 계속해서 증가하는 것을 확인한 반면, 20 주령 이후 추가 접종 때는 항체 역가가 이전보다 적은 수치로 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 17B). 이는 노화에 따라 면역 활성의 저하로 접종 효과가 감소되었기 때문이라 사료된다. 또한 특이적으로 비만군과 위약군에서 아포지단백-B100을 인식하는 자가항체가 20~21 주령까지 증가된 후 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 17B). 이는 증가된 항체가 소진된 후 노화에 의한 면역 활성의 저하로 항체 역가가 감소되는 것으로 사료된다.

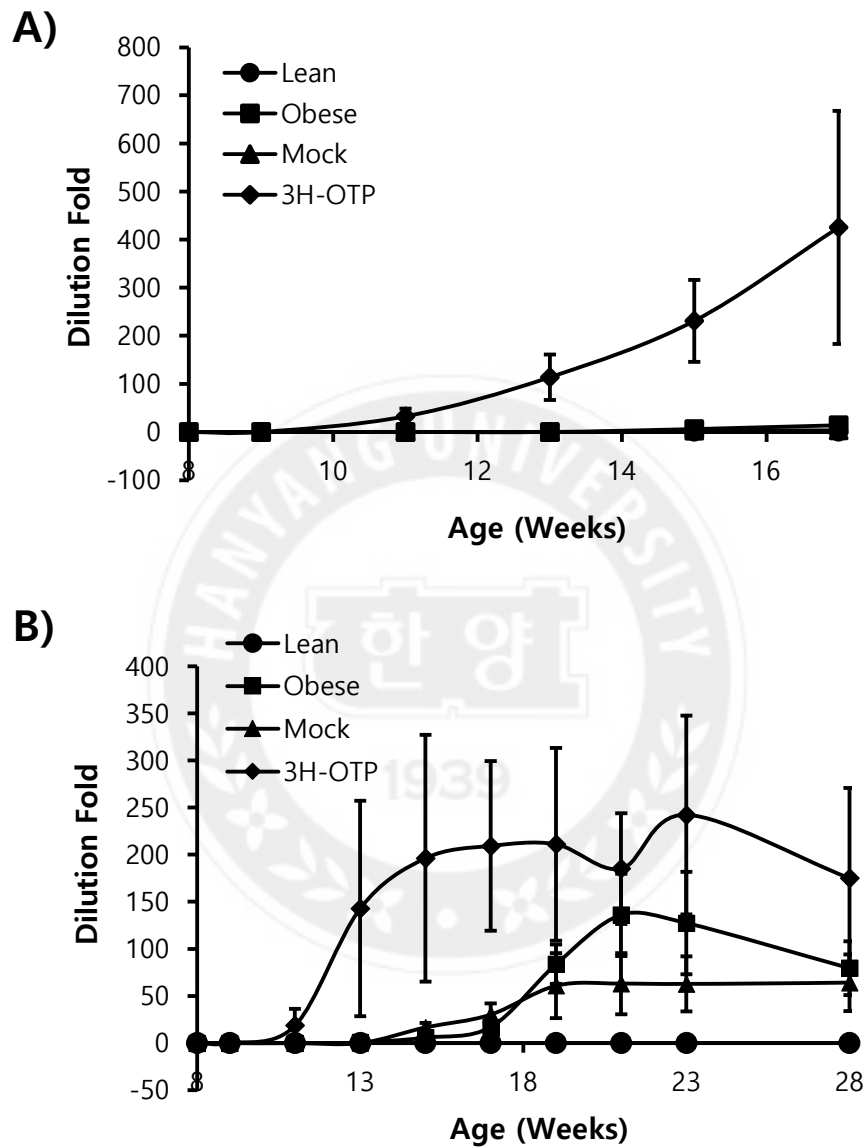


Figure 17. Titration of anti-pB1 antibody in Study-1. **A)** Antibody titer of young-stage group. **B)** Antibody titer of old-stage group. Antibody titer was determined as dilution fold that indicates the absorbance read-out of 0.5 at 450 nm. Error bars in A and B indicate means \pm s.e.m.

3.1.3. 혈중 지방 농도 측정

초기-단계 그룹과 후기-단계 그룹 실험이 완료된 후 마우스 해부 시 전혈을 채취하여 트라이글리세라이드 (TG), 저밀도 지단백질 (LDL), 초 저밀도 지단백질 (VLDL), 콜레스테롤 (CHOL), 유리 지방산 (free fatty acid, FFA, NEFA) 분석하였다.

그 결과, 초기-단계 그룹 (Young-stage group)에서는 트라이글리세라이드 (TG)와 유리 지방산 (free fatty acid, FFA, NEFA)는 모든 실험군에서 차이가 없음을 확인하였으며, 저밀도 지단백질 (LDL), 초 저밀도 지단백질 (VLDL), 콜레스테롤 (CHOL)은 전체적으로 비만군, 위약군, 3HOTP 접종군에서 정상군보다 증가하였지만, 3HOTP 접종군은 비만군, 위약군보다 감소함을 확인하였다. 이는 혈중 지방의 함량이 3HOTP 접종에 의해 개선됨을 확인하였다 (Figure 18A).

후기-단계 그룹 (Old-stage group)에서는 트라이글리세라이드 (TG), 저밀도 지단백질 (LDL), 초 저밀도 지단백질 (VLDL), 콜레스테롤 (CHOL), 유리 지방산 (free fatty acid, FFA, NEFA) 모두 비만군, 위약군, 3HOTP 접종군에서 정상군보다 증가됨을 확인하였다. 또한 3HOTP 접종군에서 모두 비만군, 위약군보다는 감소함을 확인하였다. 특히 유리 지방산 (free fatty acid, FFA, NEFA)에서 고지방식을 한 실험군에서 함량이 증가하였으며, 3HOTP 접종군은 다른 비만 실험군보다 감소함을 확인하였다. 이는 비만이 유도되면 혈액 내 유리 지방산 (free fatty acid, FFA, NEFA)의 양이 증가된다는 기존 연구와 동일한 결과이며, 3HOTP 접종군은 비만군들보다 감소됨을 통해 3HOTP 접종에 의해 개선됨을 확인하였다 (Figure 18B).

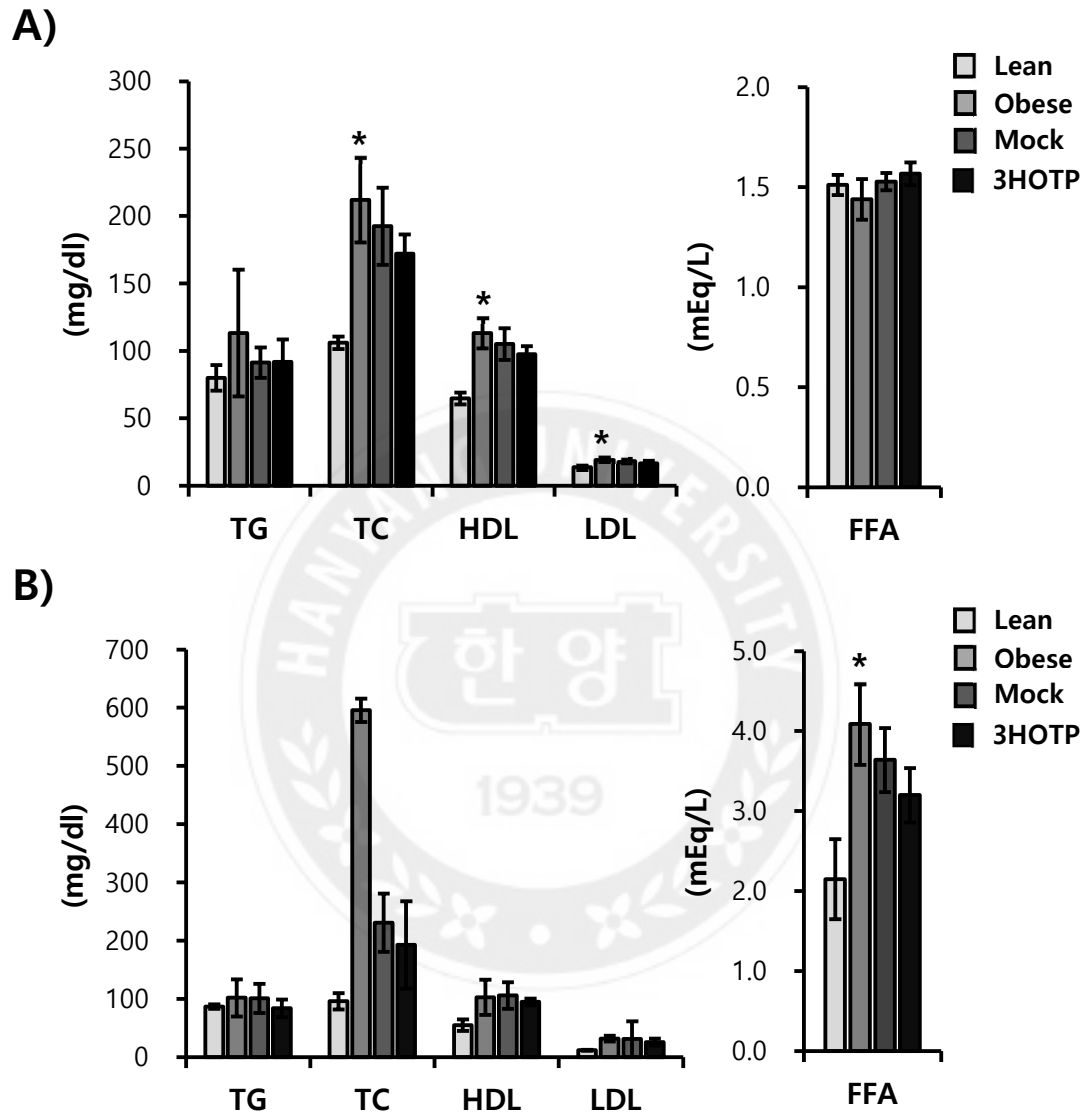


Figure 18. Serum lipid profile in Study-1. A) Young-stage group, B) Old-stage group. TG; Triacylglycerol, TC; Total Cholesterol, HDL; High density lipoprotein, LDL; Low-density lipoprotein, FFA; Free fatty acid. Error bars in A and B indicate means \pm s.e.m. *: $p < 0.05$, statistically significant difference between obese and 3HOTP.

3.1.4. 지방조직 내 지방세포 크기 분석

초기-단계 그룹과 후기-단계 그룹 실험이 완료된 후 마우스 해부 시 각 그룹의 부고환 지방조직 (Epididymal fat pad)에서 지방세포를 분리하여 DAPI 염색을 통해 지방세포의 크기를 비교하였다.

초기-단계 그룹 실험 (Young-stage group, Figure 19A)과 후기-단계 그룹 실험 (Old-stage group, Figure 19B) 모두 정상군에서 지방세포의 크기는 평균 100 μm 이하인 반면, 비만군과 위약군에서는 지방세포 크기가 약 5~6 배 이상 증가함을 확인하였다. 하지만 3HOTP 접종군은 정상군보다는 크기가 증가하였지만, 비만군과 위약군보다는 약 2~3배 감소한 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 3HOTP 접종에 의해 지방조직 내 지방 축적이 감소된 것을 확인하였다.



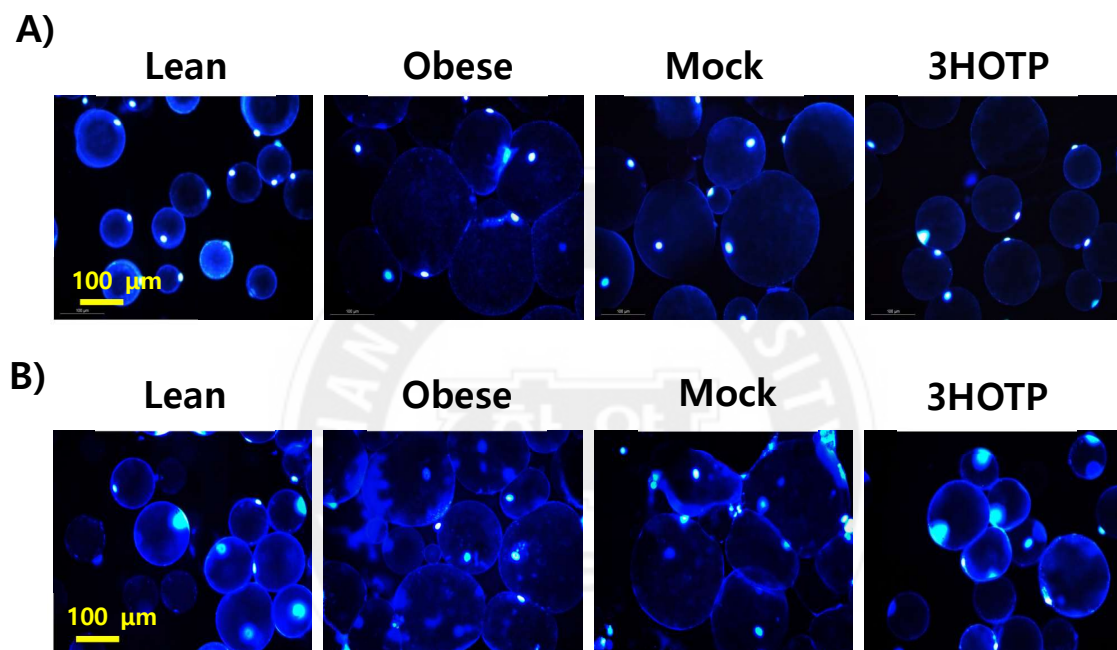


Figure 19. Comparative analysis of the size of adipocytes in Study-1. **A)** Young-stage group, **B)** Old-stage group. Adipocyte stained with DAPI and stained cells were confirmed by fluorescence microscopy.

3.1.5. FACS 분석을 통한 지방조직 내 M1/M2 대식세포의 분율 분석

초기-단계 그룹 실험과 후기-단계 그룹 실험 종료 후 마우스 해부 시 각 실험군의 부고환 지방 조직 (Epididymal fat pad)에서 기질 혈관 분획 (Stromal vascular fraction, SVF)을 분리하였으며, 전체 대식세포와 M1 대식세포, M2 대식세포의 분율을 확인하기 위한 FACS 분석을 위하여 FITC anti-F4/80, PE anti-CD11c, Alexa647 anti-CD206 항체를 반응시켰다. FACS 분석 시 FSC는 200 이상, FITC anti-F4/80는 10^2 이상을 대식세포로 설정하였으며, 대식세포로 설정한 부분에서 PE anti-CD11c를 이용하여 M1 대식세포로 Alexa647 anti-CD206를 이용하여 M2 대식세포로 분류하였다. 이후 지방조직 세포의 단위 무게당 개체 수를 비교하였다 (Figure 20).

초기-단계 그룹 (Young-stage group)에서는 정상군에서 10% 미만이던 지방조직 내 대식세포가 비만군과 위약군에서는 약 30%까지 증가한 반면, 3HOTP 집종군에서는 약 25%로 비만군에 비해 감소한 것을 확인하였다. M1/M2 대식세포의 분율을 비교한 결과 정상군에서는 M2 대식세포가 M1 대식세포보다 3 배 많음을 확인하였다 (Figure 20A). 비만군과 위약군에서는 반대로 M1 대식세포가 M2 대식세포보다 2 배 많은 것을 확인하였다. 이는 비만이 진행됨에 따라 대식세포가 M2형에서 염증성 M1형 대식세포로 분극화된 것을 의미한다. 3HOTP 집종군에서는 비만군과 비교하여 대식세포 수가 감소하였으며, 조직 재생과 관련 있는 M2형 대식세포가 증가한 것을 확인하였다. 이는 3HOTP 집종에 의해 M1형이 M2형으로 재분극이 유도된 것을 의미한다.

후기-단계 그룹 (Old-stage group)에서는 정상군과 비교하여 다른 실험군의 대식세포 수가 약 2.5배 증가한 것을 확인하였으며, 대부분이 M1형 대식세포임을 확인하였다. 초기-단계 그룹과 다르게 3HOTP 집종군이 비만군과 유의미한 차이가 없음을 확인하였다 (Figure 20B). 이는 노화에 의한 면역능의 감소로 인한 결과로 사료된다.

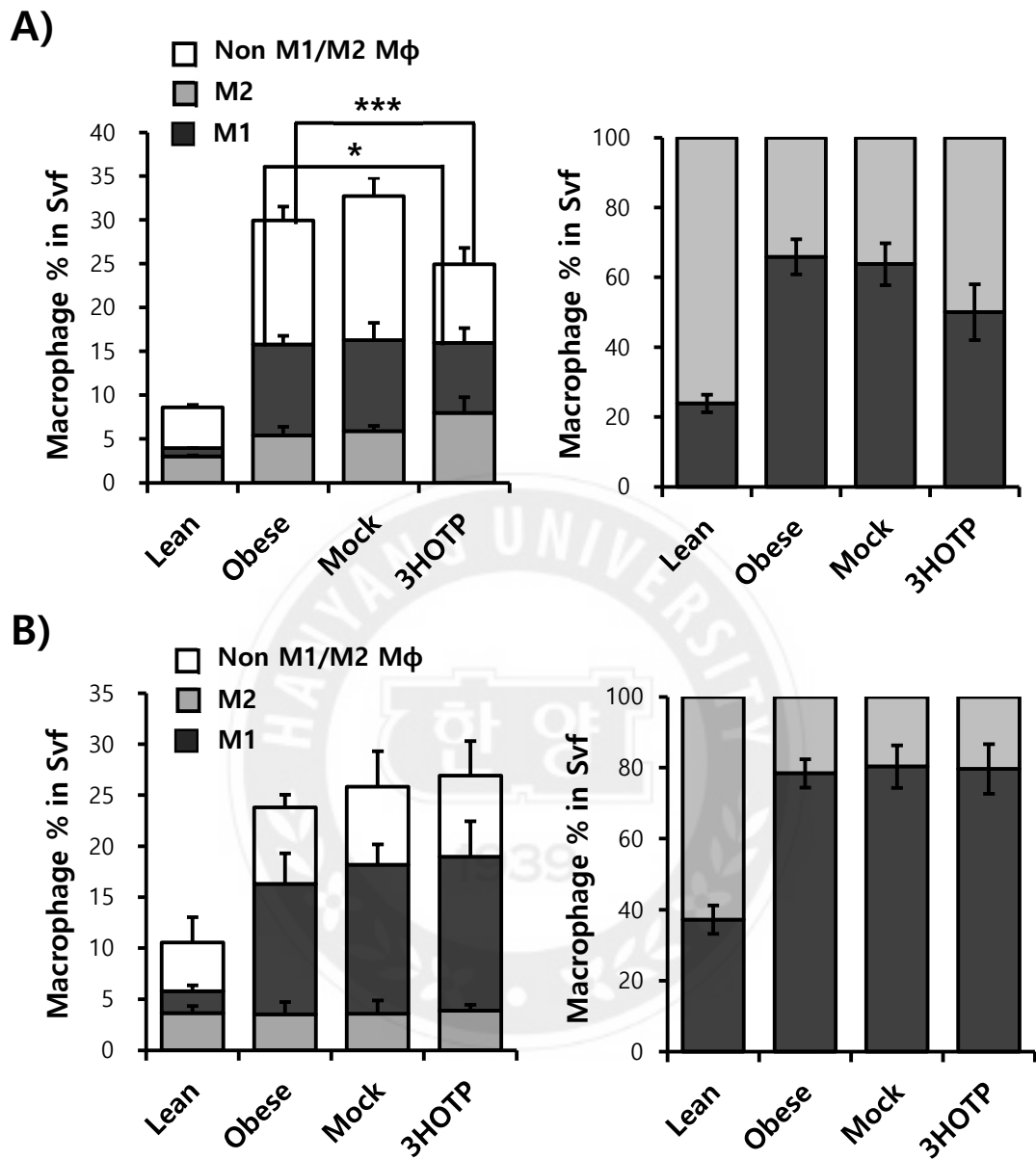


Figure 20. Analysis of the M1/M2 macrophages polarization of adipose tissue in Study-1. A) Young-stage group, B) Old-stage group. Left panel shows the macrophages density among total cell in stromal vascular fraction (SVF) of each experimental group. Right panel shows the relative M1/M2 macrophage ratio in macrophages. Error bars in A and B indicate means \pm s.e.m. *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.005$ statistically significant difference between obese and 3HOTP.

3.2. 주사 량과 횟수에 따른 3HOTP 접종에 의한 항 비만 효과 확인 (연구-2)

연구-2에서 효능 분석은 3HOTP의 접종 량과 접종 주기를 확인하였다. 8 주령부터 20 주령까지 3 주 간격으로 계속 주사를 진행한 후 20 주령 이후부터는 2 주 간격으로 주사하였으며, 2 번째 접종 때부터 (11 주령) 정상군을 제외한 모든 실험군에 60% 고지방식이를 먹여 비만을 유도하였다 (Figure 21). 실험군은 각각 정상식이 대조군 (정상군, Lean), 고지방식이 비만유도군 (비만군, Obese), 위약 투약 실험군 (위약군, Mock), 3HOTP 30 ug 접종 시험군 (3HOTP-30), 3HOTP 50 ug 접종 시험군 (3HOTP-50) 총 5 개로 나누어 진행하였다 (Table 4). 주사 방법은 연구-1의 효능 분석 실험과 동일하게 진행하였다.



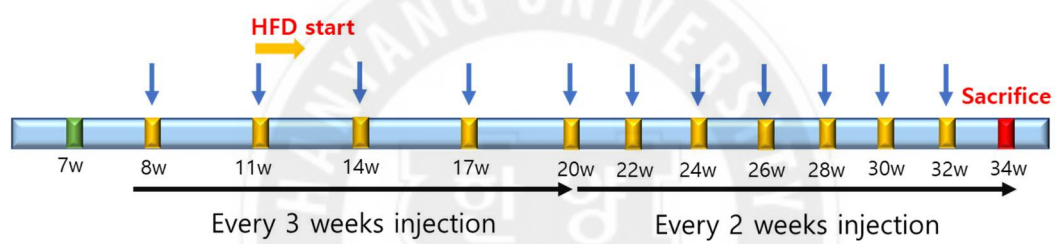


Figure 21. Animal experimental plan of Study-2

Table 4. Animal experimental groups in Study-2.

Group	Diet	Injection
Lean (n=8)	Normal diet	Only PBS
Obese (n=9)		Only PBS
Mock (n=9)		PBS+Alum+PHAD
3HOTP-30 (n=8)	60% High fat diet	PBS+Alum+PHAD+OTP3 30 ug
3HOTP-50 (n=8)		PBS+Alum+PHAD+OTP3 50 ug

3.2.1. 체중 증가 억제 효능 확인

마우스의 체중 변화를 확인하기 위하여 7 주령부터 매주 2 회 체중을 측정하였다. 8 주령부터 3 주 간격으로 계속 주사를 진행하였으며, 20 주령부터는 2 주 간격 주사하면서 체중 증가 억제 효능을 확인하였다.

고지방식이를 시작하기 전 11 주령까지는 모든 실험군에서 체중이 동일하게 증가하였으며, 이후 고지방식이를 시작한 11 주령 때부터 비만군과 위약군은 체중이 급격하게 증가한 후 22 주령부터 체중이 약 50 g으로 유지되는 것을 확인하였다 (Figure 22). 3HOTP 접종군은 2 차 접종 이후 비만군보다 체중 증가가 억제하였지만, 연구-1의 효능 분석 실험의 2 주 간격 접종 결과 (Figure 16)보다 체중 억제 효능이 감소한 것을 확인하였다. 이는 3 주 간격 접종 시 생성된 항체의 소모가 과도한 고지방식이에 의해 빨리 진행되어 체중 억제 효능이 감소되었을 것으로 사료된다. 또한 2 주 간격 주사를 실시한 20 주령부터는 체중이 증가하지 않고 유지되는 것을 확인하였다. 이는 비만면역치료제 3HOTP의 계속된 접종 효과로 지속적으로 생성된 항체가 체중 증가를 억제하여 유지시키는 것을 확인하였다.

또한 3HOTP 30 ug 접종군과 50 ug 접종군에서 체중 증가 억제능에는 차이가 없음을 확인하였다. 다른 비만치료제 약물의 경우 약물의 양이 체중 억제 효능에 영향을 미치는 것과 다르게, 3HOTP는 백신 형태의 약물로 약물 자체가 효능을 가는 것이 아니라 펩타이드 접종에 의해 유도된 항체가 체중 억제 작용하는 약물이므로 접종 양에는 효능에 큰 차이가 없는 것을 확인하였다.

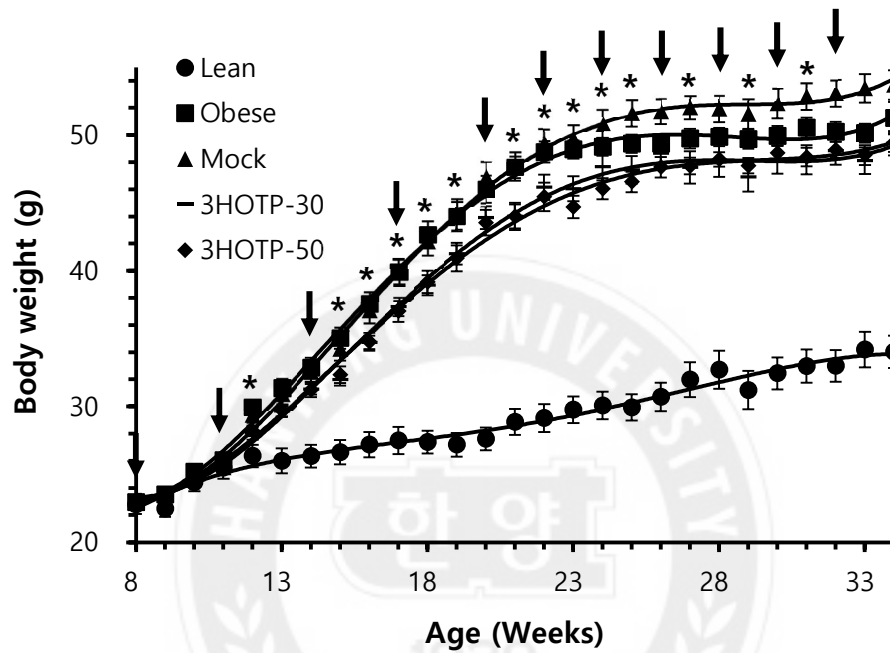


Figure 22. Inhibition effect of weight gain by 3HOTP injection according to injection dose and cycle (Study-2). Body weight curve. Lean group: chow-fed with PBS injection (n=8), Obese group: HFD-fed with PBS injection (n=9), Mock group: HFD-fed with mock injection without peptide (n=9), 3HOTP-30: HFD-fed with 30 ug 3HOTP injection (n=8), 3HOTP-50: HFD-fed with 50 ug 3HOTP injection (n=8). Injections (arrows) were given at 8, 11, 14, 17, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 weeks of age and HFD was started at 11 weeks of age. Error bars indicate means \pm s.e.m. *: $p < 0.05$, statistically significant difference between obese and 3HOTP-50.

3.2.2. Indirect ELISA 법을 이용한 항체 역가 측정

항체 역가는 9 주령부터 주사 일주일 후에 안와 정맥을 통해 채혈하여 혈청 분리 후 Indirect ELISA법을 이용하여 측정하였다. pB4를 항원으로 ELISA를 수행하였으며, 450 nm에서 흡광도가 0.5 OD값이 되는 dilution factor 값을 항체 역가 값으로 정하였다.

그 결과, 이전 실험과 동일하게 정상군에서는 항체 역가 값이 측정되지 않았으며, 비만군과 위약군에서는 적은 양의 항체 역가 값이 나오는 것을 확인하였다. 3HOTP 접종군에서는 2 번째 접종 이후 항체 유도가 잘 되어 추가 접종 이후 계속해서 증가한 이후 20 주령 이후에는 계속된 접종으로 항체 농도가 유지되는 것을 확인하였다 (Figure 23).

또한 항체 역가 값이 3HOTP 30 ug과 50 ug 접종군에서 초기 접종 시에는 항체 역가에 차이가 있지만 전체적으로는 유의미한 차이가 없음을 확인하였다. 즉 3HOTP 접종량이 유도된 항체 농도에는 큰 영향이 없음을 확인하였다.

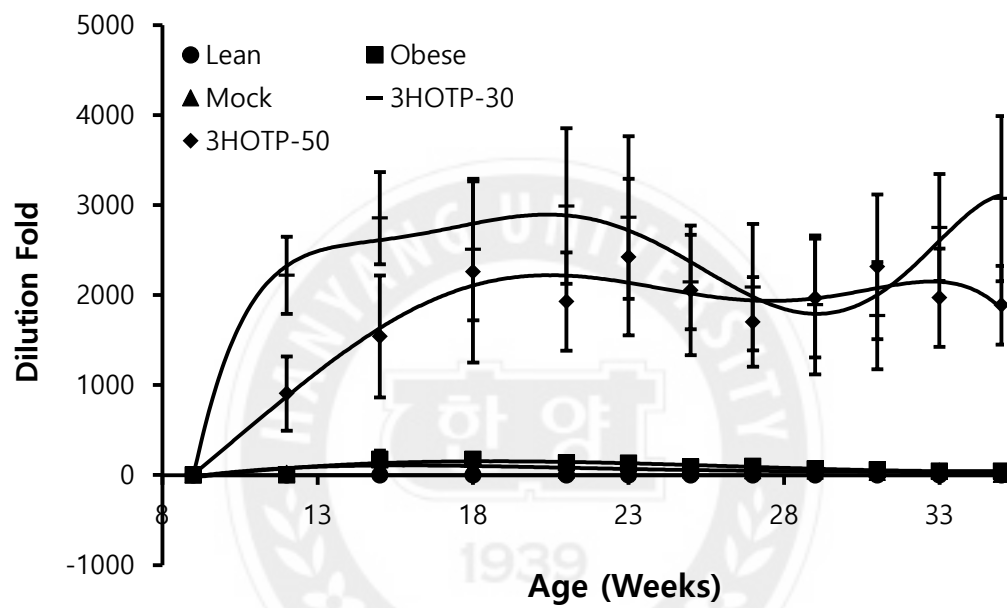


Figure 23. Titration of anti-pB1 antibody in Study-2. Antibody titer was determined as dilution fold that indicates the absorbance read-out of 0.5 at 450 nm. bars indicate means \pm s.e.m.

3.3. 비만 유도 이후의 3HOTP 접종에 의한 항 비만 효과 확인

(연구-3)

비만 유도 이후 3HOTP 접종에 의한 체중 증가 억제 효과를 확인하기 위하여 본 실험은 가천대 길병원의 이길여 암당뇨연구원 (인천, 한국)과 공동 연구로 진행하였다. 6 주령부터 정상군을 제외한 모든 실험군에 60% 고지방식이를 5 주 동안 먹여 비만을 먼저 유도한 후 11 주령부터 2 주 간격으로 총 4 번을 주사하였다 (Figure 24). 실험군은 정상식이 대조군 (정상군, Lean), 위약 투약 비만군 (비만군, Obese), 3HOTP 접종군 (3HOTP) 총 3개로 나누어 진행하였으며, 주사 방법은 연구-1의 효능 분석 실험과 동일하게 진행하였다 (Table 5).



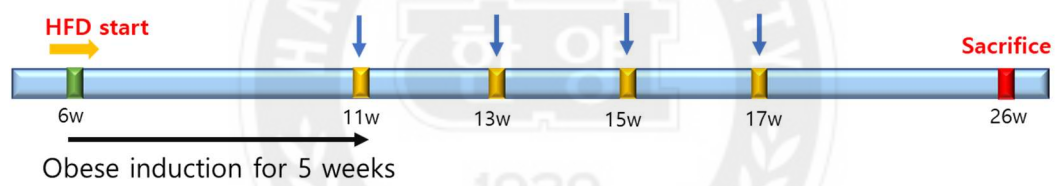


Figure 24. Animal experimental plan of Study-3

Table 5. Animal experimental groups in Study-3

Group	Diet	Injection
Lean (n=10)	Normal diet	PBS+Alum+PHAD
Obese (n=10)	60% High fat diet	PBS+Alum+PHAD
3HOTP (n=10)		PBS+Alum+PHAD+OTP3

3.3.1. 체중 증가 억제 효능 확인

먼저 비만을 유도하기 위해 비만군과 3HOTP 접종군은 6 주령부터 60% 고지방식이를 시작하였으며, 11 주령부터 2 주 간격으로 총 4 회 접종을 진행하였다. 매주 2 회 체중 측정으로 마우스의 체중 변화를 확인하였다 (Figure 25).

정상군은 전체 실험기간 동안 약 25 g으로 체중이 유지되는 것을 확인하였으며, 11 주령 때 비만을 유도한 비만을 유도한 위약군과 3HOTP 접종군은 약 30 g으로 정상군과 약 5 g의 무게 차이가 나는 것을 확인하였다 (Figure 25A). 3HOTP 접종군에서 3HOTP 접종 기간 동안 (11 주령부터 19 주령까지), 2 번째 접종 이후 효과적으로 체중 증가가 억제되어 체중이 약 30 g으로 유지되는 것을 확인하였다 (Figure 25A). 이는 2 번째 접종부터 양질의 IgG 항체가 생성되어 아포지단백-B100의 기능을 차단하여 효과적으로 체내의 지방 축적을 억제하기 때문이라 사료된다.

또한 4 회 접종 이후 25 주령까지 체중 변화를 확인한 결과, 19주령부터는 체중 억제 효과가 사라져 지속된 고지방식이에 의해 체중이 다시 증가되는 것을 확인하였다 (Figure 25B).

이는 추가 접종이 없어 생성된 항체가 빠르게 소진되면서 아포지단백-B100의 기능을 차단하지 못하여 체중 억제 효과가 사라지는 것으로 사료된다. 이는 혈중 내 항체 농도에 따라 3HOTP의 추가 접종을 적절하게 조절해야 체중 억제 효능을 지속할 수 있음을 의미한다.

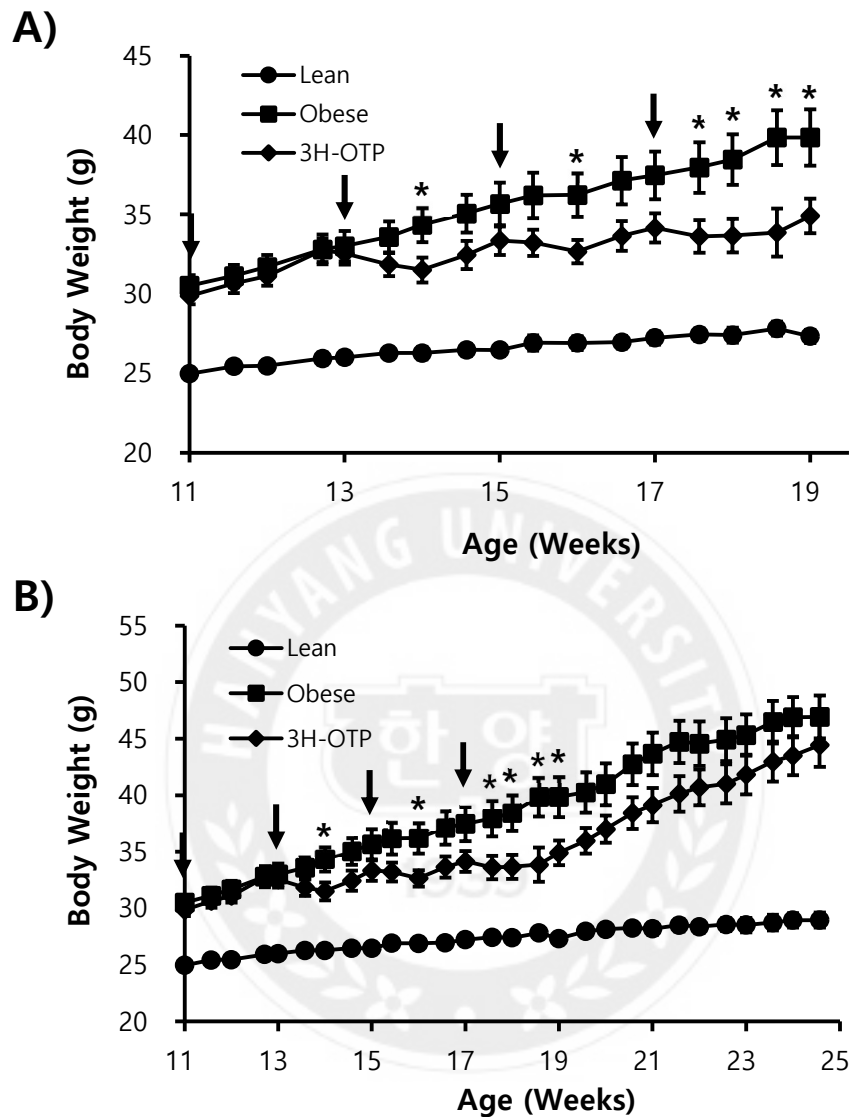


Figure 25. Inhibition effect of weight gain by 3HOTP injection after obesity induction (Study-3). A) Body weight curve from 11 weeks to 19 weeks of age during the 3HOTP injection period, B) Body weight curve from 11 weeks to 25 weeks of age, which is the entire experimental period. Lean group: chow-fed with PBS injection (n=10), Obese group: HFD-fed with mock injection without peptide (n=10), 3HOTP: HFD-fed with 50 ug 3HOTP injection (10=6). Injections (arrows) were given at 11, 13, 15, 17 weeks of age. Error bars in A and B indicate means \pm s.e.m. *: $p < 0.05$, statistically significant difference between obese and 3HOTP.

3.3.2. 전신 체지방 함량 변화 분석

전신 체지방 함량 분석은 가천대 길병원의 이길여 암당뇨연구원에서 수행하였다. 2 주 간격으로 Mini-spec (LF-90II, Bruker Optics GmbH)를 이용하여 측정하였다. Mini-spec 장비는 ^1H (hydrogen)과 ^{19}F (fluorine)를 측정하는 NMR 분석기로 시간-도메인 신호인 자유유도붕괴 (free induction decay) 데이터로부터 물과 지방 간의 스핀-스핀 이완시간 (spin-spin relaxation time)의 차이를 이용하여 생체 내에서 3 분 이내로 마취 없이 전신 체지방 함량을 측정하였다.

3HOTP 접종 기간 동안의 전신 체지방 함량을 분석한 결과, 3HOTP 접종군에서 2 차 접종 시점인 13 주령부터 효과적으로 전신 체지방 량이 증가하지 않고 10 g으로 지속적으로 유지되는 것을 확인하였다 (Figure 26). 또한 19 주령 때 비만군과 3HOTP 접종군의 전신 체지방 량이 약 5 g 차이가 나는 것을 확인하였는데, 이는 체중에서도 약 5 g의 차이를 보이는 것과 동일한 것을 확인하였다.

결론적으로 3HOTP 접종에 의해 유도된 항체가 지방입자에 결합하여 전신의 조직 내로 지방의 흡수 및 축적을 차단하기 때문에 효과적으로 체내 지방 축적이 억제되어 체중 증가가 억제된 것을 의미한다.

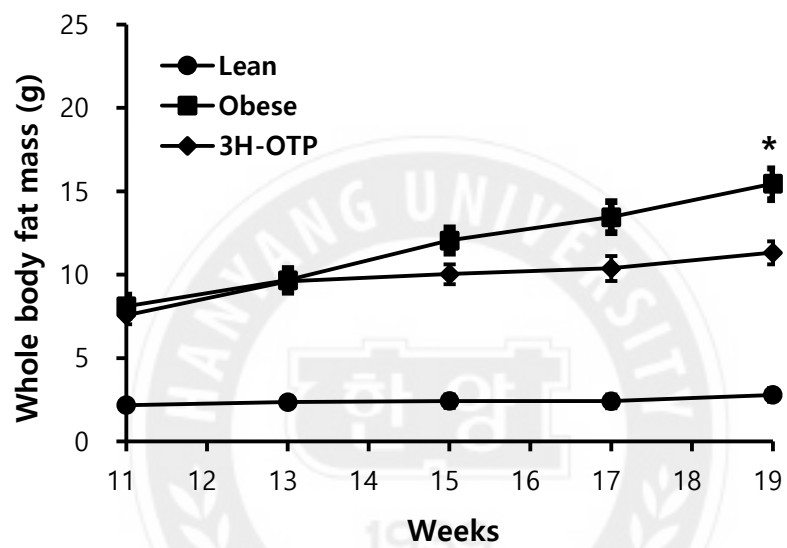


Figure 26. Analysis of whole-body fat mass in Study-3. It shows the result of whole-body fat mass from 11 weeks to 19 weeks of age during the 3HOTP vaccination period. Error bars indicate means \pm s.e.m. *; $p < 0.05$, statistically significant difference between obese and 3HOTP.

3.4. 면역결핍 마우스에서의 3HOTP 접종에 의한 항 비만 효과 확인 (연구-4)

면역능이 결핍된 마우스에서의 3HOTP의 항 비만 효능을 확인하였다. 3HOTP는 아포지단백-B100에 대한 항체 생성을 유도하여 아포지단백-B100의 기능을 차단하여 체내 지방 축적을 억제하여 비만을 예방, 치료하는 기전을 가지고 있다. 본 실험에서는 Rag2 (Recombination activating gene 2) 유전자를 제거하여 면역능이 결핍된 C57BL/6J-*Rag2^{em1hwl}*/Kor1 마우스에서 3HOTP 접종 후 항 비만 효능을 확인하였다.

마우스 그룹은 정상 유전자형 (Wild, +/+) 암컷 7 마리, 수컷 1 마리, 이종 유전자형 (Hetero, +/-) 암컷 3 마리, 수컷 3 마리, 동종 유전자형 (Homo, -/-) 암컷 3 마리, 수컷 1 마리로 11 주령 마우스를 식품의약품 안전평가원에서 분양 받아서 실험에 사용하였다. 정상 유전자형 (Wild, +/+) 암컷 3 마리를 정상식이 대조군 (정상군, Lean)으로 사용하였으며, 나머지 실험군은 60% 고지방식이를 먹이면서 11 주령부터 2 주 간격으로 총 4 번을 주사하였으며 (Figure 27), 주사방법은 연구-1 효능 분석 실험과 동일하게 진행하였다 (Table 6).

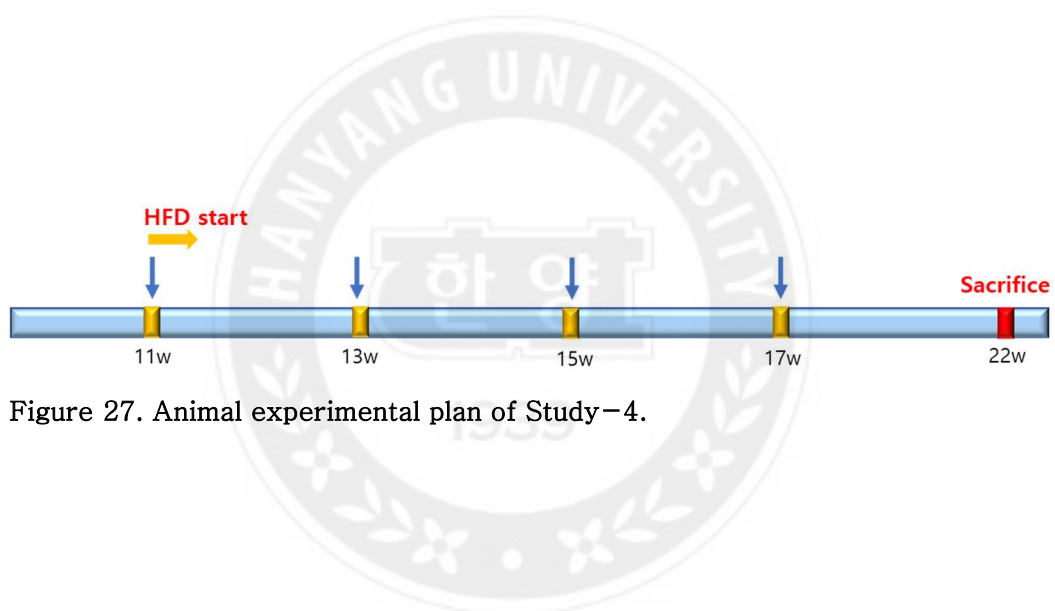


Figure 27. Animal experimental plan of Study-4.

Table 6. Animal experimental groups in Study-4

Group		Diet	Injection
Wild (+/+)	Female, n=3	Normal diet	Only PBS
Wild (+/+)	Female, n=3	60% High fat diet	PBS+Alum+PHAD +OTP3
	Male, n=1		
Hetero (+/-)	Female, n=3		
	Male, n=3		
Homo (-/-)	Female, n=3		
	Male, n=1		

3.4.1. 체중 증가 억제 효능 확인

정상 유전자형 (Wild, +/+) 암컷 3 마리를 제외하고 60% 고지방 식이를 먹이면서 11 주령부터 2 주 간격으로 총 4 회 주사를 진행하였으며, 매주 2 회 체중 측정 후 마우스의 체중 변화를 확인하였다. 각 실험군의 실험 시작 때 그룹별 평균 무게에 차이가 커서, 실험 종료 시점인 18 주령까지 7 주 동안의 무게 증가량을 확인하였다 (Figure 28).

그 결과, 정상군은 7 주 동안 약 3 g 체중이 증가하였으며, Rag2 유전자가 존재하는 암컷 이종 유전자형 (Hetero, +/-) 접종군은 약 3 g 증가하였으며, 암컷 정상 유전자형 (Wild, +/+) 접종군은 약 4.5 g 증가한 것을 확인하였다. 반면 Rag2 유전자가 없어 항체가 형성되지 않는 암컷 동종 유전자형 (Homo, -/-) 접종군은 약 6.5 g으로 다른 접종군보다 약 2 배 체중이 증가하여 비만 억제 효과가 없음을 확인하였다. 수컷에서도 암컷과 동일하게 이종 유전자형 (Hetero, +/-) 접종군의 효과가 가장 좋으며, 동종 유전자형 (Homo, -/-) 접종군에서는 효과가 없는 것을 확인하였다 (Figure 28).

이는 면역능이 결핍되어 3HOTP 접종에도 아포지단백-B100을 인식하는 항체가 생성되지 않으며 이로 인해 체중 증가를 억제하지 못하는 것을 의미한다.

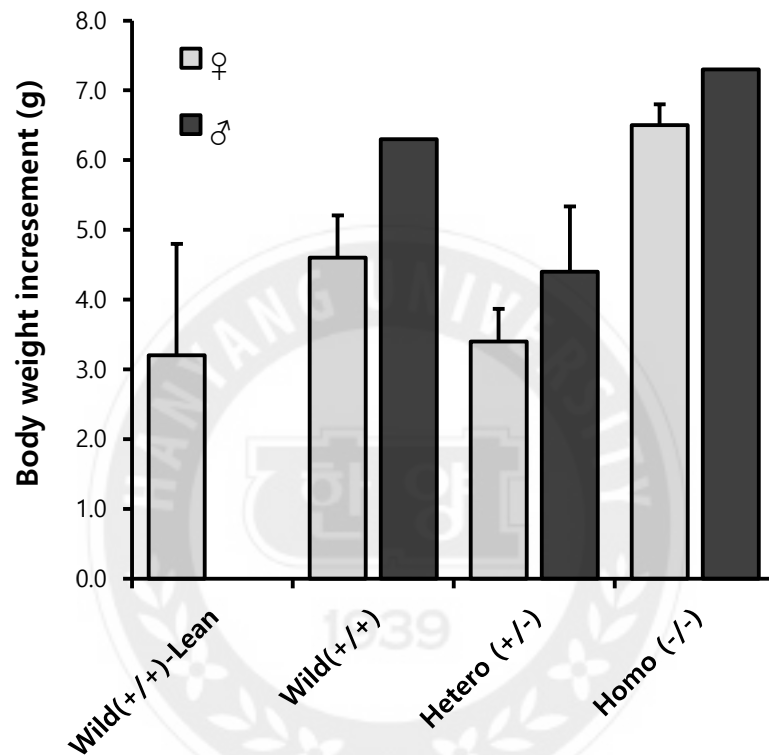


Figure 28. Weight gain in Study-4. It shows the weight gain in C57BL/6J-*Rag2^{em1hwl}*/Korl mice during 7 weeks. Wild (+/+) lean group: chow-fed with PBS injection (n=3), Wild (+/+, n=4), Hetero (+/-, n=6), Homo (-/-, n=4) group: HFD-fed with 50 ug 3HOTP injection.

3.4.2. Indirect ELISA 법을 이용한 항체 역가 측정

항체 역가는 12 주령부터 2 주 간격으로 안와 정맥을 통해 채혈하여 혈청 분리 후 Indirect ELISA법을 이용하여 측정하였다. pB4를 항원으로 사용하여 ELISA를 수행하였으며, 450 nm에서 흡광도가 0.5 OD값이 되는 희석 배수 값을 항체 역가 값으로 정하였다. 항체 역가 값은 성별에 관계없이 그룹 별로 평균값을 구하여 확인하였다.

그 결과, 3HOTP를 접종한 정상 유전자형 (Wild, +/+) 접종군과 이종 유전자형 (Hetero, +/-) 접종군에서 항체 역가가 지속적인 접종에 의해 증가하는 것을 확인하였으며, 이종 유전자형 (Hetero, +/-) 접종군에서 생성된 항체 농도가 정상 유전자형 (Wild, +/+) 접종군과 비교하여 감소된 것을 확인하였다. 반면에, 동종 유전자형 (Homo, -/-) 접종군에서는 항체가 전혀 생성되지 않은 것을 확인하였다 (Figure 29).

이 결과를 통해 Rag2 유전자가 결핍된 마우스에서는 3HOTP 접종으로 항체가 형성되지 않으며, 체중 억제 효과도 없음을 확인하였다. 이는 3HOTP의 접종에 의한 아포지단백-B100을 인식하는 항체 생성이 체중 억제에 아주 중요하게 작용하는 것을 의미한다.

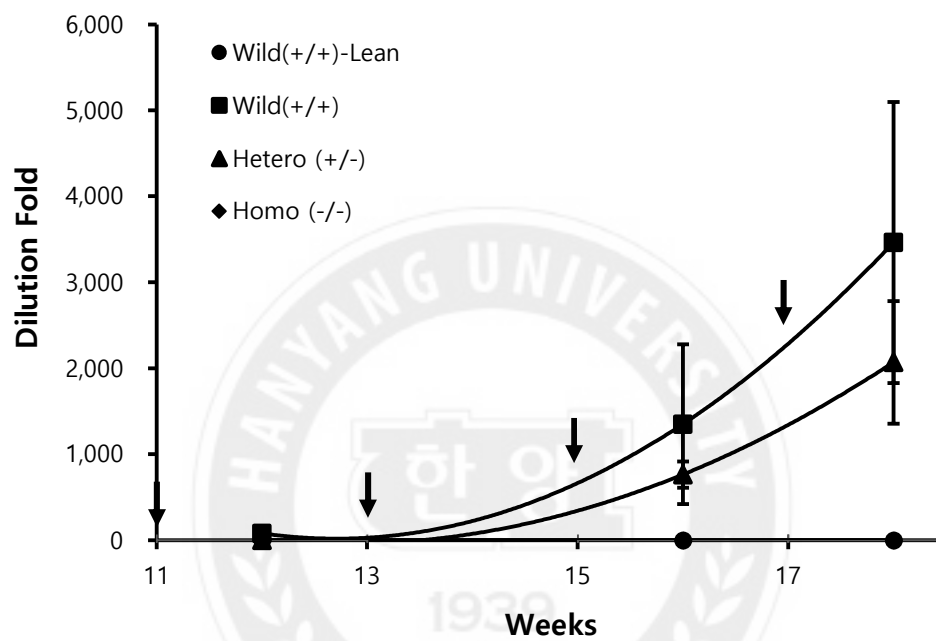


Figure 29. Titration of anti-pB1 antibody in Study-4. Antibody titer was determined as dilution fold that indicates the absorbance read-out of 0.5 at 450 nm. Injections (arrows) were given at 11, 13, 15, 17 weeks of age. Error bars indicate means \pm s.e.m.

4. 결론

아포지단백-B100을 인식하는 자가항체가 비만에 의해 생성되었다가 소모 소진되어 감소하는 것에 착안하여, 비만면역치료제 3HOTP 접종에 의해 인위적인 아포지단백-B100 항체 생성 유도에 따른 비만의 예방 및 치료 효과를 확인하였다.

연구-1의 효능 분석에서는 초기 2 주 간격 접종에 의해 생체 내 면역계를 자극하여 항체 생성이 유도됨에 따라 비만치료제로서의 효과적인 체중 억제 효과를 확인하였으며, 노화에 따라 면역 활성이 저하된 경우에는 항체 형성이 저하되어 체중 억제 효능이 악화되는 것을 확인하였다. 연구-2의 효능 분석에서는 3HOTP가 백신 형태의 약물로 약물 자체가 효능을 가지는 것이 아니라 접종에 의해 유도된 항체가 효능을 가지므로 접종 양이 체중 억제 효능에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 또한 3 주 간격 접종 시 지속된 고지방식으로 인해 생성된 항체의 빠른 소진으로 체중 억제 효능이 2 주 간격 접종보다 감소한 것을 확인하였다. 이들 실험들을 통해, 3HOTP 접종으로 체내에 생성된 항체가 소진되는 시점에 따라 주사 간격을 조절하여야 하며, 체내 항체 농도에 따라 지속적인 접종이 체중 억제에 효과적임을 확인하였다. 연구-3의 효능 분석에서는 비만이 유도된 마우스에서 3HOTP 접종에 의해 양질의 IgG 항체가 생성되는 2 차 접종 때부터 효과적으로 체중 억제 효능이 나타나 체중이 유지되는 것을 확인하였다. 또한 전신체지방량 분석을 통해 3HOTP 접종이 체내 지방 축적을 효과적으로 억제시키는 것을 확인하였다. 마지막으로 연구-4의 효능 분석에서는 면역능이 결핍된 마우스에서 3HOTP 접종을 해도 아포지단백-B100 항체 생성이 유도되지 않았으며, 또한 체중 억제에도 영향이 없음을 확인하였다. 이는 3HOTP 접종에 의한 체내 아포지단백-B100 항체 생성 유도가 체중 억제에 중요한 것을 의미한다.

결론적으로 3HOTP 접종으로 생체 내 면역계를 자극하여 아포지단백-B100을 교차 인식하는 항체의 생성 유도는 체내 지방의 축적을 차단하여 체중의 증가를 억제하여 효과적으로 비만을 예방 및 치료하는 것을 입증하였다.

이는 선행 연구를 통해 장기 반복 투여에 대한 독성이 없으며, 동맥경화를 유발하지 않는 것을 확인하였기 때문에 (이희중 2011, Kong, Choe et al. 2017), 비만을 예방하고 치료하는 비만면역치료제로서의 가능성을 제시하였다. 또한 기존의 비만치료제와 다른 새로운 기전의 체내 면역계를 자극하는 백신 형태의 예방 및 치료 가능성을 제시하는데 큰 의미가 있다고 할 수 있다.



참고 문헌

- Alexander, J., M. F. del Guercio, A. Maewal, L. Qiao, J. Fikes, R. W. Chesnut, J. Paulson, D. R. Bundle, S. DeFrees and A. Sette (2000). "Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses." J Immunol **164**(3): 1625–1633.
- Amirfakhryan, H. (2020). "Vaccination against atherosclerosis: An overview." Hellenic J Cardiol **61**(2): 78–91.
- Appari, M., K. M. Channon and E. McNeill (2018). "Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes." Antioxid Redox Signal **29**(3): 297–312.
- Arai, S., N. Maehara, Y. Iwamura, S. Honda, K. Nakashima, T. Kai, M. Ogishi, K. Morita, J. Kurokawa, M. Mori, Y. Motoi, K. Miyake, N. Matsushashi, K. Yamamura, O. Ohara, A. Shibuya, E. K. Wakeland, Q. Z. Li and T. Miyazaki (2013). "Obesity–associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells." Cell Rep **3**(4): 1187–1198.
- Arai, S. and T. Miyazaki (2014). "Impacts of the apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) on obesity–associated inflammatory diseases." Semin Immunopathol **36**(1): 3–12.
- Arai, S., J. M. Shelton, M. Chen, M. N. Bradley, A. Castrillo, A. L. Bookout, P. A. Mak, P. A. Edwards, D. J. Mangelsdorf, P. Tontonoz and T. Miyazaki (2005). "A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Ap16 in atherosclerosis development." Cell Metab **1**(3): 201–213.

- Biswas, S. K. and A. Mantovani (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." Nat Immunol **11**(10): 889–896.
- Bjorkbacka, H., R. Alm, M. Persson, B. Hedblad, J. Nilsson and G. N. Fredrikson (2016). "Low Levels of Apolipoprotein B-100 Autoantibodies Are Associated With Increased Risk of Coronary Events." Arterioscler Thromb Vasc Biol **36**(4): 765–771.
- Boes, M. (2000). "Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses." Mol Immunol **37**(18): 1141–1149.
- Chyu, K. Y., X. Zhao, P. C. Dimayuga, J. Zhou, X. Li, J. Yano, W. M. Lio, L. F. Chan, J. Kirzner, P. Trinidad, B. Cercek and P. K. Shah (2012). "CD8+ T cells mediate the athero-protective effect of immunization with an ApoB-100 peptide." PLoS One **7**(2): e30780.
- Chyu, K. Y., X. Zhao, O. S. Reyes, S. M. Babbidge, P. C. Dimayuga, J. Yano, B. Cercek, G. N. Fredrikson, J. Nilsson and P. K. Shah (2005). "Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice." Biochem Biophys Res Commun **338**(4): 1982–1989.
- Costantino, L. and D. Barlocco (2015). "New perspectives on the development of antiobesity drugs." Future Med Chem **7**(3): 315–336.
- Coutinho, A., M. D. Kazatchkine and S. Avrameas (1995). "Natural autoantibodies." Curr Opin Immunol **7**(6): 812–818.
- Elkon, K. and P. Casali (2008). "Nature and functions of autoantibodies." Nat Clin Pract Rheumatol **4**(9): 491–498.
- Filippatos, T. D., T. V. Panagiotopoulou and M. S. Elisaf (2014). "Adverse Effects of GLP-1 Receptor Agonists." Rev Diabet Stud **11**(3–4): 202–230.

- Frasca, D., A. Diaz, M. Romero, S. Thaller and B. B. Blomberg (2018). "Secretion of autoimmune antibodies in the human subcutaneous adipose tissue." PLoS One **13**(5): e0197472.
- Fredrikson, G. N., G. Berglund, R. Alm, J. A. Nilsson, P. K. Shah and J. Nilsson (2006). "Identification of autoantibodies in human plasma recognizing an apoB-100 LDL receptor binding site peptide." J Lipid Res **47**(9): 2049–2054.
- Fredrikson, G. N., H. Bjorkbacka, I. Soderberg, I. Ljungcrantz and J. Nilsson (2008). "Treatment with apo B peptide vaccines inhibits atherosclerosis in human apo B-100 transgenic mice without inducing an increase in peptide-specific antibodies." J Intern Med **264**(6): 563–570.
- Fredrikson, G. N., B. Hedblad, G. Berglund, R. Alm, M. Ares, B. Cercek, K. Y. Chyu, P. K. Shah and J. Nilsson (2003). "Identification of immune responses against aldehyde-modified peptide sequences in apoB associated with cardiovascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(5): 872–878.
- Fredrikson, G. N., A. Schiopu, G. Berglund, R. Alm, P. K. Shah and J. Nilsson (2007). "Autoantibody against the amino acid sequence 661–680 in apo B-100 is associated with decreased carotid stenosis and cardiovascular events." Atherosclerosis **194**(2): e188–192.
- Fredrikson, G. N., I. Soderberg, M. Lindholm, P. Dimayuga, K. Y. Chyu, P. K. Shah and J. Nilsson (2003). "Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(5): 879–884.
- Fujisaka, S., I. Usui, A. Bukhari, M. Ikutani, T. Oya, Y. Kanatani, K. Tsuneyama, Y. Nagai, K. Takatsu, M. Urakaze, M. Kobayashi and K. Tobe (2009). "Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2

- macrophages in diet-induced obese mice." Diabetes **58**(11): 2574–2582.
- Ghaffari–Nazari, H., J. Tavakkol–Afshari, M. R. Jaafari, S. Tahaghoghi–Hajghorbani, E. Masoumi and S. A. Jalali (2015). "Improving Multi–Epitope Long Peptide Vaccine Potency by Using a Strategy that Enhances CD4+ T Help in BALB/c Mice." PLoS One **10**(11): e0142563.
- Gistera, A. and G. K. Hansson (2017). "The immunology of atherosclerosis." Nat Rev Nephrol **13**(6): 368–380.
- Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." Cell **104**(4): 503–516.
- Goncalves, I., M. Nitulescu, M. P. Ares, G. N. Fredrikson, B. Jansson, Z. C. Li and J. Nilsson (2009). "Identification of the target for therapeutic recombinant anti–apoB–100 peptide antibodies in human atherosclerotic lesions." Atherosclerosis **205**(1): 96–100.
- Grant, R., Y. H. Youm, A. Ravussin and V. D. Dixit (2013). "Quantification of adipose tissue leukocytosis in obesity." Methods Mol Biol **1040**: 195–209.
- Grundtman, C. and G. Wick (2011). "The autoimmune concept of atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **22**(5): 327–334.
- Guilherme, A., J. V. Virbasius, V. Puri and M. P. Czech (2008). "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 367–377.
- Haase, J., U. Weyer, K. Immig, N. Kloting, M. Bluher, J. Eilers, I. Bechmann and M. Gericke (2014). "Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity–induced inflammation." Diabetologia **57**(3): 562–571.

- Hansson, G. K. and P. Libby (2006). "The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **6**(7): 508–519.
- Hartz, A. J., D. C. Rupley, Jr., R. D. Kalkhoff and A. A. Rimm (1983). "Relationship of obesity to diabetes: influence of obesity level and body fat distribution." Prev Med **12**(2): 351–357.
- Hayek, T., M. Kaplan, R. Kerry and M. Aviram (2007). "Macrophage NADPH oxidase activation, impaired cholesterol fluxes, and increased cholesterol biosynthesis in diabetic mice: a stimulatory role for D-glucose." Atherosclerosis **195**(2): 277–286.
- Herbin, O., H. Ait-Oufella, W. Yu, G. N. Fredrikson, B. Aubier, N. Perez, V. Barateau, J. Nilsson, A. Tedgui and Z. Mallat (2012). "Regulatory T-cell response to apolipoprotein B100-derived peptides reduces the development and progression of atherosclerosis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(3): 605–612.
- Iseme, R. A., M. McEvoy, B. Kelly, L. Agnew, F. R. Walker, T. Handley, C. Oldmeadow, J. Attia and M. Boyle (2017). "A role for autoantibodies in atherogenesis." Cardiovasc Res **113**(10): 1102–1112.
- Ivanov, S., J. Merlin, M. K. S. Lee, A. J. Murphy and R. R. Guinamard (2018). "Biology and function of adipose tissue macrophages, dendritic cells and B cells." Atherosclerosis **271**: 102–110.
- Kanda, H., S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira and M. Kasuga (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." J Clin Invest **116**(6): 1494–1505.
- Kanneganti, T. D. and V. D. Dixit (2012). "Immunological complications of obesity." Nat Immunol **13**(8): 707–712.

- Ketelhuth, D. F., F. J. Rios, Y. Wang, H. Liu, M. E. Johansson, G. N. Fredrikson, U. Hedin, M. Gidlund, J. Nilsson, G. K. Hansson and Z. Q. Yan (2011). "Identification of a danger-associated peptide from apolipoprotein B100 (ApoBDS-1) that triggers innate proatherogenic responses." Circulation **124**(22): 2433–2443, 2431–2437.
- Kim, H. J., H. J. Lee, J. S. Choi, J. Han, J. Y. Kim, H. K. Na, H. J. Joung, Y. S. Kim and B. Binas (2016). "An apolipoprotein B100 mimotope prevents obesity in mice." Clin Sci (Lond) **130**(2): 105–116.
- Kimura, T., K. Tse, A. Sette and K. Ley (2015). "Vaccination to modulate atherosclerosis." Autoimmunity **48**(3): 152–160.
- Kissebah, A. H., N. Vydelingum, R. Murray, D. J. Evans, A. J. Hartz, R. K. Kalkhoff and P. W. Adams (1982). "Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity." J Clin Endocrinol Metab **54**(2): 254–260.
- Klingenberg, R., M. Lebens, A. Hermansson, G. N. Fredrikson, D. Strodthoff, M. Rudling, D. F. Ketelhuth, N. Gerdes, J. Holmgren, J. Nilsson and G. K. Hansson (2010). "Intranasal immunization with an apolipoprotein B-100 fusion protein induces antigen-specific regulatory T cells and reduces atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(5): 946–952.
- Kobiyama, K., R. Saigusa and K. Ley (2019). "Vaccination against atherosclerosis." Curr Opin Immunol **59**: 15–24.
- Kong, S. K., M. K. Choe, H. J. Kim, Y. S. Kim, B. Binas and H. J. Kim (2017). "An ApoB100-mimetic vaccine prevents obesity and liver steatosis in ApoE-/- mice." Pharmacol Rep **69**(6): 1140–1144.
- Kurokawa, J., S. Arai, K. Nakashima, H. Nagano, A. Nishijima, K. Miyata, R. Ose, M. Mori, N. Kubota, T. Kadowaki, Y. Oike, H. Koga, M. Febbraio, T. Iwanaga and T. Miyazaki (2010). "Macrophage-derived AIM is

- endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity." Cell Metab **11**(6): 479–492.
- Liu, J., A. Divoux, J. Sun, J. Zhang, K. Clement, J. N. Glickman, G. K. Sukhova, P. J. Wolters, J. Du, C. Z. Gorgun, A. Doria, P. Libby, R. S. Blumberg, B. B. Kahn, G. S. Hotamisligil and G. P. Shi (2009). "Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet–induced obesity and diabetes in mice." Nat Med **15**(8): 940–945.
- Luan, Y. and H. R. Griffiths (2006). "Ceramides reduce CD36 cell surface expression and oxidised LDL uptake by monocytes and macrophages." Arch Biochem Biophys **450**(1): 89–99.
- Lumeng, C. N., J. B. DelProposto, D. J. Westcott and A. R. Saltiel (2008). "Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes." Diabetes **57**(12): 3239–3246.
- McLeod, O., A. Silveira, G. N. Fredrikson, K. Gertow, D. Baldassarre, F. Veglia, B. Sennblad, R. J. Strawbridge, M. Larsson, K. Leander, B. Gigante, J. Kauhanen, R. Rauramaa, A. J. Smit, E. Mannarino, P. Giral, S. E. Humphries, E. Tremoli, U. de Faire, J. Ohrvik, J. Nilsson and A. Hamsten (2014). "Plasma autoantibodies against apolipoprotein B–100 peptide 210 in subclinical atherosclerosis." Atherosclerosis **232**(1): 242–248.
- Miyazaki, T., Y. Hirokami, N. Matsushashi, H. Takatsuka and M. Naito (1999). "Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage–derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine–rich domain superfamily." J Exp Med **189**(2): 413–422.

- Nilsson, J., H. Bjorkbacka and G. N. Fredrikson (2012). "Apolipoprotein B100 autoimmunity and atherosclerosis – disease mechanisms and therapeutic potential." Curr Opin Lipidol **23**(5): 422–428.
- Nilsson, J. and G. K. Hansson (2008). "Autoimmunity in atherosclerosis: a protective response losing control?" J Intern Med **263**(5): 464–478.
- Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S. Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadowaki and R. Nagai (2009). "CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." Nat Med **15**(8): 914–920.
- Noack, M. and P. Miossec (2014). "Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases." Autoimmun Rev **13**(6): 668–677.
- Odegaard, J. I. and A. Chawla (2013). "Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis." Science **339**(6116): 172–177.
- Olofsson, S. O. and J. Boren (2005). "Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis." J Intern Med **258**(5): 395–410.
- Rankin, W. and G. Wittert (2015). "Anti-obesity drugs." Curr Opin Lipidol **26**(6): 536–543.
- Ricciarelli, R., J. M. Zingg and A. Azzi (2000). "Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells." Circulation **102**(1): 82–87.
- Saltiel, A. R. (2016). "New therapeutic approaches for the treatment of obesity." Sci Transl Med **8**(323): 323rv322.

- Schipper, H. S., B. Prakken, E. Kalkhoven and M. Boes (2012). "Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism." Trends Endocrinol Metab **23**(8): 407–415.
- Sjogren, P., G. N. Fredrikson, A. Samnegard, C. G. Ericsson, J. Ohrvik, R. M. Fisher, J. Nilsson and A. Hamsten (2008). "High plasma concentrations of autoantibodies against native peptide 210 of apoB-100 are related to less coronary atherosclerosis and lower risk of myocardial infarction." Eur Heart J **29**(18): 2218–2226.
- Srivastava, G. and C. Apovian (2018). "Future Pharmacotherapy for Obesity: New Anti-obesity Drugs on the Horizon." Curr Obes Rep **7**(2): 147–161.
- Takahashi, K., S. Mizuarai, H. Araki, S. Mashiko, A. Ishihara, A. Kanatani, H. Itadani and H. Kotani (2003). "Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice." J Biol Chem **278**(47): 46654–46660.
- Tateya, S., F. Kim and Y. Tamori (2013). "Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance." Front Endocrinol (Lausanne) **4**: 93.
- Thorne, R. F., N. M. Mhaidat, K. J. Ralston and G. F. Burns (2007). "CD36 is a receptor for oxidized high density lipoprotein: implications for the development of atherosclerosis." FEBS Lett **581**(6): 1227–1232.
- Versini, M., P. Y. Jeandel, E. Rosenthal and Y. Shoenfeld (2014). "Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander." Autoimmun Rev **13**(9): 981–1000.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796–1808.

- Wick, G. and Q. Xu (1999). "Atherosclerosis—an autoimmune disease." Exp Gerontol **34**(4): 559–566.
- Wildbaum, G., M. A. Nahir and N. Karin (2003). "Beneficial autoimmunity to proinflammatory mediators restrains the consequences of self-destructive immunity." Immunity **19**(5): 679–688.
- Winer, D. A., S. Winer, L. Shen, P. P. Wadia, J. Yantha, G. Paltser, H. Tsui, P. Wu, M. G. Davidson, M. N. Alonso, H. X. Leong, A. Glassford, M. Caimol, J. A. Kenkel, T. F. Tedder, T. McLaughlin, D. B. Miklos, H. M. Dosch and E. G. Engleman (2011). "B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies." Nat Med **17**(5): 610–617.
- Winer, S., G. Paltser, Y. Chan, H. Tsui, E. Engleman, D. Winer and H. M. Dosch (2009). "Obesity predisposes to Th17 bias." Eur J Immunol **39**(9): 2629–2635.
- Wolf, D. and K. Ley (2019). "Immunity and Inflammation in Atherosclerosis." Circ Res **124**(2): 315–327.
- Yla-Herttuala, S., W. Palinski, S. W. Butler, S. Picard, D. Steinberg and J. L. Witztum (1994). "Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL." Arterioscler Thromb **14**(1): 32–40.
- Ylitalo, R., O. Jaakkola, P. Lehtolainen and S. Yla-Herttuala (1999). "Metabolism of modified LDL and foam cell formation in murine macrophage-like RAW 264 cells." Life Sci **64**(21): 1955–1965.
- Yurasov, S. and M. C. Nussenzweig (2007). "Regulation of autoreactive antibodies." Curr Opin Rheumatol **19**(5): 421–426.
- 김정운 (2018). 노령 마우스에서 비만에 따른 지방조직의 대식세포분극과 지방분해능의 분석, 석사, 한양대학교.

- 김치훈 (1997). Phage 에 발현시킨 Random peptide library 를 이용한 apolipoprotein A-I 과 apolipoprotein B-100 의 생쥐 단클론 항체에 대한 항원 결정기의 확인 석사, 한양대학교.
- 박하늘 (2011). C57BL/6 마우스에서 비만에 의해 유도되는 ApoB-100 에 대한 자가항체 연구, 석사, 한양대학교.
- 심명성 (2017). 비만 치료 백신에 의한 대식세포 재분극과 지방분해능 억제, 석사, 한양대학교.
- 이진일 (2004). T cell 에피토프의 융합에 의한 면역원성 증강 비만백신의 개발, 석사, 한양대학교.
- 이희종 (2011). 비만 억제 기능성 펩티드의 지방질대사 조절기작, 박사, 한양대학교.
- 정해중 (1999). Apolipoprotein B-100 에 대한 모조펩티드의 항 비만 백신 효과, 석사, 한양대학교.



Abstract

Study on the characteristics and therapeutic effects of an ApoB100 autoantibody induced by obesity

Moonkyung Choe

Department of Molecular & Life Science

The Graduate School

Hanyang University

Obesity is caused by various etiologies such as changes in metabolism, endocrine disturbances, gene expression and epigenetic factors, and changes in the intestinal microbiome, and in turn causes pathologies such as high blood pressure, myocardial infarction, and diabetes. Of potential importance, as obesity is induced, inflammatory reactions and specific immune cells are increased in the adipose tissue, resulting in a chronic immune response and the production of various autoantibodies. Notably, our laboratory found in previous studies that some of these autoantibodies recognize Apolipoprotein B-100 (ApoB100), the primary organizing protein of the lipid-carrying particles of the blood, in obese mice.

In the present Ph. D. Thesis, I studied the characteristics of autoantibodies that recognize ApoB100 in obese mice and humans, and then I investigated the potential therapeutic effects in mice by inducing Anti-ApoB100 antibodies via the injection of a synthetic peptide mimotope named 3HOTP (3H Obesity Immuno-Therapeutic Peptide). First, I confirmed that autoantibodies recognizing ApoB100 were induced in mice that received a high-fat diet. Remarkably, the autoantibody titers initially increased, but then decreased in the transition to severe obesity. Similarly, in humans, the concentration of autoantibodies increased as obesity progressed and then decreased when transitioning to severe obesity. This suggests that autoantibodies recognizing ApoB100 are produced and become involved in a natural therapeutic mechanism to remove fat

particles that accumulated in the body due to excessive fat absorption. I further found that the ApoB100 autoantibodies are of the IgG isotype and specifically recognize the p210 epitope of ApoB100. It has been known that arteriosclerotic patients produce autoantibodies against various ApoB100 epitopes; my new data now indicate that obese patients specifically produce autoantibodies that recognize the epitope p210. The findings suggest a scenario of obesity progression in which first ApoB100–p210 autoantibodies are generated that remove (V)LDL, and then autoantibodies against various epitopes are generated by the continuously accumulating native/modified (V)LDL. Importantly, I found that when 3HOTP was repeatedly injected to induce anti–ApoB100 antibodies using this autoantibody mechanism, the body weight increment was inhibited in high fat diet–fed mice, and the effect was maintained over the injection period and was paralleled by the ApoB100 antibody titers. These findings confirm the observations we have previously made with a recombinant vaccine. Further, obesity was effectively blocked by adjusting the injection cycle according to the antibody concentration in the blood.

In conclusion, I found that (i) both humans and mice show a biphasic, ApoB100–directed autoantibody response to obesity, suggesting a physiological role of the immune system in body weight control; (ii) injection of the peptide 3HOTP induces the production of ApoB100–specific antibodies, which are most likely responsible for the concomitantly observed suppression of weight gain. Compared with the previous, recombinant, version of an anti–obesity vaccine from our laboratory, the novel 3HOTP, also from our laboratory, presents a safer and more economical version with at least equal effect. We suggest that 3HOTP has a significant potential utility in a novel, vaccination–based anti–obesity treatment.

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.

2021년06월10일

학위명 : 박사

학과 : 분자생명과학과

지도교수 : Bert Binas

성명 : 최문경



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 10, 2021

Degree : Doctor

Department : DEPARTMENT OF MOLECULAR & LIFE SCIENCE

Thesis Supervisor : Bert Binas

Name : Choe MoonKyung


(Signature)