



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](#)

약학석사 학위논문

GR과 Bsx 특이적 상호작용 억제를 통한 비만 치료제 발견

Selective inhibition of Gc and Bsx activity in
ARC AgRP neurons reduces food intake and
improves Obesity

2020년 2월

서울대학교 대학원

약학대학 약물학 전공

김 인 태

초 록

GR과 Bsx 특이적 상호작용 억제를 통한 비만 치료제 발견

김인태

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

식욕을 촉진하는 신경전달물질인 agouti-related peptide (AgRP)는 시상하부 궁상핵(Arc)에서 합성되어 분비된다. 이때 전사인자인 Bsx와 GR(Gc수용체)가 상호 작용하여 Agrp의 전사를 조절한다고 보고되었다. 이러한 전사 활성화는 AgRP의 enhancer부위에 존재하는 Gc response element (AgRP-GRE)라는 특정 DNA 시퀀스에 의해 조절받는다. 따라서, 우리는 GR와 Bsx의 상호작용을 억제함으로써 GR의 다

큰 기능에는 영향이 없지만 AgRP의 발현만을 특이적으로 조절하여 식욕을 억제해 비만을 치료하는 물질을 발굴하고자 하였다.

우리는 HEK293T 세포에서 AgRP-GRE를 사용한 발광효소분석법을 통하여 Gc와 Bsx의 상호작용을 선택적으로 억제하는 저분자 물질을 선별하였다. 그뿐만 아니라 이 화합물이 GR이 작용하는 conventional한 GRE를 가지고 있는 MMTV-GRE에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 다음으로 이 물질을 마우스에 급성으로 복강 투여하였을 때, 시상하부 공상핵의 AgRP 발현량이 감소하는 것을 확인하였으며, 마우스의 몸무게가 감소하며 음식물 섭취량이 줄어드는 것을 확인하였다. 또한, 고지방식이를 통해 비만을 유도한 마우스에서 물질을 장기간 투여하였을 때 음식물 섭취가 대조군보다 현저히 감소하며, 그 결과로 비만 상태가 호전되는 것을 관찰하였다.

GR과 Bsx의 특이적 상호작용 저해는 다른 조직에는 큰 영향을 주지 않으면서 시상하부 신경세포에서 AgRP 등 섭식촉진 신경전달물질 발현을 억제하고 대사 상태를 개선함을 검증하였고, 본 연구를 통해 발

굶한 물질의 비만치료제로서의 가능성을 확인하였다.

주요어: Obesity, Gc, GR, Hypothalamus, ARC, Bsx, AgRP, Zj7

학번: 2018-24219

목 차

초 록.....	1
목 차.....	4
List of Abbreviations.....	5
List of Figures.....	6
List of Supplementary Data.....	7
I. 서 론.....	8
II. 실험 방법.....	12
III. 실험 결과.....	17
IV. 결론 및 고찰.....	44
V. 참고문헌.....	56
Abstract.....	61

List of Abbreviations

AgRP	Agouti-related peptide
ARC	Arcuate nucleus
BSX	Brain specific homeobox factor
DIO	Diet-induced obesity
Gc	Glucocorticoid
GHRH	Growth hormone-releasing hormone
GR	Glucocorticoid receptor
GTT	Glucose tolerance test
IHC	Immunohistochemistry
ITT	Insulin tolerance test
ISH	<i>In situ hybridization</i>
NPY	Neuropeptide Y
Otp	Orthopedia homeobox
POMC	Pro-opiomelanocortin

List of Figures

- Figure 1** Chemicals inhibit GR activity in AgRP-GRE specifically but not in conventional GRE
- Figure 2** Zj7 does not affect in cell viability in HEK293T
- Figure 3** Zj7 inhibits the interaction between GR and Bsx.
- Figure 4** Zj7 inhibits the expression of AgRP and NPY induced by fasting ARC neurons
- Figure 5** Zj7 reduces body weights and food intake and increased glucose homeostasis
- Figure 6** Zj7-treated DIO mice show decreased fat mass and higher energy expenditure
- Figure 7** Zj7 reduced body weight and food intake with or without leptin in lean mice.
- Figure 8** Zj7 reduces body weight and food intake in DIO mice
- Figure 9** Zj7 reduces body weight and food intake in *db/db* mice.
- Figure 10** Working model

List of Supplementary Data

- Figure 1** Zj7 inhibits the expression of AgRP/NPY in ARC neurons of DIO mice
- Figure 2** Zj7 does not affect the cell number of AgRP-/POMC-/TH- neurons in ARC
- Figure 3** Zj7 reduced lipogenetic gene's mRNA levels of liver and AgRP/NPY/UCP2 mRNA levels of hypothalamus.
- Figure 4** Zj7 reduced blood glucose level of lean mice
- Figure 5** The administration of leptin does not affect the cell number of neurons in ARC
- Figure 6** The leptin administration increased pSTAT3+ cells in Arc of hypothalamus

I. 서 론

전 세계적으로 비만 인구가 급격하게 증가하고 있다. 세계보건기구 WHO는 1996년, 비만을 질병으로 규정하였으며, 비만이 초래하는 건강 이상에 대하여 주의를 요구하고 있다. 조사에 따르면, 1980 년부터 2015년 동안 적어도 70개 이상의 국가에서 비만을 겪고 있는 인구가 두 배 이상 증가한 것으로 보인다 (New England Journal of Medicine 377.1 (2017): 13-27). 세계보건기구는 2008년 기준 약 14억 명의 인구가 과체중 상태이며, 남성의 경우에 2억 명, 여성의 경우 3억 명 정도가 비만을 겪고 있다고 발표하였다 (Finucane et al., 2011). 또한, 2030 년에 이르면, 전 세계인구 중 약 10억 명이 비만에 이를 것이라고 연구자들은 말한다 (Kelly et al., 2008). 비만은 많은 합병증을 유발하는 심각한 질병이다. 비만일 경우에, 그렇지 않을 경우보다 제2형 당뇨병이나, 심혈관 질환, 고혈압 그리고 비알코올성 간 질환에 걸릴 위험이 높게 나타난다 (Olshansky et al., 2005; Lavie et al., 2009; Kahn et al., 2006). 유사하다.

고지방 식습관에 의하여 과하게 에너지를 섭취함에 따라, 비만이 증가하고 있다. 비만은 몸이 소모하는 에너지양보다 섭취량이 많을 때 발생한다. 인간은 음식을 섭취하면 남는 에너지를 지방 형태로 저장하

거나, 운동이나 열 발생으로 에너지를 소모한다. 그러나, 고지방 식단으로 인하여 잉여 에너지가 많이 발생하게 되고, 이로 인하여 비만이 더욱 가속화 되게 된다. 따라서, 비만을 치료하기 위해서는 음식물 섭취를 조절하는 것이 매우 중요하다.

시상하부의 궁상핵 (Arcuate nucleus, ARC)은 뇌에서 식욕을 조절하고 에너지 균형을 유지하는 기능을 수행하고 있다. 궁상핵에는 식욕을 촉진하는 신경세포 (Orexigenic neuron)와 식욕을 억제하는 신경세포 (Anorexigenic neuron)가 존재하고 있다 (Barsh et al., 2002). 여러 조직에서 분비되는 호르몬들 통해서 이들 신경세포에서 식욕을 조절하는 단백질의 분비가 조절된다. 위에서 분비되는 그렐린 (Ghrelin)은 공복 호르몬이라고도 불리며, 공복 상태에서 식욕을 촉진하는 신경세포를 활성화하는 것으로 알려졌다 (Wren, A. M., et al. 2000). 렙틴 (Leptin)은 지방세포에서 분비되는 호르몬으로써, 지방에서의 에너지 저장량을 중추신경계에 전달하는 역할을 한다 (Myers et al., 2010; Dietrich and Horvath et al., 2013). 렙틴은 식욕을 촉진하는 NPY 신경세포에서 neuropeptide Y의 생산을 억제하며, 반대로 식욕을 촉진하는 POMC 신경세포에서 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)의 생산을 도와, 음식물 섭취를 억제한다고 알려졌다 (Considine et al., 1996; Frederich et al., 1995; Klok et al., 2007).

비만이 발병하게 되면 식욕을 조절하는 호르몬에 대한 민감성이 떨어지는 것이 많은 연구를 통해 보고되었다. 첫 번째로, 인슐린에 대한 민감성이 저하되게 되며, 혈중 포도당 농도를 적절하게 유지하지 못하게 되어 당뇨병이 발생하게 된다 (Kahn et al., 2000; Shoelson et al., 2007; Kloting, Nora, et al., 2010; Bano, Gul et al., 2013). 또한 렙틴에 대한 민감도 역시 감소하는 것으로 나타났다 (Considine et al., 1996; Frederich et al., 1995; Myers et al., 2008, 2010). 비만 상태에서 식욕을 조절하는 신경세포의 렙틴 수용체에 결함이 생기게 되며, 이로 인하여 렙틴을 인식하지 못해, 식욕을 조절하지 못하게 된다 (Mazor et al., 2018; Quinones, Mar, et al.). 최근 연구에서는 비만 상태에서 낮아진 호르몬의 민감성을 회복하려는 시도를 진행 중에 있다. 흥미롭게도, 마우스에서 생성되는 렙틴의 양을 감소시켰을 때, 고지방 식단에도 불구하고 체중증가가 적은 것으로 나타났다 (Zhao, Shangang et al., 2019).

선행 연구에서, 시상하부 식욕 촉진 신경세포에서 GR과 Bsx의 상호작용을 통하여 AgRP 단백질 생산이 조절되는 것을 보고하였다. AgRP 단백질의 발현이, 기존에 알려진 conventional GRE와는 구별되는 특정한 염기 서열인 AgRP-GRE에 의하여 조절되는 것을 확인하였으며, 포유류에서 이러한 염기서열이 잘 보존되어 있는 것을 확인하였다. 나아가, GR의 antagonist 중의 하나인 RU486에 의하여 AgRP의 발현

이 감소하는 것을 확인하였다 (Lee et., at 2013).다.

본 연구에서는 Zj7이라는 저분자 물질을 통하여 식욕을 촉진하는 AgRP의 발현이 저해되는 것을 확인하였다. 이러한 현상은 GR과 Bsx의 상호작용을 Zj7이 저해함으로써 나타나는 것을 확인하였다. GR을 구성하는 3개의 domain 중에서 N-terminal domain (NTD)가 Bsx와 상호작용 하를 것을 확인하였으며, Zj7에 의하여 두 단백질 사이의 상호작용이 감소하는 것을 확인하였다. 정상체중의 마우스에 사료를 제한하여 식욕 촉진 호르몬의 분비를 유도한 뒤, Zj7을 투여하였을 때, 시상하부에서 AgRP와 NPY의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 세포주에서만 아니라 동물모델에서도 Zj7이 효과가 있는 것을 의미한다. 또한, 고지방 사료를 공급하여 비만을 유도한 마우스에게 Zj7을 장기간 투여하였을 때, 음식물 섭취가 급격히 감소하며, 체중이 점차적으로 감소하는 것을 확인하였다. 약물을 장기 투여하였을 때, 비만 상태가 시간이 경과함에 따라 호전되며, 포도당과 인슐린에 대한 민감성이 개선되는 것을 확인하였다. 더불어서, Zj7을 투여한 비만 마우스에서 렵틴 민감성이 회복된 것을 확인하였으며, 약물에 의하여 시상하부 전반의 신경세포의 수에는 변함이 없는 것을 확인하였다. 이는, 비만에 대한 새로운 치료 표적으로서 GR과 Bsx를 제시하며, Zj7이라는 저분자 물질을 통하여, 효과적으로 식욕을 조절할 수 있음을 보여준다.

II. 실험 방법

1. 1. DNA constructs

Mammalian cell에서 발현시키기 위해 HA, Flag, 또는 Myc이 표지되어 있는 pCS2 또는 pcDNA3 벡터에 rat GR full length, NTD, DBD 그리고 LBD, mouse BSX를 클로닝 하였다. GST 융합 단백질의 발현을 위해 pEBG 벡터에 클로닝 된 mouse BSX를 사용하였다.

2. 면역조직화학법 (IHC assays)과 제자리 부합법 (ISH assays)

심장 관류 (Cardiac perfusion)을 통해 꺼낸 마우스의 뇌를 4% paraformaldehyde로 고정한 후 5%/10%/15%/30% 농도 구분을 둔 sucrose에 옮긴 뒤, OCT에 넣어 동결 보존하였다. IHC assay를 할 때는 12 μ m 두께로 절단하였고, digoxigenin-labeled probes를 이용하여 ISH를 할 때는 12 μ m 두께로 절단하였다.

면역조직화학법을 위해, 다음의 항체를 사용하였다: rabbit anti-phosphoSTAT3Tyr705 (#9145, Cell signaling Technology;

1:2000), rabbit anti-POMC (H-029-30, Phoenix Pharmaceutical; 1:2000), rabbit anti-TH (ab-152, Merk Millipore; 1:2000), guinea pig anti-Otp (Homemade; 1:2000), rat anti-Bsx (Homemade; 1:500).

제자리 부합법을 위해, mouse AgRP, NPY, GHRH의 cDNA를 pBluescript 벡터에 클로닝한 플라스미드를 사용하여 digoxigenin-labeled riboprobes를 만들었다.

3. 실험 동물

급성투여를 위하여 C57BL/6 wild type 마우스 10주령을 사용하였다. 비만을 유도하기 위하여 C57BL/6 마우스를 10주령부터 16주간 고지방 사료 (#88137, Envigo)를 공급하였다. 복강투여를 통하여 약물을 공급하였으며, Zj7 (50 mg/kg), RU486 (25 mg/kg; SIGMA)으로 처치하였다. 정상마우스에 렵틴 (Cyt-351, PROSPEC)은 5 mg/kg으로 복강투여 하였으며, 16주 동안 고지방사료를 공급하여 비만을 유도한 마우스에게 1 mg/kg 렵틴을 복강투여 하였다.

4. Luciferase assay

Luciferase assay 분석을 위해 48-well plate에 HEK293T를 배양하였다. 24시간 후에 rat GR, mouse BSX, AgRP-luc을 transfection 하였다. 하루 뒤, 농도 별로 준비된 약물들을 4시간 동안 처리한 뒤, 세포를 용해하였다. Microplate-reader를 사용하여 흡광도와 발광을 측정하였다.

5. MTT Assay

약물의 세포독성을 확인하기 위하여, 4시간 혹은 24시간 동안 약물을 처리하였다. 10ul의 MTT assay solution을 처리한 뒤, 4시간 동안 세포를 배양하여 microplate-reader를 사용해 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. ELISA

마우스 혈청의 렙틴 함량을 측정하기 위해 Mouse Leptin ELISA kits (#90030, Crystal chem)을 사용하였다. 5ul의 혈청을 사용하였으며, kit의 사용법을 참고하여 실험을 수행하였다.

7. In vivo GST pull-down assay

HEK293T 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)로 보충된 DMEM media에서 배양되었다. HEK293T 세포는 10cm culture dish에서 배양되었고, HA-GR full length, 와 GST-BSX 또는 GST alone으로 transfection되었다. 2일 후에, 세포는 수확하여 IP buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 % NP-40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, 10% Glycerol, 4 mM Na₃VO₄, 200 mM NaF, 20 mM Na-pyroPO₄, and protease inhibitor cocktail)로 용해되었으며, glutathione- sepharose 4B beads로 incubation되었다, mouse anti-HA (Covance), mouse anti-GST (Santa cruz, SC-138) 항체로 면역블롯하여 관찰되었다.

8. Metabolic analysis & body composition

약물을 처리한 마우스의 대사 지표 측정은 마우스 표현형분석단의 TSE system PHENOMASTER를 사용하여 측정하였다. 마우스의 신체 조성 분석은 EchoMRI 700 장비를 사용하여 측정하였다.

9. 통계처리방법 (Statistical analysis)

Student's t-test를 이용하여 실험을 진행한 그룹들 간의 유의성을 측정하였고, 이는 평균과 표준 오차로 표기하였다. 통계적 유의성은 *는 $P<0.05$, **는 $P<0.01$, ***는 $P<0.001$ 를 기준으로 표기하였고, NS는 $P>0.05$ 로 유의하지 않음을 나타낸다.

III. 실험 결과

1. 저분자 물질을 통한 AgRP의 전사 활성 저해 효과 확인

Agouti-related peptide (AgRP)는 glucocorticoid receptor (GR)와 brain specific homeobox factor (BSX)의 상호작용을 통해 전사가 일어난다고 알려져 있다. 저분자 물질을 처리하였을 때, GR과 BSX의 상호작용을 방해 함으로써 AgRP의 전사활성을 저해할 수 있는지를 Luciferase reporter assay를 통하여 확인하였다. Luciferase reporter gene에 AgRP:GRE를 클로닝 시킨 plasmid 와 rat GR full length와 BSX를 HEK293T cell에 transfection 시켰다. 이때 GR의 agonist인 dexamethazone (Dex)를 처리하여 GR을 활성화 시키고, 각각의 chemical을 농도별로 처리하였다. 실험결과 GR의 antagonist로 잘 알려진 RU486을 처리한 sample에서 AgRP의 전사활성이 감소한 것을 확인하였으며, 또한 저분자 물질을 처리하였을 때, 농도의존적으로 AgRP의 전사활성이 저해되는 것을 확인하였다 (Fig. 1A). GC가 GR에 결합하면, GR이 dimer를 이루게 되고, 핵 안으로 이동하게 되면서 target gene의 발현을 활성화(transactivation)시키거나 억제(transrepression)함으로써 유전자의 발현을 조절한다 (Moraitis et al., 2017;

Scheschowitsch et al., 2017). 이러한 GR의 다른 전사 조절에 chemical들이 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 GR에 의해서 transactivation 된다고 알려진 Mouse mammary tumor virus (MMTV) gene을 이용하여 luciferase assay를 수행하였다. 그 결과, RU486을 처리한 sample에서는 MMTV의 전사 활성이 감소하였지만, 실험에 사용한 저분자 물질은 전사 활성에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 1B). 다음으로 GR에 의해 전사 활성이 억제된다고 알려진 NF- κ B와 AP1의 luciferase assay를 진행하였다. Dex를 처리하여 GR을 활성화시킨 상태에서 약물들을 처리하였을 때, GR에 의한 전사 활성 감소에 영향이 없는 것을 확인하였다 (Fig. 1C~D). 여러 가지 약물 중에서, AgRP의 전사 활성을 효과적으로 감소시킨 Zj7을 실험에 사용하였다.

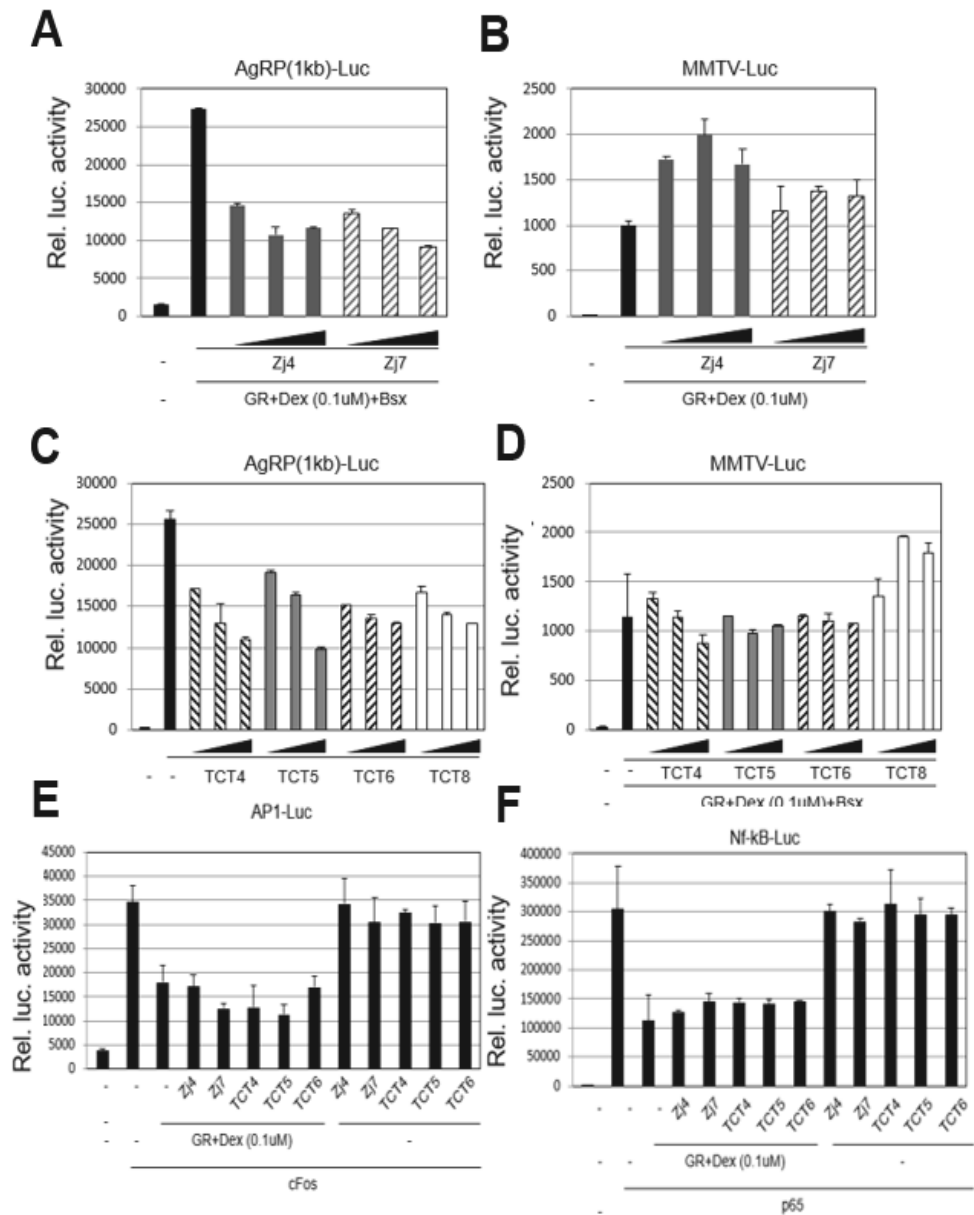


Figure 1. Chemicals inhibit GR activity in AgRP-GRE specifically but not in conventional GRE.

(A), (C) Results of AgRP-luc in HEK293T. Chemicals were treated

in concentration of 1 or 5 or 25 μM .

(B), (D) Results of MMTV-luc in HEK293T. Chemicals were treated in concentration of 1 or 5 or 25 μM .

(E) Results of AP1-luc in HEK293T.

(F) Results of NF κ B-luc in HEK293T.

2. Zj7 의 세포 독성 확인

in vivo test 단계에 앞서 약물이 세포의 대사활동과 생명 유지 활동에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. MTT assay는 세포의 증식 및 사멸도의 변화를 측정하는 데 널리 사용되는 방법의 하나다 (Van Meerloo et al., 2011; Gerlier et al., 1986). 실험에 사용되는 tetrazolium salt는 3개의 aromatic ring이 연결된 heterocyclic compound의 통칭이며, dehydrogenase나 환원형 화합물 등에 의해 환원되어 formazan을 형성한다. 세포 내의 미토콘드리아 (Mitochondria)는 전자전달계 과정을 통해 생존에 필요한 에너지를 생산하는데, 이때 사용되는 탈수효소인 dehydrogenase에 의해 tetrazolium salt가 분해되어 formazan을 생성하게 되며, 이를 통하여 살아있는 세포를 정량적으로 평가할 수 있다 (Van Meerloo et al., 2011).

MTT assay를 위하여 HEK293T cell을 96-well plate에 배양하였다. 24시간 뒤에 약물을 4/24시간 동안 준비된 농도로 처리한 뒤 Cellvia를 well 당 10 μ l씩 처리하여 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에 4시간 동안 반응시켰다. 세포 배양기에서 꺼낸 cell을 1분 동안 천천히 shaking 해 준 뒤, microplate reader를 사용하여, 흡광도를 측정하였다. 그 결과 4시간 동안 약물을 처리하였을 때, 세포 생존율에 큰 영향이 없는 것을

확인하였으며 (Fig 2A). 24시간 동안 약물을 처리하였을 때, 다른 비교군들에 비하여 세포 생존률이 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 고려하였을 때, Zj7의 독성이 크지 않은 것을 세포 실험을 통해 확인하였으며, in vivo 실험을 진행하였다.

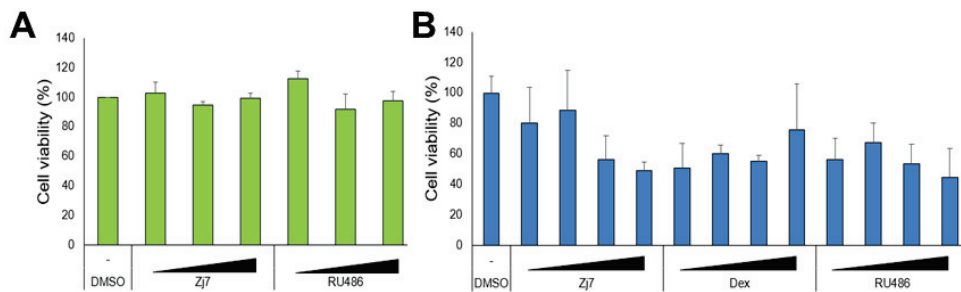


Figure 2. Zj7 does not affect in cell viability in HEK293T.

(A) (B) Zj7 was treated for 4 (A) or 24 (B) hours. After chemical treat, 10ul of MTT solution (Cellvia) was treated for 4 hours. Absorbance was measured at 450 nm using microplate reader.

3. BSX와 상호작용하는 GR의 도메인 확인 및 Zj7에 의한 상호작용 감소 효과 확인

기존의 연구에 따르면 GR은 hinge 부분을 제외한 3개의 domain인 N-terminal domain (NTD) 과 DNA binding domain (DBD) 그리고 ligand binding domain (LBD)으로 이루어져 있다 (Fig. 3A) (Giguere, Vincent, et al., 1986; Hollenberg et al., 1988). GR의 도메인 중 어느 부분이 BSX와 상호작용하는지를 확인하고자 GR의 각 부분을 HA가 표지 되어있는 pCS2 벡터에 클로닝 하였다. GST가 표지 되어있는 pEBG벡터에 도입 되어있는 마우스 BSX와 GR의 각각의 도메인들을 10mm plate에 배양한 HEK293T 세포에 transfection 시켰다. 24시간 후 세포 배양액을 교체하고 다시 24시간 뒤에 세포를 harvest 하였다. transfection 시 같이 도입한 GFP의 발현을 통하여 transfection을 확인하였다. GST-pull down을 통하여 확인한 결과, 흥미롭게도 GR의 NTD가 BSX와 상호작용하였다 (Fig. 3B).

또한, in vivo GST-pull down을 이용하여 cell line에서 Zj7에 의하여 GR과 BSX의 상호작용이 감소하는지 알아보았다. GR full length와 BSX를 transfection 시킨 뒤 Zj7을 4시간 동안 처리하였을 때, Zj7에 의해서 두 단백질의 상호작용이 감소하였다 (Fig. 3C). 흥미롭게도

Dex를 통해서 GR을 활성화 시킨 상태에서 Zj7을 처리하였을 때에도, GR과 BSX의 상호작용이 감소하였다.

결과적으로, 위의 실험 결과를 통해, Zj7이 GR과 BSX 사이의 상호작용을 저해하며, 이는 리간드의 작용과 상관없이 이루어짐을 알 수 있다.



Figure 3. Zj7 inhibits the interaction between GR and Bsx.

(A) The construct of glucocorticoid receptor. GR consists of three domains; NTD, DBD and LBD.

(B) *in vivo* GST pull down assay results. Interaction between GR-NTD and Bsx is confirmed.

(C) Zj7 treated for 4 hours. The interaction between GR and Bsx is decreased by Zj7.

4. 식욕을 촉진한 마우스에 Zj7을 급성 투여하였을 때, AgRP와 NPY의 발현이 감소한다

척수 Zj7을 마우스에 투여하였을 때, 약물에 의해서 음식물 섭취를 유도하는 펩타이드의 발현이 조절되는지를 확인하였다. RU486 (25 mg/kg), Zj7 (50 mg/kg)을 corn-oil과 함께 총량 200 μ l을 마우스에 복강 투여 하였다. 12시간 후에 마우스의 사료를 케이지에서 제거하고, 약물을 다시 투여한 뒤, 12시간 후에 마우스를 Avertin (20 mg/kg)을 사용하여 마취 후 뇌 조직을 얻었다. 제자리 부합법 (ISH assay)를 통해 분석한 결과, RU486을 투여한 마우스의 시상하부에서 AgRP의 발현이 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 4A) (Lee et al., 2013). 놀랍게도, RU486을 투여한 마우스에서는 NPY의 발현량에 차이가 없었지만, Zj7을 투여한 마우스의 시상하부에서 AgRP와 NPY 모두 유의미하게 발현량이 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 4B).

따라서, Zj7이 cell line에서 뿐만 아니라, in vivo 모델인 마우스에서도 GR과 BSX의 상호작용을 저해 함으로써 음식물 섭취를 조절하는 AgRP의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 약물의 장기 투여가 마우스의 음식물 섭취를 제한할 수 있는지를 확

인하기 위해 lean 마우스에 3주간 약물을 복강 투여 하였다. 그 결과, lean 마우스에서는 약물의 장기 투여가 음식물 섭취에 미치는 영향이 미미한 것을 관찰할 수 있었다.

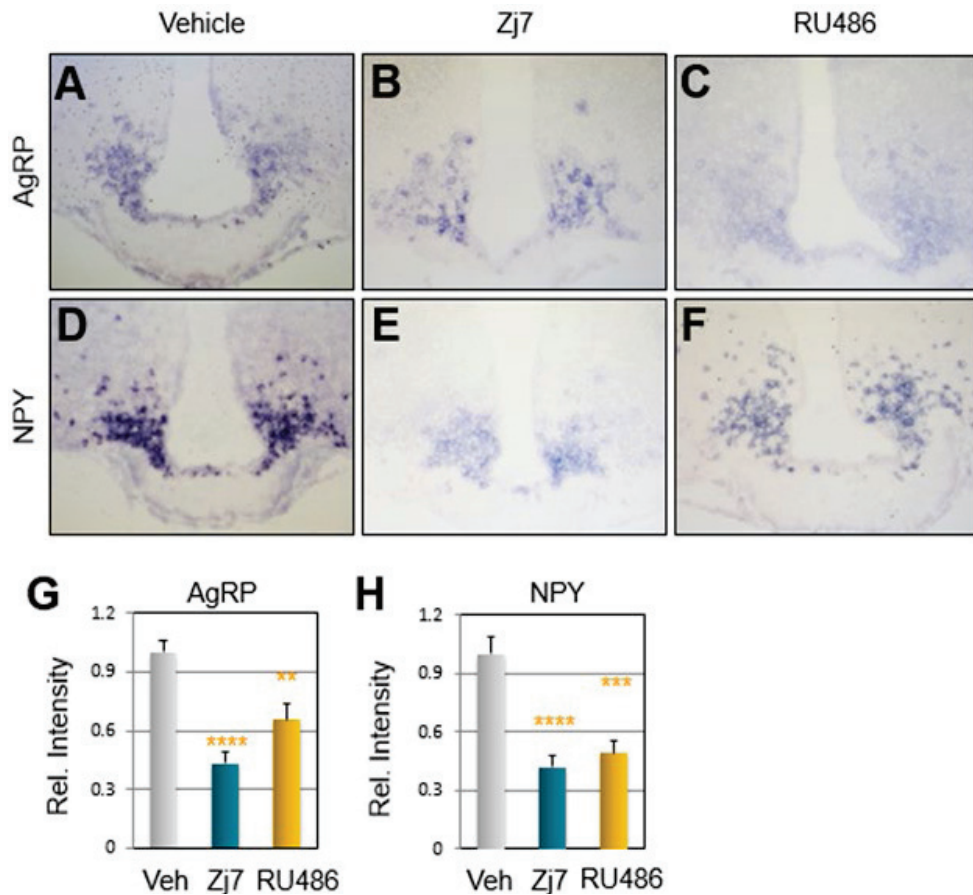


Figure 3. Zj7 inhibits the expression of AgRP and NPY induced by fasting ARC neurons.

(A), (B) and (C) is result of AgRP-ISH. The expression of AgRP is decreased in Zj7 or RU486 treated mice arcuate nucleus.

(D), (E) and (F) is result of NPY-ISH. The expression of NPY is decreased in Zj7 treated mice arcuate nucleus.

(G) Quantification data of intensity of AgRP-ISH images.

(H) Quantification data of intensity of NPY-ISH images.

****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01 'ns' indicates not significant.

Vehicle (n=4), RU486 (n=4), Zj7 (n=4).

5. 비만 마우스에 약물을 장기 투여하였을 때, 음식물 섭취가 감소하며 체중이 감소한다

서구화된 식단으로 인하여 고지방 섭취가 늘어남에 따라, 비만의 증가가 점점 더 가속화되고 있다. 따라서, 비만을 치료하기 위해서는, 비만이 발병하는 직접적인 원인인 식습관을 조절하는 것이 매우 중요하다. 마우스에서 Zj7이 음식물 섭취를 제한하는 효과가 있는지 검증하기 위해 고지방 사료를 16주간 마우스에 공급하여 비만을 유도하였다. Zj7을 마우스에 투여하였을 때 (Fig 5A), 사료 섭취가 급격하게 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig. 5C). 또한, 이로 인하여 마우스의 체중이 점차 감소하며, 비만이 개선되는 것을 확인하였다 (Fig 5B). 약물 투여 후 일주일간 24시간 동안 음식물 섭취량을 평균 내었을 때, Zj7을 투여한 마우스 그룹에서 음식물 섭취량이 현저히 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 5D). 2주간 복강 주사를 통해 약물을 처치한 뒤, 각 그룹의 glucose tolerance test (GTT)를 진행하였다. 그 결과, Zj7을 투여한 마우스에서 vehicle만 투여한 마우스보다 포도당 분해능이 뛰어난 것을 확인하였다 (Fig. 5E). 나아가 약물 투여 3주가 경과한 시점에서 insulin tolerance test (ITT)를 진행하였을 때, Zj7을 투여한 마우스에서 혈중 포도당의 항상성이 개선된 것을 확인하였다 (Fig. 5F).

약물을 2주 투여한 마우스의 body composition과 대사활동을 측정하였다. Zj7을 투여한 마우스의 fat mass가 대조군에 비교하여 10% 이상 감소하였으며 (Fig. 6A), lean mass가 증가하였다 (Fig. 6B). 또한, Zj7을 장기 투여한 마우스에서 시간당 에너지를 더 많이 소모하는 것을 확인하였다(Fig. 6D). 또한, Zj7을 장기간 투여한 마우스에서 에너지 대사에 지방을 더 많이 사용하고 있는 것을 관찰하였다 (Fig. 6E, F). 약물을 3주간 투여한 뒤, perfusion fixation을 통해 뇌조직을 확보하고, 간과 갈색지방 그리고 백색지방 세포를 채취하였다. H&E 염색법을 통하여 조직을 관찰하였을 때, 흥미롭게도 Zj7을 장기 투여한 그룹의 마우스에서 간의 지방이 감소하였으며, 백색지방의 세포 크기가 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 6G~J).

다음으로는 약물을 장기 투여한 마우스에서 시상하부에서의 변화를 관찰하였다. 음식물 섭취와 에너지 균형을 조절하는 시상하부 궁상핵에서, Zj7을 투여한 마우스의 AgRP와 NPY가 감소한 것을 제자리 실험법 (ISH assay)를 통하여 확인하였다 (Supplementary Fig. 1A~D). 반면에, 성장호르몬을 분비를 촉진하는 성장호르몬 분비호르몬인 growth hormone-releasing hormone (GHRH)의 발현에는 차이가 없는 것을 확인하였다. 또한, 시상하부 신경세포의 population에는 영향이 없

는 것을 면역염색법을 통하여 확인하였다. (Supplementary Fig. 2A~H).

다음으로, Zj7을 투여한 쥐의 간에서 지방 생성에 관여하는 유전자들의 mRNA이 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다 (Supplementary Fig. 3A). 마우스들의 시상하부의 RNA를 추출하여, qRT-PCR 분석을 하였을 때, AgRP와 NPY의 발현량이 감소하는 것을 확인하였다. 하지만, 식욕을 억제하는 Socs3와 렙틴 수용체에는 유의미한 차이를 발견할 수 없었다. 기존 연구에서, 비만 상태에서 마우스의 시상하부의 UCP2가 증가한다고 보고되었으며, 시상하부 미세아교세포 (Microglia)의 UCP2 발현 증가가 렙틴에 대한 민감성을 저하시킨다고 알려졌다 (Kim et al., 2019). 신기하게도, Zj7을 투여한 마우스의 시상하부에서 UCP2의 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 혈중 glucose가 감소하고, 간 손상의 지표인 ALT가 감소한 것을 확인하였다 (Supplementary Fig. 3C~G).

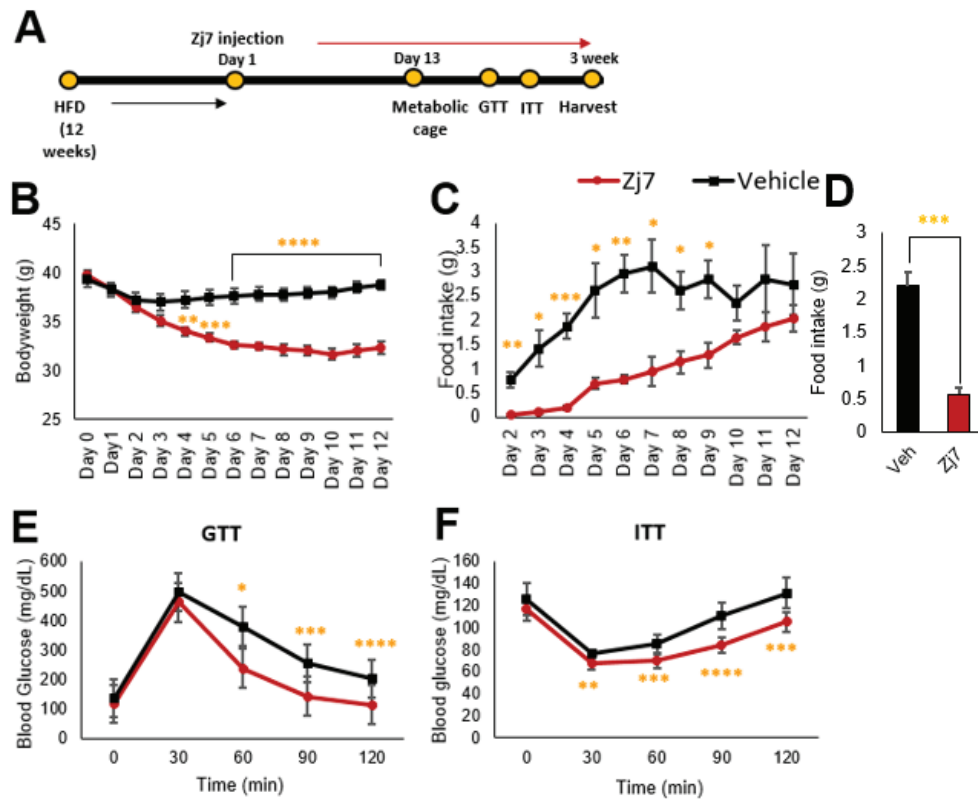


Figure 5. Zj7 reduces body weights and food intake and increased glucose homeostasis.

(A) Schematic showing long-term treatment of Zj7 in DIO mice. C57BL/6 mice were fed high fat diet for 16 weeks. Mice were received vehicle or Zj7 90 minutes before dark cycle for 3 weeks.

(B) Average of body weight of vehicle or Zj7 treated mice.

(C) Daily food intake after chemical treatment. The food intake was measured every 24 hours.

(D) Daily food intake during first week of chemical treatment.

(E) Result of GTT assay. The mice were fasted for 16 hours before glucose administration.

(F) Result of ITT assay. The mice were fasted for 4 hours in light cycle before insulin administration.

**** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 'ns' indicates not significant. Vehicle (n=10), Zj7 (n=10).

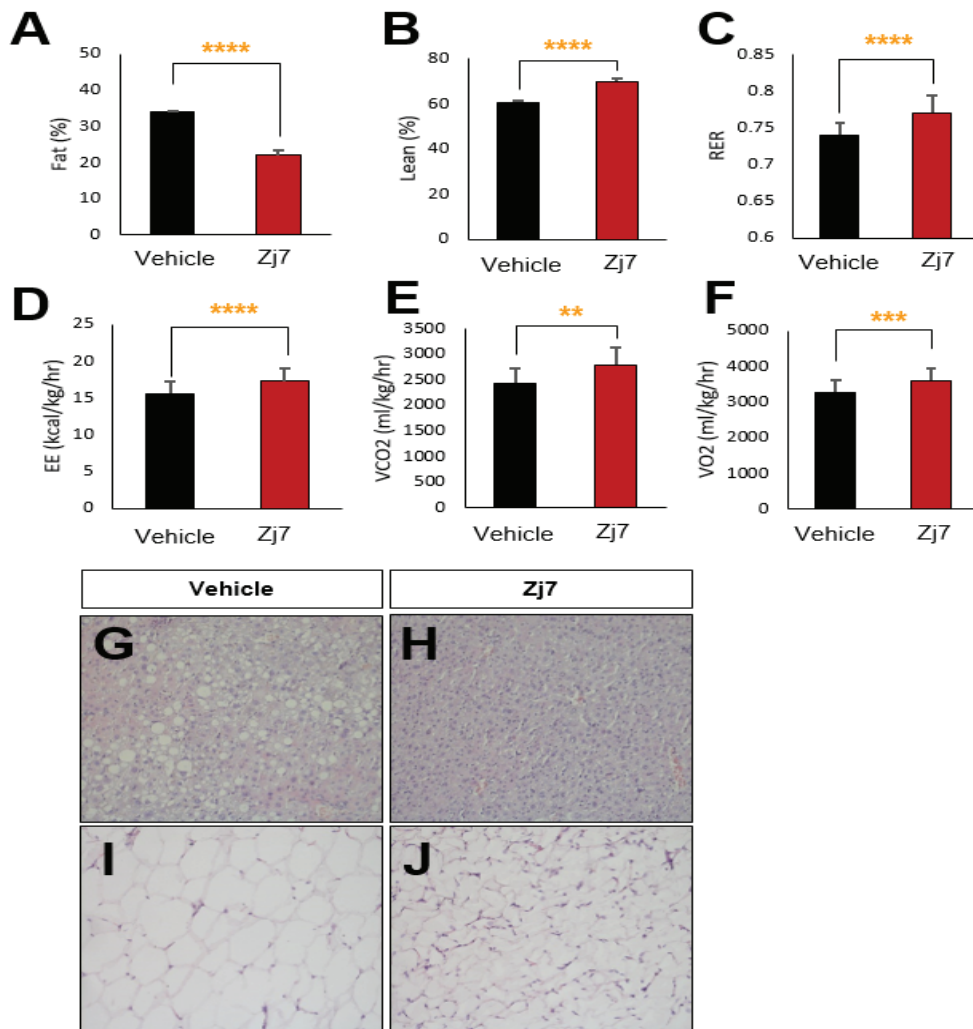


Figure 6. Zj7–treated DIO mice show decreased fat mass and higher energy expenditure.

(A), (B) is fat or lean mass of mice after 2 weeks of chemical treatment.

(C) Respiratory Exchange Ratio(RER)

(D) Energy expenditure (kcal/kg/hr).

(E) VCO₂ (ml/kg/hr).

(F) VO₂ (ml/kg/hr).

****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, 'ns' indicates not significant. Vehicle

(n=10), Zj7 (n=10).

6. Zj7은 렙틴과 다른 경로를 통하여 음식물 섭취 조절에 작용한다

비만 상태에서 음식물 섭취를 억제하는 렙틴 (Leptin)에 대한 민감성이 감소하게 되고, 이로 인하여 비만이 더욱 가속화된다는 보고가 있었기 때문에, Zj7을 투여하였을 때, 렙틴에 대한 민감성이 회복되는지를 확인하였다. 시상하부의 렙틴 수용체에 렙틴이 결합하면, STAT3의 705번째 tyrosine이 인산화되고, phosphoSTAT3가 dimer를 이루어, 핵 안으로 이동하여, 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다. 마우스의 뇌 조직을 30 μ m로 절단하여 면역염색 하였을 때, 대조군과 비교하여 Zj7을 장기 투여한 마우스의 pSTAT3의 발현량에 큰 차이가 없는 것을 확인하였다.

다음으로 정상 체중 상태의 마우스에 Zj7을 하루 한 차례 이틀 동안 투여한 뒤, 두 번째 약물 투여 후 렙틴을 투여하였다. 24시간 후에 체중과 음식물 섭취량을 측정하였을 때, Zj7만 투여한 마우스의 음식물 섭취와 체중 그리고 백색지방 무게가 감소하는 것을 확인하였다. 렙틴만을 단독으로 투여한 마우스 또한 음식물 섭취와 체중이 소량 감소하였지만, Zj7과 렙틴을 같이 투여한 마우스와 Zj7만을 단독으로 투여한 마우스

스 사이에는 유의미한 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 6A~D). 고지방식을 통해 유도한 비만 마우스에서 위와 같은 실험을 진행하였을 때, Zj7에 의한 음식물 섭취와 체중 감소를 확인하였지만, 렙틴의 유무에 따른 유의미한 차이는 없는 것을 확인하였다 (Fig. 7A~D). 또한, Zj7을 투여한 마우스의 혈중 glucose가 감소한 것을 확인하였다 (Supplementary Fig. 4). 마우스의 뇌 조직을 12 μ m로 절단하여 면역염색하였을 때, Zj7 처치에 따른 시상하부 신경세포의 세포 수에는 차이가 없는 것을 확인하였으며 (Supplementary Fig. 5), pSTAT3의 발현량에 유의미한 차이가 없음을 확인하였다 (Supplementary Fig. 6).

마지막으로, *db/db* 마우스에 Zj7을 투여하였을 때, 식욕 억제 효과가 있는지를 검증하였다. *db/db* 마우스는 렙틴 수용체 유전자를 CRISPR 유전자 가위로 편집하여, 렙틴 수용체에 결함을 가진 형질전환 마우스로써, 식욕을 조절하지 못하여, 비만에 이르게 된다 (Vaisse, Christian, et al., 1996). *db/db* 마우스에 Zj7을 복강 투여를 통해 장기간 처치하였을 때, 대조군과 비교하여 음식물 섭취가 감소하며, 체중이 더 이상 증가하지 않고 유지되는 것을 확인하였다.

이러한 관찰 결과는 Zj7이 비만에 의하여 렙틴에 대한 민감성이

낮아진 상태에서도 음식물 섭취를 효과적으로 억제할 수 있으며, 렙틴과 독립적인 경로를 통해 작용함으로써, 비만을 개선할 수 있다는 것을 보여준다.

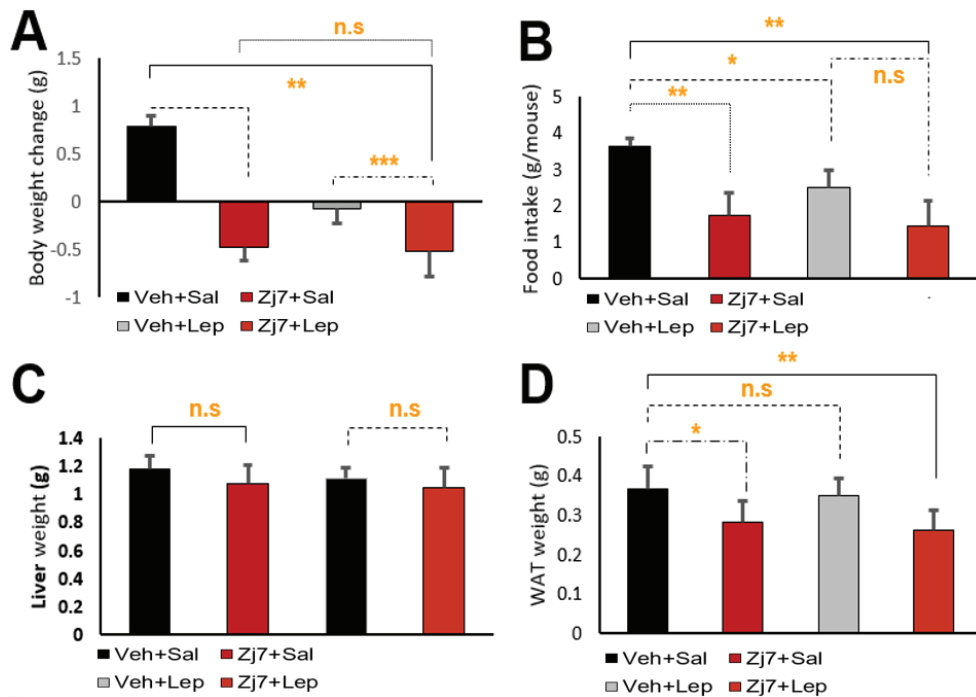


Figure 7. Zj7 reduced body weight and food intake with or without leptin in lean mice.

(A) Body weight changes after chemical and leptin administration.

(B) Food intake after saline or leptin administration.

(C), (D) Liver of WAT weight of mice.

**** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 'ns' indicates not significant. Veh+Sal (n=7), Zj7+Sal (n=7) Veh+Lep (n=6) and Zj7+Lep (n=7).

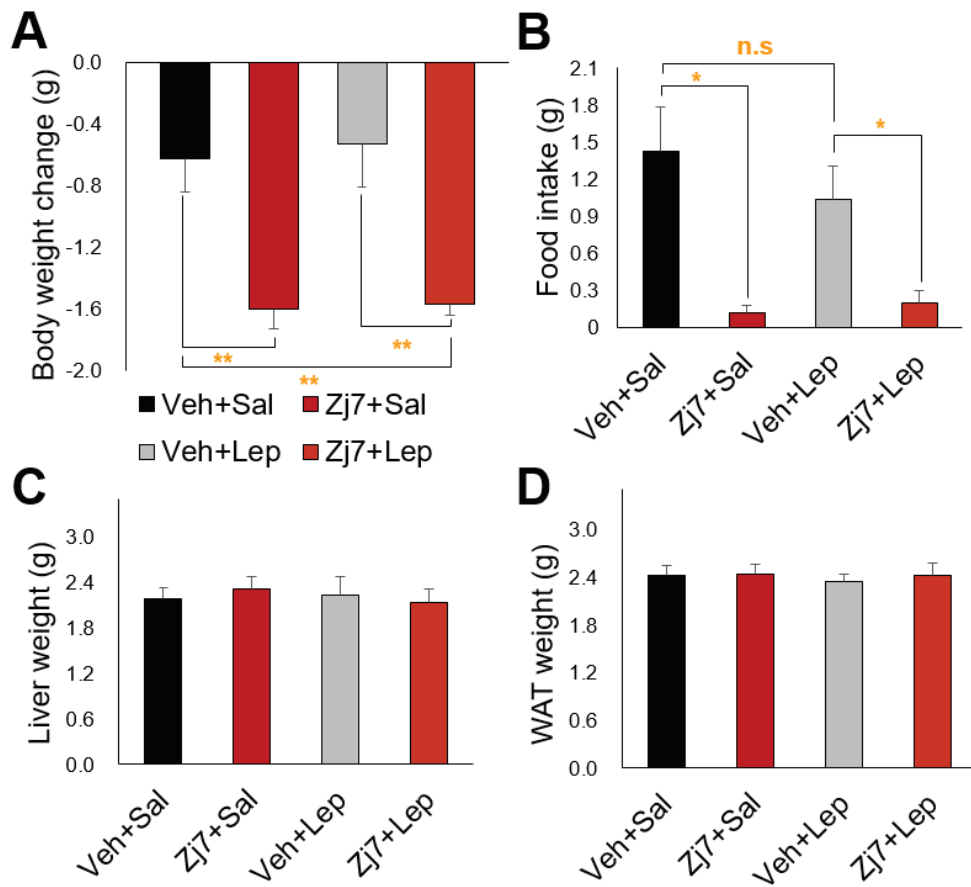


Figure 8. Zj7 reduces body weight and food intake in DIO mice.

(A) Body weight changes after chemical and leptin administration.

(B) Food intake after saline or leptin administration.

(C), (D) Liver of WAT weight of mice.

****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, 'ns' indicates not significant. Veh+Sal (n=7), Zj7+Sal (n=7) Veh+Lep (n=7) and Zj7+Lep (n=7).

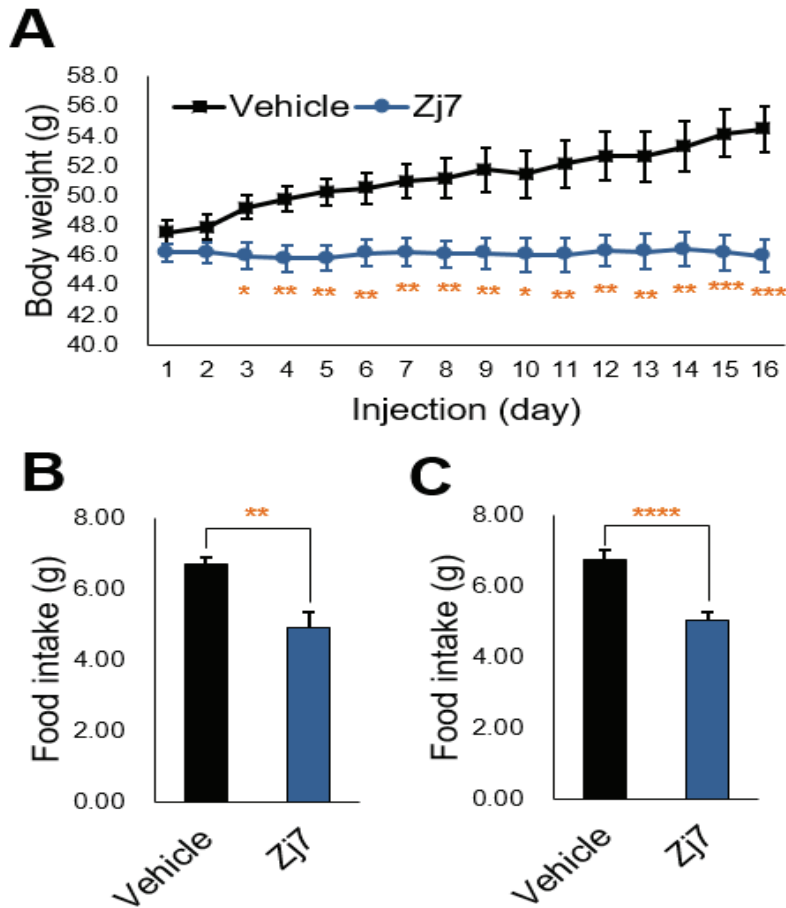


Figure 9. Zj7 reduces body weight and food intake in *db/db* mice.

(A) Body weight changes (g) after Zj7 administration.

(B) Daily food intake (g) during the first week of Zj7 administration

(C) Daily food intake (g) during the two-week after administration of Zj7

****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, 'ns' indicates not significant. Zj7 (50 mg/kg, n=10), Vehicle (n=9)

IV. 결론 및 고찰

전 세계적으로 비만 인구는 계속해서 증가하고 있지만, 이를 치료할 수 있는 효과적인 약물이나 방법은 잘 알려지지 않았다. 또한, 현재까지 알려진 약물들은 약효에 비해 큰 부작용을 가지고 있으며, 약물의존성을 유발하기 때문에, 남용의 위험성이 있다 (Rodgers et al., 2012; Derosa et al., 2012; Melnikova et al., 2006; Daneschvar et al., 2016). 예로써, 스테로이드와 유사한 구조를 가지는 펜터민은 식욕억제제 중 하나이다 (Fleming et al., 2013; Cosentino et al., 2013). 펜터민은 식욕억제 효과가 있지만, 불면증을 유발하며, 약물에 대한 의존성이나 내성을 유발할 수 있기 때문에 향정신성 의약품으로 지정되어 있다 (Hendricks et al., 2014). 비만은 그 자체로 질병 중 하나이지만, 다른 심각한 질병을 초래하는 원인이기도 하다. 대표적인 예로, 당뇨병과 고지혈증, 고혈압이 생길 확률이 높아지며, 성기능 장애와 관절염, 그리고 심혈관계 질환의 발병위험이 정상 체중인 사람보다 커진다 (Garrow et al., 1988; Antonios et al., 2010). 또한, 일부 비만 환자의 경우 암의 발생을 가져온다는 연구 결과도 발표되었다. 이러한 비만의 원인은 인체에서 소모하는 에너지에 비해서 영양소를 과도하게 장기간 섭취하게 되면서, 에너지의 불균형이 발생하는 것이다 (Spiegelman et al., 2001; Hill

et al., 2012). 특정 유전자의 돌연변이로 인하여, 섭식에 장애가 있거나 에너지 불균형을 가지고 있는 일부 예외가 있으나, 일반적으로 에너지 소모와 영양소 섭취의 불균형에 따라 비만이 발생한다는 의견이 지배적이다. 현대 사회의 경우 고지방 식단이 증가하게 되었으며, 활동량이 감소하는 생활양상에 따라 에너지 불균형 발생하게 되며, 비만율의 엄청난 증가를 가져오게 되었다. 때문에, 식습관을 조절하는 것이 비만을 치료하는 가장 효과적인 방법이다. 본 연구에서는 기존 연구에서 섭식을 유도하는 시상하부 궁상핵의 신경세포에서 분비되는 펩타이드에 주목하였다.

선행 연구에 따르면, AgRP 유전자에 존재하는 특정 서열에 GR과 BSX가 결합하게 되며, 이 둘 사이의 상호작용을 통해 AgRP의 발현을 조절한다고 보고되었다. 따라서, 이러한 두 단백질 사이의 상호작용을 특이적으로 방해함으로써, AgRP의 발현량을 감소시키고, 이로 인해 음식물 섭취 감소 효과가 나타날 것이라고 가설을 세우게 되었다. 먼저, GR에 결합하는 Gc와 유사한 구조를 가지는 물질을 선별하고, 세포주에서 화합물에 의한 효과를 확인하였다. 첫 번째로, Zj7에 의하여 GR과 BSX의 상호작용이 감소하며, 이로 인하여 음식물 섭취와 에너지 소모를 조절하는 AgRP의 전사활성이 감소하는 것을 확인하였다. HEK293T에 GR의 agonist인 Dex를 통해 GR을 활성화 시켰을 때, 화합물들을 농도

별로 처리하였을 때, AgRP의 전사활성을 저해하는 것을 luciferase assay를 통하여 확인하였다 (Fig. 1). 그뿐만 아니라 선별한 물질들이 GR의 다른 기능에는 영향을 끼치지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 1). GR의 transactivation target인 MMTV:luc에서 RU486에 의해 전사 활성이 저해되나, 약물들에 의한 전사 활성의 감소는 관찰되지 않았다. 또한, GR에 의해서 transrepression되는 NFkB와 AP1의 경우에, 약물을 처리하더라도 전사 활성이 감소되는 것에 영향을 미치지 않았다. 이것으로 볼 때, 새롭게 선별한 저분자 화합물들이 기존에 알려진 GR의 antagonist와 달리 AgRP의 전사 활성만을 특이적으로 조절할 수 있는 것을 밝혔다. 이러한 결과는 기존에 알려진 GR antagonist가 가지는 많은 부작용을 나타내지 않을 가능성을 의미한다. 실험에 사용한 또한, 전임상 단계에서 Zj7을 HEK293T에 처리하였을 때, 약물에 의한 세포 사멸을 확인하였다 (Fig 2). 약물을 처치 후 4시간, 24시간이 경과하였을 때, 대조군에 비교하여 약물에 의하여 세포 생존율에 미치는 유의미한 차이가 없음을 확인하였다. 나아가 GR과 Bsx을 도입한 HEK293T에서 Zj7을 처리하였을 때, GR과 BSX의 상호작용이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig .3). 두 번째로, Zj7에 의해 마우스에서 AgRP의 발현량이 감소하고, 음식물 섭취가 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4~6). 정상 체중의 마우스에 Zj7을 급성 투여하였을 때, 마우스의 시상하부에서 AgRP

와 NPY가 유의미하게 감소하는 것을 확인하였으며 (Fig. 4), 비만 마우스에 약물을 장기간 투여 시, 음식물 섭취가 감소하며, 비만이 개선되는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 또한, Zj7의 장기 투여에 따라 비만이 개선되면서, 마우스들의 대사 지표가 개선되며, 에너지 소모가 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 6). 그뿐만 아니라 약물에 의하여 체내 혈당항상성유지가 개선되는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 이러한 Zj7의 효과는 음식물 섭취를 제한하는 기능을 수행한다고 알려진 렙틴과는 독립적으로 작용하는 것으로 보인다 (Fig. 6~9). 정상 체중의 마우스와 비만 마우스에 Zj7을 투여한 뒤 렙틴을 투여하였을 때, 렙틴의 유무에 따른 그룹 간의 차이는 확인할 수 없었다. 하지만 ELISA를 통하여 Zj7을 장기 투여한 마우스의 혈청을 분석해보았을 때, 혈중 렙틴의 양이 유의미하게 감소한 것을 확인하였다. 렙틴 수용체가 결여된 *db/db* 마우스에 Zj7을 투여하였을 때, 음식물 섭취가 대조군에 비하여 감소하며, 체중이 더 이상 증가하지 않고 유지되는 것을 확인하였다. 이는 Zj7이 여전히 렙틴과는 다른 경로로 음식물 섭취 조절에 작용하지만, 이를 통하여 비만 상태를 효과적으로 개선함에 따라서 렙틴에 대한 민감성이 회복될 수 있다는 것을 보여준다.

종합하자면, Zj7에 의하여 GR과 BSX의 상호작용을 억제하며, 이를 통해 AgRP의 전사량이 감소하는 것을 확인하였다. 나아가 마우스

에 Zj7을 투여하였을 때, 음식물 섭취를 유도하는 단백질들의 발현량을 감소시키는 것을 연구를 통해 확인하였으며, 섭식을 감소시킴으로써 체중이 감소하는 것을 관찰하였다. 또한, 음식물 섭취와 체중이 감소함에 따라서, 비만 상태가 효과적으로 개선되며, 이로 인한 생체 대사 지표 역시 증진되는 것을 확인하였다. 본 연구 결과는 Zj7이 기존에 보고되었던 RU486와 같은 GR antagonist들이 GR의 다른 target에도 영향을 미침으로 인하여 보고된 많은 부작용을 지닌 한계가 있는 것과 비교하여, GR과 BSX의 상호작용만을 특이적으로 억제함으로써 음식물 섭취를 제한하고, 에너지 소모를 늘려 궁극적으로 비만을 치료할 가능성이 있음을 제시하였으며, 또한, 비만에 의하여 렙틴에 대한 민감성이 저하된 상태에서도 효과를 보이며, GR과 BSX의 상호작용은 섭식을 개선하는 새로운 대상으로 이용될 수 있을 것이다.

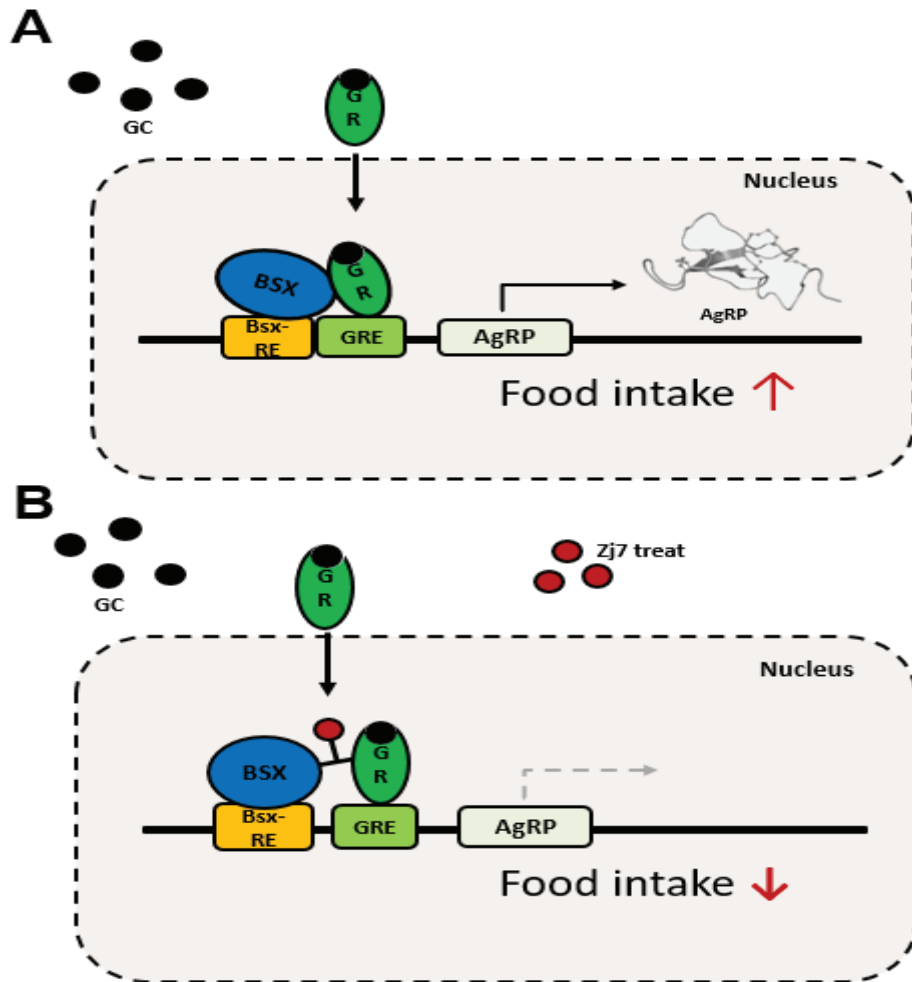
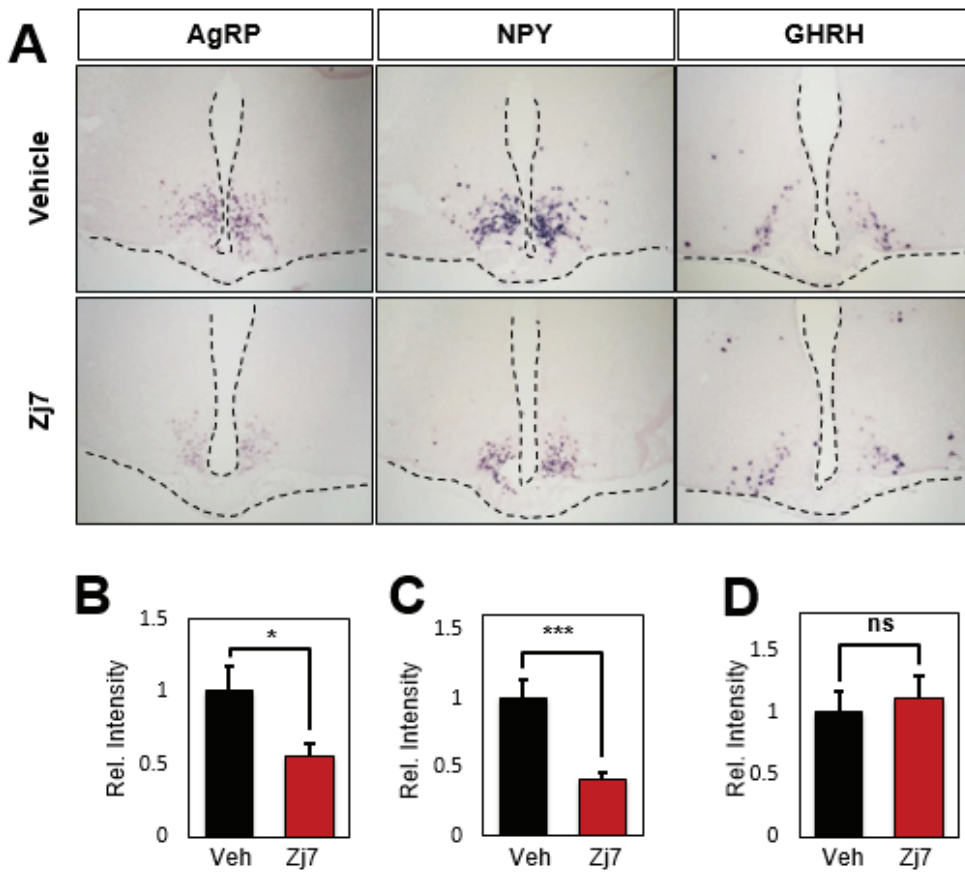


Figure 10. Working model.

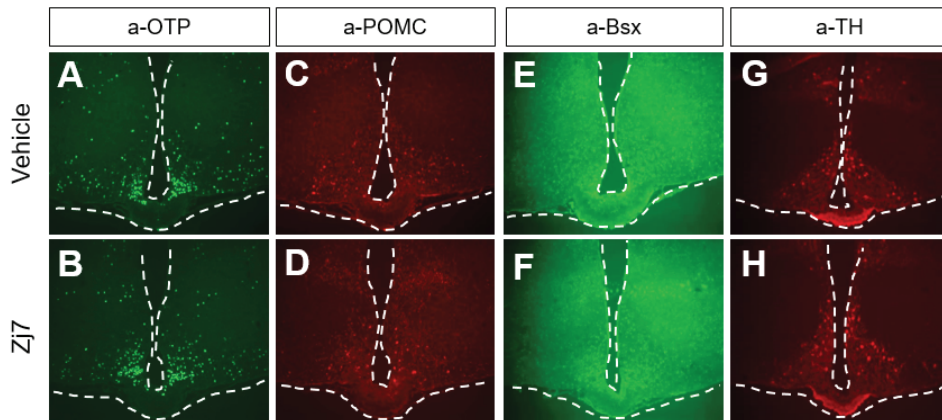
(A) Schematic showing AgRP induction by interaction between GR and Bsx.

(B) Working model of Zj7 treatment. Zj7 inhibits interaction between GR and Bsx.

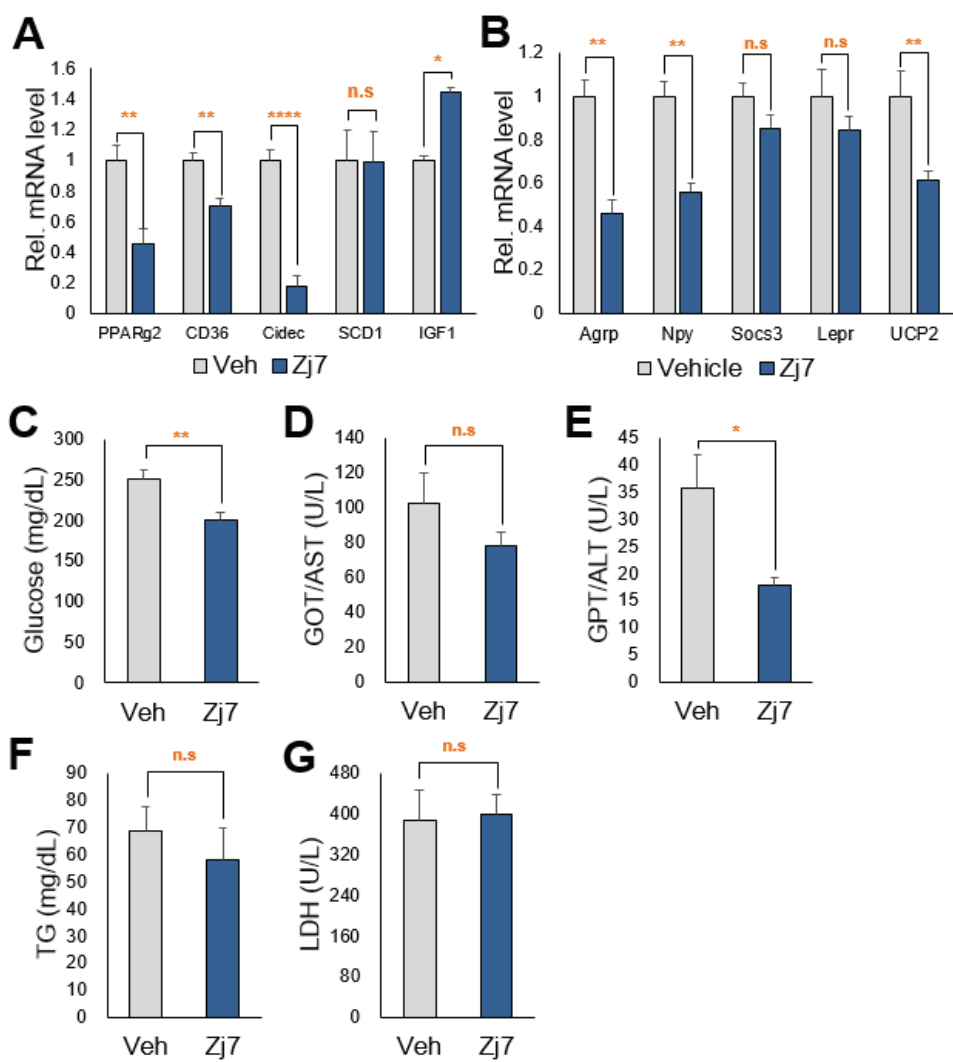
Supplementary Figure 1. Zj7 inhibits the expression of AgRP/NPY in ARC neurons of DIO mice. (A) AgRP/NPY ISH images. Both AgRP and NPY were decreased in Zj7 treated DIO mice ARC but, GHRH was not changed. (B), (C) and (D) Relative intensity of AgRP/NPY/GHRH ISH images.



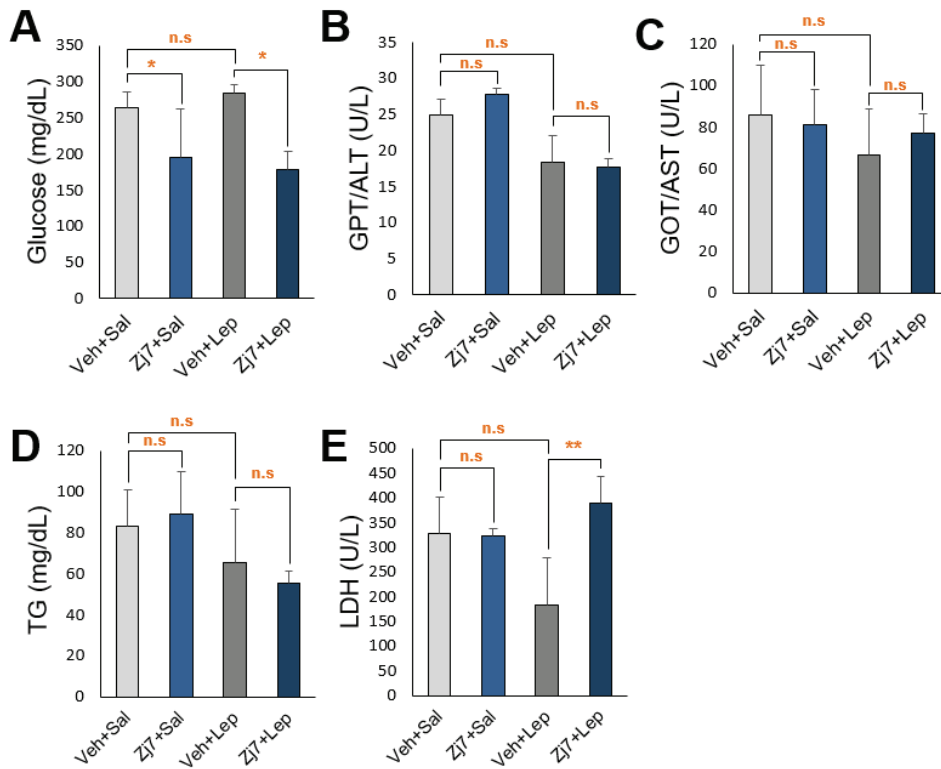
Supplementary Figure 2. Zj7 does not affect the cell number of AgRP-/POMC-/TH- neurons in ARC. (A)~(H) immunofluorescence images. Long-term administration of Zj7 does not affect cell population of ARC neurons. Vehicle (n=4), Zj7 (n=6)



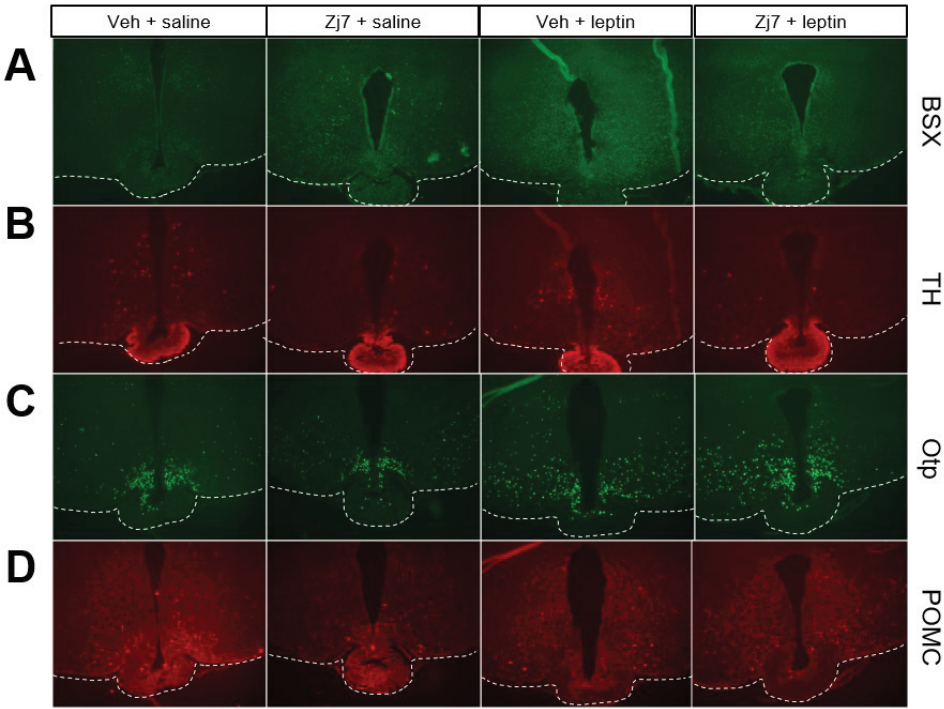
Supplementary Figure 3. Zj7 reduced lipogenic gene' s mRNA levels of liver and AgRP/NPY/UCP2 mRNA levels of hypothalamus. (A), (B) Quantitative RT-PCR result of liver and hypothalamus of DIO mice. The long-term administration of Zj7 reduced lipogenic-associated gene mRNA of DIO mice liver. Also the expression level of AgRP, NPY and UCP2 was decreased in Zj7 treated mice hypothalamus. Vehicle (n=3), Zj7 (n=3). (C) Serum glucose level (mg/dL), AST (U/L), ALT (U/L), TG (mg/dL) and LDH (U/L) was measured using biochemistry analyzer (Dri-chem; FUJIFILM). ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, 'ns' indicates not significant. Vehicle (n=10), Zj7 (n=8).



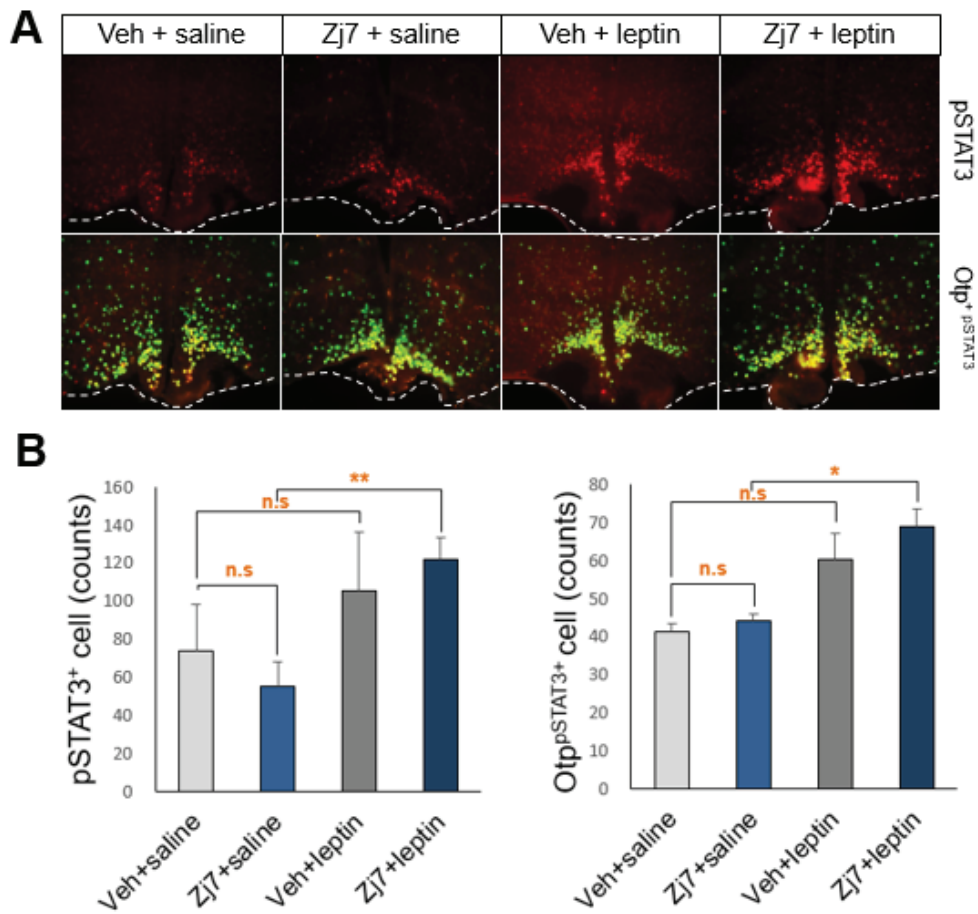
Supplementary Figure 4. Zj7 reduced blood glucose level of lean mice. (A)~(E) The serum glucose level (mg/dL), AST (U/L), ALT (U/L), TG (mg/dL) and LDH (U/L) was measured using biochemistry analyzer (Dri-chem; FUJIFILM). Acute administration of Zj7 reduced blood glucose level. There was no significant difference between Zj7+Saline and Zj7+Leptin groups. ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, 'ns' indicates not significant. Veh+Sal (n=7), Zj7+Sal (n=7) Veh+Lep (n=6) and Zj7+Lep (n=7).



Supplementary Figure 5. The administration of leptin does not affect the cell number of neurons in ARC. (A)~(D)immunostaining analyses wit Bsx, TH, Otp and POMC antibodies for mouse hypothalamus with vehicle+saline, Zj7+saline, vehicle+leptin and Zj7+leptin. Leptin administration with Zj7 does not change the population of neurons in ARC.



Supplementary Figure 6. The Leptin administration increased pSTAT3+ cells in Arc of hypothalamus. (A) Immunostaining analyses with Otp and pSTAT3 antibodies for mouse hypothalamus with vehicle+saline, Zj7+saline, vehicle+leptin and Zj7+leptin. (B) Quantitative data of immunostaining images. Values are means \pm s.d. ** p<0.01, * p<0.05 'ns' indicates not significant.



V. 참고문헌

- (1) GBD 2015 Obesity Collaborators. "Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years." *New England Journal of Medicine* 377.1 (2017): 13–27.
- (2) Finucane, Mariel M., et al. "National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants." *The Lancet* 377.9765 (2011): 557–567.
- (3) Kelly, Tanika, et al. "Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030." *International journal of obesity* 32.9 (2008): 1431.
- (4) Olshansky, S. Jay, et al. "A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century." *New England Journal of Medicine* 352.11 (2005): 1138–1145.
- (5) Lavie, Carl J., Richard V. Milani, and Hector O. Ventura. "Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss." *Journal of the American college of cardiology* 53.21 (2009): 1925–1932.
- (6) Kahn, Steven E., Rebecca L. Hull, and Kristina M. Utzschneider. "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." *Nature* 444.7121 (2006): 840.
- (7) Barsh, Gregory S., and Michael W. Schwartz. "Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration." *Nature Reviews Genetics* 3.8 (2002): 589.
- (8) Wren, A. M., et al. "The novel hypothalamic peptide ghrelin

stimulates food intake and growth hormone secretion." *Endocrinology* 141.11 (2000): 4325–4328.

(9) Myers Jr, Martin G., et al. "Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21.11 (2010): 643–651.

(10) Dietrich, Marcelo O., and Tamas L. Horvath. "Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity." *Trends in neurosciences* 36.2 (2013): 65–73.

(11) Considine, Robert V., et al. "Serum immunoreactive–leptin concentrations in normal–weight and obese humans." *New England Journal of Medicine* 334.5 (1996): 292–295.

(12) Frederich, Robert C., et al. "Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet–induced resistance to leptin action." *Nature medicine* 1.12 (1995): 1311.

(13) Klok, M. D., S. Jakobsdottir, and M. L. Drent. "The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review." *Obesity reviews* 8.1 (2007): 21–34.

(14) Kahn, Barbara B., and Jeffrey S. Flier. "Obesity and insulin resistance." *The Journal of clinical investigation* 106.4 (2000): 473–481

(15) Shoelson, Steven E., Laura Herrero, and Afia Naaz. "Obesity, inflammation, and insulin resistance." *Gastroenterology* 132.6 (2007): 2169–2180.

(16) Kloting, Nora, et al. "Insulin–sensitive obesity." *American Journal of Physiology–Endocrinology and Metabolism* 299.3 (2010): E506–E515.

(17) Bano, Gul. "Glucose homeostasis, obesity and diabetes." *Best*

Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 27.5 (2013): 715–726.

(18) Myers, Martin G., Michael A. Cowley, and Heike Munzberg. "Mechanisms of leptin action and leptin resistance." *Annu. Rev. Physiol.* 70 (2008): 537–556.

(19) Myers Jr, Martin G., et al. "Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21.11 (2010): 643–651.

(20) Mazar, Rafi, et al. "Cleavage of the leptin receptor by matrix metalloproteinase-2 promotes leptin resistance and obesity in mice." *Science translational medicine* 10.455 (2018): eaah6324.

(21) Quinones, Mar, et al. "p53 in AgRP neurons is required for protection against diet-induced obesity via JNK1." *Nature communications* 9.1 (2018): 3432.

(22) Zhao, Shangang, et al. "Partial leptin reduction as an insulin sensitization and weight loss strategy." *Cell metabolism* 30.4 (2019): 706–719.

(23) Lee, Bora, et al. "Brain-specific homeobox factor as a target selector for glucocorticoid receptor in energy balance." *Molecular and cellular biology* 33.14 (2013): 2650–2658.

(24) Van Meerloo, Johan, Gertjan JL Kaspers, and Jacqueline Cloos. "Cell sensitivity assays: the MTT assay." *Cancer cell culture*. Humana Press, 2011. 237–245.

(25) Gerlier, Denis, and Nicole Thomasset. "Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation." *Journal of immunological methods* 94.1–2 (1986): 57–63.

(26) The role of glucocorticoid receptors in metabolic syndrome

and psychiatric illness

(27) Scheschowitsch, Karin, Jacqueline Alves Leite, and Jamil Assreuy. "New insights in glucocorticoid receptor signaling—more than just a ligand binding receptor." *Frontiers in endocrinology* 8 (2017): 16.

(28) Van Meerloo, Johan, Gertjan JL Kaspers, and Jacqueline Cloos. "Cell sensitivity assays: the MTT assay." *Cancer cell culture*. Humana Press, 2011. 237–245.

(29) Giguere, Vincent, et al. "Functional domains of the human glucocorticoid receptor." *Cell* 46.5 (1986): 645–652.

(30) Hollenberg, Stanley M., and Ronald M. Evans. "Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor." *Cell* 55.5 (1988): 899–906.

(31) Kim, Jung Dae, et al. "Microglial UCP2 mediates inflammation and obesity induced by high-fat feeding." *Cell metabolism* 30.5 (2019): 952–962.

(32) Vaisse, Christian, et al. "Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice." *Nature genetics* 14.1 (1996): 95–97.

(33) Rodgers, R. John, Matthias H. Tschöp, and John PH Wilding. "Anti-obesity drugs: past, present and future." *Disease models & mechanisms* 5.5 (2012): 621–626.

(34) Derosa, Giuseppe, and Pamela Maffioli. "Anti-obesity drugs: a review about their effects and their safety." *Expert opinion on drug safety* 11.3 (2012): 459–471.

(35) Melnikova, Irena, and David Wages. "Anti-obesity therapies." (2006): 369.

- (36) Daneschvar, Homayoun L., Mark D. Aronson, and Gerald W. Smetana. "FDA-approved anti-obesity drugs in the United States." *The American journal of medicine* 129.8 (2016): 879–e1.
- (37) Fleming, Joshua W., Katie S. McClendon, and Daniel M. Riche. "New obesity agents: lorcaserin and phentermine/topiramate." *Annals of Pharmacotherapy* 47.7–8 (2013): 1007–1016.
- (38) Cosentino, Gina, Ariane O. Conrad, and Gabriel I. Uwaifo. "Phentermine and topiramate for the management of obesity: a review." *Drug design, development and therapy* 7 (2013): 267.
- (39) Hendricks, E. J., et al. "Addiction potential of phentermine prescribed during long-term treatment of obesity." *International journal of obesity* 38.2 (2014): 292.
- (40) Garrow, John Stuart. *Obesity and related diseases*. Churchill Livingstone, 1988.
- (41) Stavropoulos–Kalinoglou, Antonios, et al. "Obesity in rheumatoid arthritis." *Rheumatology* 50.3 (2010): 450–462.
- (42) Spiegelman, Bruce M., and Jeffrey S. Flier. "Obesity and the regulation of energy balance." *cell* 104.4 (2001): 531–543.
- (43) Hill, James O., Holly R. Wyatt, and John C. Peters. "Energy balance and obesity." *Circulation* 126.1 (2012): 126–132.

Abstract

Selective inhibition of Gc and Bsx activity in ARC AgRP neurons reduces food intake and improves obesity

Kim, Intae

College of Pharmacy, Pharmacology major

The Graduate School

Seoul National University

In spite of the risks of obesity, effective drug treatment for obesity has not been found yet. In stressed condition, the level of glucocorticoid (Gc) is increased and promotes the orexigenic function of Gc is unclear. Agouti-related peptide (AgRP), an orexigenic neuropeptide is synthesized and secreted from the AgRP neurons in the arcuate nucleus (ARC) of hypothalamus.

Previously, it has been shown that Gc receptor (GR) and brain-specific homeobox factor (Bsx) interact and synergize to direct the induction of AgRP expression in hypothalamic ARC. To identify specific inhibitors that block the activity of GR and Bsx in inducing

AgRP expression, we set up a screening system using the AgRP-GRE luciferase reporter and identified small molecules that inhibit the synergistic activation by glucocorticoids and Bsx in HEK293T cells. Next, we tested the Anorexigenic effect of this molecule in mice by treating intraperitoneally (ip). We confirmed that the expression of AgRP was reduced in both acute and long-term treated mice. Consistently, this specific inhibitor also reduced food intake and body weight and, promoted energy expenditure in diet induced obesity (DIO) mice for 3 weeks. Taken together, these results further support the molecular basis of the orexigenic activity of GR/Bsx and provide the novel therapeutic target for obesity treatment.

Key words: Obesity, Gc, GR, Hypothalamus, ARC, Bsx, AgRP, Zj7

Student Number: 2018-24219