



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](#)

이학석사 학위논문

골수유래 대식세포의 Progranulin 결핍의
항비만 효과와 기전 연구

Anti-obesity effect and its mechanisms of
macrophage-specific progranulin-deficiency

울 산 대 학 교 대 학 원
의 과 학 과
장 원 희

골수유래 대식세포의 Progranulin 결핍의
항비만 효과와 기전 연구

지도교수 김민선

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2022년 02월

울산대학교 대학원
의과학과
장원희

장원희의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 송 영 섭 (인)

심사위원 김 민 선 (인)

심사위원 강 상 욱 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2022년 2월

국문요약

연구배경 : 비만은 제2형 당뇨병, 심혈관 질환 및 일부 암의 발생을 증가시키는 건강의 주요한 위험요인이다. 고지방식이를 장기간 섭취할 때 발생하는 비만은 몸 여러 장기에 염증 반응을 일으켜서 인슐린 저항성과 당뇨병을 일으키는 것으로 알려져 있다. Progranulin (PGRN)은 대식세포와 같이 혈액에 순환하는 면역세포를 조직으로 유도하는 기능을 가진다. 전신에 PGRN 결핍을 유도하면 고지방식으로 인한 인슐린 저항성이 개선되었지만, 비만 및 대사 질환의 진행에 대한 골수 유래 대식세포 (bone marrow-derived macrophages, BMDM)에서 PGRN의 역할이 아직 명확하게 다루어지지 않았다. 본 연구에서는 BMDM에 특이적인 PGRN이 비만에 끼치는 영향과 대사질환에 진행에 있어 구체적으로 어떠한 메커니즘으로 조절하는지 연구하고자 하였다.

재료 및 방법 : 비만 및 대사 질환에 대한 BMDM에서 PGRN의 역할을 확인하기 위해 LysM-cre 마우스를 $Grn^{f/f}$ 마우스와 교배하여 BMDM에서 *Grn* 유전자를 제거한 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스를 만들었다. $Grn^{f/f}$ 마우스와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스 간의 체중, 신체 구성, 음식 섭취, 에너지 소비, 포도당 및 인슐린 저항성을 일반식이 (chow diet, CD) 또는 고지방식이 (high fat diet, HFD) 조건에서 비교했다. 메커니즘을 설명하기 위해 지방조직에서 대식세포 침윤, M1/M2 비율, 그리고 시상하부에서 염증반응과 렙틴 저항성을 확인하였다

결과 : $Grn^{f/f}$ 마우스에 비해 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스는 HFD 섭취 동안 체중 증가 및 대사 기능 장애 감소를 보였으나 CD 섭취 동안에는 유의한 변화가 없었다. $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스는 에너지 소비량이 증가로 인하여 HFD를 섭취하는 동안 체중 증가가 억제하였다. 또한, $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스는 포도당 및 인슐린 저항성 역시 $Grn^{f/f}$ 마우스에 비해 많이 개선되었다. 메커니즘 연구에서 HFD를 먹은 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스는 지방조직과 혈액에서 염증성 사이토카인 발현량이 $Grn^{f/f}$ 마우스보다 많이 감소하였다. 또한 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스에서 HFD로 유도된 시상하부에서 염증성 사이토카인 발현과 소교세포, 정상세포의 활성 및 렙틴 저항성이 호전되었다.

결론 : 본 연구 결과, BMDM의 *Grm* 유전자로부터 만들어지는 PGRN 혹은 GRN이 지방조직과 시상하부에 염증을 일으켜서 HFD로 인한 비만과 대사 합병증을 촉진할 수 있음을 제시한다.

목차

국문요약	I
목차	III
서론	1
연구 목적	4
연구 방법	5
연구 결과	9
고찰	12
그림	14
참고문헌	29
영문요약	34

I. 서론

1. 비만: 유행성과 원인

비만은 많은 나라에서 가장 흔한 대사 질병 중 하나가 되었다. 성인 미국인의 약 3분의 1은 비만이고 미국인의 절반은 과체중이다. 세계보건기구 (WHO)는 적어도 10억 명의 성인이 비만하다고 보고했으며, 이 수치는 앞으로도 계속 증가할 것으로 예상된다 (1). 비만은 제2형 당뇨병 (type 2 diabetes, T2D), 동맥경화증 및 관상동맥 심장병의 위험 증가와 밀접한 관련이 있다 (2, 3). 비만은 에너지 섭취가 증가하고 에너지 소비가 감소하였을 때 발생하며 이로 인해 지방 저장량이 해로운 정도로 크게 증가한다. 비만의 발달은 환경, 대사 및 행동 요인의 영향을 받는다. 비만을 치료하기 위한 많은 노력이 있었지만 효과적인 치료법은 아직 부족한 실정이다.

2. 시상하부의 에너지항상성 조절

시상하부는 에너지 항상성을 조절하는 뇌에서 중요한 부분이다 (4). 이를 위해 시상하부는 말초 기관으로부터 오는 호르몬 및 영양 대사 신호를 통해 우리 몸의 에너지 상태를 감지하고, 이러한 정보를 조정하고 대사율 및 섭식 행동을 조절하여 에너지 균형을 유지한다 (5). 시상하부는 arcuate nucleus (ARC), paraventricular nucleus (PVN), lateral hypothalamic area (LHA), dorsomedial nucleus (DMN), ventromedial nucleus (VMN)으로 구성된다 (6).

그 중 ARC는 전신 대사 상태를 감지하는 측면에서 가장 중요한 영역이다. ARC는 third cerebroventricle (3V)과 blood-brain barrier (BBB)가 영양소와 호르몬이 유입되는 뇌실 주위 기관인 median eminence (ME)에 인접한 위치에 있다 (7). ARC에 있는 두 가지 종류의 뉴런은 에너지 균형 조절에 중요한 역할을 한다. 하나는 식욕을 자극하는 neuropeptide Y (NPY)와 agouti-related peptide (AgRP)를 발현하고 다른 하나는 proopiomelanocortin (POMC)와 cocaine, amphetamine-regulated transcript (CART)를 생산한다 (8). NPY는 에너지 소비를 억제하고 음식 섭취를 증가시켜 에너지 균형을 일으키는 대표적인 신경성 펩타이드이다 (9). POMC는 멜라노코르틴 수용체 MC3R, MC4R에

대한 agonist인 α -melanocyte stimulating factor (α -MSH)를 생성하도록 처리되어 운동 활성 및 에너지 소비를 촉진하지만 음식 섭취는 억제한다 (10). AgRP는 멜라노코르틴 작용에 반대하는 MC3R 및 MC4R에 대한 antagonist이다. MC3R, MC4R을 발현하는 다운스트림 표적 뉴런과 함께, 두 집단 모두 중앙 멜라노코르틴 시스템을 구성한다 (11). 이 신경 회로는 많은 주변 신호를 감지하고 통합하여 음식 섭취와 에너지 대사를 정밀하게 제어하는 데 중요한 것으로 알려져 있다 (12).

3. 비만과 염증의 관련성

비만을 유발하는 대사질환에 관련된 메커니즘 중 염증반응은 많은 관심을 받고 있다. 반복적인 고지방식이 (high fat diet, HFD)가 특히 백색 지방 조직의 여러 기관에서 염증을 유발한다는 많은 증거가 있다 (13). 비만과 관련된 지방조직 염증은 전염증성 사이토카인과 케모카인 발현을 약하게 증가시키고 M1형 대식세포, 세포독성 T 림프구, NK 세포를 포함한 전염증성 면역세포의 축적을 특징으로 한다 (14). HFD 섭취 후 염증 반응은 중추신경계 (central nerve system, CNS), 특히 시상하부 및 지방조직, 간, 골격근을 포함한 말초 조직에서 발생한다 (15). HFD로 유도된 상승된 혈장 유리 지방산 (free fatty acid, FFA)은 순환하는 대식세포에서 toll-유사 수용체 (toll-like receptors, TLR) 발현을 자극하여 염증성인 M1의 형태로 나타나게 만들 수 있다 (16). 순환하는 M1 대식세포가 말초 조직에 도달하면 포도당 불내성 및 인슐린 저항성과 같은 전신 염증이 발생한다 (17). 염증성 신호전달 경로와 염증성을 일으키는 면역세포의 지방세포의 축적을 억제시키면 식이유발비만 (diet-induced obesity, DIO)를 동반한 마우스에서 인슐린 저항성과 내당능 장애를 완화시켰다 (18, 19). 따라서 과도한 영양으로 인한 염증반응은 비만과 제2형 당뇨병을 연결하는 핵심 기전으로 제시되었다.

4. Progranulin

Progranulin (PGRN)은 분비 단백질이다. 포유류에서 PGRN은 granulin (GRN) 모티프와 링커 부분의 7.5개가 반복되어 구성된다 (20). Elastase PGRN과 같은 세포외 프로테아제는 PGRN을 GRN (GRN A-F)과 paraganulin으로 절단하며, 이는 아직

알려지지 않은 별개의 기능을 가질 수 있다 (20). 주로 뉴런과 미세아교세포에서 발현되며 PGRN 결핍은 전측두엽치매 (frontotemporal dementia, FTD)를 유발하고, 또한 염증 반응을 조절하는 것으로 알려져 있다 (21). 연구에 따르면 PGRN은 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 수용체의 리간드이며, 이는 PGRN이 류마티스 관절염과 같은 항염증 반응을 한다는 것을 시사한다 (22, 23). PGRN은 또한 염증을 일으키는 작용을 가진다. 전신 *Grn* 녹아웃 마우스에서 IL-6가 감소하고 HFD로 유도한 인슐린 저항성을 예방한다는 것을 보여주었다 (24). 지금까지 알려진 바로는 PGRN은 염증을 억제하는 작용을, GRN은 염증을 일으키는 상반된 작용을 가지고 있다.

5. 고지방식이와 대식세포의 관련성

HFD는 지방조직에서 지방조직 대식세포 (adipose tissue macrophage, ATM)의 침투를 유도한다. ATM 함량은 C-C 모티브 케모카인수용체-2 (C-C motif chemokine receptor 2, CCR2), 단핵구 화학유인단백질-1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP1, CCL2)에 의존적인 메커니즘을 통해 인슐린 저항성을 강하게 증가시켰다 (25). PGRN은 강력한 화학유인인자로 제2형 당뇨병 환자에서 혈청 PGRN의 증가되어 인슐린 저항성을 증가시키고, 내장 지방조직에서 대식세포 침윤을 유도하였다 (26, 27). 마찬가지로, 또 다른 논문은 *Grn* 유전자의 전신적으로 억제하면 Mac-3⁺ 염증성 대식세포를 낮추어 HFD으로 인한 인슐린 저항성, 지방세포의 증가와 비만을 유의하게 예방한다는 것을 입증하였다 (28).

II. 연구 목적

Progranulin (PGRN) 발현은 고지방식이-유도 비만 모델과 제2형 당뇨 모델에서 증가하며, 증가된 PGRN은 혈액 내의 대식세포와 같은 면역 세포를 염증 조직으로 유도하는 역할을 수행한다고 알려져 있다 (29). 기능 상실 연구를 수행한 선행 연구에 따르면, 몸 전체에서 PGRN의 결핍은 고지방식으로 인한 인슐린 저항성과 염증반응을 개선시켰다 (24). 그러나 어떠한 세포에서 이러한 역할을 수행하는지에 대한 세포-특이적 연구는 부재한 상태이다. 최근 순환되는 단핵구와 모집된 대식세포가 고지방식이 동안 PGRN의 강하게 발현되는 것이 보고된 바 있으며 (30, 31), 이를 근거로 본 연구에서는 bone marrow-derived macrophage (BMDM)에서의 PGRN의 역할에 초점을 맞추었다. 본 학위 논문에서는 BMDM 특이적인 PGRN 결핍이 정상식이와 고지방식이 섭취 상태에서 대사에 미치는 영향을 비교 분석하였으며, 그 기전을 연구하는 것을 목적으로 하였다.

III 연구 방법

1. 동물

모든 동물실험들은 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)에서 승인을 받았다. C57BL/6 유전적 배경의 Lysozyme M(LysM)-cre 마우스 (Jackson Laboratory, ME, USA, #004781)를 Grn^{f/f} 마우스 (Jackson Laboratory, #013174)와 교배하여 LysM^{ΔGrn} 마우스를 만들었다. LysM^{ΔGrn} 마우스를 enhanced green fluorescence protein (eGFP) 를 가진 마우스 (Jackson Laboratory, #007676)와 교배하여 LysM^{ΔGrn};GFP 마우스를 만들었다. 동물들은 통제된 온도 (22 ± 1°C)와 12시간 주기 (오전 8시 - 오후 8시 조명)에서 사육하였다. 기본적으로 마우스는 표준식이 (chow diet, CD, Samyang, Seoul, Korea)와 물을 자유롭게 섭취였고. 식이로 인한 비만을 유도하기 위해 생후 7주부터 고지방식이 (58% 지방, Research Diets, NJ, USA, #D12331)를 공급하였다.

2. 먹이섭취량과 비만도 평가

음식섭취량과 체중을 weaning 후 매주 측정하였다. 신체 성분 분석을 위해 dual x-ray absorptiometry (iNSiGHT VET DXA, OsteoSys, Seoul, Korea)을 사용하여 제지방과 체지방을 측정하였다.

3. 에너지 소비량 측정

에너지소비량 (energy expenditure, EE)와 locomotor activity는 comprehensive lab monitoring system (CLAMS, Columbus Instruments, OH, USA)로 측정하였다. 마우스를 각 chamber에 넣고 24h 적응시킨 후 48h 동안 확인하였다. 마우스가 chamber에 있는 동안 낮과 밤의 주기는 이전과 동일했고 음식은 CLAMS 케이지 바닥에 두었다. 모든 EE 데이터는 제지방량으로 나누어 계산하였다.

4. 당대사 평가

내당능을 평가하기 위하여 glucose tolerance test (GTT)를 시행하였다. 모든 마우스를 밤 사이 16 시간 동안 금식시킨 뒤 D-glucose (1 g/kg, Sigma, MO, USA, #G7021)를 경구로 투여하였다. 인슐린 감수성을 평가하기 위하여 insulin tolerance test (ITT)을 위해 마우스를 16h 동안 금식한 후 인슐린 (Humulin-R® 0.25 U/kg, Eli Lilly, USA)을 복막에 주사했다. GTT의 경우 경구투여 후 0, 15, 30, 60, 120분에 혈당을 측정하였고, ITT의 경우 주사 후 0, 30, 60, 90, 120분에 혈당을 측정하였다. 혈액의 경우 꼬리의 정맥에서 얻어 사용했고, 혈당은 혈당측정기 (ACCU-CHEK®, Aviva Plus System, IN, USA)를 사용하여 측정했다.

5. 약물 주입 후 음식 섭취량 측정

Stainless steel cannula (26 gauge)를 마우스의 3rd ventricle (3V)에 이식했다. 7 일 동안 회복을 시킨 후, 각 cannula가 올바른 위치에 있는지는 50 ng의 angiotensin-II 을 투여 후 양성반응을 관찰함으로써 확인하였다. angiotensin-II 을 투여한 후 물을 마시지 않는 동물은 연구에서 제외되었다. 렙틴 (1 µg)을 2 µl로 생리 식염수에 녹여서 3V에 삽입한 캐놀라를 통하여 서서히 주입하였다. 렙틴 주사 후 24 시간 동안 음식섭취량과 체중을 모니터링했다.

6. 혈액의 대식세포 분리

Blood sample을 LysM:GFP와 LysM^{ΔGrn}:GFP 마우스의 안와채혈을 통해 얻은 후 1 ml의 1X red blood cell (RBC) lysis buffer (Invitrogen, MA, USA, #00-4333) 을 10 분간 처리하였다. PBS로 3 번 washing 후 300 x g 에서 5 분간 centrifuge 하여 2% FBS로 pellet을 resuspension한다. GFP를 띄는 세포를 BD FACS Aria II Cell Sorter (BD Biosciences, CA, USA)로 분리하여 RNA를 추출한 뒤 qRT-PCR로 *Grn*이 제대로 감소하였는지 확인하였다.

7. 비만조직 대식세포의 분리

부고환 지방조직을 얻어 잘게 자른 후 collagenase buffer (0.1 M HEPES, 0.125 M NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 1.5% (w/v) glucose, and 0.1% (w/v) collagenase I)에 20분간 37°C에서 처리하였다. 원심분리 후 SVC fraction을 lysis buffer (155 mM NH₄Cl/0.1 M Tris-HCl (pH 7.65) (9:1)) 를 넣은 후 적혈구로부터 분리하였다. PBS washing 후 CD11b (BD Biosciences, #MAB1124), F4/80 (eBioscience, MA, USA, #ab6640), CD11c (eBioscience, #14-0114-82), CD206 (eBioscience, #17-2061-82) 단클론항체를 사용하여 염색 후 FACS Canto II (BD Biosciences)로 대식세포를 분석하였다.

8. 지방조직 염색

지방 조직을 포르말린으로 고정 후 파라핀 블록을 만들어 5 µm 두께로 잘랐다. 얻은 조직을 xylene으로 파라핀을 제거하고 에탄올로 탈수화를 한 후 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 진행하였다.

9. 시상하부 면역염색

Zoletil® (40 mg/kg)과 Rompun® (5 mg/kg)을 복강 내 (IP) 주사하여 마우스를 마취시킨 다음, 심장의 좌심실을 통해 50 ml의 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde, PFA)와 50 ml의 식염수로 perfusion하였다. 얻은 뇌를 4°C에서 16시간 동안 4% PFA로 post-fixation하고, 조직이 용기 바닥으로 가라앉을 때까지 30% sucrose 용액에서 탈수화하였다. 시상하부 (Bregma -1.22 mm ~ -2.30 mm) 를 포함하는 부분을 cryostat (Leica, Itzlar, Gemany)를 사용하여 30 µm 두께로 절단하였다. Iba1과 GFAP 염색을 위해 시상하부 조각을 3% donkey serum으로 1시간 동안 blocking 한 후 Iba1 (1:400, goat, Abcam, Cambridge, UK, #ab5706), GFAP (1:1000, rabbit, Millipore, MA, USA, #ab5804) antibody를 4°C에서 48시간 동안 처리하였다. washing 후 슬라이드를 Alexa-Flour 633-(Iba1)와 Alexa-Flour 555-(GFAP)가 붙은 2차 antibody (1:1000, Invitrogen)를 실온에서 2시간 동안 처리하였다. 핵 염색을 위해 10분 동안 DAPI (5 mg/ml, 1:10,000)로 처리했다. 공초점현미경 (Carl Zeiss 710, Jena, Germany)을 사용하여 면역형광사진을

얻었다.

10. 유전자 발현 분석

마우스를 자유롭게 feeding 하였고 오전 9:00-10:00에 희생시켰다. Mediobasal 시상하부 샘플을 얻고 액체 질소에서 급속 동결하여 -70°C 에서 보관했다. 모든 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 TRIzol을 사용하여 추출되었다. 5 μg RNA를 역전사하여 cDNA를 만들었다. Threshold cycle (CT) 값은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenas (GAPDH)로 평균화하였다. 사용한 primer는 다음과 같다. Il-1 β (5'-ttc acc atg gaa tcc gtg tc-3' 와 5'-gtc ttg gcc gag gac taa gg-3'), Il-6 (5'-gat gga tgc tac caa act gg-3' 와 5'-tgt act cca ggt agc tat gg-3'), Tnfa (5'- ttc gag tga caa gcc tgt ag-3' 와 5'-ctt tga gat cca tgc cgt tg -3'), Il-4 (5'-aga ttg gat gtg cca aac gtc ctc a-3'와 5'-aat atg cga agc act tgg aag cc-3'), Il-10 (5'-att gaa ttc cct ggg tga gga-3' 와 5'-cac agg gga gaa atc gat gac a-3'), Ptp1b (5'- cat gca aag tcg cga agc tt-3' 와 5'-gag aat ata gct cct ctg gg-3'), Socs3 (5'-ctt tct tat ccg cga cag ct-3' 와 5'-tca ctc tgc agc gaa aag ct-3').

11. 통계분석

모든 데이터는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 통계분석은 SPSS version 24 (IBM Analytics, North Castle, NY) 또는 Prism (GraphPad) software version 8.0 (GraphPad, San Diego, CA)를 통해 진행하였다. 표본 크기는 이전 연구에서 채택된 비슷한 방법으로 채택되었다. 그룹 간 통계분석은 두 군 간에는 t-test를 사용하고, 3 군 이상 간 분석에는 ANNOVA 분석을 시행한 뒤 post-hoc test (LSD)로 사후검정을 실시하였다. P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

IV 연구 결과

1. 정상식이 섭취 상태에서 골수유래 대식세포의 progranulin 유전자 결핍이 대사 표현형에 미치는 영향

대식세포의 PGRN 결핍이 대사에 어떻게 영향을 미치는지 확인했다. Grn-floxed ($Grn^{f/f}$) 마우스와 LysM 프로모터에서 cre recombinase를 발현하는 LysM-cre 마우스를 교차시켜 BMDM에서 PGRN에 결함이 있는 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스를 만들었다. 유세포 분석을 사용하여 LysM:GFP 또는 $LysM^{\Delta Grn};GFP$ 마우스의 혈액에서 GFP⁺ 세포를 분리하고 GFP⁺ 단핵구와 대식세포에서 *Grn* mRNA의 60% 이상 감소를 확인하였다 (Figure 1).

20주령까지 모니터링을 진행했지만 전체적인 모습과 체중 변화, 체지방량, 제지방량, 음식 섭취량, 에너지 소비량은 $Grn^{f/f}$ 마우스와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스에서 비슷했다 (Figure 2, 3, 4). 또한 포도당과 인슐린에 대한 반응을 확인하였지만 이들 그룹 사이에는 차이가 없었다 (Figure 5). 이 데이터는 BMDM에 특이적인 PGRN 결핍이 성장, 식욕 및 신진대사를 유의하게 방해하지 않는다는 것을 시사한다.

2. 고지방식이 섭취 상태에서 골수유래 대식세포의 progranulin 유전자 결핍이 대사 표현형에 미치는 영향

다른 논문에서 PGRN 발현이 고지방식이 (high fat diet, HFD)와 같은 고에너지 조건에 반응하여 상당히 증가한다는 것을 보여주었다 (28). BMDM의 PGRN 결핍이 전신 대사에 미치는 영향을 조사하기 위해 7주령의 $Grn^{f/f}$ 마우스와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스에게 HFD를 먹였다. 결과는 BMDM의 PGRN 결핍이 음식섭취에 영향을 미치지 않으면서 HFD으로 인한 체중 증가를 방지한다는 것을 보여주었다 (Figure 6, 7).

체중 감소의 원인을 확인하기 위해 에너지 소비를 측정했고 야간시간에 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스가 $Grn^{f/f}$ 마우스에 비해 증가된 기초 대사율을 나타내는 것을 확인하였다 (Figure 8). 이러한 데이터는 증가된 에너지 소비가 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스에서 식이 유발 비만의 진행을 예방함을 시사한다.

3. 골수유래 대식세포의 progranulin 유전자 결핍이 고지방식이 섭취에 의한 지방조직으로 대식세포 침윤에 미치는 영향

지방이 축적될 때, 대식세포의 침윤이 증가되는 것이 인슐린 저항성 및 당 대사장애에 발생과 밀접하게 관련되어 있다는 것은 잘 알려져 있다. PGRN은 Erk에 따라 chemotactic activity을 일으킨다 (33). BMDM에서의 PGRN 결핍이 대식세포의 침윤을 방지하여 식이 유발 비만을 개선하는 데 관여할 수 있다고 가정하였다. 예상대로 지방 조직의 지방 세포 크기와 왕관 모양 구조 (crown-like structure, CLS)의 수는 지방량이 증가할 때 같이 증가하였다 (Figure 10).

지방조직의 대식세포는 그 기능과 표현형에 따라 두 가지 주요 집단으로 분류된다. 일반적으로 전염증성 상태의 대식세포를 M1, 항염증성 상태의 대식세포를 M2라고 한다 (34). 식이로 인해 유도된 비만이 진행되는 동안 M1-지방 조직 대식세포 (adipose tissue macrophage, ATM)의 수가 증가하고 인슐린 저항성과 지방 조직에서의 염증과 상관관계가 있다 (35). 다음으로 CD11b⁺ F4/80⁺ ATM 간의 M1(CD11c⁺)/M2(CD206⁺) 비율을 측정했다. 결과는 BMDM에 특이적인 PGRN 결핍이 CD11b⁺ F4/80⁺ ATM 중 CD11c⁺ 세포 (M1-ATM)의 양을 낮추고 CD206⁺세포 (M2-ATM)의 양을 증가시킴으로써 HFD에 의해 유도된 증가된 M1/M2 비율을 유의하게 감소시켰다는 것을 나타냈다 (Figure 11). 이 데이터는 BMDM의 PGRN 결핍이 M1/M2 비율을 제어하여 비만을 예방한다는 것을 의미한다.

4. 골수유래 대식세포의 progranulin 유전자 결핍이 고지방식이 섭취에 의한 시상하부의 염증 반응과 렙틴반응성에 미치는 영향 .

시상하부는 영양소와 호르몬을 감지하여 식욕과 에너지 소비를 조절하는 데 중추적인 역할을 한다 (4, 36). 이전에 비만 관련 대사 장애가 시상하부의 ARC에서 혈관주위에 있는 골수유래 대식세포의 확장과 관련이 있다고 보고했다 (30). ARH 대식세포에서 PGRN 결핍의 영향을 조사하기 위해 ARH에서 GFP⁺ 대식세포와 Iba1⁺ 인 전체 미세아교세포의 수를 측정했다. 그 결과, BMDM의 PGRN 결핍이 Iba1⁺ 미세아교세포의 수에 영향을 미치지 않으면서 ARH에서 HFD로 인한 대식세포 증가를 막는 것을 보여주었다 (Figure 12). ARH에 있는 대식세포의 수뿐만 아니라 HFD로 유도된

활성화된 성상세포는 BMDM의 PGRN 결핍에 의해 회복되었다 (Figure 13).

또한, 시상하부에서 사이토카인 발현을 측정하여 시상하부 염증을 확인했다. BMDM에 특이적인 PGRN 결핍이 HFD에 의해 *Il-1 β* , *Il-6*, *TNF- α* 와 같은 증가된 전염증성 사이토카인을 강하게 회복되는 것을 보여주었다 (Figure 14). 이러한 데이터는 BMDM의 PGRN 결핍이 ARH에서 시상하부 염증과 대식세포 축적을 유의하게 감소시켰음을 시사한다. 여러 연구에서 시상하부 염증성 사이토카인의 활성화가 시상하부 뉴런에서 영양 과잉 관련 렙틴 신호 전달 장애를 매개하는 것으로 나타났다 (29, 30) 이를 확인하기 위해 제 3 뇌실 (3rd ventricle, 3V)에 렙틴을 주입하여 시상하부의 렙틴 민감도를 조사했다. 10주 동안 HFD를 먹은 마우스에서 렙틴으로 인한 식욕 억제 효과가 감소하였으나, BMDM-특이적인 PGRN 결핍 마우스에서 렙틴 반응성이 호전되었다 (Figure 15). 따라서 이러한 관찰은 BMDM에서 유래된 PGRN 결핍이 HFD 섭취로 유발된 시상하부에서 대식세포 확장, 소교세포 및 성상세포 염증성 활성화, 염증성 사이토카인 발현 및 렙틴 저항성에 기여한다는 것을 의미한다.

V. 고찰

이 논문에서 골수 유래 대식세포 (bone marrow-derived macrophages, BMDM)에서 Progranulin (PGRN)이 비만과 대사성 질환의 발병에 미치는 역할을 입증했다. PGRN은 조혈 세포, 뉴런, 대식세포, 미세아교세포, 수지상 세포 및 T 림프구와 같은 면역세포를 포함하는 다양한 세포에서 널리 발현되는 것으로 알려져 있지만, 염증과 대사에 대한 각 세포에서 PGRN의 특정 역할은 불분명하다. 본 연구 결과는 BMDM *Grn* 유전자에 의하여 생산되는 단백 산물이 HFD 섭취 동안 비만 및 대사 장애의 진행에 중요한 역할을 한다는 것을 증명하여 주었다.

PGRN 결핍은 전두측두엽 치매 (frontotemporal dementia, FTD), 신경 세로이드 리포푸신증 (neuronal ceroid lipofuscinoses, NCL)을 유발한다 (16). 그러나 PGRN이 순환하는 면역 세포를 모집하는 강력한 화학 유인 분자이지만 신진대사에 대한 PGRN 결핍의 역할에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 이 논문에서는 BMDM의 PGRN 결핍이 일반식이 (chow diet, CD)에서 체중 증가, 음식섭취, 포도당 내성, 인슐린 저항성 및 에너지 소비를 조절하지 않는다는 것을 보여준다 (Figure 1, 2, 3, 4). 그러나 HFD 동안 BMDM에 특이적인 PGRN 결핍은 비만 표현형, 포도당 및 인슐린 저항성을 상당히 완화하고 HFD를 먹인 대조군에 비해 에너지소비를 개선시켰다 (Figure 5, 6, 7, 8). HFD와 제2형 당뇨병은 혈액과 시상하부에서 PGRN 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며, 이는 PGRN 발현 수준과 지방량 간에 상관관계를 의미한다 (24, 29, 39). 이와 일치하게 여러 연구에서 PGRN의 투여가 포도당과 인슐린 민감성에 영향을 준다고 보고되었다 (24, 40, 41). 종합하자면, 이러한 결과는 PGRN이 인슐린 신호를 손상시키는 정확한 메커니즘이 아직 해결되지 않았지만 증가한 PGRN 수준이 대사 합병증 일으킬 수 있는 강한 연관성을 설명한다.

이전 연구에서 PGRN은 케모카인으로 알려져 있다. 여러 논문에서 *Grn* 유전자의 제거가 지방 조직 염증 및 인슐린 저항성으로 이어지는 지방 조직 대식세포 (adipose tissue macrophage, ATM) 모집의 예방과 관련이 있음을 보여주었다 (28, 42). 순환되는 단핵구와 모집된 대식세포가 HFD 동안 PGRN의 강하게 발현하기 때문에 BMDM에서 PGRN의 역할에 초점을 맞추었다 (30, 31). BMDM의 PGRN 결핍은 더

작은 지방 크기를 수반하는 ATM의 왕관 모양 구조 (crown-like structure, CLS)의 수를 상당히 낮췄다 (Figure 10). 더욱이, PGRN 결핍은 또한 HFD에 의해 유도된 증가된 대식세포 M1/M2 비율을 감소시켰는데 (Figure 11), 이는 *Grn* 유전자의 제거가 HFD 동안 염증 상태로 전환되는 것을 억제한다는 것을 의미한다. 종합하면, BMDM에서 유래된 *Grn* 단백질 산물이 HFD 동안 M1/M2 비율을 조절함으로써 지방조직의 염증반응과 인슐린 저항성 등 대사기능의 장애를 유발하는데 중요한 역할을 한다.

최근 리소자임 M+ (lysozyme M, LysM) 대식세포를 BMDM으로 보고되었으며, 이는 미세아교세포 집단과 구별된다 (43). HFD는 위와 같은 세포의 증식과 이동을 자극하여 시상하부 염증 및 대사 질환을 일으킨다 (30). BMDM에 특이적인 PGRN 결핍이 ARH에서 HFD로 인한 대식세포 확장을 상당히 감소시키는 것으로 나타났다 (Figure 12). Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1/AIF1)은 중추신경계 (central nerve system, CNS)의 전체 미세아교세포의 마커로 사용된다. BMDM의 PGRN 결핍은 ARH에서의 확장을 줄였지만 Iba1⁺ 미세아교세포 활성화와 증가를 막지 못하였다 (Figure 12). 이것은 ARH에서 BMDM의 확장이 시상하부 염증과 관련되어 있음을 강하게 의미한다. ARH의 BMDM이 혈관주위에 존재하는 대식세포 (perivascular macrophages, PVM)와 시상하부 실질의 대식세포 (parenchymal macrophages, PM)로 구분된다고 보고되었다 (44, 45). 대식세포 특이적인 iNOS 결핍은 HFD 동안 ARH에서 PM의 수를 감소시키는 PVM의 증식을 방해한다. Figure 12의 데이터는 BMDM의 *Grn* 유전자 결핍이 HFD를 먹인 대조군에 비해 PM의 수를 감소시키는 것으로 나타났다. 종합하면, BMDM의 PGRN은 HFD 동안 시상하부 염증과 렙틴저항성을 유발한다.

세균 감염과 TNF 투여로 유발한 시상하부 염증은 말초 지방조직에 면역 반응을 변화시키는 것으로 나타났다 (46, 47). 마찬가지로, ARH에서 대식세포 축적을 막는 것이 HFD 동안 전신 포도당 및 인슐린 대사를 유의하게 개선시켰다. 따라서 시상하부와 말초 대사 간에 염증 반응에 있어서 유의미한 상관관계가 있다. 본 논문은 골수 유래 대식세포에 특이적인 *Grn* 유전자의 단백질 산물이 지방조직과 시상하부에 대식세포 축적을 증가시켜 비만과 포도당, 인슐린 내성의 진행에 기여한다는 것을 강조한다.

VI. 그림

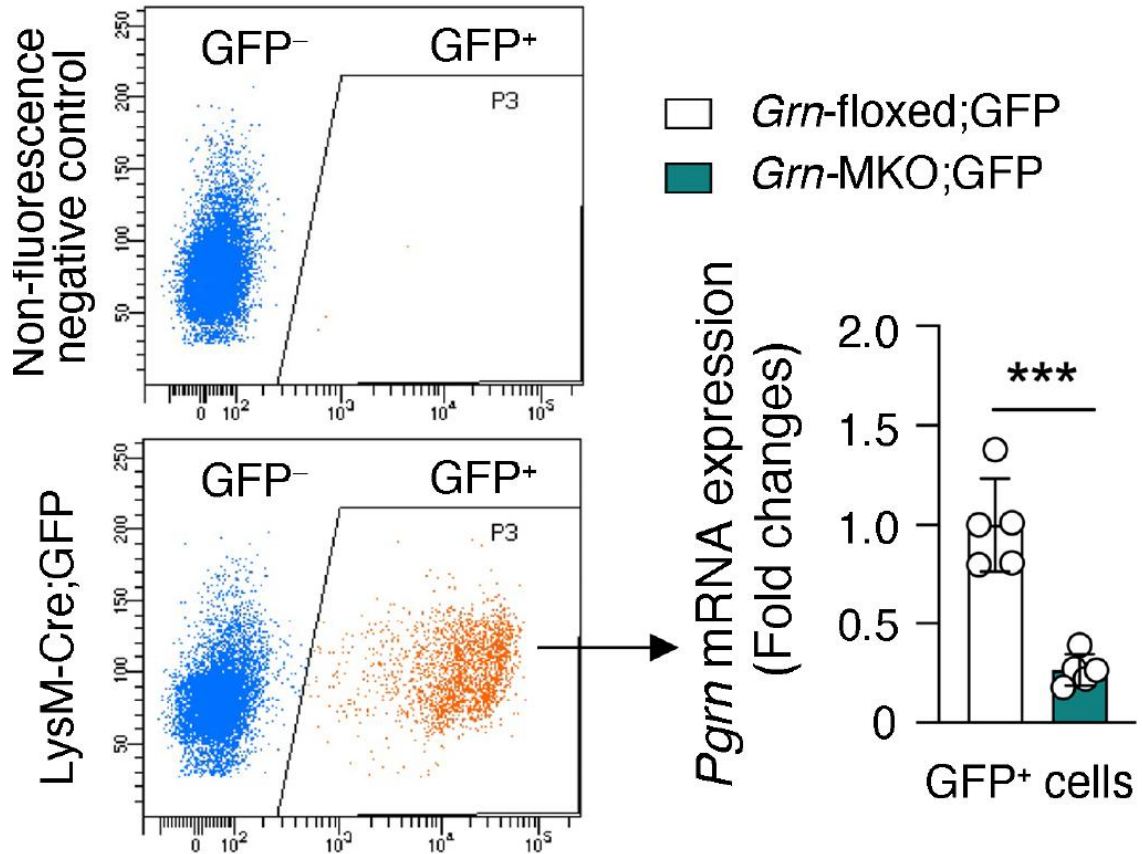


Figure 1. LysM;GFP 와 LysM^{ΔGrn};GFP 마우스의 대식세포의 Grn mRNA 발현량 비교

LysM;GFP와 LysM^{ΔGrn};GFP 마우스의 대식세포에서 GFP⁺로 sorting하여 Grn mRNA 발현양 비교. 마우스의 안와채혈을 통해 blood sample을 이용하였다. GFP를 띄는 세포를 BD FACS Aria II Cell Sorter로 분리하여 qRT-PCR로 Grn이 제대로 depletion된 것을 확인했다 (n = 6). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다. ****p* < 0.005 vs. LysM;GFP.

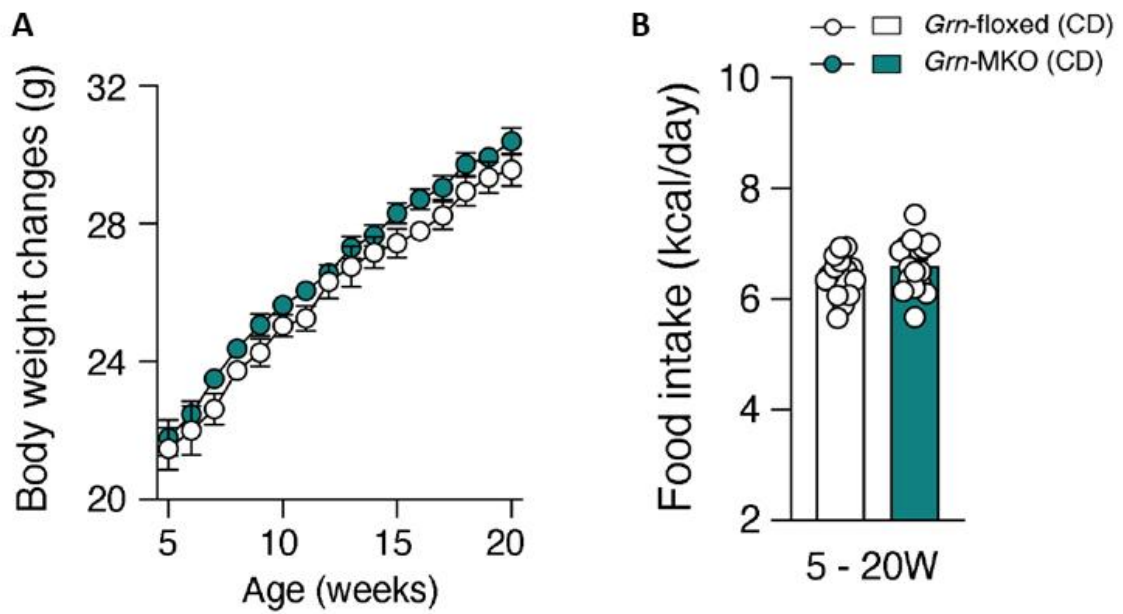


Figure 2. CD 조건에서 체중과 음식섭취량 비교

(A) Chow diet (CD) 조건에서 $Grn^{f/f}$ 와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 체중. (B) $Grn^{f/f}$ 와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 음식섭취량. 모든 마우스는 5 주령부터 20주령까지 매주 모니터링 하였다. (n = 4~5). 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다.

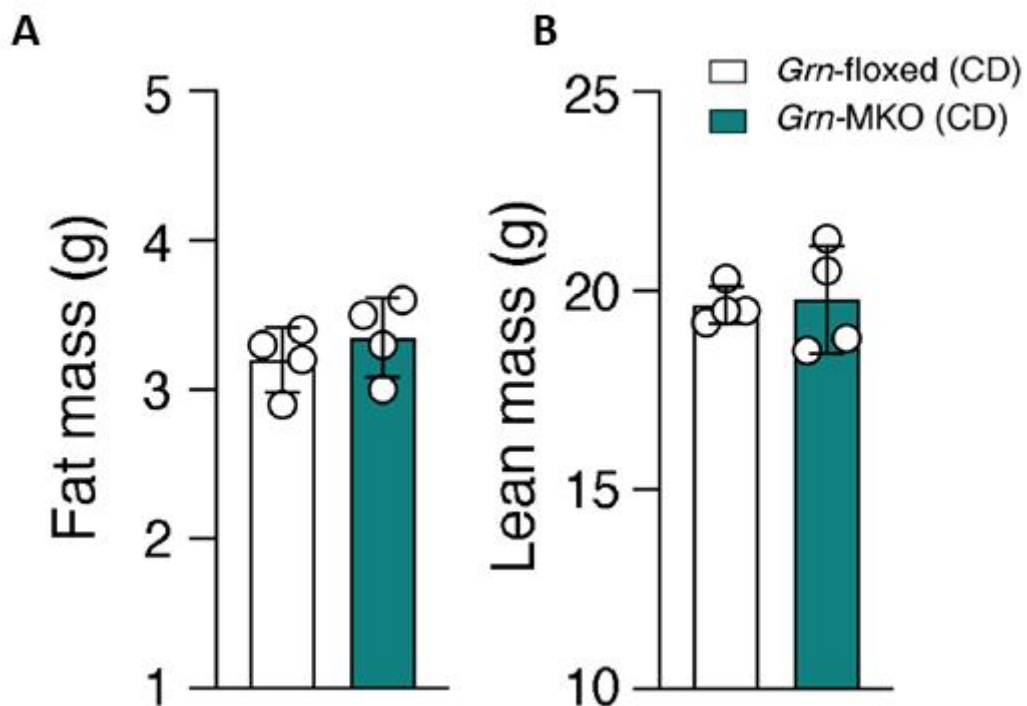


Figure 3. CD 조건에서 지방량과 제지방량 비교

(A) CD 조건에서 *Grn*^{f/f}와 *LysM*^{ΔGrn} 마우스의 지방량. (B) *Grn*^{f/f}와 *LysM*^{ΔGrn} 마우스의 제지방량. 신체 구성을 확인하기 위해 dual x-ray absorptiometry (iNSiGHT VET DXA, OsteoSys) 을 사용하여 15주령에 제지방과 체지방을 측정하였다 (n = 4~5). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다.

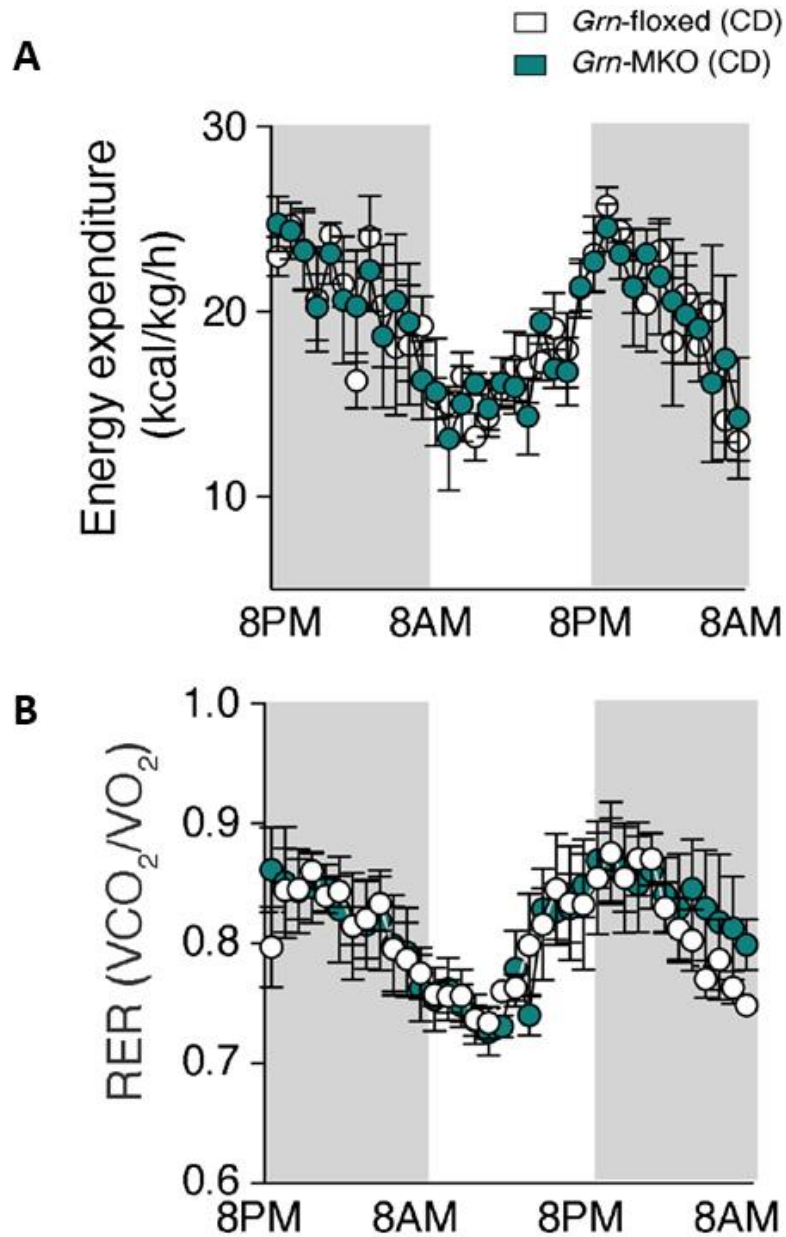


Figure 4. CD 조건에서 energy expenditure와 RER 비교

(A) CD 를 섭취한 $Grn^{f/f}$ 와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 energy expenditure. (B) $Grn^{f/f}$ 와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 RER 비교. Comprehensive lab monitoring system (CLAMS, Columbus Instruments) 로 12~15주령 마우스를 각 chamber에 넣고 적응시킨 후 48h 동안 확인하였다. 모든 EE 데이터는 제지방량으로 나누어 계산하였다 ($n = 4$). 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다.

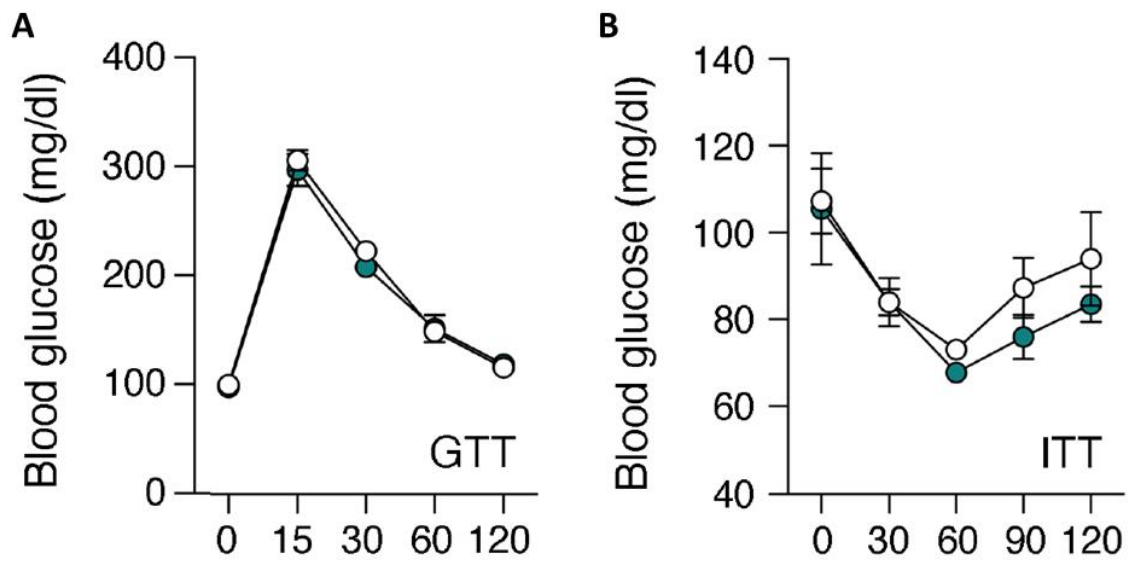


Figure 5. CD 조건에서 glucose tolerance test (GTT) 와 insulin tolerance test (ITT)

(A) CD에서 $Grn^{f/f}$ 와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 GTT. (B) $Grn^{f/f}$ 와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 ITT. GTT는 12~15주령 마우스를 16h 동안 금식시킨 후, D-glucose(1g/kg, Sigma)를 경구투여 후 0, 15, 30, 60, 120분에 혈당을 측정하였다. ITT의 경우, 인슐린 (Humulin-R® 0.25 U/kg, Eli Lilly)을 복막에 주사 후 0, 30, 60, 90, 120분에 혈당을 측정하였다 (n = 4~5). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다.

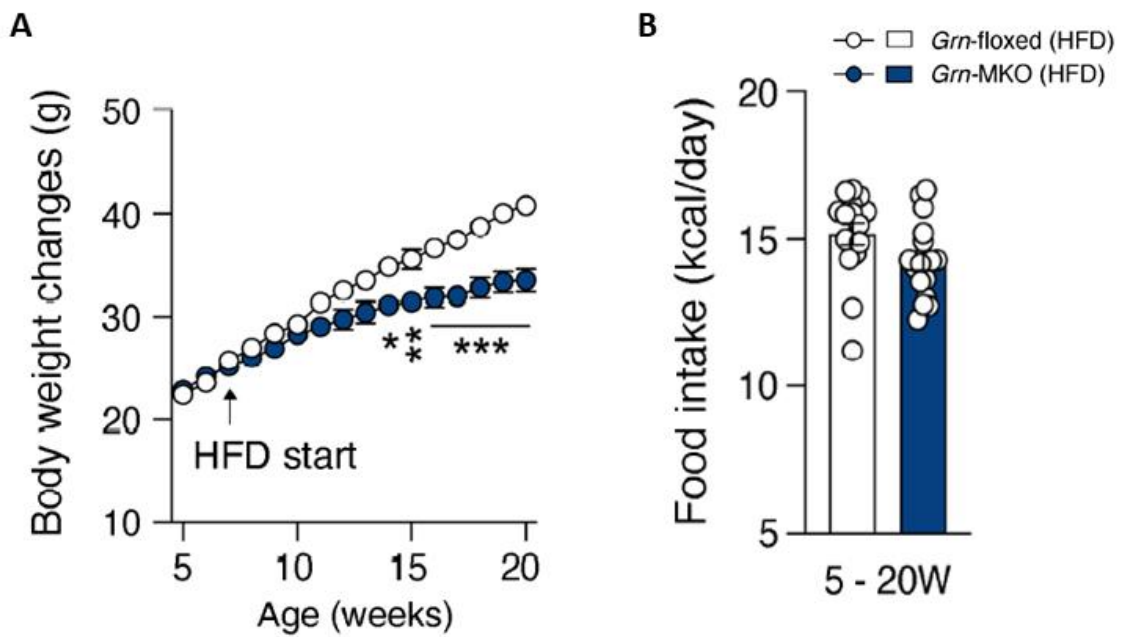


Figure 6. HFD 조건에서 체중과 음식섭취량 비교

(A) High fat diet (HFD) 에서 $Grn^{f/f}$ 와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 체중. (B) HFD에서 $Grn^{f/f}$ 와 $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 음식섭취량. 모든 마우스는 5 주령때부터 20주령까지 매주 모니터링하였고, 7 주령때부터 HFD를 시작하였다 (n = 4~5). 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ vs. $Grn^{f/f}$.

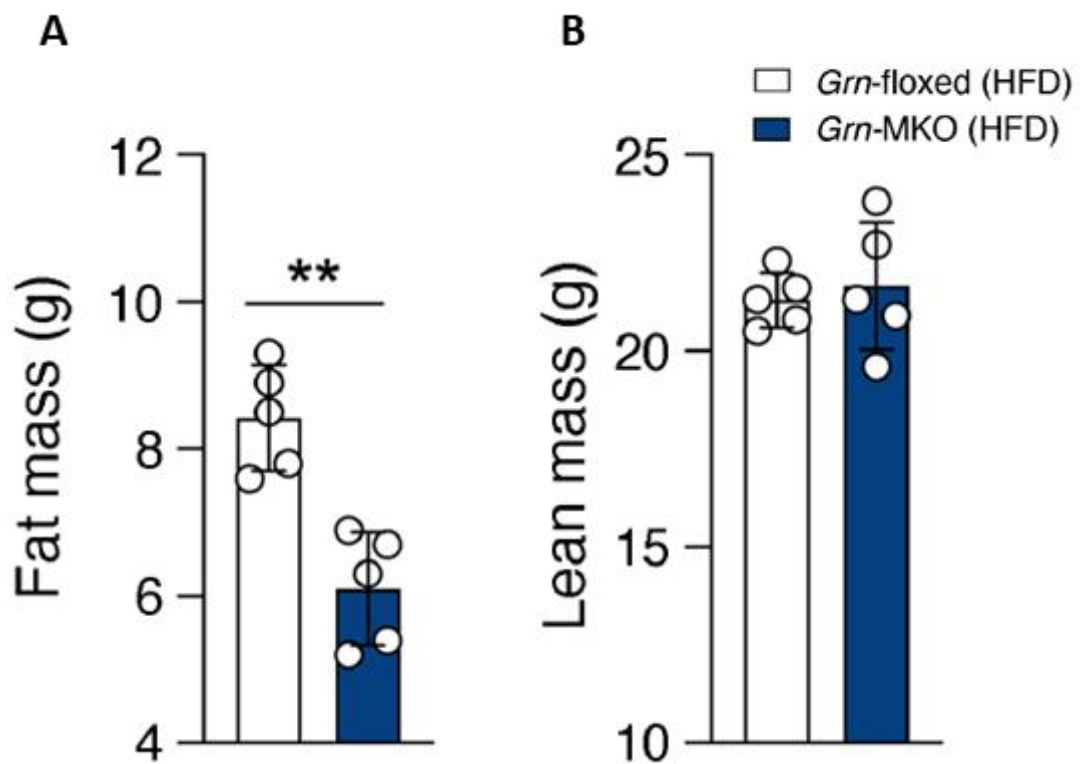


Figure 7. HFD 조건에서 지방량과 제지방량 비교

(A) HFD 조건에서 *Grn*^{f/f}와 *LysM*^{Δ*Grn*} 마우스의 지방량. (B) *Grn*^{f/f}와 *LysM*^{Δ*Grn*} 마우스의 제지방량. 신체 구성을 확인하기 위해 DXA를 사용하여 15주령에 제지방과 체지방을 측정하였다 (n = 4~5). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다. ***p* < 0.01, vs. *Grn*^{f/f}.

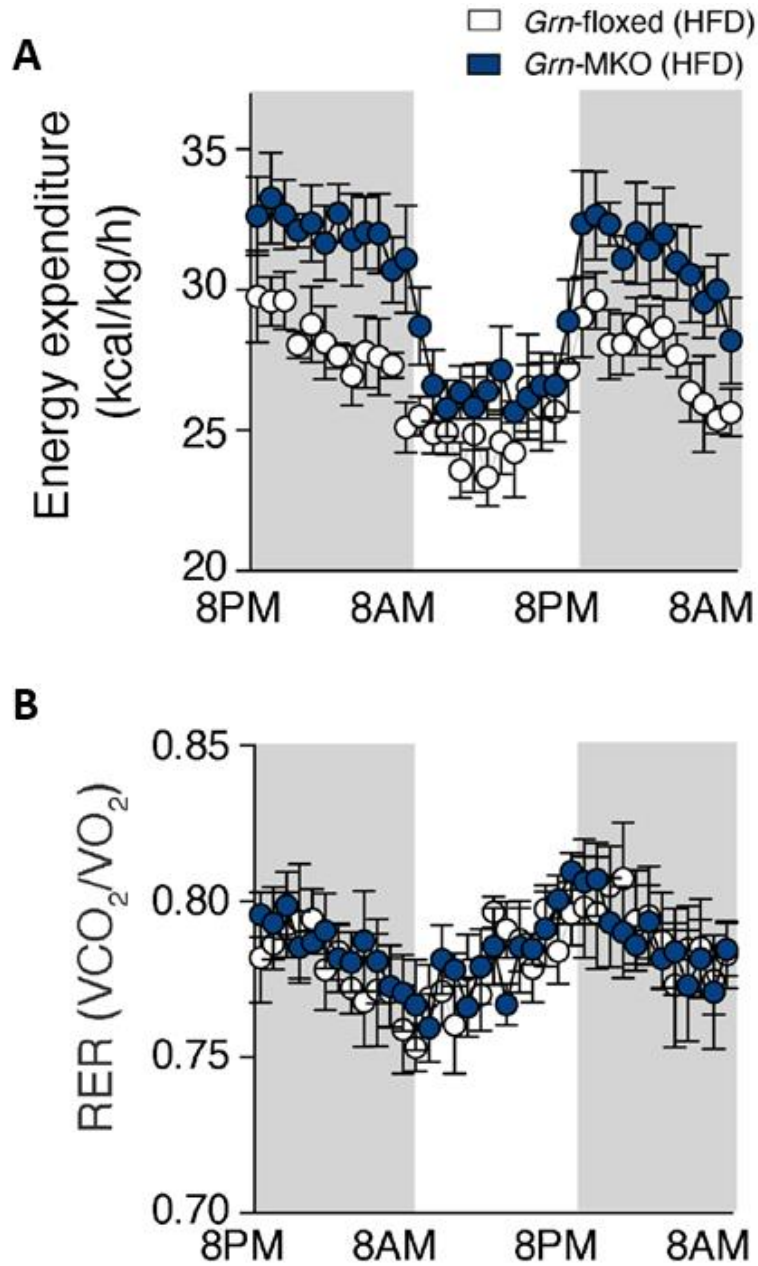


Figure 8. HFD 조건에서 energy expenditure와 RER 비교

HFD 조건에서 *Grn*^{f/f}와 *LysM*^{Δ*Grn*} 마우스의 energy expenditure (A)와 RER (B)비교 CLAMS로 12~15주령 마우스를 각 chamber에 넣고 적응시킨 후 48h 동안 확인하였다. 모든 EE 데이터는 제지방량으로 나누어 계산하였다 (n = 5). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다.

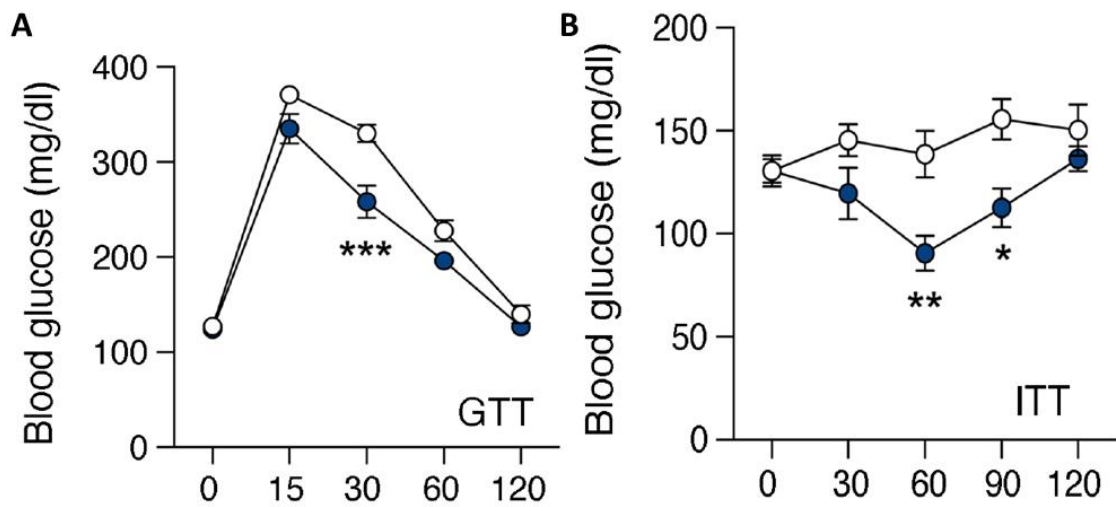


Figure 9. HFD 조건에서 glucose tolerance test (GTT)와 insulin tolerance test (ITT)

(A) HFD 조건에서 Grn^{f/f}와 LysM^{ΔGrn} 마우스의 GTT. (B) Grn^{f/f}와 LysM^{ΔGrn} 마우스의 ITT. GTT는 12~15주령 마우스를 16h 동안 금식시킨 후, D-glucose를 경구투여 후 0, 15, 30, 60, 120분에 혈당을 측정하였다. ITT의 경우, 인슐린을 복막에 주사 후 0, 30, 60, 90, 120분에 혈당을 측정하였다 (n = 4~5). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.005 vs. Grn^{f/f}.

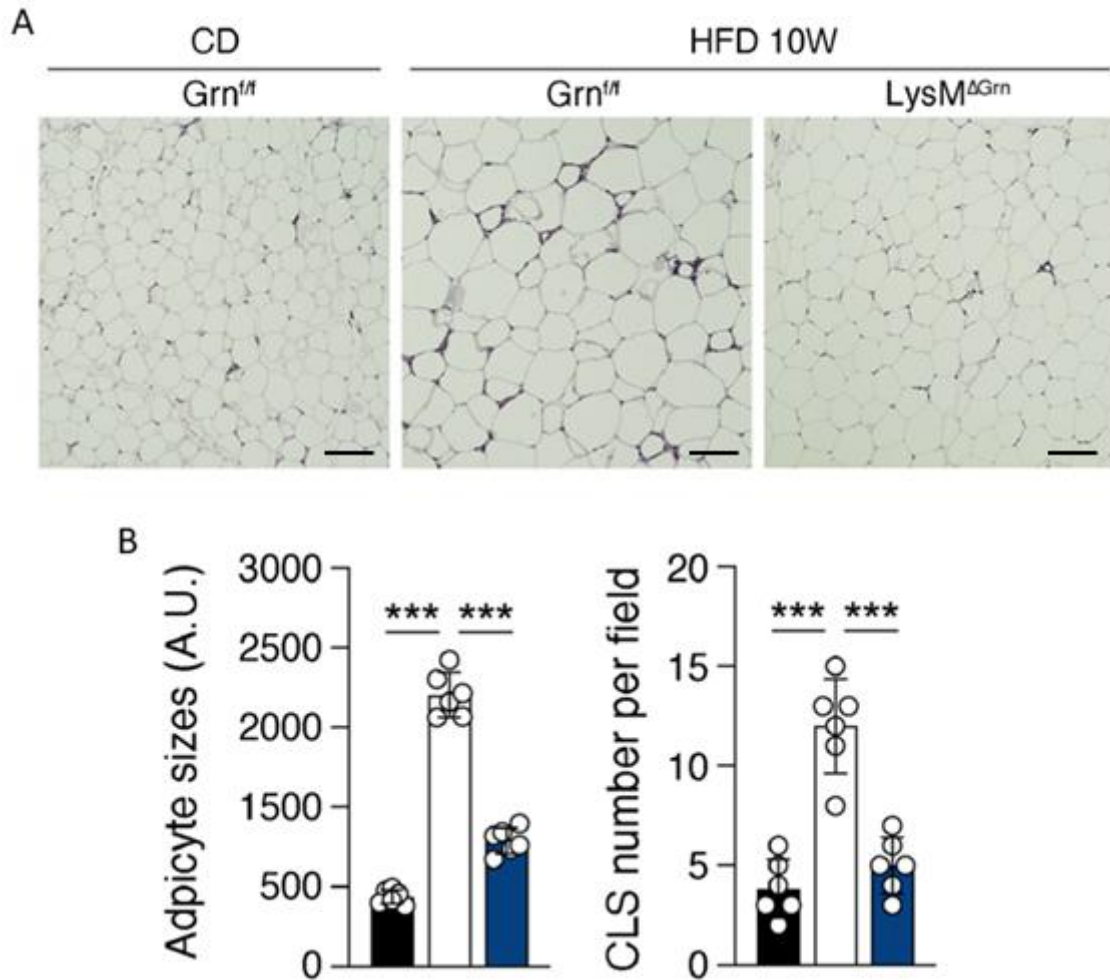


Figure 10. 지방조직의 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

(A) CD에서 $Grn^{f/f}$ 마우스와 HFD에서 $Grn^{f/f}$, $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 부고환 지방조직 (epididymal white adipose tissue, eWAT) 현미경 사진. Scale bars: 200 μ m. (B) 17주령 마우스의 eWAT에서 지방세포 크기와 crown-like structure (CLS)의 수 비교. 지방 조직을 5 μ m 두께로 자른 후 H&E 염색하였다 (n = 6). 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. *** $p < 0.005$ vs. $Grn^{f/f}$.

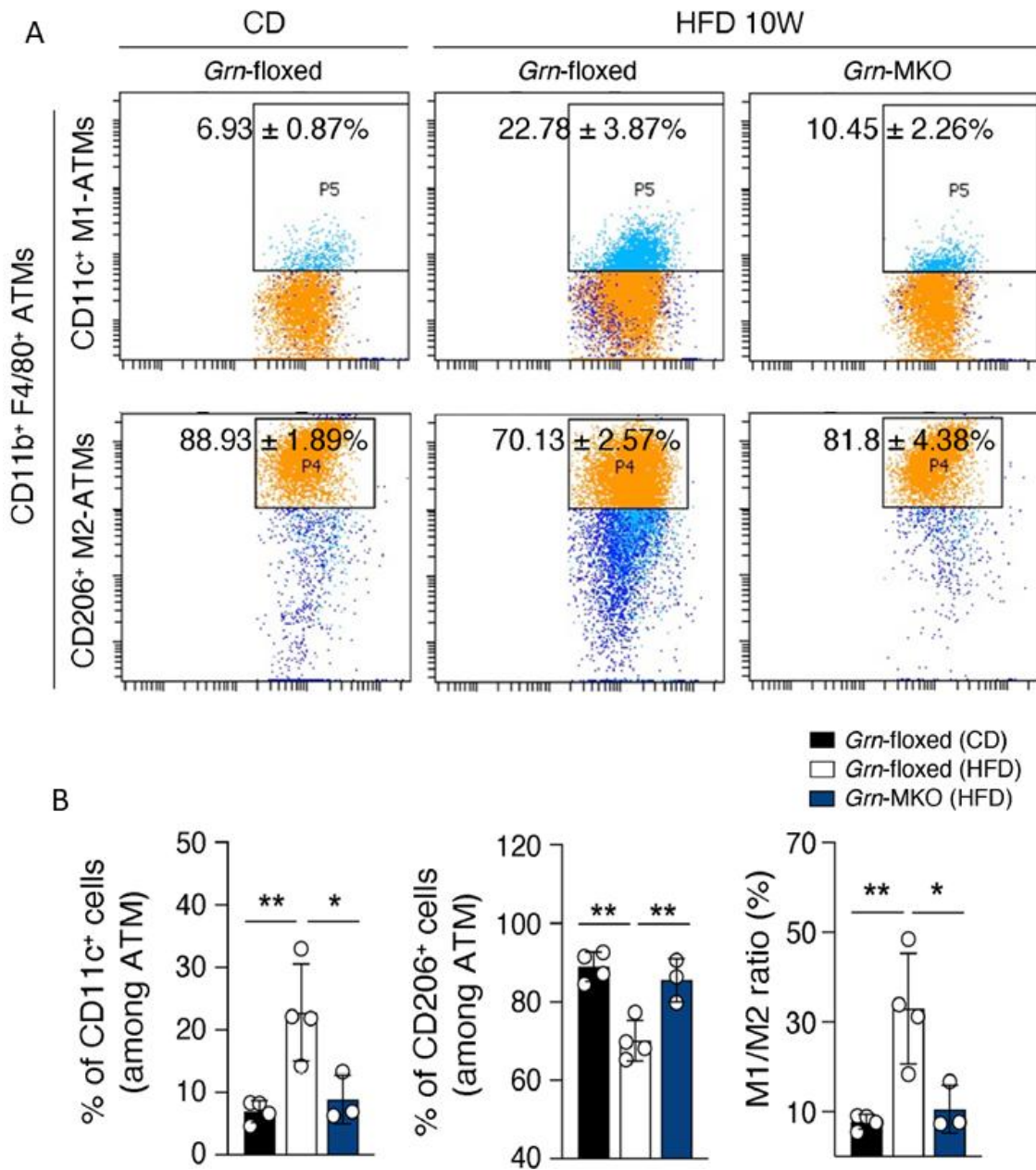


Figure 11. 지방조직의 면역세포 FACS 분석

(A) 17주령의 CD에서 *Grn*^{f/f} 마우스와 HFD에서 *Grn*^{f/f}, *LysM*^{ΔGrn} 마우스의 eWAT에서 SVC fraction으로 FACS 분석 (B) CD11c⁺ (M1대식세포), CD206⁺ (M2대식세포)의 비율. CD11b (BD Biosciences), F4/80, CD11c, CD206 (eBioscience) 단클론항체를 사용하여 FACS Canto II (BD Biosciences)로 분석하였다 (n = 3~4). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, vs. *Grn*^{f/f}.

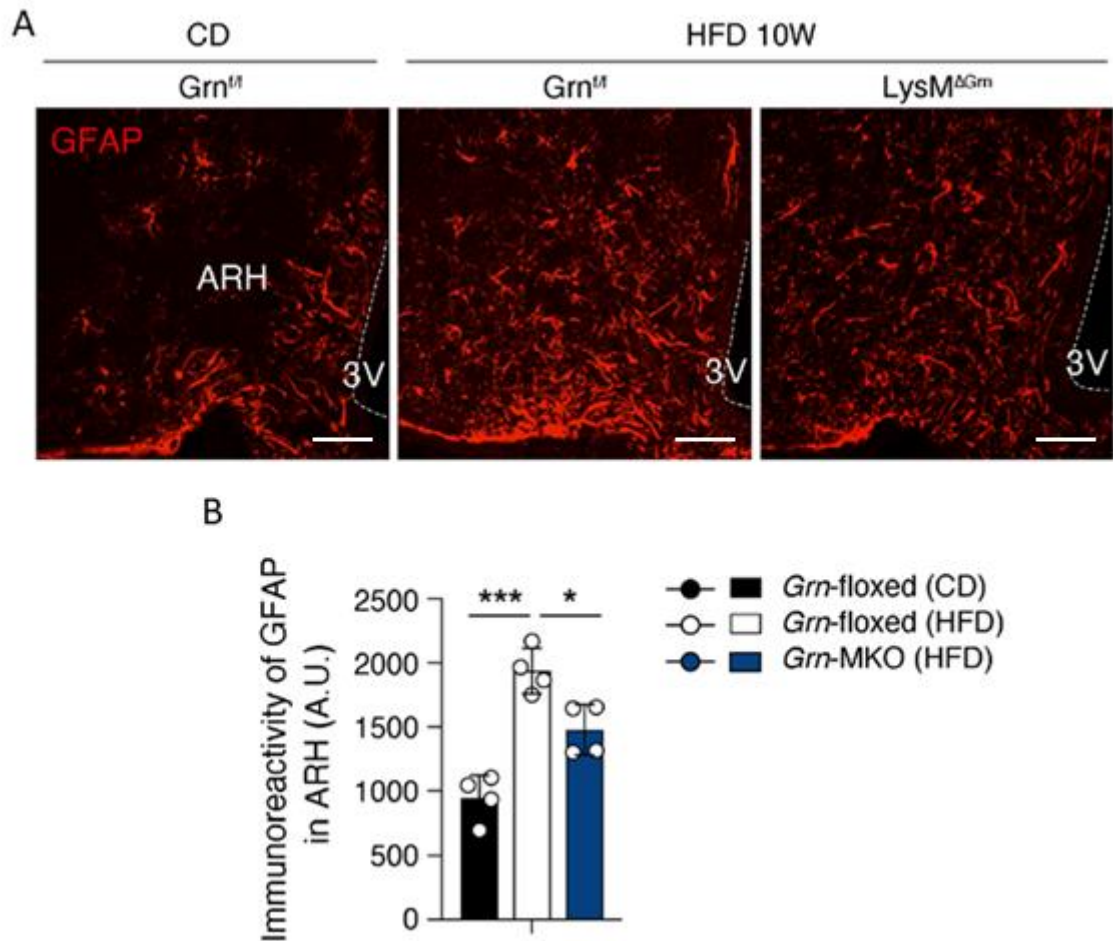


Figure 13. 시상하부 GFAP로 염색한 정상세포 면역형광염색

(A) CD를 먹은 20주령의 *Grn*^{f/f} 마우스와 HFD를 먹은 *Grn*^{f/f}, *LysM*^{Δ*Gm*} 마우스의 ARH에서 GFAP 염색한 정상세포 현미경 사진. Scale bars: 100 μm. (B) ARH에서 염색된 GFAP⁺의 세포 수 (n = 4). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다. **p* < 0.05, ****p* < 0.005 vs. *Grn*^{f/f}.

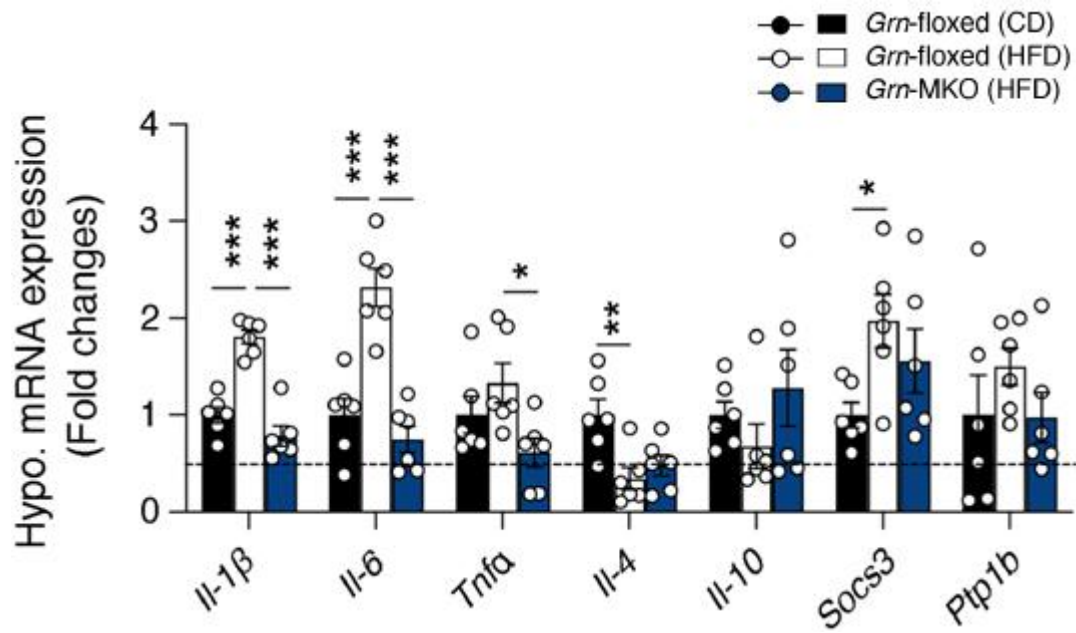


Figure 14. 시상하부에서 염증성 사이토카인과 렙틴신호억제인자 mRNA 분석
 17주령의 CD에서 $Grn^{f/f}$ 마우스와 HFD에서 $Grn^{f/f}$, $LysM^{\Delta Grn}$ 마우스의 mediobasal hypothalamus (MBH) 에서 *Il-1β*, *Il-6*, *TNF-α*, *Il-4*, *Il-10*, *Socs3*, *Ptp1b* 유전자 발현을 q-PCR을 통해 확인하였다 (n = 5~6). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ vs. $Grn^{f/f}$.

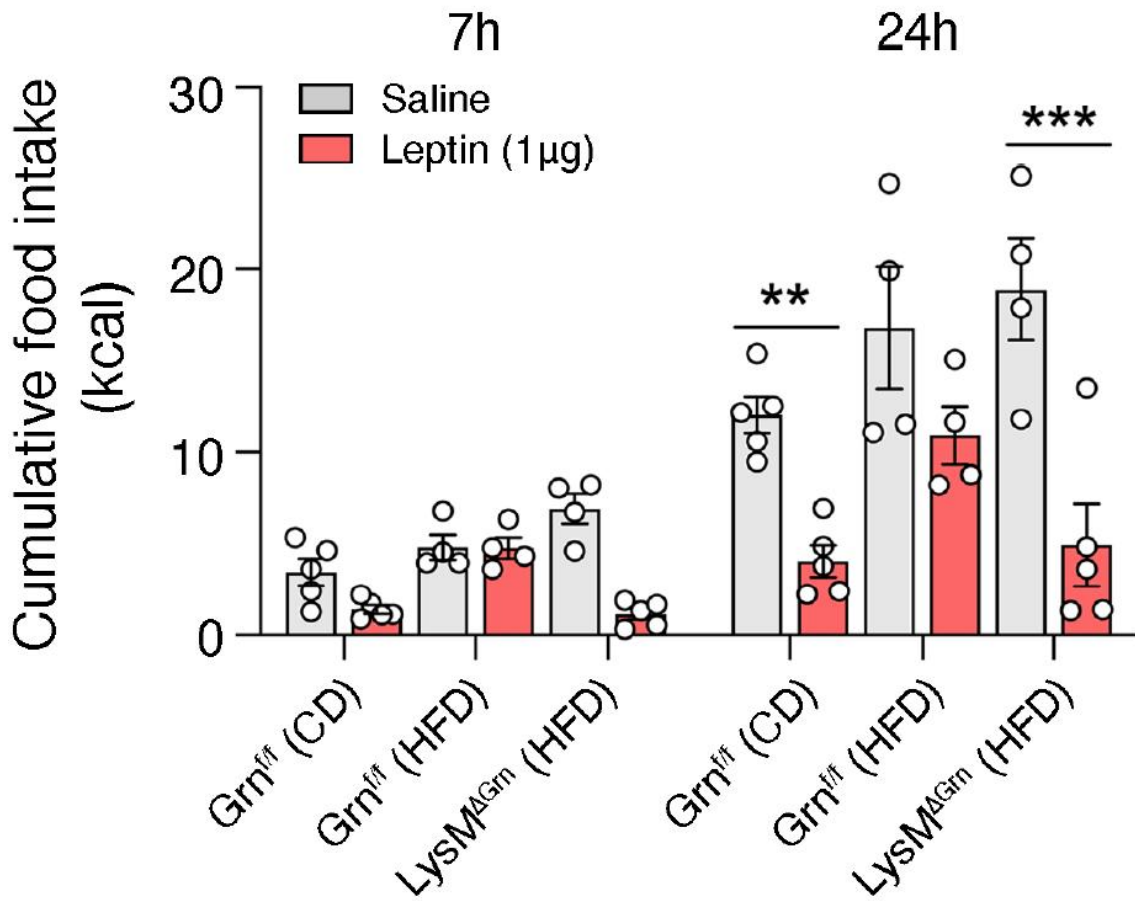


Figure 15. Leptin 투여 후 음식섭취량 측정

15주령의 CD를 섭취한 Grn^{f/f} 마우스와 HFD를 섭취한 Grn^{f/f}, LysM^{ΔGrn} 마우스의 3rd ventricle (3V)에 캐놀라를 삽입하고 7일 동안 회복을 시킨 후 angiotensin-II test를 하였다. Leptin (1 μg)을 saline에 희석시키고 2μL로 3V에 투여하였고, 24시간 동안 음식섭취량과 체중을 모니터링했다 (n = 4~5). 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다. **p < 0.01, ***p < 0.005 vs. Saline.

VII. 참고문헌

1. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *New England Journal of Medicine* **377**, 13-27 (2017).
2. Y. Bai, Q. Sun, Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obes Rev* **16**, 127-136 (2015).
3. N. Ouchi, J. L. Parker, J. J. Lugus, K. Walsh, Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 85-97 (2011).
4. C. T. De Souza *et al.*, Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **146**, 4192-4199 (2005).
5. S. P. Kalra *et al.*, Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* **20**, 68-100 (1999).
6. D. E. G. McNay, N. Briançon, M. V. Kokoeva, E. Maratos-Flier, J. S. Flier, Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *The Journal of clinical investigation* **122** **1**, 142-152 (2012).
7. R. Haddad-Tóvolli, N. R. V. Dragano, A. F. S. Ramalho, L. A. Velloso, Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Frontiers in neuroscience* **11**, 224-224 (2017).
8. J. Lau, H. Herzog, CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Frontiers in neuroscience* **8**, 313-313 (2014).
9. A. Spiegel, E. Nabel, N. Volkow, S. Landis, T. K. Li, Obesity on the brain. *Nat Neurosci* **8**, 552-553 (2005).
10. C. Zhan *et al.*, Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J*

- Neurosci* **33**, 3624-3632 (2013).
11. R. D. Cone, Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* **8**, 571-578 (2005).
 12. L. Sousa-Ferreira, L. P. d. Almeida, C. Cavadas, Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **25**, 80-88 (2014).
 13. C. K. Glass, J. M. Olefsky, Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell metabolism* **15** **5**, 635-645 (2012).
 14. M. Visser, L. M. Bouter, G. M. McQuillan, M. H. Wener, T. B. Harris, Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *Jama* **282**, 2131-2135 (1999).
 15. A. Jais, J. C. Brüning, Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation* **127**, 24-32 (2017).
 16. G. I. Lancaster *et al.*, Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metabolism* **27**, 1096-1110.e1095 (2018).
 17. M. F. Gregor, G. S. Hotamisligil, Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* **29**, 415-445 (2011).
 18. O. Guillemot-Legris *et al.*, High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. *Journal of Neuroinflammation* **13**, 206 (2016).
 19. Y. Duan *et al.*, Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
 20. R. A. Townley, B. F. Boeve, E. E. Benarroch, Progranulin: Functions and neurologic correlations. *Neurology* **90**, 118-125 (2018).
 21. L. H. Martens *et al.*, Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury. *The Journal of Clinical Investigation* **122**, 3955-3959 (2012).

22. W. Tang *et al.*, The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science* **332**, 478-484 (2011).
23. L. A. Cerezo *et al.*, Progranulin Is Associated with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm* **2015**, 740357-740357 (2015).
24. T. Matsubara *et al.*, PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab* **15**, 38-50 (2012).
25. N. Kamei *et al.*, Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* **281**, 26602-26614 (2006).
26. H. Qu, H. Deng, Z. Hu, Plasma Progranulin Concentrations Are Increased in Patients with Type 2 Diabetes and Obesity and Correlated with Insulin Resistance. *Mediators Inflamm* **2013**, 360190 (2013).
27. B.-S. Youn *et al.*, Serum Progranulin Concentrations May Be Associated With Macrophage Infiltration Into Omental Adipose Tissue. *Diabetes* **58**, 627 (2009).
28. T. Matsubara *et al.*, PGRN is a Key Adipokine Mediating High Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Obesity through IL-6 in Adipose Tissue. *Cell Metabolism* **15**, 38-50 (2012).
29. B. S. Youn *et al.*, Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. *Diabetes* **58**, 627-636 (2009).
30. L. B. Buckman *et al.*, Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun* **35**, 33-42 (2014).
31. D. A. Hume, The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology* **18**, 49-53 (2006).

32. C. H. Lee *et al.*, Hypothalamic Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Obesity-Associated Hypothalamic Inflammation. *Cell Rep* **25**, 934-946.e935 (2018).
33. J. Jian, J. Konopka, C. Liu, Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *J Leukoc Biol* **93**, 199-208 (2013).
34. F. O. Martinez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**, 13-13 (2014).
35. D. Har, M. Carey, M. Hawkins, Coordinated regulation of adipose tissue macrophages by cellular and nutritional signals. *J Investig Med* **61**, 937-941 (2013).
36. J. P. Thaler *et al.*, Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* **122**, 153-162 (2012).
37. V. Francisco *et al.*, Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Front Physiol* **9**, 640-640 (2018).
38. N. F. Mendes, Y.-B. Kim, L. A. Velloso, E. P. Araújo, Hypothalamic Microglial Activation in Obesity: A Mini-Review. *Frontiers in Neuroscience* **12**, (2018).
39. H. K. Kim *et al.*, Involvement of progranulin in hypothalamic glucose sensing and feeding regulation. *Endocrinology* **152**, 4672-4682 (2011).
40. H. Qu, H. Deng, Z. Hu, Plasma progranulin concentrations are increased in patients with type 2 diabetes and obesity and correlated with insulin resistance. *Mediators Inflamm* **2013**, 360190 (2013).
41. N. Klöting *et al.*, Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E506-515 (2010).
42. B.-S. Youn *et al.*, Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. *Diabetes* **58**, 627-636 (2009).
43. D. Gosselin *et al.*, Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* **159**,

- 1327-1340 (2014).
44. G. Faraco, L. Park, J. Anrather, C. Iadecola, Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med (Berl)* **95**, 1143-1152 (2017).
 45. T. Yang, R. Guo, F. Zhang, Brain perivascular macrophages: Recent advances and implications in health and diseases. *CNS Neurosci Ther* **25**, 1318-1328 (2019).
 46. M. S. Kim *et al.*, Rapid linkage of innate immunological signals to adaptive immunity by the brain-fat axis. *Nature Immunology* **16**, 525-533 (2015).
 47. D. Cai, S. Khor, “Hypothalamic Microinflammation” Paradigm in Aging and Metabolic Diseases. *Cell Metabolism* **30**, 19-35 (2019).

VIII. Abstract

BACKGROUND : Obesity is a major disease leading to type 2 diabetes, cardiovascular disease, and cancer. Progranulin (PGRN) induces circulating immune cells like macrophages into the tissues. Previous many studies have shown that PGRN deficiency improves insulin resistance and inflammatory response due to high-fat diet, but the detailed evidence of PGRN in bone marrow-derived macrophages (BMDM) in obesity and metabolic disease is not clear. I will show the effect of BMDM-specific PGRN on obesity and the specific mechanism by which it regulates metabolic disease progression.

Materials and Methods : To determine the role of PGRN in BMDM for metabolic diseases and obesity, LysM-cre mice were crossed with Grn^{f/f} mice to generate LysM^{ΔGrn} mice. They are deficient in the *Grn* gene in BMDM. I measured body weight, food intake every weeks. Under the chow diet (CD) or high fat diet (HFD) conditions, energy expenditure and glucose and insulin resistance were compared between Grn^{f/f} mice and LysM^{ΔGrn} mice. To elucidate molecular mechanism, I isolated SVC fraction from their epididymal white adipose tissue (eWAT) and then conformed the macrophage recruitment and M1/M2 ratio by FACS analysis.

Result : Compared with Grn^{f/f} mice, LysM^{ΔGrn} mice showed reduced body weight gain and metabolic dysfunction during HFD feeding because of increased energy expenditure (EE), but no significant changes during CD feeding. In addition, glucose and insulin resistance were also greatly improved in LysM^{ΔGrn} mice compared to Grn^{f/f} mice. In the molecular experiment, LysM^{ΔGrn} mice showed a greater decrease in the expression of proinflammatory cytokines and M1/M2 ratio in adipose tissue and blood than Grn^{f/f} mice under the HFD. Moreover, LysM^{ΔGrn} mice had reduced hypothalamic inflammation and improved leptin resistance in HFD-fed condition.

Conclusion : This paper shows that PGRN in BMDM can promote the development of obesity and metabolic complications under HFD condition through the regulation of the adipose tissue and hypothalamic inflammation.