(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0014921
(43) 공개일자 2023년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)
A23L 33/13 (2016.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A01K 67/0276 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0095931
(22) 출원일자 2021년07월21일
심사청구일자 2021년07월21일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
고명곤
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
변성준
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

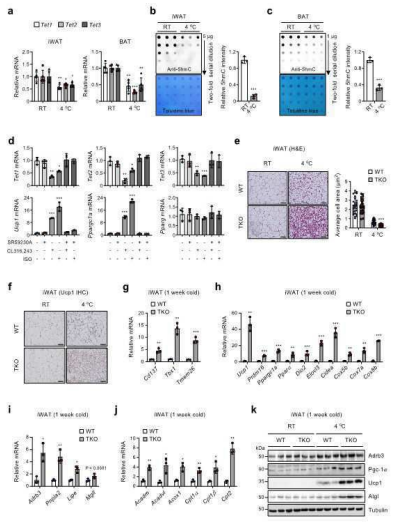
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **TET 단백질의 억제를 이용한 지방세포의 지방분해 및 열발생 촉진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 TET(Ten-eleven translocation) 단백질의 발현 또는 활성을 억제함으로써 지방분해 및 열발생을 촉진할 수 있는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 TET 단백질의 발현 또는 활성을 억제함으로써 비만 또는 대사질환을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/13 (2016.08)
A61K 31/7088 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 3/00 (2018.01)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A01K 2217/075 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0362 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하는, 지방세포의 지방분해(lipolysis)를 촉진하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성의 억제가 유전자 녹아웃(knockout)에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성의 억제가 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질의 도입에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질이 항-TET shRNA, 항-TET siRNA, 항-TET 안티센스 핵산, 가이드 RNA(gRNA)와 CRISPR/Cas9, 항-TET 소분자 화합물 또는 항-TET 항체인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하는, 지방세포의 열발생(thermogenesis)을 촉진하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성의 억제가 유전자 녹아웃에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성의 억제가 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질의 도입에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질이 항-TET shRNA, 항-TET siRNA, 항-TET 안티센스 핵산, 가이드 RNA(gRNA)와 CRISPR/Cas9, 항-TET 소분자 화합물 또는 항-TET 항체인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 지방세포의 지방분해 촉진용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질이 항-TET shRNA, 항-TET siRNA, 항-TET 안티센스 핵산, 가이드 RNA(gRNA)와 CRISPR/Cas9, 항-TET 소분자 화합물 또는 항-TET 항체인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 11

지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 지방세포의 열발생 촉진용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질이 항-TET shRNA, 항-TET siRNA, 항-TET 안티센스 핵산, 가이드 RNA(gRNA)와 CRISPR/Cas9, 항-TET 소분자 화합물 또는 항-TET 항체인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 13

지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 또는 대사질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질이 항-TET shRNA, 항-TET siRNA, 항-TET 안티센스 핵산, 가이드 RNA(gRNA)와 CRISPR/Cas9, 항-TET 소분자 화합물 또는 항-TET 항체인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 대사질환이 제2형 당뇨병(T2D), 고인슐린혈증, 고혈당증, 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 간 지방증(hepatic steatosis), 포도당 내성, 인슐린 저항성, 또는 염증인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 16

지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 또는 대사질환의 개선용 식품 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질이 항-TET shRNA, 항-TET siRNA, 항-TET 안티센스 핵산, 가이드 RNA(gRNA)와 CRISPR/Cas9, 항-TET 소분자 화합물 또는 항-TET 항체인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서, 대사질환이 제2형 당뇨병(T2D), 고인슐린혈증, 고혈당증, 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 간 지방증(hepatic steatosis), 포도당 내성, 인슐린 저항성, 또는 염증인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

청구항 19

지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하는, 백색 지방세포의 수를 증가시키는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성의 증가가 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질의 도입에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질이 (i) TET1, TET2 및 TET3 cDNA, (ii) CRISPR/dCas9 기반 전사 활성인자, (iii) TET1, TET2 및 TET3의 전사를 촉진하는 소분자 화합물, 또는 (iv) TET1, TET2 및 TET3의 활성을 증가시키는 소분자 화합물인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 22

지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 포함하는, 항암 치료 보조제 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질이 (i) TET1, TET2 및 TET3 cDNA, (ii) CRISPR/dCas9 기반 전사 활성인자, (iii) TET1, TET2 및 TET3의 전사를 촉진하는 소분자 화합물, 또는 (iv) TET1, TET2 및 TET3의 활성을 증가시키는 소분자 화합물인 것을 특징으로 하는, 항암 치료 보조제 조성물.

청구항 24

인간을 제외한 동물의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성이 증가된, 비만 동물모델.

청구항 25

제24항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성의 증가가 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질의 도입에 의한 것임을 특징으로 하는, 비만 동물모델.

청구항 26

제25항에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질이 (i) TET1, TET2 및 TET3 cDNA, (ii) CRISPR/dCas9 기반 전사 활성인자, (iii) TET1, TET2 및 TET3의 전사를 촉진하는 소분자 화합물, 또는 (iv) TET1, TET2 및 TET3의 활성을 증가시키는 소분자 화합물인 것을 특징으로 하는, 비만 동물모델.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항의 비만 동물모델을 이용한 비만 치료용 약물을 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TET(Ten-eleven translocation) 단백질의 발현 또는 활성을 억제함으로써 지방분해 및 열발생을 촉진할 수 있는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 TET 단백질의 발현 또는 활성을 억제함으로써 비만 또는 대사질환을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비만은 주로 에너지 섭취와 소비 사이의 만성적인 불균형의 결과로 발생한다. 비만의 세계적 유행과 제2형 당뇨병(T2D), 심혈관 질환 및 특정 유형의 암을 포함한 다양한 만성 질환의 관련 위험은 공중 보건에 대한 위협적인 도전으로 부상하였다. 지방 조직(adipose tissue, AT)은 영양 상태 및 온도와 같은 환경 요인에 따라 크기와 기능을 변경할 수 있는 놀라운 능력을 가진 고도로 가소화된(plastic) 기관이다. 백색 지방 조직(white adipose tissue, WAT)은 단안(unilocular) 지질 방울(LD)에 트리글리세리드(TG)의 형태로 과잉 칼로리를 저장하는 백색 지방세포를 주로 함유한다. 이에 반해, 갈색 지방 조직(brown adipose tissue, BAT)은 주로 다안(multilocular) 지질 방울(LD)을 가진 갈색 지방세포와 수많은 미토콘드리아로 구성되어 있으며, 지방산을 연소시켜 적응 열발생(thermogenesis)을 통해 체온을 유지한다.

[0003] 만성 영양 과잉에 대한 반응으로 백색 지방 조직(WAT)은 지방세포의 크기(비대)와 세포 수(과형성)를 증가시켜 급속하게 팽창하여 저혈관성 유발 저산소증 및 지방세포 사멸을 유발하여 대식세포 축적 및 염증 반응을 유발한다. 만성 염증은 지방세포 기능 장애를 유발하고, 이는 인슐린 저항성, 고혈당증(hyperglycaemia), 고지혈증(hyperlipidaemia), 간 지방증(hepatic steatosis) 및 제2형 당뇨병(T2D)을 포함한 대사 장애의 발병을 촉진한다. 반대로, 장기간 추위에 노출되거나 β-아드레날린성 자극은 갈변(browning) 또는 베이지화(beiging)로 알려진 과정인 백색에서 갈색으로의 지방 전환을 유발하며, 이로 인해 갈색-유사(베이지/브라이트) 지방세포가 형성되며 이는 특히 피하 지방 저장소에서 발생한다. 지방 갈변 동안 카테콜아민 노르에피네프린과 에피네프린은 β-아드레날린 수용체를 활성화하여 단백질 키나제 A(PKA) 신호 전달 경로를 활성화시켜 트리글리세리드(TG)의 가수분해를 촉진하며, 이 과정을 "지방분해(lipolysis)"라고 한다.

[0004] 갈색 지방 조직(BAT)은 열 에너지를 생성하기 위해 미토콘드리아 β-산화 및 Ucp1 활성화를 위해 지방산을 활용한다. 백색 지방 조직(WAT)의 지방분해는 또한 말초 기관에 연료를 공급하는 지방산 기질을 제공한다. β-아드

레날린성 수용체로부터의 신호는 또한 *Ppargc1a*(Pgc-1α를 인코딩) 및 *Ucp1*을 포함한 다양한 열발생(thermogenic) 유전자의 발현을 증가시킨다. 따라서 백색 지방 갈변은 향상된 Ucp1 발현, 지방분해, 미토콘드리아 함량 및 β-산화를 포함한 일련의 세포 과정을 포함한다. 인간과 마우스(생쥐)에서 갈색 및 베이지색 지방세포 양자 모두는 비만, 포도당 불내성 및 인슐린 저항성에 대항하는 매우 활동적인 열발생 능력을 가지고 있다. 따라서 이러한 세포들의 열발생 가능성을 활용하여 전신 에너지 소비(expenditure)를 증가시키는 것을 목표로 하는 접근 방식은 비만 및 대사 장애 치료에 가능성이 있다.

[0005] TET(Ten-eleven translocation) 단백질은 5-메틸시토신(5mC)을 5-하이드록시메틸시토신(5hmC) 및 추가의 산화된 유도체로 산화시켜 DNA의 메틸화 상태를 변형하는 디옥시게나제(dioxygenase)이다. TET 단백질은 전사 활성화제 또는 억제인자로 작용하여 전사 조절에서 중요한 역할을 한다. 마우스 배아 줄기세포, 면역세포 또는 신경세포를 포함한 많은 세포 유형에서 TET 단백질은 그들의 효소 활성을 이용하여 프로모터 및/또는 인핸서에서 5-메틸시토신(5mC)을 5-하이드록시메틸시토신(5hmC) 및 추가의 산화 생성물로 순차적으로 산화시킨 다음 DNA 탈메틸화를 통해 유전자 전사를 조절한다.

[0006] TET 단백질은 최근 시험관 내에서 지방세포 분화 및 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다(Serandour, A. A. et al. Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers. *Nucleic Acids Res* 40, 8255-8265, (2012)). 5-메틸시토신(5mC)은 시험관 내에서 지방생성(adipogenesis) 동안 분화 관련 인핸서에 강력하게 축적되었다. Tet1 및/또는 Tet2의 결손은 3T3-L1 지방전구세포 또는 마우스 배아 섬유아세포의 지방생성 분화를 억제하였다. PPARγ의 전사 활성은 TET1 및 TET2와의 상호 작용에 의해 향상되었다. 마우스에서 3가지 TET 단백질(TET1, TET2 및 TET3)은 모두 수준은 다르지만 다양한 지방 저장소에서 발현되는 것으로 나타났으며, 일부 연구에서는 Tet1 결실은 베이지색 지방세포에서 *Ucp1* 및 *Ppargc1a*를 억제하여 열발생을 억제하는 것으로 나타났다.

[0007] 그러나 현재까지 TET 단백질이 지방전구세포로부터 지방세포로의 분화가 아닌 성숙한 지방세포 자체에 미치는 영향, 특히 이들 3가지 TET 단백질의 결손이 지방세포에 미치는 영향에 대해서는 규명된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명은 지방세포 자체에서 TET 단백질의 기능을 규명하고, 이를 토대로 지방분해 및 열발생을 촉진하는 조성물을 개발하여, 비만과 대사질환을 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 약학 조성물 및 식품 조성물을 제공하는 것을 그 기술적 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여 연구하였으며, 그 결과 본 발명자들은 TET 단백질이 생체 내 백색 지방 조직(WAT) 및 갈색 지방 조직(BAT) 모두에서 지방세포 열발생(thermogenesis) 및 에너지 소비의 주요 후성유전적 억제인자임을 밝혀내었다.

[0010] 구체적으로, 지방세포의 *Tet* 발현은 추위나 아드레날린 자극 시 감소하였으나 고지방 식이(HFD) 섭취 후에는 증가하였다. 지방세포에서 3개의 *Tet* 유전자(*Tet1, 2, 3*)가 모두 3중 결실된 마우스(생쥐)는 지방 갈변 및 열발생이 강화되어 에너지 소비가 더 높았다. 이들 마우스는 또한 Adrb3의 상승된 발현 그리고 Atgl 및 Hsl을 포함한 주요 리파제의 상승된 발현으로 인해 상당히 향상된 지방분해를 나타내었다. 결과적으로, 녹아웃 마우스는 개선된 내한성을 나타내고 비만, 염증 및 인슐린 저항성을 비롯한 관련 대사 합병증에 실질적으로 저항성이 있었다. 또한 TET 결손은 지방 조직에서 고지방 식이(HFD) 유도 전사 변경을 실질적으로 방지한다. TET 단백질은 *Adrb3*, *Ppargc1a* 및 *Ucp1*을 포함한 주요 열발생 유전자 좌위에 히스톤 데아세틸라제(HDAC)를 동원하여 히스톤 탈아세틸화를 통해 전사 억제를 유도한다. 따라서, TET-HDAC 축은 비만 및 관련 대사 질환을 치료하기 위해 치료적으로 표적화될 수 있다.

[0011] 이러한 발견에 기초하여, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하는, 지방세포의 지방분해(lipolysis)를 촉진하는 방법을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하는, 지방세포의 열발생(thermogenesis)을 촉진하는 방법을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 지방세포의

지방분해 촉진용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 지방세포의 열발생 촉진용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 또는 대사질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 또는 대사질환의 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 위와는 반대로, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하는, 백색 지방세포의 수를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 포함하는, 항암 치료 보조제 조성물을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 인간을 제외한 동물의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하는, 비만 동물모델을 제조하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 인간을 제외한 동물의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성이 증가된 비만 동물모델을 제공한다.

[0020] 또한 본 발명은 상기 비만 동물모델을 이용한 비만 치료용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는 조성물은 지방세포의 지방분해 및 열발생을 촉진하여 비만 또는 대사질환을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 포함하는 조성물은 암환자의 백색 지방세포의 수를 증가시켜 에너지 축적을 유도함으로써 항암 치료 보조제로서 사용될 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명의 인간을 제외한 동물의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 방법을 통해 상기 동물의 지방세포의 지방분해 및 열발생을 저해함으로써 비만 동물모델을 제조할 수 있고, 이를 이용하여 비만 치료용 약물을 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] **도 1**은 지방의 *Tet* 발현이 열발생 자극에 의해 억제되고, TET 결손이 백색 지방 갈변을 촉진함을 보여주는 데이터이다.

a: RT(22℃) 또는 4℃에서 1주 동안 유지된 C57BL/6 수컷 마우스의 iWAT(inguinal WAT, 서혜부 백색 지방조직) 및 BAT에서 Gapdh에 상대적인 Tet1, 2 및 3 mRNA 수준. n = 5.

b,c: (a)에 표시된 마우스의 iWAT (b) 및 BAT (c)에서 게놈 5hmC 수준을 정량화한 도트 블롯 분석. 상대적 5hmC 강도는 각 그림의 오른쪽에 표시되어 있다.

d: CL316,243 (1 μM, 24시간) 또는 ISO (10 μM, 6시간)의 유무 하에 자극된 분화된 지방세포에서 Gapdh에 상대적인 표시된 유전자의 mRNA 발현. 세포는 CL216,243 또는 ISO 처리 전에 Adrb3 길항제인 SR59230A (10 μM)로 1시간 동안 처리되지 않았거나 사전 처리되었다. n = 3.

e: RT(22℃) 또는 4℃에서 유지된 정상 식이(CD)를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 iWAT 섹션의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색. 평균 지방세포 세포 크기는 오른쪽에 표시되어 있다. 스케일 바, 50 μm.

f: (e)에 표시된 마우스의 iWAT 섹션에서 Ucp1 단백질의 면역조직화학(IHC). 스케일 바, 50 μm.

g-j: 추위에 노출된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 iWAT에서 Gapdh로 정규화된 베이지화 마커 (g), 열발생 (h), 지방분해 (i) 및 지방산 산화 (j) 유전자의 mRNA 수준. n = 3.

k: RT 또는 4℃에서 유지된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 iWAT의 면역블롯 분석. α-튜불린은 로딩 대조군으로 사용되었다. n = 3.

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. P-값은 unpaired Student's t-test 에 의해 결정되었다. $^{*}P <$

0.05, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$ vs. RT (a), 비처리 (d), 또는 WT (b,c,e,g-j).

도 2는 cAMP 신호 전달에 의한 Tet 발현 억제 및 지방세포 특이적 Tet 삼중 녹아웃 마우스의 생성을 보여주는 데이터이다.

a,b: 포스콜린(forskolin) 처리(20 μM, 6시간) 유무 하에 분화된 지방세포에서 Gapdh에 상대적인 Tet1, Tet2 및 Tet3 (a) 또는 Ucp1, Ppargc1a 및 Pparg (b)의 mRNA 발현. n = 6.

c: 8주령에 WT 및 TKO 마우스의 표시된 기관에서 Gapdh에 상대적인 Tet1, Tet2 및 Tet3의 mRNA 발현. n = 6.

d,e: WT 및 TKO 마우스에서 분리한 지방 조직 (d) 및 표시된 기관 (e)에서 5hmC 수준을 정량화한 도트 블롯 분석.

f,g: WT 및 TKO 마우스의 iWAT (f) 및 eWAT (epididymal WAT, 부고환 백색 지방 조직) (g)에서 분리한 성숙한 지방세포 및 기질 혈관 분획(SVF) 세포에서 Gapdh에 상대적인 Tet1, Tet2 및 Tet3의 mRNA 발현. 지방 세포의 경우 n = 3-4이고 SVF의 경우 n = 6이다.

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. P-값은 unpaired Student's t-test 에 의해 결정되었다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$ vs. 대조군 (a,b) 또는 WT (c,f,g).

도 3은 TET 결손이 WAT 갈변 및 지방세포 열발생 가능성을 촉진함을 보여주는 데이터이다.

a: 4℃에서 1주일 동안 유지된 정상 식이(CD)를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 체중 변화(%). n = 5-7.

b,c: 4℃에서 1주일 동안 유지된 WT 및 TKO 마우스의 해부된 마우스 (b)와 iWAT, eWAT 및 BAT (c)의 대표적인 사진. n = 6. 스케일 바, 1 cm.

d: 4℃에서 1주일 동안 유지된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 체중에 상대적인 다양한 지방 저장소 및 간의 중량 변화. n = 5-7. mWAT = mesenteric WAT; pWAT = perirenal WAT; atWAT = anterior subcutaneous WAT.

e,f: 30℃, 22℃ 및 4℃에서 유지된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 VCO_2를 수득하기 위한 간접 열량계. n = 6.

g,h: 표시된 온도에서 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 낮과 밤 동안의 운동 활성 (g) 및 평균치 (h).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. P-값은 unpaired Student's t-test 에 의해 결정되었다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$ vs. WT.

도 4는 지방 TET 결손이 BAT 활성화에 의한 에너지 소비를 촉진하고 저온 노출 시 열발생을 향상시킴을 보여주는 데이터이다.

a,b: 1주일 동안 실온(22℃) 또는 4℃에서 유지된 정상 식이(CD)를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 BAT 섹션의 Haematoxylin 및 eosin(H&E) (a) 또는 항-Ucp1 항체 염색 (b). 스케일 바, 50 μm.

c: 4℃에서 1주일 동안 보관된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 BAT에서 Gapdh에 상대적인 열발생 유전자의 mRNA 수준. n = 3.

d,e: 4℃에서 1주일 동안 보관된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 BAT에서 Gapdh에 상대적인 지방분해 (d) 및 지방산 산화 (e) 유전자의 mRNA 수준. n = 3.

f: RT 또는 4℃에서 1주일 동안 보관된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 BAT의 면역블롯 분석. α-튜불린은 로딩 대조군으로 사용되었다. n = 3.

g: 1주일 동안 저온 노출 후 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 혈장 글리세롤 농도. n = 3.

h: RT 또는 4℃에서 1주 동안 유지된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 iWAT(왼쪽) 및 BAT(오른쪽)의 생체외 지방산 산화. n = 3.

i-l: 30℃, 22℃ 및 4℃에서 유지된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 VO_2 (i,j) 및 열 생산 (k, l)을 수득하기 위한 간접 열량계. n = 6.

m: RT 또는 4℃에서 1주일 동안 유지된 CD를 먹인WT 및 TKO 마우스의 대표적인 등쪽 적외선 열화상(왼쪽) 및 평

균 피부 온도(오른쪽). n = 3-5.

n: RT 또는 4℃에서 1주일 동안 보관된 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 직장 온도. n = 3-5.

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. P-값은 unpaired Student's t-test 에 의해 결정되었다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$ vs. WT.

도 5는 지방세포 Tet 발현이 비만에서 증가하고 TET 결손 마우스는 비만에 저항함을 보여주는 데이터이다.

a: 8주령부터 시작하여 12주 동안 CD 또는 HFD를 먹인 C57BL/6 수컷 마우스의 iWAT 및 eWAT에서 Gapdh에 상대적인 Tet1, 2 및 3 mRNA 수준. n = 5.

b,c: (a)에 표시된 마우스의 iWAT 및 eWAT에서 게놈 5hmC 수준을 정량화하기 위한 도트 블롯 분석 (b). 정량 결과는 (c)에 나타나 있다.

d: 8주령부터 시작하여 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 체중 변화. n = 12.

e: 12주 동안 CD(n = 6) 또는 HFD(n = 12)를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 체중 증가의 요약.

f: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 체지방량(왼쪽) 및 제지방량(lean mass)(오른쪽)의 절대량. CD의 경우 n = 6이고, HFD의 경우 n = 10이다.

g: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 iWAT, eWAT 및 BAT의 대표적인 사진(상단). 각 지방 패드의 무게 요약도 표시하였다(하단). CD의 경우 n = 6이고, HFD의 경우 n = 10이다. 스케일 바, 1 cm.

h-j: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 iWAT, eWAT 및 BAT의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색(h, n = 10), 지방세포 크기의 빈도 분포(i) 및 평균 지방세포 부피(j). 스케일 바, 100 μm.

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. P-값은 unpaired Student's t-test 에 의해 결정되었다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$ vs. CD (a) 또는 WT (c-g,j). $^{b}P < 0.005$, $^{c}P < 0.0005$ vs. CD (e-g,j).

도 6은 지방 TET 결손이 비만에 대한 저항을 초래함을 보여주는 데이터이다.

a-d: 12주 동안 CD (a,b) 또는 HFD (c,d)를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 eWAT 및 iWAT에서 Gapdh에 상대적인 대표적인 지방 생성 마커의 mRNA 발현. n = 3.

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

도 7은 TET가 결손된 암컷 마우스가 식이 유발 비만에 저항력이 있음을 보여주는 데이터이다.

a: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 암컷 마우스의 체중 변화. n = 5-6.

b: 12주 동안 CD(n = 6) 또는 HFD(n = 14)를 먹인 WT 및 TKO 암컷 마우스의 체중 증가의 요약.

c: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 암컷 마우스의 일일 음식 섭취. n = 30.

d: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 암컷 마우스의 iWAT, eWAT 및 BAT의 대표적인 사진(상단). 각 지방 패드의 무게 요약도 표시하였다(하단). n = 5. 스케일 바, 1 cm.

e: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 암컷 마우스의 체지방량(상단) 및 제지방량(lean mass)(하단)의 절대량. n = 5.

f: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 암컷 마우스의 내부 장기의 무게. n = 5.

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. P-값은 unpaired Student's t-test 에 의해 결정되었다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$ vs. WT. $^{c}P < 0.0005$ vs. CD.

도 8은 TET 결손이 비만의 유해한 대사 효과로부터 보호함을 보여주는 데이터이다.

a: 12주 동안 CD(n = 6) 또는 HFD(n = 12)를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 공복 혈청 포도당 농도.

b: 12주 동안 CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 공복 혈청 인슐린 농도. n = 5.

c,d: 12주 동안 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스에서 경구 포도당 내성(OGTT)(c, n = 12) 및 인슐린 내성

(IPITT)(d, n = 10) 테스트.

e,f: 인슐린(1.5U/kg)을 사용하거나 사용하지 않고 자극한 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 eWAT(e) 및 간(f)에서의 p-Akt (Ser 473), p-Akt (Thr 308) 및 total Akt 단백질의 면역블롯 분석. α-튜불린은 로딩 대조군으로 사용되었다.

g: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 췌장의 대표적인 인슐린 면역조직화학(IHC) 이미지(상단)(n = 6). 평균 β 세포 면적을 보여주는 요약 그래프를 나타내었다(하단). n = 8. Scale bar, 50 μm.

h: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 간의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색. n = 6. Scale bar, 100 μm.

i: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 간의 트리글리세리드 수준. n = 5.

j: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스에서 콜레스테롤, 저밀도 지단백질(LDL) 및 유리 지방산(FFA)의 혈장 농도. n = 4-8.

k: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 혈장 아디포넥틴 농도(왼쪽, n = 4-8) 및 eWAT에서 Gapdh에 상대적인 아디포넥틴 mRNA 수준(n = 3).

l: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 혈장 렙틴 농도(왼쪽, n = 4-8) 및 eWAT에서 Gapdh에 상대적인 렙틴 mRNA 수준(n = 3).

m: HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스에서 eWAT의 대표적인 F4/80 면역조직화학(IHC) 이미지. n = 4. Scale bar, 100 μm.

n: HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 eWAT에서 Gapdh에 상대적인 전염증성 분자의 mRNA 발현. n = 4.

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. P-값은 unpaired Student's t-test 에 의해 결정되었다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$ vs. WT. $^{b}P < 0.005$, $^{c}P < 0.0005$ vs. CD.

도 9는 TET 결손이 생쥐에서 비만과 관련한 각종 대사장애를 억제함을 보여주는 데이터이다.

a: HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 HOMA-IR 스코어. n = 5.

b,c: CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 경구 포도당 내성(OGTT)(b, 왼쪽) 및 인슐린 내성(IPITT)(c, 오른쪽) 테스트. n = 3-5.

d,e: 인슐린(1.5U/kg)을 사용하거나 사용하지 않고 자극한 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 근육(d) 및 iWAT(e)에서의 p-Akt (Ser 473), p-Akt (Thr 308) 및 total Akt의 면역블롯 분석. α-튜불린은 로딩 대조군으로 사용되었다. n = 2.

f: 표시된 기간 동안 인슐린(1.5U/kg)을 사용하거나 사용하지 않고 자극한 CD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 eWAT, iWAT 및 간에서의 p-Akt (Ser 473), p-Akt (Thr 308) 및 total Akt 단백질의 면역블롯 분석. α-튜불린은 로딩 대조군으로 사용되었다.

g: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스에서 대표적인 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색(왼쪽) 및 췌장의 섬 영역(islet area) 정량화(오른쪽). n = 8. Scale bar, 50 μm.

h: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 간의 대표적인 사진(왼쪽)과 절대 중량(오른쪽). CD의 경우 n = 6이고, HFD의 경우 n = 10 이다. Scale bar, 1 cm.

i: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 혈장 알라닌 아미노전이효소(ALT) 및 아스파르테이트 아미노전이효소(AST) 농도. n = 5-6.

j: CD 또는 HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 고밀도 지단백질(HDL) 및 트리글리세리드(TG)의 혈장 농도. n = 4-8.

k: HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스에서 eWAT의 대표적인 F4/80 염색 이미지(왼쪽). F4/80 강도의 정량화 결과도 표시하였다(오른쪽) (n = 10). ICC, immunocytochemistry. Scale bar, 50 μm.

l: HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 eWAT에서 대식세포 침윤의 유세포 분석. CD45+ CD11b+ F4/80+ 세포를 대식

세포로 정의하였다. 대표적인 등고선(contour) 플롯(왼쪽)과 정량화 결과(오른쪽)를 나타내었다. n = 6.

m,n: HFD를 먹인 WT 및 TKO 마우스의 eWAT에서 Gapdh에 상대적인 염증성 케모카인(m) 및 대식세포 마커(n)의 mRNA 발현. n = 4.

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. P-값은 unpaired Student's t-test 에 의해 결정되었다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$ vs. WT. $^{a}P < 0.05$, $^{b}P < 0.005$, $^{c}P < 0.0005$ vs. CD.

도 10은 지방세포 내 TET 결손이 지방분해를 촉진함을 보여주는 데이터이다.

a, b: HFD를 먹인 WT 및 TKO 생쥐에서 분리한 eWAT(좌측) 및 iWAT(우측)에 이소프로테레놀(ISO)을 처리하거나 그렇지 않은 후 지방분해를 측정하였다. 세포 배양액에 방출된 글리세롤(a) 및 유리지방산(FFA)(b) 농도를 측정한 후 단백질 양으로 보정하였다. n = 3-4.

c: HFD를 먹인 WT 및 TKO 생쥐에서 분리한 eWAT(좌측) 및 iWAT(우측)에 이소프로테레놀(ISO, 5 μM), 포르스콜린(20 μM), 또는 이소부틸메틸잔틴(IBMX, 0.2 mM)을 처리하거나 그렇지 않은 후 세포 배양액에 방출된 글리세롤 농도를 측정한 후 단백질 양으로 보정하였다. n = 3-4.

d: HFD를 먹인 WT 및 TKO 생쥐의 생체 내에서 지방분해. 이들 생쥐에 CL316,243을 주사한 후 표시된 시간 대에서 혈장 내 글리세롤과 지방산 농도를 측정하였다. n = 3-4.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명자들은 TET 단백질이 생체 내에서 지방세포 열발생 및 에너지 소비의 주요한 후성유전적 억제인자임을 규명하였다. 구체적으로, 지방세포의 *Tet* 발현은 β-아드레날린성 신호 전달 경로의 활성화 시 억제되었고 고지방 식이(high fat diet, HFD) 섭식 후에 상향 조절되었다. 고도로 지방세포 특이적 Cre인 *Adiponectin-Cre*를 사용한 3가지 TET 단백질(TET1, TET2 및 TET3) 모두의 조건부 절제(ablation)는 여러 대사 과정에 영향을 미쳐 유익한 대사 효과를 이끌어내었다. 지방세포에 3가지 TET 단백질이 모두 결손된 마우스는 백색 지방 조직(WAT) 및 갈색 지방 조직(BAT) 모두에서 지방 갈변 및 열발생이 강화되어 더 높은 에너지 소비를 보였다. 상기 마우스는 또한 Adrb3 그리고 Atgl 및 Hsl을 포함한 주요 리파제의 증가된 발현으로 인해 생체외 및 생체내에서 실질적으로 향상된 지방분해를 보여주었다. 그 결과, 녹아웃(knockout) 마우스는 개선된 내한성을 보였고 비만, 염증, 그리고 인슐린 저항성 및 고지혈증을 포함한 관련 대사 합병증으로부터 실질적으로 보호되었다. 전사 프로파일링은 TET 손실이 지방 조직에서 고지방 식이(HFD) 유도 전사 변경을 실질적으로 차단하고, TET 단백질이 세포 자율적 방식으로 주요 열발생 유전자 발현을 네거티브하게 조절함을 보여주었다.

[0026] 또한, 본 발명자들은 TET 단백질의 주요 다운스트림 표적으로서 지방분해 및 열발생의 주요 조절자인 *Adrb3*, 그리고 *Ucp1* 및 *Ppargc1a*를 포함한 기타 열발생 유전자를 확인하였다. 특히, TET 단백질은 물리적 결합을 통해 이들 유전자에 히스톤 데아세틸라제(HDAC)를 동원함으로써 TET 촉매 활성과 무관한 방식으로 이들 유전자의 발현을 억제하였다.

[0027] 본 발명자들은 TET-HDAC 상호 작용을 통한 염색질 변형이 백색 지방세포 가소성과 적응 열발생의 전사 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혀내었다. 따라서 TET 단백질은 에너지 소비를 증가시킴으로써 비만 및 제2형 당뇨병(T2D)의 발달을 방해하기 위해 치료학적으로 표적화될 수 있다.

[0028] 결론적으로, TET1, TET2 및 TET3은 지방세포의 지방분해(lipolysis) 및 열발생(thermogenesis)을 촉진하기 위한 신규 표적이 될 수 있으며, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 유전자 발현 또는 단백질의 활성을 억제함으로써 지방세포의 지방분해 및 열발생을 효과적으로 향상시킬 수 있다.

[0029] 위의 발견들에 기초하여, 일 측면에서, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하는, 지방세포의 지방분해(lipolysis)를 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[0030] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하는, 지방세포의 열발생(thermogenesis)을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[0031] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 지방세포의 지방분해 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0032] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하

는, 지방세포의 열발생 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0033] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 또는 대사질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0034] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 또는 대사질환의 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0035] 또한, 위와는 반대로, 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하는, 백색 지방세포의 수를 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0036] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 포함하는, 항암 치료 보조제 조성물에 관한 것이다.

[0037] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 인간을 제외한 동물의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하는, 비만 동물모델을 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 인간을 제외한 동물의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성이 증가된 비만 동물모델에 관한 것이다.

[0038] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 상기 비만 동물모델을 이용한 비만 치료용 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0039] 본 명세서에 있어서, 3가지 TET 단백질인 "TET1, TET2 및 TET3"은 간략하게 "TET 단백질"로도 언급될 수 있다. 따라서 본 명세서에서 "TET 단백질"이라는 용어는 "TET1, TET2 및 TET3"이라는 용어와 상호호환적으로 사용된다.

[0040] 본 발명의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하는 지방세포의 지방분해를 촉진하는 방법 및 지방세포의 열발생을 촉진하는 방법은 생체 내에서 수행될 수도 있고, 생체 외에서 수행될 수도 있다. 일 구현예에서, 상기 방법은 생체 내에서 수행된다. 일 구현예에서, 상기 방법은 생체 외에서 수행된다.

[0041] 본 발명에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계는 지방세포에서 TET 단백질의 발현 또는 활성을 직접적으로 억제하는 방법에 의해 수행될 수도 있고, TET 단백질의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 지방세포에 도입하는 방법에 의해 수행될 수도 있다.

[0042] 일 구현예에서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계는 지방세포에서 TET 단백질의 발현 또는 활성을 직접적으로 억제하는 방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법으로는 해당 유전자를 녹아웃(knockout)시키는 방법이 있으며, 구체적으로 Cre-LoxP 시스템에 의해 수행될 수 있다. 후술하는 실시예에서는 지방 조직 특이적으로 LoxP 서열이 삽입된 Tet 유전자 모두를 제거하기 위해 $Tet1^{fl/fl}$ $Tet2^{fl/fl}$ $Tet3^{fl/fl}$ 생쥐를 Adiponectin-Cre 생쥐와 교배하여, 지방 특이적 Tet 삼중 녹아웃 마우스(이하 "TKO"라고 지칭됨)를 생성하였다.

[0043] 일 구현예에서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 단계는 "지방세포에서 TET 단백질의 발현 또는 활성을 억제하는 물질"을 지방세포에 도입하는 방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 "지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질"은 또한 본 발명의 약학 조성물 및 식품 조성물을 포함한 조성물의 유효성분(활성성분)이기도 하다. 구체적으로, TET 단백질의 발현을 억제하는 물질로는 TET의 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 항-TET shRNA, 항-TET siRNA, 항-TET 안티센스 핵산, 가이드 RNA(gRNA)와 CRISPR/Cas9 등이 있다. 또한 TET 단백질의 활성을 억제하는 물질로는 TET 단백질에 특이적으로 결합하여 활성을 억제하는 소분자 화합물 또는 항-TET 항체 등이 있다.

[0044] 일 구현예에서, 지방세포에서 TET 단백질의 발현을 억제하는 유전학적 방법으로서, TET1, TET2 및 TET3 유전자를 표적으로 하는 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산을 다양한 운반체를 이용하거나 직접 지방조직에 도입하여 TET 단백질의 발현을 억제할 수 있다. 또는 TET1, TET2 및 TET3 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA(gRNA)와 CRISPR/Cas9을 지방조직에 도입하여 TET 유전자를 결손 또는 억제시킬 수 있다. 또는 TET1, TET2 및 TET3 유전자를 표적으로 하는 CRISPR/dCas9 기반 전사 억제자를 지방조직에 도입하여 TET 유전자의 발현을 억제시킬 수 있다.

[0045] 일 구현예에서, 지방세포에서 TET 단백질의 발현을 억제하는 약리학적 방법으로서, TET1, TET2 및 TET3의 전사를 억제하는 소분자 화합물을 지방조직에 주입하여 TET 유전자의 발현을 억제시킬 수 있다.

[0046] 일 구현예에서, 지방세포에서 TET 단백질의 활성을 억제하는 약리학적 방법으로서, TET1, TET2 및 TET3의 활성을 억제하는 소분자 화합물을 지방조직에 주입하여 TET 단백질의 활성을 억제시킬 수 있다. TET1, TET2 및 TET3의 활성을 억제하는 소분자 화합물의 예로는 2-하이드록시글루타레이트(2-hydroxyglutarate), 숙시네이트(succinate), 푸마레이트(fumarate) 및 새로 동정될 억제인자 등을 포함하며, 이에 한정되지 않는다.

[0047] siRNA(small interfering RNA)는 특정 mRNA의 절단을 통하여 RNAi(RNA 간섭) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자 치료의 방법으로 제공될 수 있다.

[0048] shRNA(short hairpin RNA 또는 small hairpin RNA)는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 Ⅲ의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase Ⅲ)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.

[0049] 안티센스 핵산은 특정 mRNA 의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

[0050] TET 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체는 단일클론항체 및 이에 대한 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함하는 것이고, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다. 상기 항체는 TET에 특이적으로 결합하는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편은 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), $F(ab')_2$ 및 Fv 등이 있다.

[0051] TET 단백질의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 지방세포에 주입하는 방법으로는 리포좀이나 유전공학적 기술인 벡터 시스템을 이용하는 방법 등 다양한 형태로 구현될 수 있다. 또는, 약제의 제제 형태로 제조하여 통상적인 방식으로 체내에 투여하는 방법이 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체 또는 첨가제를 추가로 포함할 수 있으며, 기존의 비만 또는 대사질환 치료용 약학 조성물의 전형적인 제형 형태와 유사하게 제제화될 수 있고, 또한 기존의 비만 또는 대사질환 치료용 약학 조성물의 전형적인 투여방식과 유사한 방식으로 투여될 수 있다.

[0053] 본 발명의 식품 조성물은 통상적으로 허용되는 식품 보조 첨가제를 추가로 포함할 수 있으며, 기존의 비만 또는 대사질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 첨가제를 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명의 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는 조성물은 지방세포의 지방분해 및 열발생을 촉진하여 비만 또는 대사질환을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선할 수 있다. 대사질환의 예로는 제2형 당뇨병(T2D), 고인슐린혈증, 고혈당증, 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 간 지방증(hepatic steatosis), 포도당 내성, 인슐린 저항성, 염증 등을 포함하며 이에 국한되는 것은 아니다.

[0055] 한편, 상술한 바와 같이, 본 발명의 또 다른 측면은, 위와는 반대로 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하는, 백색 지방세포의 수를 증가시키는 방법을 포함한다. 본 발명의 백색 지방세포의 수를 증가시키는 방법은 생체 내에서 수행될 수도 있고, 생체 외에서 수행될 수도 있다. 일 구현예에서, 상기 방법은 생체 내에서 수행된다. 일 구현예에서, 상기 방법은 생체 외에서 수행된다.

[0056] 본 발명에 있어서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 단계는 지방세포에서 TET 단백질의 발현 또는 활성을 직접적으로 증가시키는 방법에 의해 수행될 수도 있고, 지방세포에서 TET 단백질의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 지방세포에 도입하는 방법에 의해 수행될 수도 있다.

[0057] 일 구현예에서, 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질은 (i) TET1, TET2 및 TET3 cDNA, (ii) CRISPR/dCas9 기반 전사 활성인자, (iii) TET1, TET2 및 TET3의 전사를 촉진하는 소분자 화합물, 또는 (iv) TET1, TET2 및 TET3의 활성을 증가시키는 소분자 화합물일 수 있다.

[0058] 또한 본 발명은 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 포함하는, 항암 치료

보조제 조성물을 포함한다. 구체적으로, 본 발명의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 포함하는 조성물은 암환자의 백색 지방세포의 수를 증가시켜 에너지 축적을 유도하여 암환자에서 흔히 관찰되는 체중감소 및 근소실등과 연관된 악액질(cachexia) 등 각종 대사결함을 억제함으로써 항암 치료 보조제로서 사용될 수 있다.

[0059] 일 구현예에서, 지방세포에서 TET 단백질의 발현을 증가시키는 유전학적 방법으로서, TET1, TET2 및 TET3 cDNA를 아데노바이러스나 렌티바이러스 등 다양한 운반체를 이용하거나 플라스미드 발현벡터를 직접 지방조직에 도입하여 TET 단백질을 과발현시킬 수 있다. 또는 TET1, TET2 및 TET3 유전자를 표적으로 하는 CRISPR/dCas9 기반 전사 활성인자를 지방조직에 도입하여 TET 단백질을 과발현시킬 수 있다.

[0060] 일 구현예에서, 지방세포에서 TET 단백질의 발현을 증가시키는 약리학적 방법으로서, TET1, TET2 및 TET3의 전사를 촉진하는 소분자 화합물을 지방조직에 주입하여 TET 단백질을 과발현시킬 수 있다.

[0061] 일 구현예에서, 지방세포에서 TET 단백질의 활성을 증가시키는 약리학적 방법으로서, TET1, TET2 및 TET3의 활성을 증가시키는 소분자 화합물을 지방조직에 주입하여 TET 단백질의 활성을 증대시킬 수 있다. TET1, TET2 및 TET3의 활성을 증가시키는 소분자 화합물의 예로는 아스코브산(ascorbic acid) 및 새로 동정될 활성인자 등을 포함하며, 이에 한정되지 않는다.

[0062] 이러한 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 방법 또는 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 사용하여, 인간을 제외한 동물의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시킴으로써 비만 동물모델을 제조할 수 있다. 구체적으로, 인간을 제외한 동물의 지방세포에서 TET1, TET2 및 TET3의 발현 또는 활성을 증가시키는 방법을 통해 상기 동물의 지방세포의 지방분해 및 열발생을 저해함으로써 비만 동물모델을 제조할 수 있고, 이를 이용하여 비만 치료용 약물을 스크리닝할 수 있다. 구체적으로, 인간을 제외한 동물은 포유류이며, 보다 구체적으로는 마우스일 수 있다.

[0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 그러나 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0064] **실시예**

[0065] **실시예 1: TET1, TET2, TET3 단백질의 기능 규명**

[0066] **재료 및 방법**

[0067] **실험동물**

[0068] *Tet1, Tet2, Tet3* 유전자 자리에 LoxP 서열을 삽입시킨 생쥐(Tet1$^{fl/fl}$, Tet2$^{fl/fl}$, Tet3$^{fl/fl}$)는 이전 논문에 기술되어 있으며, 미국 라호야 연구소(La Jolla Institute, CA, USA)의 Anjana Rao 박사로부터 확보하였다. *Adiponectin-Cre* (#010803) 및 *Cre-ERT2* (#8085) 형질전환 생쥐는 미국 Jackson Laboratory에서 구입하였다. 지방 조직 특이적으로 LoxP 서열이 삽입된 Tet 유전자 모두를 제거하기 위해 *Tet1*$^{fl/fl}$ *Tet2*$^{fl/fl}$ *Tet3*$^{fl/fl}$ 생쥐를 Adiponectin-Cre 생쥐와 교배하였다. 이를 통해 지방 특이적 Tet 삼중 녹아웃 마우스(이하 "TKO"라고 지칭됨)를 생성하였다. LoxP 서열이 포함된 Tet 유전자를 선택적으로 절단하기 위해 *Tet1*$^{fl/fl}$ *Tet2*$^{fl/fl}$ *Tet3*$^{fl/fl}$ 생쥐를 Cre-ERT2 형질전환 생쥐와 교배하였다. 모든 연구는 달리 명시되지 않은 한 C57BL/6J 유전적 배경을 지닌 수컷 생쥐를 사용하였다. 생쥐는 12시간 간격의 낮/밤 주기 및 일정 온도(22 ± 2℃)가 유지되는 시설에서 사육하였다. 각각의 생쥐는 울산국립과학기술원(UNIST, 울산, 한국)의 In Vivo Research Center (IVRC)에서 특정 병원체가 없는 상태에서 교배 및 유지되었다. 모든 동물관련 실험은 UNIST의 Institutional Animal Care and Use Committee (UNISTACUC-17-35, 20-23)에 의해 승인되었으며 정해진 기관의 지침을 준수하여 진행되었다.

[0069] **저온 노출 및 식이요법에 의한 비만 모델**

[0070] 생쥐를 장기간 저온에 노출시키기 위해 생쥐를 음식과 물에 접근하도록 한 채 7일 동안 4℃에서 유지하였다. 직장 온도는 디지털 온도계(TD-300, Shibaura Electronics, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 저온 노출 후 열화상 카메라(Fortric, #226)를 사용하여 열화상 영상을 획득하고 AnalyzIR 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 7일 동안 저온에 노출시킨 후 생쥐에서 혈액 샘플을 채취하였다. 그 후, 조직을 분리하여 무게를 측정하고 후속 생화학적 또는 조직학적 검사를 수행하였다. 식이요법에 의한 비만모델을 구축하기 위해 모든 쥐들에게 생후 8주까지는 정상적인 식이 (13.5% 지방 함유; #R03-10, SAFE, Rosenberg, Germany)를 제공하였다. 이후 생쥐를 무작위로 두 그룹으로 나누어 각각 정상식이(13.5% 지방 함유; #R03-10, SAFE, Rosenberg,

Germany) 또는 고지방 식이(60% 지방 함유, Research Diets, NJ, USA)를 12주 동안 물과 함께 제공하였다. 생쥐에게 제공한 음식의 무게와 일주일 후 사라진 음식의 무게를 측정하여 생쥐가 섭취한 음식의 양을 측정했다. 각 생쥐의 몸무게는 매주 측정하였다. 실험이 종료될 시점에 정맥에서 혈액 샘플을 채취하였다. 백색 지방 조직(WAT), 갈색 지방 조직(BAT), 간, 췌장을 포함한 내부 장기는 분리한 후 무게를 측정하였다. 조직은 채취한 즉시 액체 질소에 동결하였고 추가 분석 때까지 -80℃에 저장하였다.

[0071] **대사 분석(포도당 내성, 인슐린 내성 및 간접 열량 측정)**

[0072] 경구 포도당 내성 검사(OGTT)를 위해 밤새 단식을 한 생쥐에서 혈액 샘플을 수집하였다 (0분 샘플). 그런 다음 D-글루코스(체중 1 kg당 1g; ThermoFisher, #15023-021)를 경구 주사하고 15, 30, 60, 90, 120분 후에 혈액 샘플을 채취하였다. 인슐린 내성 검사(ITT)의 경우 6시간 동안 굶긴 생쥐의 복강 내로 인슐린(1 kg 체중 당 0.75 단위, Sigma, #91077C)을 주사한 후 일정 시점에 혈액 샘플을 수집하였다. 혈청 포도당 수준은 포도당측정기(Accu-check Performa, Roche)를 사용하여 측정하였다. HOMA-IR (homeostatic model assessment of insulin resistance)은 "단식 혈당(mg dL^{-1}) × 단식 혈장 인슐린 (mU L^{-1})/405"의 수식을 이용하여 계산하였다. 산소 소비량과 이산화탄소 생산량은 모두 Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) 장비를 사용하여 측정하였다. 생쥐가 새로운 주거 조건에 적응할 수 있도록 실제 측정 전에 생쥐를 각각의 케이지에 3일 동안 개별적으로 유지하였다. 모든 생쥐를 지정된 케이지에 유지하기 전에 몸무게를 쟀다. 산소 소비량(VO_2)과 이산화탄소 생산량(VCO_2), 호흡기 교환비(VCO_2/VO_2), 열 생산량은 내장 소프트웨어(Oxymax)를 이용해 측정한 후 체중을 이용해 보정하였다. 동물의 운동량은 수평 빔 파단 수를 세어 측정하였다. 주변 온도는 2일 간격으로 30℃에서 22℃에서 4℃로 자동 하강하도록 설정되었다. 전체 실험 기간 동안 측정치는 자동 기록 되었다.

[0073] **효소결합면역측정법(ELISA) 및 지질 분석**

[0074] 혈액 내 포도당 수치는 포도당측정기(Accu-check Performa, Roche)를 사용하여 측정하였다. 혈장 내 인슐린(케이맨,#589501), 아디포넥틴(케이맨,#10007620), 렙틴(케이맨,#10007609), 간지질(케이맨,#10010303) 수준은 상업용 키트를 사용하여 효소결합면역측정법(ELISA)을 이용하여 측정하였다. 혈청 내 ALT, AST, 콜레스테롤, 저밀도 또는 고밀도 지질단백질(LDL, HDL), 중성 지방, 유리 지방산은 BS-390 Automated Chemistry Analyzer (포항 TECHNOPARK, Bioengineering 센터, 포항, 한국)를 사용하여 분석하였다. 혈장 샘플은 분석 전까지 -80℃에 보관하였다.

[0075] **지방분해(lipolysis) 분석**

[0076] 생체 내 지방분해 정도를 측정하기 위해 생쥐에 1kg 체중 당 1 mg의 CL316,243(Tocris Bioscience, #1499)를 복강 내로 주입하였다. 혈장샘플은 주입 전 혹은 주입 후 7.5, 15, 30분에 채취하였다. 생체 외 및 체외 측정을 위해서는 지방 조직(0.5 ~ 1 cm^2) 또는 체외에서 분화시킨 지방세포에 이소프로테레놀(isoproterenol) (Sigma, #I2760, 1-10μM), 포스콜린(forskolin) (Selleckchem, #S2449, 20μM) 또는 이소부틸메틸크산틴(isobutylmethylxanthine) (IBMX) (Sigma, #I5879, 0.2 mM)를 90분간 처리하였다. 제조사의 지침에 따라 EZ-free Glycerol Assay kit (Dogenbio, #DG-FGC100, Seoul, Korea) 또는 Free Fatty Acid Assay kit (Dogenbio, #DG-FFA100, Seoul, Korea)을 사용하여 각각 글리세롤 또는 유리 지방산의 농도를 측정하였다. 생체 외 샘플의 경우 정량화 결과는 조직의 무게로 보정하여 지방분해 정도의 표준 지수로 삼았다.

[0077] **조직학적 검사**

[0078] 생쥐의 조직 검체를 10% 중성 완충 포르말린(MEDILAB, #0151)에서 4℃에서 밤사이 고정하고 표준 실험실 프로토콜에 따라 탈수 및 파라핀 주입을 진행하였다. 파라핀 블록을 표준 프로토콜에 따라 5 μm 두께로 자른 후 탈파라핀화, 재수화를 진행한 후 hematoxylin 및 eosin (H&E) 염색을 진행하였다. 지방세포 면적은 H&E로 염색된 슬라이드에서 virtual microscopy (Olympus)를 사용하여 측정하였다. 지방세포 크기는 개별 생쥐의 무작위 영상에서 내장 소프트웨어(이미징 소프트웨어)를 사용하여 최소 50개 이상의 지방세포에서 측정하였다. 면역조직화학 염색의 경우, 표본에서 파라핀을 제거한 후 0.3% H_2O_2를 처리하여 내생성 과산화효소 활성을 차단하였다. 이후 1%의 소 혈청 알부민이 함유된 PBS로 습도를 유지한 채 상온에서 30분간 블로킹을 진행한 후, 밤새 4℃에서 Ucp1 (Abcam, #ab10983)과 F4/80 (Abcam, #ab6640) 항체 또는 인슐린 항체(Abcam, #ab1547)로 조직을 염색하였다. 조직 절편을 PBS로 세척한 후 1시간 동안 홀스래디쉬 페록시다제(HRP)에 반응시키고 3,3-di-amino-benzidine (DAB) 용액(다코, #L346811)으로 추가 염색한 후 현미경으로 촬영하였다. Ucp1 염색 정도는 ImageJ

(iJ150, USA) 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 면역 형광 분석에는 Alexa Fluor 594를 결합시킨 2차 항체가 사용되었으며 LSM880 confocal microscopy (ZEISS)을 사용하여 영상촬영을 수행하였다.

[0079] **iWAT에서 유래한 불멸화된(immortalized) 지방전구세포 구축**

[0080] 4-6주령의 야생형(WT) 생쥐의 서혜부 백색 지방 조직(iWAT)으로부터 기질 혈관 분획(stromal vascular fraction, SVF)을 분리하였다. 이후 iWAT을 인산염 완충식염수(PBS)로 세척하고 DMEM/F12 배지 (Thermo Fisher Scientific)에서 1.5 mg/mL 콜라겐아제 II(Sigma)를 37℃에서 40분간 처리하여 분해함으로써 단일세포를 확보하였다. 이후 세포를 10% FBS, 100 U/mL 페니실린, 100 U/mL 스트렙토마이신이 포함된 DMEM/F12에 풀어주고 100 μm 나일론 세포필터(BD Falcon)로 걸러주었다. 적혈구는 ACK 용해 완충제(150 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0.1 mM Na_2-EDTA)를 상온에서 1분간 처리하여 제거하였다. 면역세포와 기타 오염물질을 제거하기 위해 SVF 세포를 배양접시 위에서 1~2시간 정도 배양 후 상층 배양액을 제거하였다. 세포를 PBS로 두 번 더 세척하고 새로운 배양으로 교체한 후 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 불멸화된 지방전구세포는 SV40 large T 항원을 발현하는 레트로바이러스로 세포를 감염시킨 후 geneticin (G418, 500 μg/mL)을 처리하여 선별하였다.

[0081] **체외 지방분화**

[0082] 불멸화시킨 지방전구세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 10% FBS, 100 U/mL 페니실린, 100 U/mL 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM/F12에서 배양하였다. 세포가 배양용 접시를 꽉 채운 지(confluency) 이틀 후, 지방분화 유도 칵테일(5 mg/mL 인슐린(Sigma, #I6634), 1 nM T3(Sigma, #T2877), 125 μM Indomethacin (Sigma, #I7378), 1μM 덱사메타손(Sigma, #D1756), 0.5 mM IBMX (Sigma, #I5879), 및 0.5 μM rosiglitazone (Sigma, #R2408))을 처리하여 지방 분화를 유도하였다. 이틀이 지난 후부터는 인슐린과 T3가 포함된 배양 배지에서 세포를 유지하였고 이틀에 한 번씩 새로운 배양액으로 교체하였다.

[0083] **유세포 분석**

[0084] 기질 혈관 분획(SVF) 세포는 앞서 기술한 대로 수집하여 1X PBS로 세척하였다. 이후 세포를 1X 유세포분석 버퍼(0.2% 열처리한 FBS 및 0.1% sodium azide를 포함하는 1X PBS)에 풀어 CD16/CD32 항체(Mouse BD Fc Block™)로 블로킹을 진행하고 아래 항체를 이용하여 4℃에서 30분간 빛을 차단한 채 염색하였다: APC-Cy7-CD45.2 (104), APC-CD11b (M1/70), 그리고 PE-Cy7-F4/80 (BM8). 이후 유세포분석 버퍼에서 세포를 세척한 후 유세포분석을 진행하였다. 유세포 분석은 FACS LSR Fortessa(BD Bioscience)를 사용하여 수행했으며, 데이터는 FlowJo 소프트웨어(BD Bioscience)를 사용하여 분석하였다.

[0085] **RNA 분리, 역전사 및 실시간 RT-PCR**

[0086] 제조사의 안내에 따라 TRIzol reagent (Invitrogen)를 이용해 세포나 조직에서 전체 RNA를 추출한 뒤 SuperScript IV (Invitrogen)를 이용하여 역전사를 진행하였다. 희석한 cDNA를 QuantStudio 5, 6 또는 7 Flex(Applicated Biosystems) 및 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX(Enzynomics)를 사용하여 실시간 PCR을 통해 분석하였다. 데이터는 QuantStudio 5, 6 또는 7 실시간 PCR 소프트웨어(Applicated Biosystems)에 의해 분석하였다. 유전자 발현 수준은 *Gapdh*의 양으로 보정하였다. 프라이머 서열은 하기 표 1에 나열되어 있다.

[0087] [표 1]

본 연구에 사용된 oligonucleotide 목록 및 서열

Target	Forward primer (5'-> 3')	Reverse primer (5' -> 3')
Ucp1	TCTCAGCCGGCTTAATGACTG	GGCTTGCATTCTGACCTTCAC
Prdm16	CCAAGGCAAGGGCGAAGAA	AGTCTGGTGGGATTGGAATGT
Ppargc1a	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT	CCACTTCAATCCACCCAGAAAG
Ppara	AAGACTACCTGCTACCGAAATG	AACATTGGGCCGGTTAAGA
Dio2	CATTGATGAGGCTCACCCTTC	GGTTCCGGTGCTTCTTAACCT
Cidea	TCCTATGCTGCACAGATGACG	TGCTCTTCTGTATCGCCCAGT
Elovl3	GTGTGCTTTGCCATCTACACG	CTCCCAGTTCAACAACCTTGC
Cox5b	TTCAAGGTTACTTCGCGGAGT	CGGGACTAGATTAGGGTCTTCC
Cox7a	GCTCTGGTCCGGTCTTTTAGC	GTACTGGGAGGTCATTGTCGG
Cox8b	TGCTGGAACCATGAAGCCAAC	AGCCAGCCAAAACTCCCACTT
Cd137	CCAAGTACCTTCTCCAGCATAGG	GCGTTGTGGGTAGAGGAGCAAA
Tmem26	TGGTCCTGGATACAGTGCTCAC	GGTGCATTTCAAGAAGCCACAGG
Tbx1	GGCAGGCAGACGAATGTTC	TTGTCATCTACGGGCACAAAG
Adrb3	AGGCACAGGAATGCCACTCCAA	GCTTAGCCACAACGAACACTCG
Atgl	TTCACCATCCGCTTGTTGGAG	AGATGGTCACCCAATTTCCTC
Hsl	ACGCTACACAAAGGCTGCTT	TCGTTGCGTTTGTAGTGCTC
Mgl	TCGGAACAAGTCGGAGGT	TCAGCAGCTGTATGCCAAAG
Cpt1a *Acox1* *Acadm*	GGCATAAACGCAGAGCATTCCTG GCCATTCGATACAGTGCTGTGAG TGACGGAGCAGCCAATGA	CAGTGTCCATCCTCTGAGTAGC CCGAGAAAGTGGAAGGCATAGG TCGTCACCCTTCTTCTCTGCTT
Acadvl	TTACATGCTGAGTGCCAACATG	CGCCTCCGAGCAAAAGATT
Cpt1β	GGTCCCATAAGAAACAAGACCTC	AGACGATGTAAAGGGCAGAAGAGG
Cpt2	CCAAGCACAGTGTGGGCGAGC	AGGGTGACCCCTCTGGCTGCT
Pparg	GATGGAAGACCACTCGCATT	GGATCCGGCAGTTAAGATCA
Adiponectin *Leptin*	TGTTCCTCTTAATCCTGCCCA GGGCTTCACCCCATTCTGA	CCAACCTGCACAAGTTCCCTT TGGCTATCTGCAGCACATTTTG
Fabp4	TGGGAACCTGGAAGCTTGTCTC	GCTGATGATCATGTTGGGCTTG
Col2	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
Col5	TGCCCTCACCATCATCCTCACT	GGCGGTTCCTTCGAGTGACA
Col3	AGCCAGGTGTCATTTTCCTG	CTCAAGCCCCTGCTCTACAC
Col4	CCTGACCAAAAGAGGCAGAC	GAGGAGGCCCTCCTGAAGT
Col7	GTGTCCCTGGGAAGCTGTTA	AGAAAGAACAGCGGTGAGGA
Ccr2	ATTCTCCACACCCTGTTTCG	GATTCCTGGAAGGTGGTCAA
Ccr5	CGAAAACACATGGTCAAACG	GTTCTCCTGTGGATCGGGTA
F4/80	CCCCAGTGTCCTTACAGAGTG	GTGCCCAGAGTGGATGTCT
Tnfα	GACGTGGAACTGGCAGAAGAG	ACCGCCTGGAGTTCTGGAA
Il-1b	GCAACTGTTCCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
Il6 *iNOS*	CCACGGCCTTCCCTACTTC ACATCGACCCGTCCACAGTAT	TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA CAGAGGGGTAGGCTTGTCTC
Tet1	GAGCCTGTTCCTCGATGTGG	CAAACCCACCTGAGGCTGTT
Tet2	AACCTGGCTACTGTCATTGCTCCA	ATGTTCTGCTGGTCTCTGTGGGAA
Tet3	TCCGGATTGAGAAGGTCATC	CCAGGCCAGGATCAAGATAA

[0088]

[0089] **도트 블롯 분석**

[0090] 세포와 조직을 55℃에서 200 μg/mL 단백질 분해효소 K(Roche)를 밤새 처리하여 분해한 후, 게놈 DNA를 페놀/클로로폼 추출법에 의해 분리하였다. DNA 샘플에 0.4 M NaOH, 10 m EDTA를 95℃에서 10분간 처리하여 DNA 변성을 유도하고, 이어서 차가운 2 M 암모늄 아세테이트(pH 7.0)로 중화하였다. 제조사의 안내에 따라 조립한 바이오도트 장치(Bio-Rad)에 삽입한 니트로셀룰로스 막 위에 2배 연속 희석시킨 변성된 DNA 샘플을 부착시켰다. 이후 DNA가 부착된 막을 2배 농축한 SSC 완충제로 세척하고 80℃ 진공상태에서 2시간 동안 건조시킨 후 5% 무지방 우유로 1시간 동안 블로킹을 진행하였고, 항-5hmC 항체(1:6000, Anjana Rao 박사 그룹에서 제공)와 4℃에서 밤새 반응시켰다. 이후 홀스래디쉬 페록시다제(HRP)가 부착된 이차 항체 및 화학발광기법을 통해 시각화하였다. 막에 동일한 양의 DNA가 부착되었음을 확인하기 위해 0.3 M 소디움 아세테이트(pH 5.2)에 0.04% 톨루이딘 블루가 첨가된 용액으로 동일한 블롯을 염색하였다.

[0091] **웨스턴 블롯팅**

[0092] 세포와 조직을 단백질 분해효소/탈인산화효소 억제제(20 mM β-glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium o-vanadate, 10 μM leupeptin, 10 μg/mL aprotinin, 1 mM 새롭게 준비한 phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) 가 포함된 RIPA 완충제(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% 트리톤 X-100, 0.5 % 디옥시콜산나트륨, 0.1% SDS)를 이용하여 파괴한 후 얼음 위에서 15분 동안 보관하였다. 지방조직은 세포용해 완충액에 담아 TissueLyser LT (Qiagen)를 사용하여 파괴하였다. 세포 찌꺼기는 4℃, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 제거하였다. 단백질 농도는 브래드포드 단백질 측정법에 의해 측정하였다. 단백질 샘플을 SDS 샘플 버퍼와 혼합하여 5분간 끓인 후 세포 추출액을 7.5% 또는 10% SDS-PAGE로 분리한 후 니트로셀룰로스 막 위로 전달하였다. 5%의 저지방 우유와 관심 단백질에 대한 항체가 함유된 TBST(150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.5% Tween-20)에서 웨스턴블롯팅을 통해 특정 단백질을 검출하였으며, 홀스래디쉬 페록시다제(HRP)가 부착된 이차항체 및 화학발광기법을 통해 시각화하였다. 이 연구에서 사용한 항체는 다음과 같다:

Anti-Ucp1 (Abcam, #ab10983), anti-Pgc-1α (Novus, #NBP1-04676), anti-Adrb3 (Santa Cruz, #sc-515763), anti-p-Akt (Ser473) (CST, #9271), anti-p-Akt (Thr308) (CST, #9275), anti-Akt (CST, #9272), anti-Atgl (Santa cruz, #sc-365278), anti-α-Tubulin (Sigma, #T5168).

[0093] **정량 및 통계분석**

[0094] 모든 통계분석은 GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 모든 데이터는 특별히 표시하지 않은 한 '평균 ± 표준편차'로 표시하였다. 통계적 유의성은 특별히 표시하지 않은 한 two-tailed, unpaired Student's *t* test를 사용하여 분석하였다. $*P < 0.05$, $** P < 0.005$, 및 $***P < 0.0005$은 유의미하다고 간주하였다.

[0095] **실시예 2: 지방세포의 TET 절제는 지방 갈변 및 열발생을 촉진함**

[0096] 4℃에서 7일 동안 유지된 야생형(WT) 마우스의 피하 서혜부 백색 지방 조직(iWAT) 및 견갑간(interscapular) 갈색 지방 조직(BAT)에서 Tet1, 2 및 3 mRNA 수준이 감소했으며(도 1a), 도트 블롯 분석에 의해 평가된 바와 같이 이는 동시에 게놈 5hmC 수준을 감소시켰다(도 1b 및 1c).

[0097] 이 효과가 세포 자율적(cell autonomous)인지 여부를 평가하기 위해, iWAT로부터 기질 혈관 분획(SVF)을 분리하고 이를 시험관 내에서 성숙한 지방세포로 분화시켰다. cAMP/PKA 신호 전달에 대한 β-아드레날린성 수용체를 활성화하는 CL316,243, isoproterenol(ISO) 또는 forskolin과 같은 열발생 자극제에 대한 반응으로 Tet1, 2 및 3은 이들 세포(성숙한 지방세포)에서 유의하게 억제된 반면 *Ucp1* 및 *Ppargc1a*는 강력하게 유도되었다(도 1d, 도 2a 및 도 2b). 이러한 억제 효과는 β3-아드레날린성 수용체(Adrb3) 길항제인 SR59230A로 전처리할 경우 사라졌다(도 1d). 한편, 일반적인 지방세포 마커인 *Pparg*의 발현 수준은 변하지 않았다. 저온 노출이 아드레날린 신호 전달 캐스케이드를 통해 베이지색 및 갈색 지방세포에서 지방 조직의 갈변 및 열발생 프로그램을 자극하는 바, 이러한 결과는 생체 내에서 지방 갈변 및 열발생의 조절에서 TET 단백질의 잠재적 역할을 시사한다.

[0098] 이 가능성을 테스트하기 위해, $Tet1^{fl/fl}$ $Tet2^{fl/fl}$ $Tet3^{fl/fl}$ 생쥐를 Adiponectin-Cre 생쥐와 교배하여 지방 특이적 Tet 삼중 녹아웃 마우스(이하 "TKO"라고 지칭됨)를 생성하였다. 모든 Tet 유전자가 저온 또는 아드레날린성 자극에 대해 동시에 하향 조절되었으므로, 다양한 조직에서 흔하게 발생하는 TET 패밀리 멤버간의 잠재적 기능적 보상을 배제하기 위하여 모든 유전자를 결실시켰다. 지방 조직에서 성공적인 Tet 결실 및 그로 인한 지방 조직에서 특이적인 5hmC 감소를 확인한 반면, 간, 신장, 췌장 및 기타 비-지방 조직에서는 그렇지 않았다(도 2c 내지 2e). 지방 저장소들 내에서, Tet 결실은 성숙한 지방세포에서만 유도되었고 지방전구세포와 백혈구를 포함하는 기질 혈관 분획(SVF) 세포에서는 유도되지 않았다(도 2f 및 2g).

[0099] TET 단백질이 생체 내 지방 갈변에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위하여 WT 및 TKO 마우스를 7일 동안 4℃에 적응시켰다. WT 마우스와 비교하여 TKO 마우스는 주로 백색 지방 조직(WAT) 질량의 감소로 인해 더 많은 체중을 감량한 반면(도 3a 내지 3d), 실온(RT, 22℃)에 보관된 마우스의 체중은 비슷하였다. TKO 마우스의 iWAT는 색상이 더 갈색으로 보였고(도 3b 및 3c) Ucp1+ 다안(multilocular) 베이지색 지방세포가 더 풍부하였다(도 1e 및 1f). 또한 TKO 마우스의 iWAT는 베이지화(*Cd137*, *Tbx1* 및 *Tmem26*), 열발생(*Ucp1*, *Ppargc1a*, *Ppara* 등), 지방분해(*Adrb3*, *Pnpla2*, *Lipe* 등) 및 지방산 산화(*Acadm*, *Acadvl*, *Acox1* 등)와 관련된 유전자의 mRNA 수준이 더 높았다(도 1g 내지 1j). Adrb3, Pgc-1α(*Ppargc1a*에 의해 인코딩됨), Ucp1 및 Atgl(*Pnpla2*에 의해 인코딩됨)의 단백질 발현 또한 TKO 마우스에서 증가하였다(도 1k).

[0100] 이전 연구에 따르면 Fabp4-Cre 매개 *Tet1*의 결실이 있는 마우스는 저장소 특이적 효과를 나타내었다; 이들 마우스는 iWAT에서는 *Ucp1* 및 *Ppargc1a*의 증가된 발현을 나타내었으나, 갈색 지방 조직(BAT)에서는 그렇지 않았다. 그러나, 본 실시예의 마우스에서는, TKO iWAT에서 관찰된 모든 표현형은 TKO 마우스의 BAT에서도 되풀이되었다. TKO BAT는 증가된 갈변을 나타내었고(도 4a 및 4b), 추위에 대한 반응으로 열발생, 지방분해 및 지방산 산화와 관련된 유전자의 증가된 발현을 나타내었다(도 4c 내지 4f). 이는 지방 세포의 TET 결손이 WAT 갈변과 함께 BAT 활성화를 촉진한다는 것을 의미한다.

[0101] 유전자 발현 프로파일과 일치되게, TET 결손은 저온 스트레스에 대한 관련 대사 반응을 증가시켰다. 저온 노출된 TKO 마우스는 WT 마우스보다 더 높은 수준의 혈청 글리세롤을 나타내었는데, 이는 적응 열발생을 위한 연료를 제공하기 위해 지방분해가 증가하였음을 나타낸다(도 4g). 저온에 노출된 TKO 마우스의 1차 iWAT 및 BAT 외식편은 지방산 산화 능력이 향상되었다(도 4h). 특히, 간접 열량측정법으로 대사율을 평가한 결과, TKO 마우스는 WT 마우스에 비해서 4℃에서 산소 소비(VO_2), 이산화탄소 생성(VCO_2) 및 열발생 속도가 유의하게 더

높았지만, 30℃ 또는 22℃에서는 그렇지 않은 것으로 나타났다(도 4i 내지 4l, 도 3e 및 3f). 한편, 운동 활동 수준은 이들 마우스 그룹 간에 비슷하였다(도 3g 및 3h). 이러한 관찰과 일치하게, TKO 마우스는 기본 조건 및 저온 노출 후 WT 한배 새끼(littermate) 마우스보다 더 높은 표면 온도 및 코어(직장) 온도를 유지하였다(도 4m 및 4n).

[0102] 종합하면, 위 결과는 TET 단백질이 백색 지방 갈변 및 BAT 활성화의 열감수성 억제인자이며, 지방세포에서 세 가지 *Tet* 유전자의 3중 결실이 주요 열발생 유전자 프로그램을 활성화함으로써 마우스가 저온 유발 열발생에 더 적응하도록 만든다는 것을 나타낸다.

[0103] **실시예 3: TET TKO 마우스는 식이 유발 비만의 발병에 저항함**

[0104] 다음으로, Tet 발현이 지속적인 영양 과잉 상태에서 변경될 것인지를 조사하였다. 흥미롭게도, 정상 식이(chow diet, CD) (지방으로서 10% 에너지)를 급여한 마우스에서의 수준과 비교하여 Tet1, 2, 3 mRNA 및 5hmC의 수준이 고지방 식이(HFD)(지방으로서 60% 에너지)를 급여한 마우스의 iWAT와 eWAT에서 유의하게 증가하였고(도 5a 내지 5c), 이는 지방증에서 TET 단백질의 잠재적인 역할을 시사한다.

[0105] TET 단백질의 생리학적 기능을 명확히 하기 위해 Tet TKO 및 WT 한배 새끼 마우스에게 8주령부터 시작하여 12주 동안 CD 또는 HFD를 급여하였다. CD에 대한 반응으로 체중 증가에는 차이가 없었다(데이터 미기재). 그러나 TKO 마우스는 유사한 음식 섭취에도 불구하고 WT 마우스보다 HFD에 대한 반응으로 체중 증가에 더 저항하였다(도 5d 및 5e). TKO 마우스의 낮은 체중은 지방량의 감소에 의해 크게 영향을 받았으며, 마른 체질량(lean body mass)은 미미하게만 변하였다(도 5f). 해부된 지방 조직의 검사 결과, iWAT, eWAT 및 BAT는 TKO 마우스에서 상당히 작은 것이 확인되었다(도 5g). 조직학적으로, HFD를 먹인 TKO 마우스의 WAT와 BAT는 모두 WT 대조군에 비해 현저히 작은 지질 방울(LD)을 가진 지방세포를 포함했지만, CD를 먹인 마우스에서는 지방세포 크기에 눈에 띄는 차이가 없었다(도 5h 내지 5i). 이러한 데이터는 지방 TET 결손이 비만 및 비만 유발 지방세포 비대의 발달을 강력하게 억제한다는 것을 나타낸다.

[0106] 한편, 이전 연구에서 TET 단백질은 시험관 내에서 3T3-L1 지방전구세포 또는 마우스 배아 섬유아세포의 지방생성 분화에 필요한 것으로 보고되었다. 그러나 지방 생성의 공지된 마커 또는 조절인자의 mRNA 수준이 어느 식단에서든 WT 및 TKO 마우스 간에 비슷했기 때문에, 체중 변화에서 관찰된 차이가 생체 내 손상된 지방 생성에 기인하는 것으로는 보이지 않았다(도 6a 내지 6d).

[0107] 또한, 본 발명자들은 TET TKO 암컷 마우스가 식이 유발 비만에도 저항성이 있음을 확인하였다(도 7).

[0108] **실시예 4: 지방세포에서 TET 결손은 비만 관련 각종 대사장애를 억제함**

[0109] 비만은 포도당 내성 및 인슐린 저항성을 포함하는 각종 대사합병증을 수반하며 이는 고혈당증 및 고인슐린혈증을 유발한다. HFD는 WT 생쥐에서 혈장내 포도당 및 인슐린 농도를 현저히 증가시켰지만 TKO 생쥐에서는 이들이 강력하게 억제되었다(도 8a 및 8b). HOMA-IR 수치 역시 TET 결손에 의해 비만에 의해 유도되는 인슐린저항성이 억제됨을 확인하였다(도 9a). 포도당 및 인슐린 내성 테스트(각각 OGTT와 IPITT) 결과 HFD를 먹인 TKO 생쥐에서 포도당내성 및 인슐린 민감성이 개선된 것으로 나타났다(도 8c 및 8d). 그러나 CD를 먹인 마우스 그룹 간에는 차이가 보이지 않았다(도 9b 및 9c).

[0110] 생쥐에 인슐린을 주사한 후 인슐린에 반응하는 대사조직 (즉, 지방조직, 간, 근육)에서 Akt 인산화 과정을 검사한 결과 모든 조직에서 HFD를 먹인 TKO 생쥐에서 Akt 인산화가 증가하였다(도 8e, 8f, 9d 및 9e). 그러나 CD-피드 마우스에는 차이가 없었다(도 9f). 인슐린 저항성에 반응하여 췌장의 β-세포의 비대와 고인슐린혈증이 유도되는데 HFD를 먹인 TKO 생쥐에서는 췌장섬 및 인슐린을 분비하는 β-세포의 비대가 관찰되지 않았다 (도 8g 및 9g).

[0111] 만성적인 HFD 공급은 간 지방분열증을 유발하며 간질량 증가를 유발하며, 이는 모두 간기능 장애와 연관된다. 예상대로, HFD를 먹인 WT 생쥐에서는 크기가 큰 지방방울 및 높은 지질함량을 지닌 간의 비대(도 8h, 8i 및 9h), 알라닌 아미노전달효소(ALT) 및 아스파르트 아미노전달효소(AST), 콜레스테롤, 저밀도 및 고밀도 지단백질(LDL, HDL), 지질 (도 8j, 9i 및 9j)의 증가가 관찰되었으나 이러한 모든 변화는 TKO 마우스에서 극적으로 완화되었다. 또한, 혈장 내 지방산 농도는 HFD가 투여된 WT 생쥐에서 증가했지만 TKO에서는 증가하지 않았다 (도 8j).

[0112] 비만은 또한 아디포카인 프로파일을 심각하게 변화시켜 전신의 포도당 항상성 및 인슐린 민감성을 악화시킨다. HFD를 먹인 TKO 생쥐의 혈장에는 고농도의 항-당뇨활성을 지닌 아디포넥틴이 측정되었으며 eWAT에서 아디포넥틴

mRNA 수준이 높게 측정되었다(도 8k). WT 생쥐에 HFD를 공급하면 혈장 내 렙틴의 농도 및 렙틴 mRNA이 증가하는데 HFD를 먹인 TKO 생쥐에서는 낮은 수준을 유지했다(도 8l).

[0113] 만성 저급성 염증은 비만의 독특한 특징으로서 지방조직의 비대 초기에 주로 eWAT에서 개시되며 비만이 진행되는 동안 발달하여 염증반응을 유도하고 인슐린 신호전달을 억제한다. 그러나 고지방 식이를 먹인 TKO 생쥐의 eWAT에서는 왕관 유사 구조물의 빈도 및 CD11b+F4/80+ 대식세포의 빈도가 현저히 감소하였다 (도 8m, 9k 및 9l). 이러한 결과와 마찬가지로 염증성 키모카인(Ccl2, Ccl5 등), 염증성 분자(Tnf-a, Il-1b, Il6, Nos) 및 대식세포 표지자(F4/80, CCR2, Ccr5)의 발현 수준도 현저히 감소하였다(도 8n, 9m 및 9n). 이러한 결과들은 비만 발달과정에서 대식세포 축적, 염증반응, 및 지방 조직의 병리학적 리모델링에 지방세포의 TET 단백질이 필요함을 나타낸다.

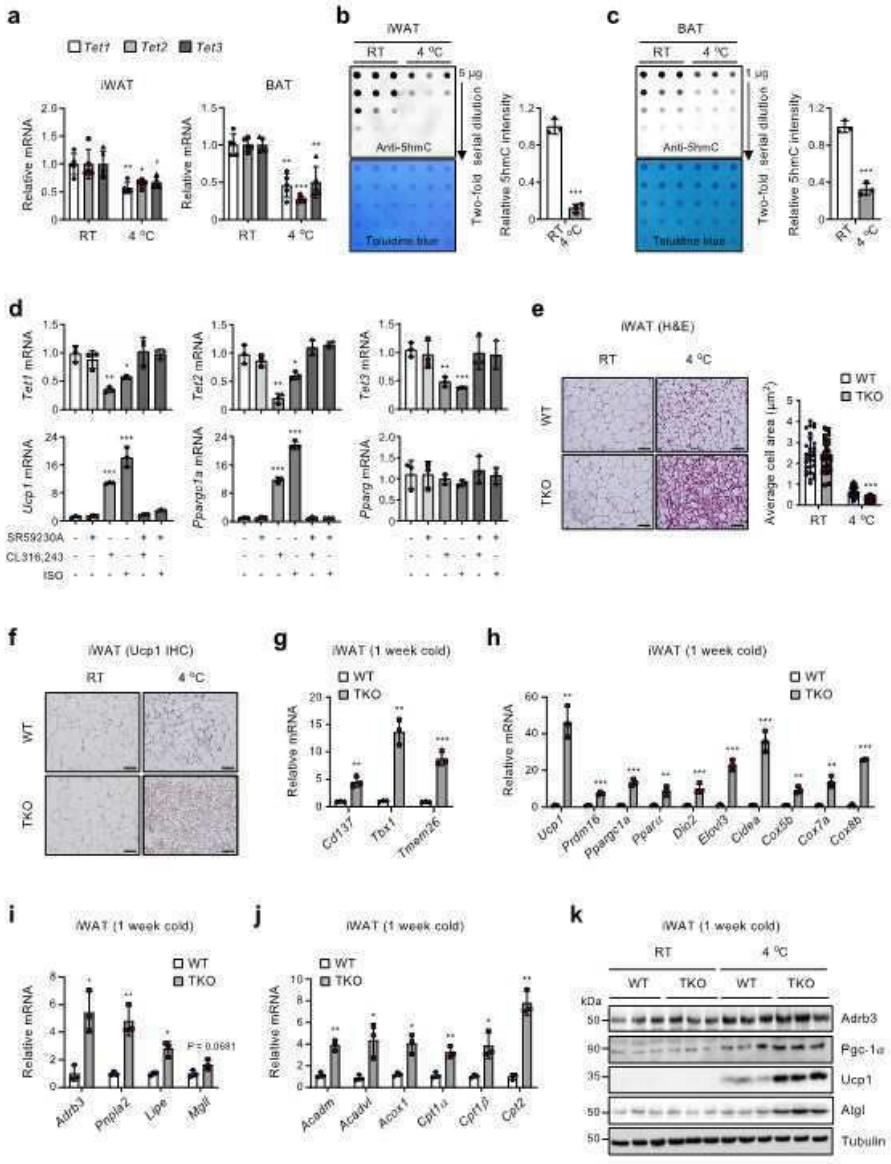
[0114] **실시예 5: 지방세포에서 TET 결손은 지방분해를 촉진함**

[0115] 지방세포가 교감신경에 의해 활성화되면 지방분해(lipolysis), 지방산 산화(fatty acid oxidation) 및 열발생이 촉진되어 지방 축적이 억제된다. 지방 분해 결과 생성되는 유리 지방산(free fatty acid)은 갈색지방에 의해 흡수되어 Ucp-1을 활성화시켜 열발생을 촉진한다. 따라서 고지방 식이를 먹인 TKO 생쥐에서 지방 조직의 비대가 억제되고 열발생이 증가하는 것이 TET 결손에 의한 지방분해 촉진에 기인하는지 살펴보았다. 고지방 식이를 먹인 TKO 생쥐에서 eWAT과 iWAT을 분리한 후 베타 아드레날린 수용체의 작용제인 이소프로테레놀(ISO)을 처리하여 ISO에 의해 활성화되는 지방분해를 측정하였다. 그 결과 WT에 비해 TKO 생쥐의 지방조직에서 ISO에 의한 글리세롤(도 10a) 및 유리 지방산(FFA, 도 10b) 방출이 현저히 증가하였다. 마찬가지로 TET이 결손된 지방세포에서 forskolin 및 이소부틸메틸잔틴(IBMX)에 의해 활성화되는 지방분해 역시 촉진되었다(도 10c).

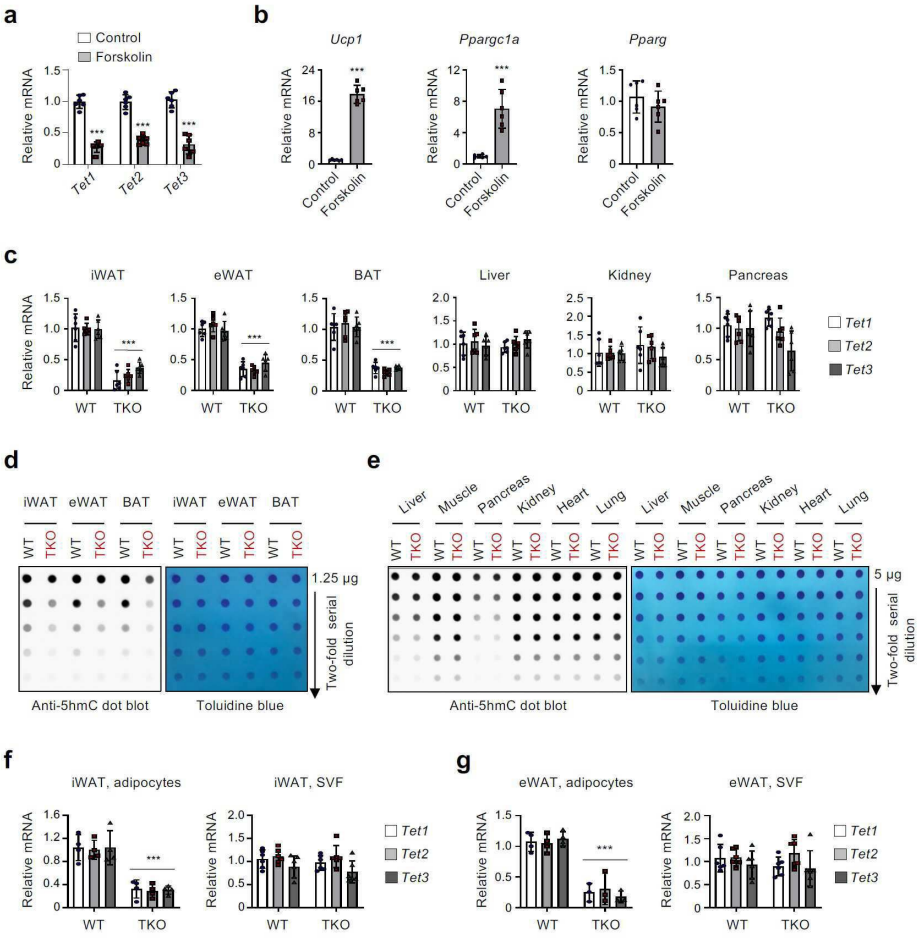
[0116] 생체 내에서 TET 결손이 지방분해 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 WT과 TKO 생쥐에 베타-3-아드레날린 수용체(Adrb3) 작용제인 CL316,243을 주사한 후 혈장 내 글리세롤과 유리 지방산 농도를 측정한 결과 WT 생쥐에 비해 TKO 생쥐에서 이들 수치가 현저히 증가하였다(도 10d). 이상의 결과는 지방세포에서 TET이 결손될 경우 지방분해가 촉진되어 고지방식이를 제공하더라도 지방축적이 억제되어 비만이 억제됨을 나타낸다.

도면

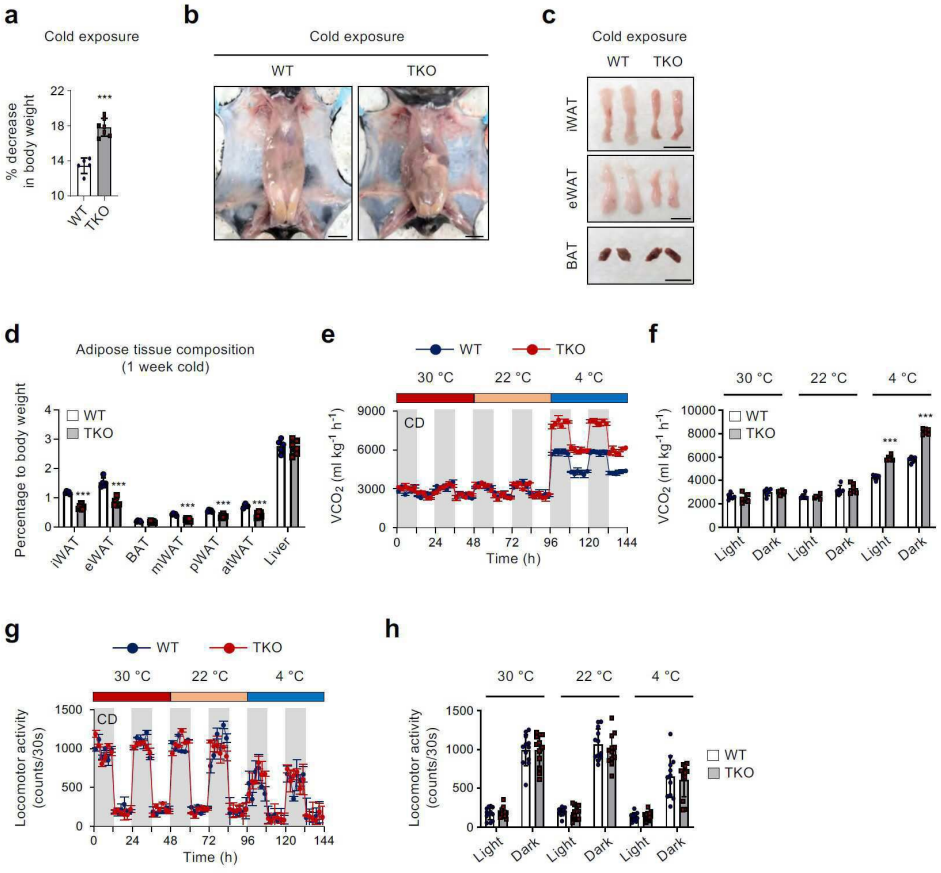
도면1


a
Tet1 Tet2 Tet3
iWAT
BAT
Relative mRNA
RT
4 °C
b
iWAT
RT
4 °C
5 μg
Anti-5hmC
Toluidine blue
Two-fold serial dilution
Relative 5hmC intensity
c
BAT
1 μg
d
Tet1 mRNA
Tet2 mRNA
Tet3 mRNA
Ucp1 mRNA
Ppargc1a mRNA
Pparg mRNA
SR59230A
CL316,243
ISO
e
iWAT (H&E)
WT
TKO
Average cell area (μm²)
f
iWAT (Ucp1 IHC)
g
iWAT (1 week cold)
Cd137
Tbx1
Tmem26
h
Ucp1
Prdm16
Ppargc1a
Ppara
Dio2
Elovl3
Cidea
Cox6b
Cox7a
Cox8b
i
Adrb3
Pnpla2
Lipe
Mgl
P = 0.0681
j
Acadm
Acadvl
Acox1
Cpt1α
Cpt1β
Cpt2
k
kDa
Adrb3
Pgc-1α
Ucp1
Atgl
Tubulin

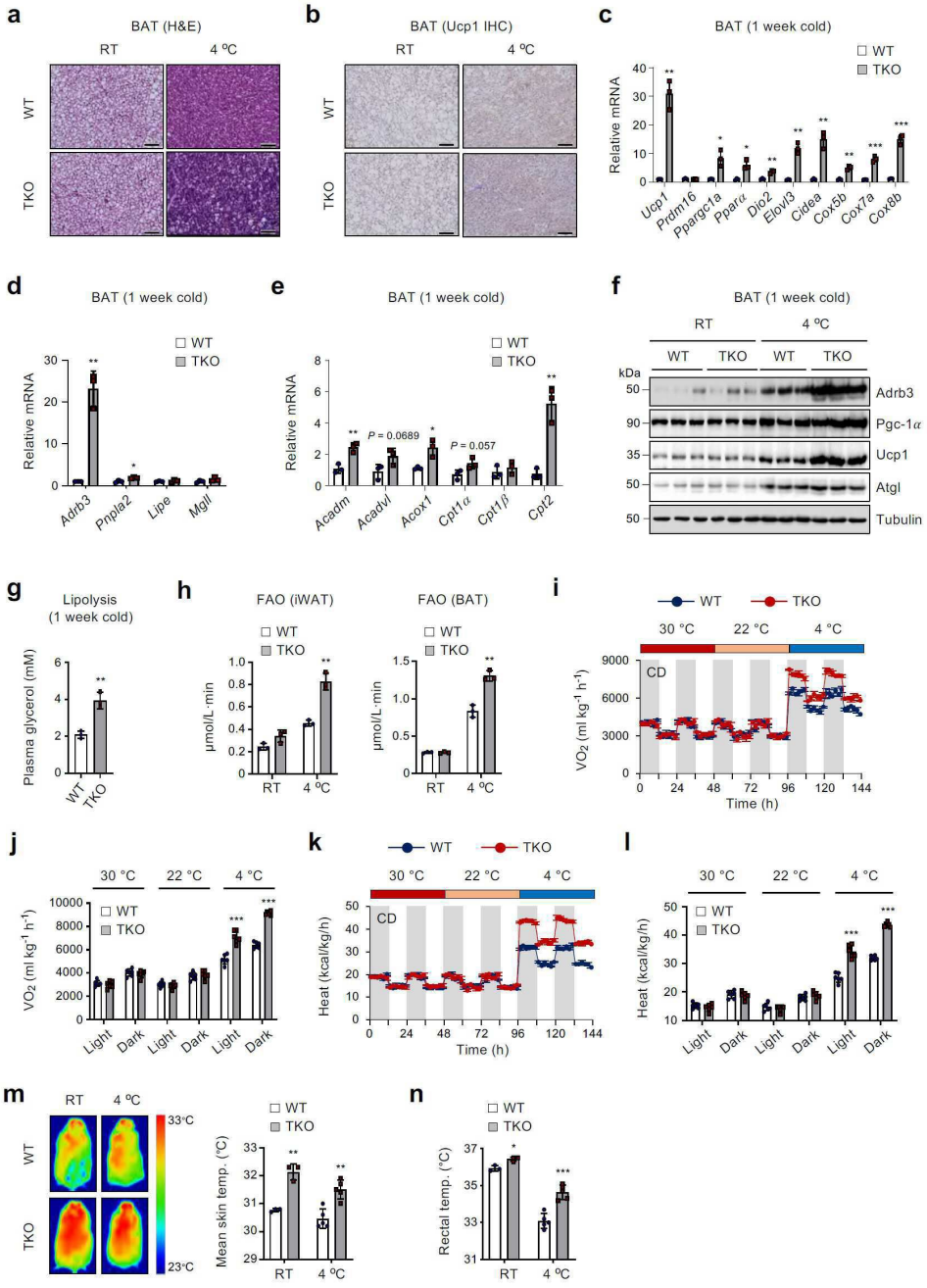
도면2


a
Control
Forskolin
Relative mRNA
Tet1
Tet2
Tet3
b
Ucp1
Ppargc1a
Pparg
Relative mRNA
Control
Forskolin
c
iWAT
eWAT
BAT
Liver
Kidney
Pancreas
Relative mRNA
WT
TKO
Tet1
Tet2
Tet3
d
iWAT
eWAT
BAT
WT
TKO
1.25 μg
Two-fold serial dilution
Anti-5hmC dot blot
Toluidine blue
e
Liver
Muscle
Pancreas
Kidney
Heart
Lung
5 μg
Two-fold serial dilution
Anti-5hmC dot blot
Toluidine blue
f
iWAT, adipocytes
iWAT, SVF
Relative mRNA
WT
TKO
Tet1
Tet2
Tet3
g
eWAT, adipocytes
eWAT, SVF
Relative mRNA
WT
TKO

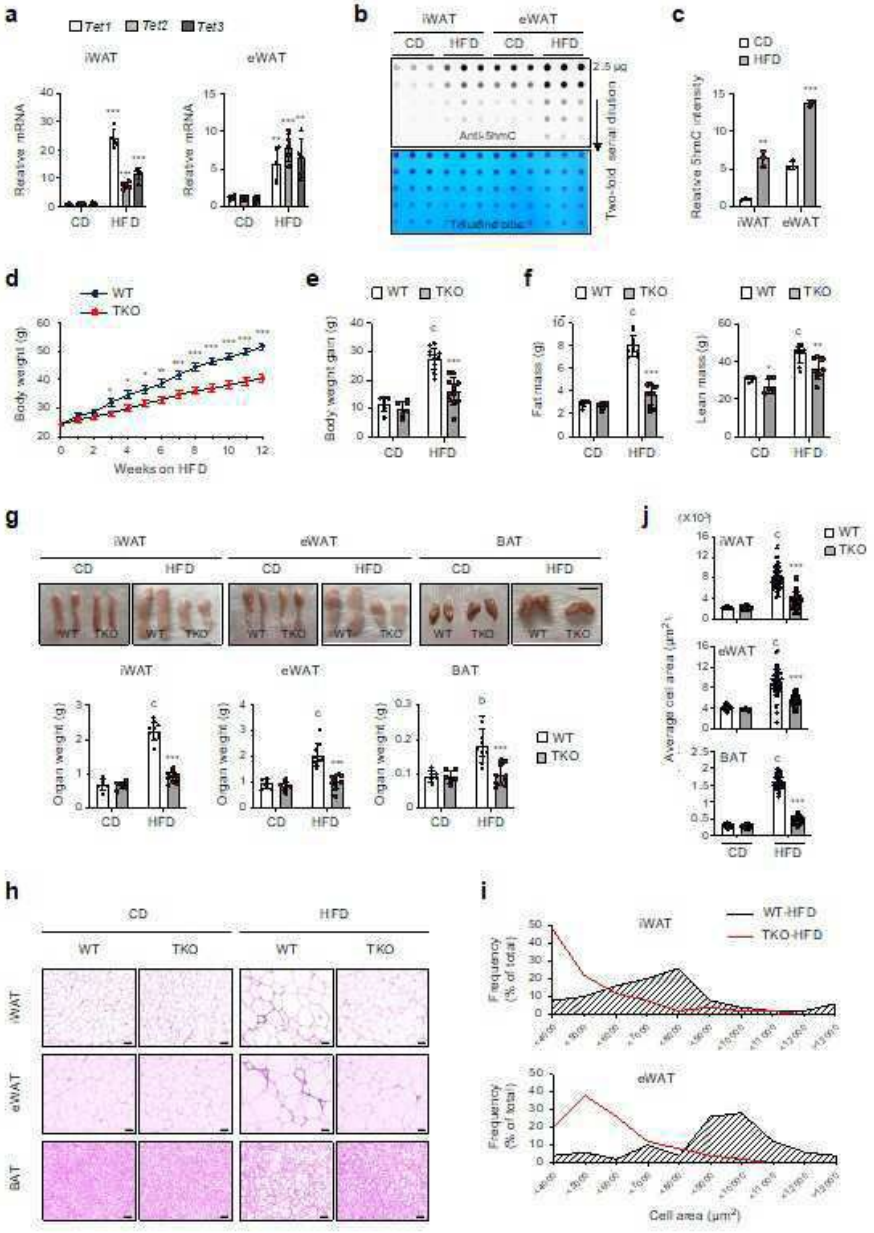
도면3


a
Cold exposure
% decrease in body weight
WT
TKO
b
Cold exposure
WT
TKO
c
Cold exposure
WT
TKO
iWAT
eWAT
BAT
d
Adipose tissue composition (1 week cold)
Percentage to body weight
WT
TKO
iWAT
eWAT
BAT
mWAT
pWAT
atWAT
Liver
e
WT
TKO
30 °C
22 °C
4 °C
CD
VCO2 (ml kg-1 h-1)
Time (h)
f
30 °C
22 °C
4 °C
WT
TKO
VCO2 (ml kg-1 h-1)
Light
Dark
g
WT
TKO
30 °C
22 °C
4 °C
CD
Locomotor activity (counts/30s)
Time (h)
h
30 °C
22 °C
4 °C
Locomotor activity (counts/30s)
WT
TKO
Light
Dark

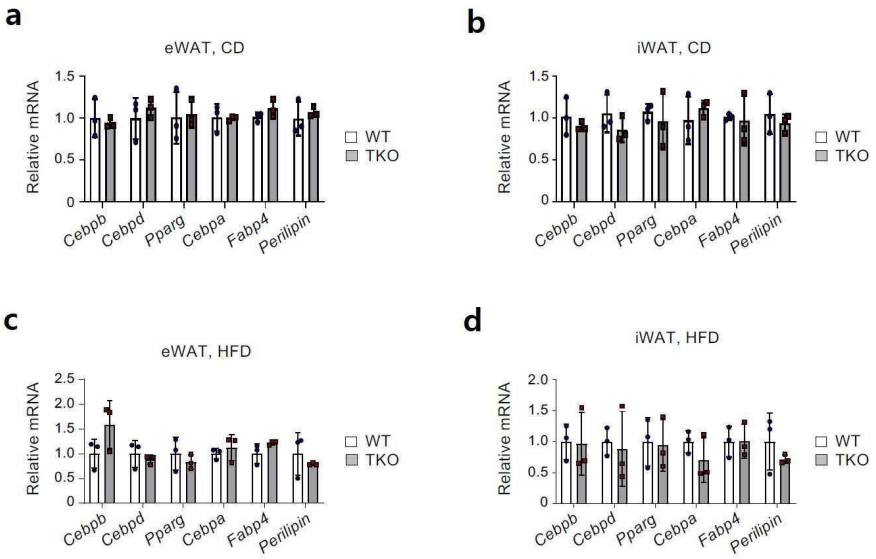
도면4


a
BAT (H&E)
RT
4 ºC
WT
TKO
b
BAT (Ucp1 IHC)
RT
4 ºC
WT
TKO
c
BAT (1 week cold)
WT
TKO
Relative mRNA
Ucp1
Prdm16
Ppargc1a
Pparα
Dio2
Elovl3
Cidea
Cox5b
Cox7a
Cox8b
d
BAT (1 week cold)
WT
TKO
Relative mRNA
Adrb3
Pnpla2
Lipe
Mgll
e
BAT (1 week cold)
WT
TKO
Relative mRNA
P = 0.0689
P = 0.057
Acadm
Acadvl
Acox1
Cpt1α
Cpt1β
Cpt2
f
BAT (1 week cold)
RT
4 ºC
WT
TKO
WT
TKO
kDa
Adrb3
Pgc-1α
Ucp1
Atgl
Tubulin
g
Lipolysis
(1 week cold)
Plasma glycerol (mM)
WT
TKO
h
FAO (iWAT)
FAO (BAT)
WT
TKO
μmol/L·min
RT
4 ºC
i
WT
TKO
30 °C
22 °C
4 °C
CD
VO2 (ml kg-1 h-1)
Time (h)
j
30 °C
22 °C
4 °C
WT
TKO
VO2 (ml kg-1 h-1)
Light
Dark
k
WT
TKO
30 °C
22 °C
4 °C
CD
Heat (kcal/kg/h)
Time (h)
l
30 °C
22 °C
4 °C
WT
TKO
Heat (kcal/kg/h)
Light
Dark
m
RT
4 ºC
WT
TKO
33°C
23°C
WT
TKO
Mean skin temp. (°C)
RT
4 ºC
n
WT
TKO
Rectal temp. (°C)
RT
4 ºC

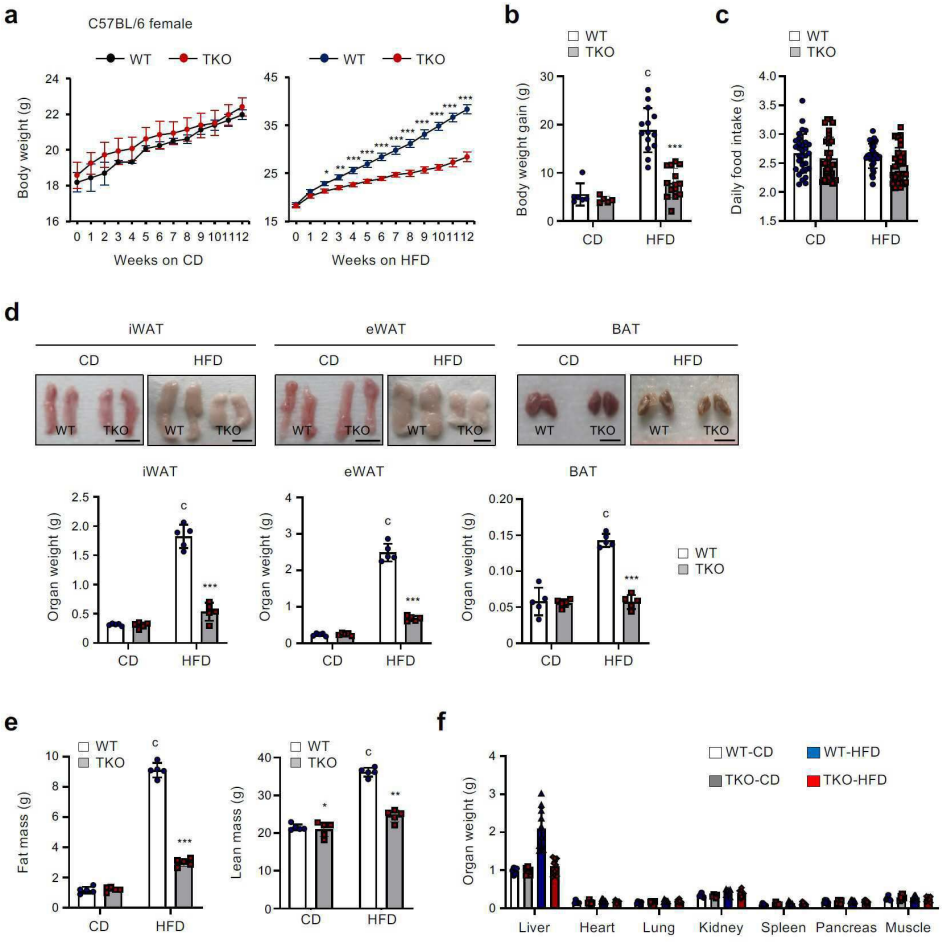
도면5


a
Tet1
Tet2
Tet3
iWAT
eWAT
Relative mRNA
CD
HFD
b
iWAT
eWAT
CD
HFD
2.5 μg
Anti-5hmC
Two-fold serial dilution
c
CD
HFD
Relative 5hmC intensity
iWAT
eWAT
d
WT
TKO
Body weight (g)
Weeks on HFD
e
WT
TKO
Body weight gain (g)
f
WT
TKO
Fat mass (g)
Lean mass (g)
g
iWAT
eWAT
BAT
CD
HFD
WT
TKO
Organ weight (g)
j
(X10³)
Average cell area (μm²)
h
CD
HFD
WT
TKO
iWAT
eWAT
BAT
i
iWAT
eWAT
WT-HFD
TKO-HFD
Frequency (% of total)
Cell area (μm²)

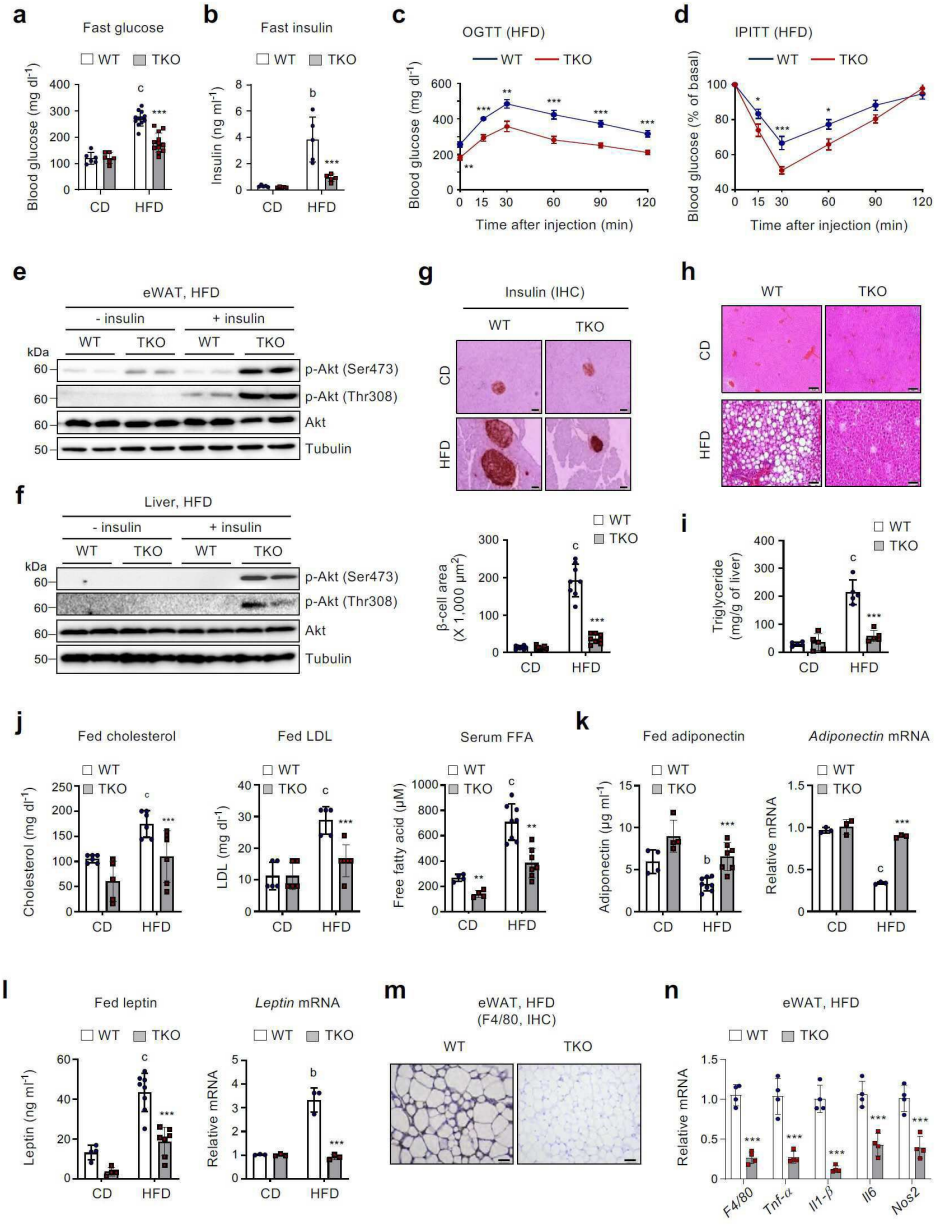
도면6


a
eWAT, CD
b
iWAT, CD
c
eWAT, HFD
d
iWAT, HFD
Relative mRNA
WT
TKO
Cebpb
Cebpd
Pparg
Cebpa
Fabp4
Perilipin

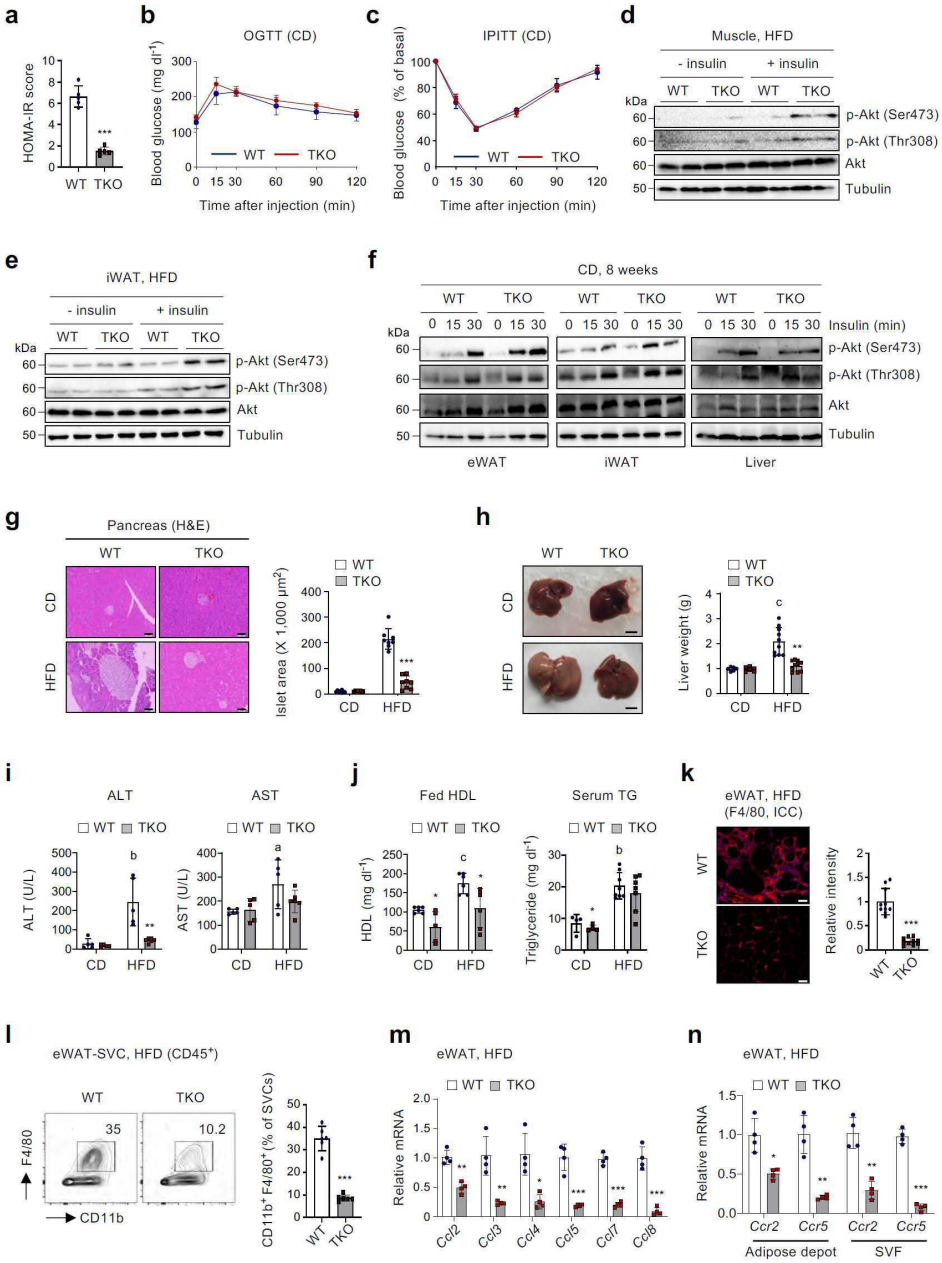
도면7


a
C57BL/6 female
WT
TKO
Body weight (g)
Weeks on CD
Weeks on HFD
b
Body weight gain (g)
c
Daily food intake (g)
CD
HFD
d
iWAT
eWAT
BAT
Organ weight (g)
e
Fat mass (g)
Lean mass (g)
f
WT-CD
WT-HFD
TKO-CD
TKO-HFD
Liver
Heart
Lung
Kidney
Spleen
Pancreas
Muscle

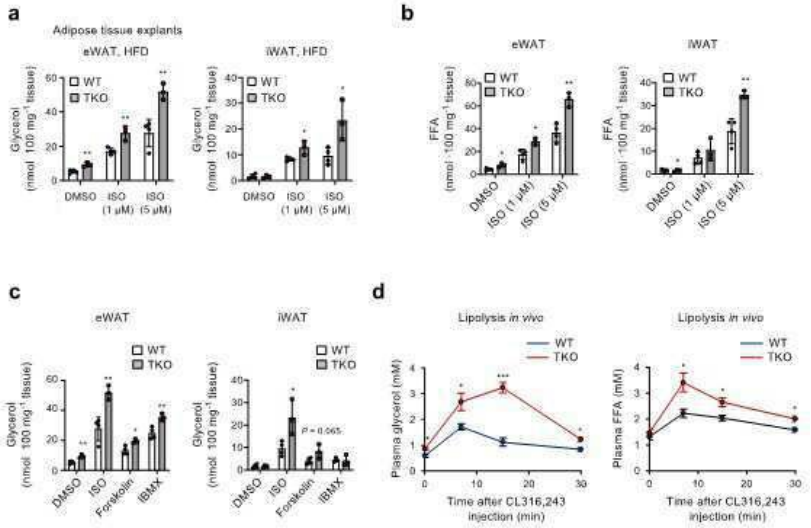
도면8


a
Fast glucose
WT TKO
Blood glucose (mg dl-1)
CD HFD
b
Fast insulin
Insulin (ng ml-1)
c
OGTT (HFD)
Blood glucose (mg dl-1)
Time after injection (min)
d
IPITT (HFD)
Blood glucose (% of basal)
e
eWAT, HFD
- insulin + insulin
kDa
p-Akt (Ser473)
p-Akt (Thr308)
Akt
Tubulin
f
Liver, HFD
g
Insulin (IHC)
β-cell area (X 1,000 μm2)
h
i
Triglyceride (mg/g of liver)
j
Fed cholesterol
Cholesterol (mg dl-1)
Fed LDL
LDL (mg dl-1)
Serum FFA
Free fatty acid (μM)
k
Fed adiponectin
Adiponectin (μg ml-1)
Adiponectin mRNA
Relative mRNA
l
Fed leptin
Leptin (ng ml-1)
Leptin mRNA
m
eWAT, HFD
(F4/80, IHC)
n
eWAT, HFD
F4/80
Tnf-α
Il1-β
Il6
Nos2

도면9


a
HOMA-IR score
WT TKO
b
OGTT (CD)
Blood glucose (mg dl-1)
WT TKO
Time after injection (min)
c
IPITT (CD)
Blood glucose (% of basal)
WT TKO
Time after injection (min)
d
Muscle, HFD
- insulin
+ insulin
WT TKO WT TKO
kDa
p-Akt (Ser473)
p-Akt (Thr308)
Akt
Tubulin
e
iWAT, HFD
- insulin
+ insulin
WT TKO WT TKO
kDa
p-Akt (Ser473)
p-Akt (Thr308)
Akt
Tubulin
f
CD, 8 weeks
WT TKO WT TKO WT TKO
0 15 30 0 15 30 0 15 30 0 15 30 0 15 30 0 15 30 Insulin (min)
kDa
p-Akt (Ser473)
p-Akt (Thr308)
Akt
Tubulin
eWAT
iWAT
Liver
g
Pancreas (H&E)
WT TKO
CD
HFD
Islet area (X 1,000 μm2)
WT
TKO
CD HFD
h
WT TKO
CD
HFD
Liver weight (g)
WT
TKO
CD HFD
i
ALT
AST
WT TKO
ALT (U/L)
AST (U/L)
CD HFD
j
Fed HDL
Serum TG
WT TKO
HDL (mg dl-1)
Triglyceride (mg dl-1)
CD HFD
k
eWAT, HFD
(F4/80, ICC)
WT
TKO
Relative intensity
WT TKO
l
eWAT-SVC, HFD (CD45+)
WT TKO
35
10.2
F4/80
CD11b
CD11b+ F4/80+ (% of SVCs)
WT TKO
m
eWAT, HFD
WT TKO
Relative mRNA
Ccl2 Ccl3 Ccl4 Ccl5 Ccl7 Ccl8
n
eWAT, HFD
WT TKO
Relative mRNA
Ccr2 Ccr5 Ccr2 Ccr5
Adipose depot
SVF

도면10


a
Adipose tissue explants
eWAT, HFD
iWAT, HFD
Glycerol (nmol 100 mg-1 tissue)
WT
TKO
DMSO
ISO (1 μM)
ISO (5 μM)
b
eWAT
iWAT
FFA (nmol 100 mg-1 tissue)
c
Forskolin
IBMX
d
Lipolysis in vivo
Plasma glycerol (mM)
Plasma FFA (mM)
Time after CL316,243 injection (min)