(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0024233
(43) 공개일자 2025년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/155 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/155 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0105458
(22) 출원일자 2023년08월11일
심사청구일자 2023년08월11일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이찬희
강원특별자치도 춘천시 방송길 70 롯데캐슬스카이클래스 105동1201호
(74) 대리인
특허법인본

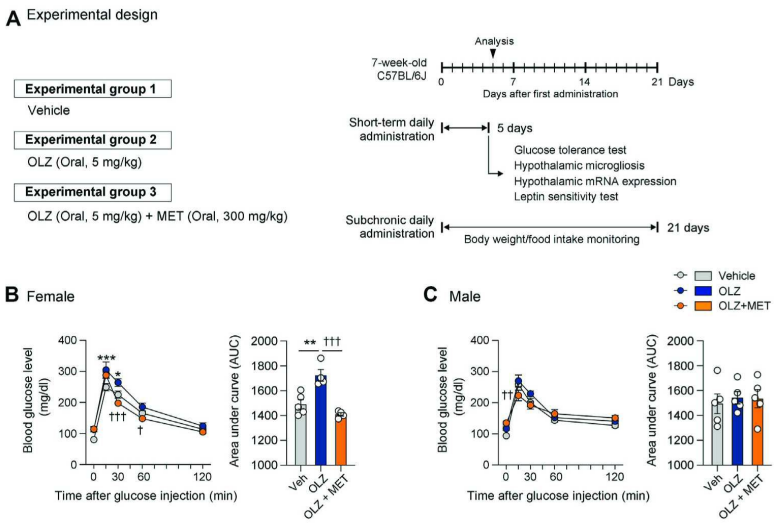
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **메트포르민을 포함하는 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은, 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 미세아교세포의 과발현 개선용 약학적 조성물, 시상하부 염증 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/0053 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711181272
과제번호 2022R1C1C1004187
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 비만 및 대사장애 발생을 조절하는 신경-면역계 상호작용 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 한림대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시상하부 염증은 올란자핀에 의해 유도된 것인, 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 시상하부 염증은 올란자핀에 의해 유도된 미세아교세포의 과발현에 의한 것인, 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 올란자핀에 의해 유도된 미세아교세포의 과발현이 유도된 암컷 마우스에 투여되기 위한 것인, 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 5

메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 미세아교세포의 과발현 개선용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 미세아교세포의 과발현은 올란자핀에 의해 유도된 것인, 미세아교세포의 과발현 개선용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 올란자핀에 의해 유도된 미세아교세포의 과발현이 유도된 암컷 마우스에 투여되기 위한 것인, 미세아교세포의 과발현 개선용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항의 조성물과 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 포함하는 제제.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 제제는 경구 투여용인 제제.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 제제는 펠렛, 산제, 과립제, 건조시럽제, 정제 및 캡슐제로 이루어진 군으로 선택되는 하나 이상의 형태를 갖는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 11

메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 시상하부 염증 개선용 건강기능 식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 시상하부 염증은 올란자핀에 의해 유도된 것인, 시상하부 염증 개선용 건강기능 식품 조성물.

청구항 13

올란자핀을 마우스에 투여하여 시상하부 염증 유도된 마우스 모델을 제조하는 단계;

상기 시상하부 염증 유도된 마우스 모델에 후보물질을 처리하는 단계;

상기 후보물질을 처리한 후 시상하부 염증이 완화되는 경우 시상하부 염증 치료제로 판단하는 단계;를 포함하는, 시상하부 염증 치료제 스크리닝 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 마우스는 암컷 마우스인, 시상하부 염증 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메트포르민을 포함하는 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 올란자핀(OLZ)은 정신분열증 치료에 널리 사용된다. 과활성 중변연계 도파민 활성을 낮추고 전두엽 피질의 도파민 민감도를 증가시켜 정신분열증을 효과적으로 조절하다(Peuskens et al., 2005; Brisch et al., 2014). 그러나 OLZ를 포함한 2세대 항정신병약(AP)은 심각한 대사 부작용이 있으며 이러한 부작용은 여성에서 훨씬 더 두드러집니다(Albaugh et al., 2006; Nasrallah, 2008; Bak et al., 2014). 이러한 약물은 당뇨병 및 비만과 같은 대사 조절 장애를 유발하여 정신분열증 환자의 수명을 정신분열증이 없는 환자에 비해 최대 10-20년까지 단축시킵니다(Tiihonen et al., 2009). 메트포르민(MET)과 같은 당뇨병 및 비만에 사용되는 약물은 대사 장애의 진행 및 발달을 중지시키기 위해 AP와 함께 처방되었지만(Baptista et al., 2007; de Silva et al., 2015; de Silva et al., 2016), 이러한 효과의 기본 메커니즘은 거의 알려지지 않았다.

[0003] 지난 수십 년 동안 축적된 증거는 시상하부 염증이 대사 조절 장애 및 비만의 병태생리학의 중요한 구성 요소임을 보여줍니다(Valdearcos et al., 2015; Jais and Brüning, 2017; Lee et al., 2018). 또한, 이전 연구에서는 시상하부 미세아교세포 활성화를 방지하면 고지방식이(HFD) 유발 시상하부 염증 및 렙틴 저항성이 완화되는 것으로 나타났으며, 이는 시상하부 미세아교세포가 비만 관련 대사 장애의 중요한 치료 표적임을 의미하다(Valdearcos et al., 2014; Andre et al., 2017; Valdearcos et al., 2017; Lee et al., 2018). 염증 상태에서 활성화된 미세아교세포는 전염증성 사이토카인을 생성하고 시상하부 뉴런에서 단백질 티로신 포스파타제 1B(Ptp1b) 및 사이토카인 신호전달 3(Socs3) 억제제와 같은 렙틴 저항성 관련 유전자의 발현을 향상시킵니다(Picardi et al., 2008; Pedroso 외, 2014). 비만과 대사성 질환의 발달에서 시상하부 미세아교세포증의 중요성에도 불구하고, OLZ에 의해 유도된 대사 조절 장애의 중추적 병태생리학은 여전히 불분명하다.

[0004] 본 연구에서는 시상하부 염증이 OLZ에 의해 독립적으로 유도되는지 여부와 MET의 보호 효과가 시상하부 염증 및 미세아교세포증의 조절에 의해 매개되는지 여부를 확인하고자 하였다. 본 발명자들은 OLZ 또는 OLZ + MET를 투여한 암컷 및 수컷 마우스에서 시상하부 미세아교세포의 변화를 조사했다. 단기 OLZ 투여 또는 OLZ와 MET 병용 투여 후에 시상하부 염증 표지자 및 렙틴에 대한 시상하부 반응을 측정했다. 우리의 연구 결과는 OLZ가 시상하부 염증과 대사 장애를 유발하며, 이는 시상하부 미세아교세포증의 조절을 통해 MET에 의해 개선된다는 것을 시

사한다.

선행기술문헌

[0005] 한국등록특허 제10-2286615호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은, 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 미세아교세포의 과발현 개선용 약학적 조성물, 시상하부 염증 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은, 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 포함하는 제제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 시상하부 염증 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 시상하부 염증은 올란자핀에 의해 유도된 것일 수 있다.

[0012] 상기 시상하부 염증은 올란자핀에 의해 유도된 미세아교세포의 과발현에 의한 것일 수 있다.

[0013] 상기 약학적 조성물은 올란자핀에 의해 유도된 미세아교세포의 과발현이 유도된 암컷 마우스에 투여되기 위한 것일 수 있다.

[0014] 본 발명은 또한, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 미세아교세포의 과발현 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 미세아교세포의 과발현은 올란자핀에 의해 유도된 것일 수 있다.

[0016] 상기 약학적 조성물은 올란자핀에 의해 유도된 미세아교세포의 과발현이 유도된 암컷 마우스에 투여되기 위한 것일 수 있다.

[0017] 본 발명은 상기조성물과 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 포함하는 제제를 제공한다.

[0018] 상기 제제는 경구 투여용일 수 있다.

[0019] 상기 제제는 펠렛, 산제, 과립제, 건조시럽제, 정제 및 캡슐제로 이루어진 군으로 선택되는 하나 이상의 형태를 갖는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 시상하부 염증 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 시상하부 염증은 올란자핀에 의해 유도된 것일 수 있다.

[0022] 본 발명은 또한, 올란자핀을 마우스에 투여하여 시상하부 염증 유도된 마우스 모델을 제조하는 단계; 상기 시상하부 염증 유도된 마우스 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 상기 후보물질을 처리한 후 시상하부 염증이 완화되는 경우 시상하부 염증 치료제로 판단하는 단계;를 포함하는, 시상하부 염증 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0023] 상기 마우스는 암컷 마우스일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따르면, 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 미세아교세포의 과발현 개선용 약학적 조성물, 시상하부 염증 개선용 건강기능식품을 제공할 수 있다.

[0025] 본 발명에 따르면, 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 시상하부 염증 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 포함하는 제제를 제공할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따르면, 시상하부 염증 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 암컷 마우스에서 올라자핀에 의해 유도된 글루코오스 불내성을 약화시키는 것을 나타낸 것으로서, (A)는 메트포르민에 의한 시상하부 염증 치료 효과를 실험한 방법을 나타내며, (B)는 암컷 마우스에서 올란자핀 또는 올란자핀과 메트포르민을 투여한 이후 혈당 수치를 나타낸 것이며, (C)는 수컷 마우스에서 올란자핀 또는 올란자핀과 메트포르민을 투여한 이후 혈당 수치를 나타낸 것이다.

도 2는 메트포르민이 올란자핀에 의해 유도된 시상하부 내 미세아교 세포 과발현을 억제하는 것을 나타낸 것으로서, (A) 및 (B)는 5일 동안 OLZ 또는 OLZ + MET를 투여한 암컷 및 수컷 마우스의 시상하부 궁상핵에서 이온화된 칼슘 결합 어댑터 단백질 1(Iba1)-발현 미세아교세포의 대표적인 이미지를 나타내고, (C) 및 (D)는 5일 동안 OLZ 또는 OLZ + MET를 투여한 암컷 및 수컷 마우스의 ARH에서 Iba1 발현 미세아교세포의 수 및 크기(n = 3-5)를 나타낸다.

도 3은 메트포르민(MET)이 시상하부에서 올란자핀(OLZ)에 의해 유발된 소교세포 활성화 및 염증을 약화시키는 것을 나타낸 것으로, (A),(B)는 암컷 및 수컷 마우스에서 Il-1β, Il-6, Tnfα, Il-4 및 Il-10의 시상하부 mRNA 발현에 대한 OLZ 또는 OLZ + MET 투여의 효과(n =4-5)를 나타내고, (C)는 ARH에서 Iba1 및 TNFα 발현의 대표 이미지를 나타낸다(n = 3).

도 4는 미노사이클린(MINO)이 암컷 마우스에서 소교세포 활성화를 감소시켜 올란자핀(OLZ)에 의해 유도된 포도당 불내성을 개선하는 것을 나타내며, (A)는 생후 7주령 마우스에게 OLZ 또는 OLZ + MINO를 투여하는 실험 계획을 나타내고, (B)는 OLZ 또는 OLZ + MINO를 5일 동안 투여한 암컷 마우스의 Iba1의 수와 크기 및 ARH에서 소교세포 TNFα의 발현을 나타내며, (C)는 OLZ 또는 OLZ + MINO를 투여한 후 포도당 내성 검사를 수행한 결과이다.

도 5는 올란자핀(OLZ)에 의해 유도된 렙틴 저항성이 메트포르민(MET)과 미노사이클린(MINO)에 의해 역전되는 것을 나타내며, (A)는 암컷 마우스에서 시상하부 Ptp1b 및 Socs3 mRNA 발현에 대한 OLZ 또는 OLZ + MET 처리의 효과(n =4-5), (B)는 OLZ, OLZ + MET 또는 OLZ + MINO를 투여한 마우스에 관한 실험 계획, (C), (E)는 5일 동안 OLZ, OLZ + MET 또는 OLZ + MINO를 투여한 암컷 마우스에서 렙틴 주사 후 음식 섭취량 및 체중 변화(n = 4-5), (D)는 5일 동안 OLZ 또는 OLZ + MET로 처리된 암컷 마우스의 등쪽 시상하부(DMH)에 있는 c-Fos+ 세포의 수(n = 3-5)를 나타낸다.

도 6은 OLZ에 의해 유도된 시상하부 미세아교세포증 및 대사 기능 장애의 기본 메커니즘에 대한 개략도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 명세서에서 “올란자핀(Olanzapine)”이란, 화학식 2-메틸-4-(4-메틸-1-피페라지닐)-10H-티에노([2,3-b][1,5]벤조디아제핀(2-Methyl-4-(4-methyl-1-piperazinyl)-10H-thieno[2,3-b][1,5]benzodiazepine)의 화합물로서, 조현병 우울증 치료에 사용되는 것으로 알려진 화합물이다.

[0029] 본 명세서에서 “메트포르민(Metrformin)”이란, 화학식 N,N-디메틸이미도디카르본이미딕 디아마이드(N,N-Dimethylimidodicarbonimidic diamide)의 화합물로서, 당뇨병 치료에 사용되는 것으로 알려진 화합물이다.

[0030] 본 명세서에서 “미세아교세포증(microgliosis)”란, 뇌와 척추 전역에 분포되어 있는 신경아교세포의 한 종류인 미세아교세포가 과발현되는 것을 의미한다.

[0031] 본 명세서에서 “시상하부 염증”이란, 시상의 밑에 위치한 시상하부에서 발생하거나 시상하부에 연관된 염증을 의미하며, 본 명세서에서는 주로 올란자핀에 의해 유도된 시상하부 염증을 의미한다.

[0032] 본 명세서에서 "예방"이란, 본 발명에 따른 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 시상하부 염증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

[0033] 본 명세서에서 "치료"란, 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 시상하부 염증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다

[0034] 본 명세서에서 "개선"이란, 본 발명에 따른 건강기능식품의 섭취에 의해 시상하부 염증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0035] 본 명세서에서, "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 포함하며, 영양 공급 외에도 본 발명의 목적상 시상하부 염증의 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.

[0036] 메트포르민 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 변경될 수 있음은 물론이며, 상기 메트포르민은 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1~80중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 복용 효율성이 떨어질 수 있으며, 95중량%를 초과할 경우에는 제형화의 어려움이 있을 수 있다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 통상의 기술자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성 분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0038] 상술한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 첨가하여 제제화될 수 있다. 상기 부형제 또는 담체는 해당 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 물질이면 특별하게 한정되지 않는다. 상기 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 제제의 종류에 따라 달라질 수 있으나, 예를 들어 당류, 착향제, 감미제, 산미제, 보존제, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 제제는 경구 또는 비경구 투여용으로 사용될 수 있다. 경구 투여용으로 사용되는 경우 제제화된 약제학적 조성물은 펠렛, 산제, 과립제, 건조시럽제, 정제 및 캡슐제로 이루어진 군으로 선택되는 하나 이상의 형태를 가질 수 있다.

[0039] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 재료 및 방법

[0042] 동물

[0043] 한림대학교 동물보호이용위원회(IACUC)(한림 2021-58)에 의해 동물 실험에 대한 승인을 받았다. 7주령 C57BL/6J 수컷 및 암컷 마우스는 DBL(충북, 한국)에서 구입하였다. 동물은 12시간 명암 주기(오전 8시 점등)로 온도가 조절되는 방(22 ± 1° C)에 단독으로 수용되었다. 생쥐는 45% HFD 또는 식이(chow diet; CD)와 물을 자유롭게 제공받았다. 체중과 음식섭취량은 매주 측정하였고 1일 음식섭취량(kcal)은 일주일 섭취량을 7로 나누어 추정하였다.

[0044] 약물 및 실험 설계

[0045] OLZ(Sigma, #O1141), MET(Sigma, #PHR1084) 및 미노사이클린(MINO)(Sigma, #M9511)은 Sigma-Aldrich에서 구입했다. OLZ는 항정신병 약물 유발 체중 증가(antipsychotic drug-induced weight gain; AIWG) 및 혈당 이상 실험에 사용되었다. OLZ 용량(5 mg/kg/d) 및 투여 기간은 선행 연구(Fernø et al., 2011; Ikegami et al., 2013; Lord et al., 2017; Castellani et al., 2018)를 기준으로 선정하였다. OLZ를 디메틸 설폭사이드에 용해한 다음 생리 식염수(0.9% 염화나트륨)로 희석하여 원하는 최종 농도를 얻었다. MET는 멸균 생리 식염수에 용해

되었다. MET의 용량(300 mg/kg/d)은 이전 연구를 기반으로 선택되었다(Shore et al., 2008; Matsui et al., 2010; Calixto et al., 2013). 대조군 마우스는 10% dimethyl sulfoxide 또는 생리 식염수를 경구 투여받았다. Vehicle, OLZ 및 MET 그룹의 동물은 오전 8시에서 오전 9시 사이에 경구 위관영양으로 매일 처치를 받았다. MINO는 이전 연구에서 AP 유발 부작용을 예방하는 약물로 사용되었다(Perez-Gomez et al., 2018; Zapata 외, 2020). MINO를 증류수에 녹인 후 생리 식염수에 희석하여 원하는 최종 농도를 얻었다. 음식 섭취에 영향을 미치지 않으면서 시상하부 미세아교세포증을 억제하는 MINO의 농도를 추가 동물 실험을 위해 선택했다. MINO(5μg)는 OLZ 투여 1시간 전에 뇌실내(intracerebroventricular; ICV) 경로를 통해 주사되었다. 21일 동안 체중 및 식이섭취 모니터링을 실시하였고, 투약 5일차에 당부하검사, 시상하부 미세아교세포증 분석, 시상하부 mRNA 발현 분석, 렙틴 감수성 검사를 실시하였다. 실험 설계의 개략도는 도 1A, 4A, 5B에 나와 있다.

[0046] 경구 포도당 내성 검사

[0047] 우리는 5일 동안 OLZ 또는 OLZ + MET를 투여한 마우스에 대해 경구 포도당 내성 검사를 수행했다. 내당능 시험을 위해 D-포도당(1g/kg, Sigma, #G8270)을 하룻밤 절식시킨 마우스에 경구 투여하였다. 주사 직전과 주사 후 15, 30, 60, 90, 120분에 포도당 수준을 측정하기 위해 꼬리 끝에서 혈액 샘플을 채취했다. 포도당 수치는 혈당계(ACCU-CHEK®, Aviva Plus System)를 사용하여 측정되었다.

[0048] 면역 형광 염색

[0049] 비히클, OLZ, 또는 OLZ + MET 투여 5일째에 조직학적 분석을 수행하였다. Isoflurane 흡입은 마우스 마취에 사용되었다. 그런 다음 마우스에 50ml의 차가운 식염수와 50ml의 4% 파라포름알데히드를 경심장 관류시켰다. 전체 뇌를 수집하고 4° C에서 16시간 동안 4% 파라포름알데히드로 고정했다. 이어서, 뇌를 탈수 용액(PBS(phosphate-buffered saline) 중 30% 자당)에 48시간 동안 두었다. 뇌의 시상하부 영역을 cryostat (Leica, Wetzlar, Germany)를 사용하여 30 μm마다 관상으로 절단하였다. 섹션은 -70° C에서 보관되었다. 이온화 칼슘 결합 어댑터 단백질-1(ionized calcium-binding adaptor protein-1; Iba1) 염색을 위해 시상하부 절편을 Triton X-100이 포함된 0.5% PBS에서 5분 동안 투과성화하고(permeabilized) 0.1% PBS 및 Triton X-100에서 3% 소 혈청으로 차단했다. 1시간 슬라이스를 차단 용액에서 항마우스 Iba1 항체(1:400, Abcam, #ab5076)와 함께 4° C에서 16시간 동안 배양한 다음 실온(RT)에서 1시간 동안 배양했다. 종양 괴사 인자(TNF)α 염색을 위해 시상하부 절편을 Triton X-100을 포함하는 0.5% PBS의 3% 소 혈청 알부민으로 RT에서 1시간 동안 차단한 후 항-마우스 TNFα 항체(1:200, Abcam, #ab1793) PBS에서 4° C에서 16시간 동안 실온에서 1시간 동안 배양하였다. c-Fos 염색을 위해 시상하부 절편을 실온에서 1시간 동안 Triton X-100을 포함하는 0.5% PBS 중 3% 소혈청알부민(BSA)으로 차단하고 항-c-Fos 항체(1:1000, Synaptic System, #226 008)와 함께 48시간 동안 4° C에서 차단 용액에서 배양하였다. PBS로 세척한 후 시상하부 절편을 적절한 Alexa-Flour 488-, 546- 또는 555-컨쥬게이션된 2차 항체(1:1000, Invitrogen)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양했다. 공초점 현미경(Carl Zeiss #710, Germany)을 사용하여 형광 항체를 관찰하였다.

[0050] 시상하부 유전자 발현

[0051] OLZ 또는 OLZ + MET를 5일 동안 투여한 마우스에서 시상하부 유전자 발현을 분석하였다. 중기저 시상 하부를 분리하는 방법은 선행 연구(Kim et al., 2006; Han et al., 2014; Lee et al., 2018; Kang et al., 2021)를 기반으로 하였다. 뇌를 추출하여 뒤집고 정중 융기의 돌출 전후를 1mm 두께의 절편으로 관상 절단했다. 이 과정을 용이하게 하기 위해 마우스 뇌 매트릭스를 사용했다(RWD, #68707). 뇌 슬라이드를 옆으로 눕힌 후 제3뇌실(3V)의 1/2 지점에 정점이 있는 복측 정삼각형 영역을 얻었다. 조직은 액체 질소를 사용하여 신속하게 동결되었고 -70° C 냉동고에서 보존되었다. 제조업체의 프로토콜에 따라 TRIzol(Life Technologies, #15596018)을 사용하여 뇌 조직에서 총 RNA를 추출했다. RNA를 역전사하여 cDNA를 생성했다. 실시간 PCR 분석을 사용하여 다음 유전자의 mRNA 발현 수준을 결정했다. mRNA 발현 수준은 Gapdh의 수준으로 정규화되었다.

[0052] ICV 주입

[0053] 정위(stereotaxic) 수술은 1.5%-2% 이소플루란을 지속적으로 흡입하여 마취된 7주령 C57BL/6 마우스에게 수행되었다. 스테인리스 강 가이드 캐뉼라(26-게이지)(P1 Technologies, Cat# C313G/SPC)를 마우스의 3V에 이식했다(Stereotaxic 좌표: bregma에 대한 꼬리 1.5mm 및 시상동에 대한 복부 5.5mm). 가이드 캐뉼라를 치과용 시멘트(Vertex Resin Self Curing)로 두개골에 부착했다. 더미 캐뉼라(P1 Technologies, Cat# C313DC/SPC)는 내부 캐뉼라(P1 Technologies, Cat# C313I/SPC)를 통한 약물 주입 시간을 제외하고 항상 가이드 캐뉼라에 삽입되었다. 회복 7일 후, 50ng의 안지오텐신-2(Sigma, Cat# A9525)를 각 캐뉼라를 통해 투여하여 캐뉼라가 올바르게 배치되

었는지 테스트했다. ICV 경로에 의한 안지오텐신-2 주사는 마우스에서 적절한 캐뉼라 배치를 테스트하기 위해 일반적으로 수행된다(Faesel et al., 2021). 안지오텐신-2 주사는 15분 이내에 음주 행동을 유도하지만 캐뉼라가 잘못 배치된 마우스는 이러한 음주 행동을 나타내지 않다. 본 연구에서는 이전 연구(Lee et al., 2018; Kang et al., 2021)에 따라 안지오텐신-2에 음주 반응을 보이지 않는 마우스를 제외하였다. ICV 주사에 사용되는 모든 약물은 Harvard 장치(Cat# 70-2000)를 사용하여 5㎍/min의 속도로 2㎕의 용량으로 주입되었다.

[0054] 렙틴 감수성 검사

[0055] 이 연구에 사용된 렙틴의 용량과 타임라인은 이전 작업을 기반으로 했다(Lee et al., 2018). ICV 투여 전에 렙틴(1㎍)을 2㎍ 생리 식염수에 용해시켰다. 라이트 페이즈 동안 비히클, OLZ 및 OLZ + MET 투여 5일째에 3V에 렙틴을 주입하였다. c-Fos 면역형광 염색을 위해 ICV 렙틴 주사 후 45분에 마우스를 심장 관류시켰다. 렙틴 섭식 연구를 위해, 렙틴을 밤새 단식시킨 쥐에 주사했다. 렙틴 주입 후 24시간 동안 음식 섭취와 체중 변화를 모니터링했다. 혈장 렙틴 농도는 OLZ 또는 OLZ + MET 투여 5일 후에 렙틴 효소 결합 면역흡착 분석(Invitrogen, #KMC2281)에 의해 측정되었다.

[0056] 통계

[0057] 모든 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차(SEM)로 표시된다. Prism 버전 9.3.0(GraphPad)을 사용하여 통계 분석을 수행했다. 단방향, 양방향 또는 반복 측정 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 그룹 간 통계적으로 유의미한 차이를 감지한 후 사후 최소 유의차 테스트 또는 적절한 경우 양면 스튜던트 t-테스트를 수행했다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$로 정의되었다.

[0058] 결과

[0059] MET는 암컷 마우스에서 OLZ로 유발된 체중 증가 및 고혈당증을 약화시킨다

[0060] OLZ 투여는 인간의 체중 증가와 관련이 있지만, 이 현상은 실험적으로 동물의 종류와 계통, 성별, 음식 및 식이 조건에 따라 다양하다(Cope et al., 2005; Davey et al., 2012; Lord et al., 2017; 자파타 및 오스본, 2020). 45% HFD와 함께 마우스에 OLZ를 투여하는 것은 이 약물 투여 방식이 인간의 것과 매우 유사하기 때문에 널리 사용되는 방법이다(Morgan et al., 2014; Perez-Gomez et al., 2018; Zapata et al., 2020). 이전 보고와 일치하게 우리는 45% HFD와 함께 OLZ 투여가 C57BL/6J 암컷 마우스에서 과식증 유발 체중 증가를 자극함을 관찰했다. 그러나 HFD 자체가 미세아교세포증 및 고혈당증을 유발할 수 있으므로 정상 CD를 먹인 동물에서도 OLZ로 인한 부작용이 관찰되는지 조사하였다.

[0061] OLZ가 체중 증가에 독립적으로 영향을 미칠 수 있는지 여부를 테스트하기 위해 CD 공급 마우스에 OLZ를 투여했다. 수컷 마우스에서 장기간 OLZ 투여는 음식 섭취량과 체중의 변화로 이어지지 않았다). 그러나 암컷 마우스에서는 OLZ 투여 2주 후에 음식 섭취가 증가하였다. 더욱이, 동물의 약 46%('비만' 그룹)는 암컷 마우스 중에서 대조군 또는 '비만' 그룹에 비해 지연된 OLZ 유도 체중 증가를 보였다. "비만" 그룹과 "비만" 그룹 간의 음식 섭취량의 차이는 유의하지 않았지만, "비만" 그룹이 대조군 또는 "비만" 그룹보다 더 많은 음식을 섭취했다. 이것은 "비만" 그룹과 "비만" 그룹 간의 체중 차이를 설명할 수 있다.

[0062] MET는 OLZ의 부작용을 줄이기 위해 널리 처방된다(Baptista et al., 2007; de Silva et al., 2015; de Silva et al., 2016). 동물 모델에서 MET는 OLZ로 인한 체중 증가를 완화하는 것으로 보고되었다(Hu et al., 2014; Li et al., 2018; Guo et al., 2021). 우리는 MET 병용투여가 OLZ를 투여한 암컷 '비만' 마우스의 체중 증가와 '비비만' 그룹과 '비만' 그룹 모두에서 음식 섭취를 유의하게 감소시켰음을 관찰했다. MET가 AIWG에 대한 보호 효과를 가질 수 있다는 점은 주목할 만하며, 이는 체중 감소 효과보다 더 두드러질 수 있다. 수컷 마우스 중 MET 그룹의 체중과 음식 섭취량은 OLZ 단독 그룹과 크게 다르지 않았다.

[0063] 이전 보고에서는 OLZ의 전신 투여가 고혈당증을 유발하는 것으로 나타났다(Ikegami et al., 2013; Castellani et al., 2018; Boyda et al., 2022). 대사 이상이 체중 증가에 선행하는지 여부를 확인하기 위해 암컷 및 수컷 마우스 모두에서 OLZ 또는 OLZ +MET를 5일 동안 투여한 후 포도당 내성 테스트를 수행했다. 5일 OLZ 투여는 암컷 마우스에서만 15분 및 30분 포도당 수준을 상당히 증가시켰다(도 1B,C). OLZ를 투여한 암컷 마우스와 수컷 마우스를 직접 비교한 결과 기준선과 비교한 혈당 증가율은 수컷 마우스보다 암컷 마우스에서 유의하게 높았다. MET는 암컷 마우스에서 OLZ로 유발된 고혈당증을 유의하게 낮추었고 수컷 마우스에서 일부 시점에서 포도당 수준을 완화했다(도 1B,C). 이러한 결과는 MET가 암컷 생쥐에서 과식증 유발 비만과 OLZ로 인한 고혈당증을 모두 완화시킨다는 것을 보여줍니다.

[0064] MET는 시상 하부에서 OLZ에 의해 유도된 미세아교세포증 및 염증을 약화시킵니다

[0065] 우리는 다음으로 OLZ가 암컷 마우스에서만 과식증 관련 비만과 포도당 과민증을 유발하는 메커니즘을 조사했다. 시상하부 염증 및 미세아교세포증은 포도당 불내성 및 인슐린 저항성과 같은 대사 기능 장애와 밀접한 관련이 있다(Valdearcos et al., 2015; Jais and Bruning, 2017). 5일 동안 OLZ 또는 OLZ + MET를 투여한 마우스의 뇌 절편에서 시상하부 미세아교세포증을 분석했다. OLZ는 암컷 및 수컷 시상하부 모두에서 미세아교세포 증식 및 활성화의 상당한 증가를 유도했다(도 2A,B). 그러나 소교 세포 증식은 수컷 마우스보다 암컷 마우스에서 훨씬 더 심각했다(도 2A-D). MET 병용 투여는 암컷 및 수컷 마우스 모두에서 시상하부 미세아교세포증을 감소시켰다(도 2A,D).

[0066] 우리는 또한 중간 기저 시상 하부에서 IL-1β, IL-6 및 TNFα와 같은 전 염증성 사이토카인과 IL-4 및 IL-10과 같은 항 염증성 사이토카인의 발현을 측정했다. OLZ는 암컷 시상하부에서만 전염증성 사이토카인의 발현을 유의하게 증가시켰다(도 3A, B). 이 효과는 MET 공동 투여에 의해 역전되었다(도 3A). 유전자 발현 분석의 결과와 일관되게, 우리의 면역염색 결과는 암컷 마우스에서 OLZ가 시상하부 미세아교세포에서 TNFα 발현을 상향 조절했으며, 이는 MET 병용 투여에 의해 개선되었음을 밝혔다(도 3C). 이러한 결과는 MET가 암컷 시상하부에서 OLZ 유도 미세아교세포 활성화 및 염증을 완화시킨다는 것을 시사한다.

[0067] 중앙 MINO 투여는 OLZ 유발 포도당 불내성을 완화하다.

[0068] OLZ와 MET는 모두 경구 투여되었기 때문에 위에서 언급한 OLZ 유발 현상이 약물의 말초 효과가 아니라 주로 시상하부 변화에 기인하는지 확인하는 것이 필요했다. MINO는 M1 분극화를 억제하여 소교세포 활성화를 방지하는 반합성 테트라사이클린 유도체이다(Tikka et al., 2001; Krady et al., 2005; Kobayashi et al., 2013). 또한, 최근 연구에서는 MINO와 OLZ의 병용 투여가 생쥐에서 대사 부작용을 예방하는 것으로 나타났다(Perez-Gomez et al., 2018; Zapata et al., 2020). OLZ에 의해 유발된 대사 기능 장애가 시상하부 미세아교세포 활성화 때문임을 입증하기 위해, 우리는 OLZ 투여 1시간 전에 MINO를 매일 3V에 투여했다(도 4A). MINO의 중앙 투여는 미세아교세포 활성화 및 확장을 방지했을 뿐만 아니라 OLZ 투여 암컷 마우스에서 시상하부의 미세아교세포에서 TNFα 발현을 감소시켰다(도 4B). 더욱이, 중앙 MINO 투여는 OLZ-유도된 포도당 불내성을 완화시켰고(도 4C), 이는 시상하부 미세아교세포 활성화가 OLZ-유도된 전신 포도당 불내성의 기초가 됨을 나타냅니다.

[0069] MET와 MINO는 OLZ에 의해 유도된 시상하부 렙틴 저항성을 예방하다

[0070] 렙틴은 음식 섭취와 에너지 소비를 조절하는 중요한 지방세포 유래 호르몬이다(Coll et al., 2007). 렙틴의 중심 작용이 포도당 조절 메커니즘의 필수 구성 요소라는 것도 잘 알려져 있다(Morton and Schwartz, 2011). OLZ가 시상하부 염증, 이상혈당증 및 체중 증가를 유발할 수 있음을 확인하여 OLZ로 유발된 시상하부 염증이 시상하부 렙틴 저항성을 유발하는지 여부를 조사했다. 연구에 따르면 IL-1β, IL-6, TNFα와 같은 시상하부의 염증성 사이토카인은 렙틴 신호 전달의 음성 조절자인 PTP1B 및 SOCS3를 상향 조절함으로써 렙틴 반응을 감소시키는 것으로 나타났다(Bjorbak et al., 2000; Zabolotny et al., 2002, Zabolotny 등, 2008, Ito 등, 2012, Cao 등, 2018). 따라서 우리는 먼저 렙틴 감수성을 조사하고 OLZ 또는 OLZ + MET 투여 후 PTP1B 및 SOCS3의 발현을 추가로 평가했다. 이들 분자의 발현 수준은 OLZ 투여에 의해 상당히 증가되었고 암컷 마우스 시상하부에서 MET 병용투여에 의해 정상화되었다(도 5A). 이러한 변화는 수컷 마우스 시상 하부에서 관찰되지 않았다 (보조 도 S5, S6).

[0071] 우리는 다음으로 렙틴에 대한 반응이 OLZ 또는 OLZ + MET 투여에 의해 변경되는지 여부를 조사하기 위해 렙틴 공급 연구를 수행했다(도 5B). 우리의 데이터는 렙틴에 의해 유발된 식욕 부진 효과가 OLZ 투여에 의해 감소되고 이 감소가 MET 공동 투여에 의해 역전됨을 보여주었다(도 5C). 등쪽 시상하부(DMH)의 뉴런은 음식 섭취와 에너지 소비를 조절하는 데 중추적인 역할을 하다(Zhang et al., 2018). 렙틴 투여는 DMH에서 c-Fos + 뉴런의 수를 적어도 2배 증가시킵니다(Rezai-Zadeh et al., 2014). 우리의 데이터는 OLZ 투여가 렙틴에 의해 유도된 DMH 뉴런의 활성화를 손상시켰고, 이 효과가 암컷 마우스 시상하부에서 MET 병용투여에 의해 상당히 역전되었음을 보여주었다(도 5D). 우리는 다음으로 소교세포 활성화가 시상하부에서 OLZ 유도된 렙틴 저항성에 책임이 있는지 여부를 평가했다. 우리의 먹이 연구 데이터는 중앙 MINO 투여가 OLZ 투여 암컷 마우스에서 렙틴 반응을 상당히 회복시켰음을 보여주었다(도 5E). 염증성 사이토카인은 SOCS3 및 PTP1B의 발현에 기여하며, 이는 렙틴 수용체 신호 전달을 차단하여 렙틴 저항성을 유발한다(Zabolotny et al., 2008; Ito et al., 2012; Cao et al., 2018). 5일 동안 OLZ 또는 OLZ + MET를 투여한 후 혈장 렙틴 농도에는 유의한 변화가 없었다. 이러한 데이터는 OLZ에 의해 유발된 렙틴 저항성이 주로 OLZ에 의해 유발된 시상하부 미세아교세포 활성화에서 발생함을 시사한

다.

[0072] 논의

[0073] 본 연구에서는 OLZ가 비만과 대사장애를 유발하는 기전을 조사하였다. 시상하부 미세아교세포증과 염증이 대사장애 발달에 미치는 중요성에도 불구하고 OLZ와 시상하부 미세아교세포증 사이의 관계는 아직 명확하지 않다. 현재 연구에서 우리는 OLZ 투여에 대한 반응에서 성별에 따른 차이를 발견했다. 우리는 대사 장애와 비만의 발달에 중추적인 역할을 하는 OLZ로 유발된 시상하부 미세아교세포증이 수컷 쥐보다 암컷 쥐에서 더 두드러진다는 것을 발견했다. 또한, 본 연구 결과는 OLZ의 대사 부작용을 개선하기 위해 일반적으로 사용되는 약물인 MET도 시상하부 미세아교세포증을 조절함으로써 그 효과를 발휘한다는 것을 보여주었다.

[0074] 우리는 시상하부 염증과 미세아교세포증이 비만, 과식증, 포도당 불내성의 주요 원인이라는 이전 연구에 따라 OLZ 유발 미세아교세포증에 초점을 맞췄다(Valdearcos et al., 2017; Lee et al., 2018). 최근 OLZ에 의해 유도된 비만의 발병기전은 성상세포(중추신경계에 있는 신경교세포의 또 다른 유형)에서 toll-like receptor-4 신호전달에 의해 유도된 시상하부 염증과 관련이 있는 것으로 보고되었다(He et al., 2020). 이 연구에서 성상교세포증은 OLZ를 투여한 쌍영양 그룹에서 관찰되었으며, 이는 OLZ가 시상하부 신경교세포를 직접 자극함을 시사한다(He et al., 2020). 우리 연구와 유사한 이러한 결과는 OLZ로 유도된 대사 부작용의 병인에서 시상하부 염증의 필수적인 역할을 시사한다.

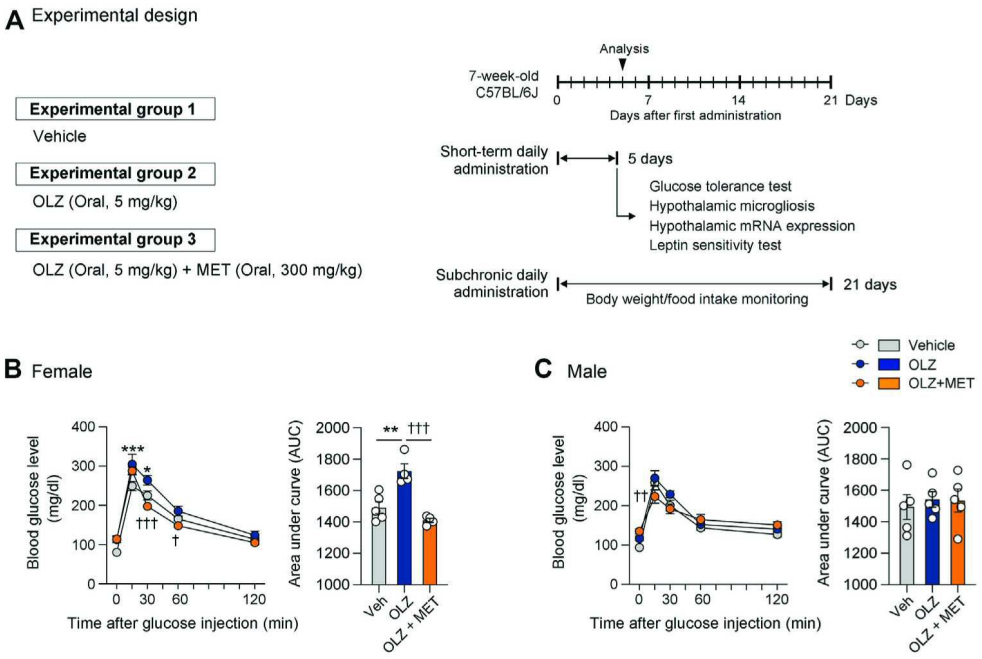
[0075] AP 유발 부작용에 대한 마우스 연구에서 암컷 마우스(C57BL/6J)가 수컷 마우스보다 OLZ 유발 체중 증가 및 대사장애에 더 취약한 것으로 나타났다(Fernø et al., 2011; Lord et al., 2017; Zapata et al., 2021). 이것은 또한 여성 환자가 남성 환자보다 체중 증가와 이상혈당증에 더 취약하다는 것을 보여주는 임상 데이터와 일치하다(Bobes et al., 2003; McEvoy et al., 2005; Iversen et al., 2018). 실험에서 우리는 수컷과 암컷 쥐 사이의 시상하부 미세아교세포 변화를 비교했다. 암컷 쥐는 시상하부 미세아교세포가 상당히 증가한 반면, 수컷 쥐는 훨씬 적은 증가를 보였고, 이는 수컷 쥐가 염증성 사이토카인과 OLZ로 인한 체중 증가의 증가를 나타내지 않는 이유를 설명할 수 있다. 이것은 시상하부 염증이 OLZ에 의해 유발된 대사 부작용에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 우리는 AIWG에서 시상하부 염증의 역할과 의미를 추가로 조사했다. 우리는 AIWG에 일반적으로 사용되는 약물인 MET가 OLZ로 유발된 시상 하부 염증을 개선할 수 있음을 발견했다. 우리는 또한 OLZ가 Socs3 및 Ptp1b 발현의 증가를 통해 시상하부 렙틴 저항성을 유도함을 발견했다. 이들 유전자는 시상하부 염증 및 미세아교세포 활성화와 직접적으로 관련이 있다(Zabolotny et al., 2008; Ito et al., 2012; Cao et al., 2018).

[0076] 중요한 것은 모든 암컷 마우스에서 상당한 시상하부 미세아교세포증 및 고혈당증이 관찰되었다는 것이다. 한 가지 가능한 설명은 시상하부 궁상핵(arcuate nucleus of the hypothalamus; ARH)의 시상하부 염증이 필요하지만 AIWG의 발병에 충분하지 않다는 것이다. HFD에 의해 유발되는 다른 조건은 음식 섭취 증가 또는 비만 발병에 필요할 수 있다(보조 도 S1A, B).

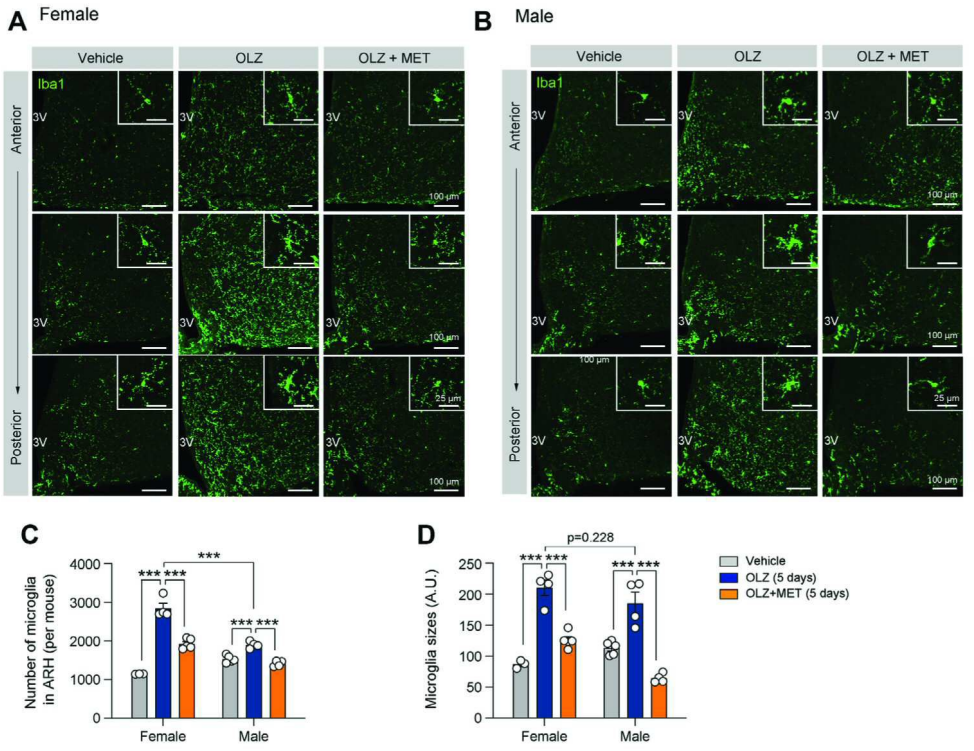
[0077] 최근 연구는 위에서 언급한 측면에 대한 통찰력을 제공했다(Zapata et al., 2021). 그 연구에서 OLZ를 투여한 HFD를 먹인 쥐는 체중 증가의 변화를 보였고 이는 면역 조절 전사 네트워크의 변화로 설명되었다(Zapata et al., 2021). 이러한 데이터를 고려할 때 OLZ에 의한 과식증에는 활성화된 미세아교세포와 다양한 조건에 의한 전사 인자의 변화 사이의 상호 작용이 필요하다고 가정하는 것이 타당할 것이다. 우리의 데이터는 또한 일반적으로 사용되는 2형 당뇨병 및 AIWG 약물인 MET의 작용 메커니즘을 설명하는 데 도움이 되었다. 요약하자면, 우리 연구 결과는 OLZ가 독립적으로 시상하부 미세아교세포 활성화를 유도하고 이 효과가 OLZ로 유발된 체중 증가 및 이상혈당증에 필요하다는 것을 보여주었다(도 6). 우리는 또한 일반적으로 사용되는 AIWG 약물인 MET가 시상하부 미세아교세포 작용을 조절함으로써 그 효과를 발휘함을 보여주었다. OLZ 부작용의 성별 차이와 비만 발달 과정에서 미세아교세포의 역할에 대한 추가 연구가 필요하다. 종합하면, 이러한 데이터는 부작용이 적은 AP 또는 AIWG 및 고혈당증을 효과적으로 예방하는 약물의 개발에 기여할 것이다.

도면

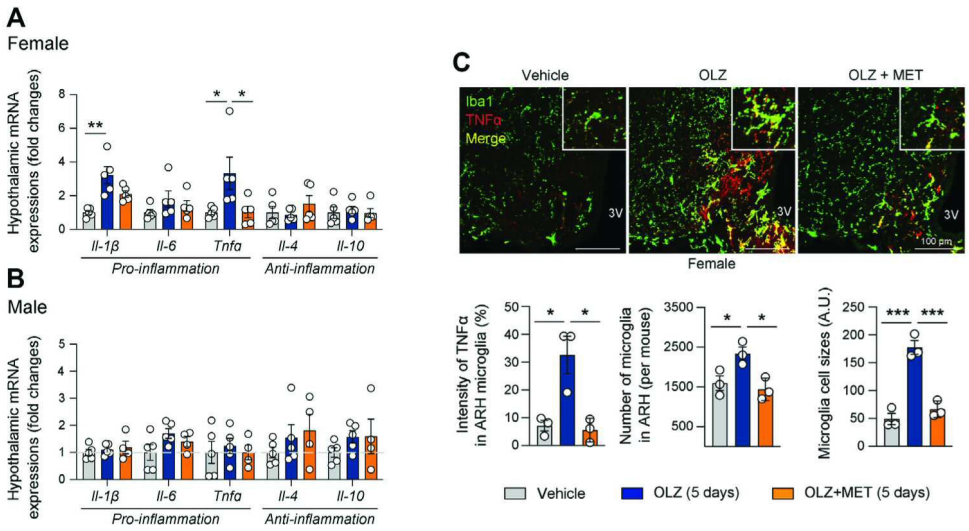
도면1


A Experimental design
Experimental group 1
Vehicle
Experimental group 2
OLZ (Oral, 5 mg/kg)
Experimental group 3
OLZ (Oral, 5 mg/kg) + MET (Oral, 300 mg/kg)
Analysis
7-week-old C57BL/6J
0
7
14
21 Days
Days after first administration
Short-term daily administration
5 days
Glucose tolerance test
Hypothalamic microgliosis
Hypothalamic mRNA expression
Leptin sensitivity test
Subchronic daily administration
21 days
Body weight/food intake monitoring
B Female
C Male
Vehicle
OLZ
OLZ+MET
Blood glucose level (mg/dl)
Time after glucose injection (min)
Area under curve (AUC)
Veh
OLZ
OLZ + MET

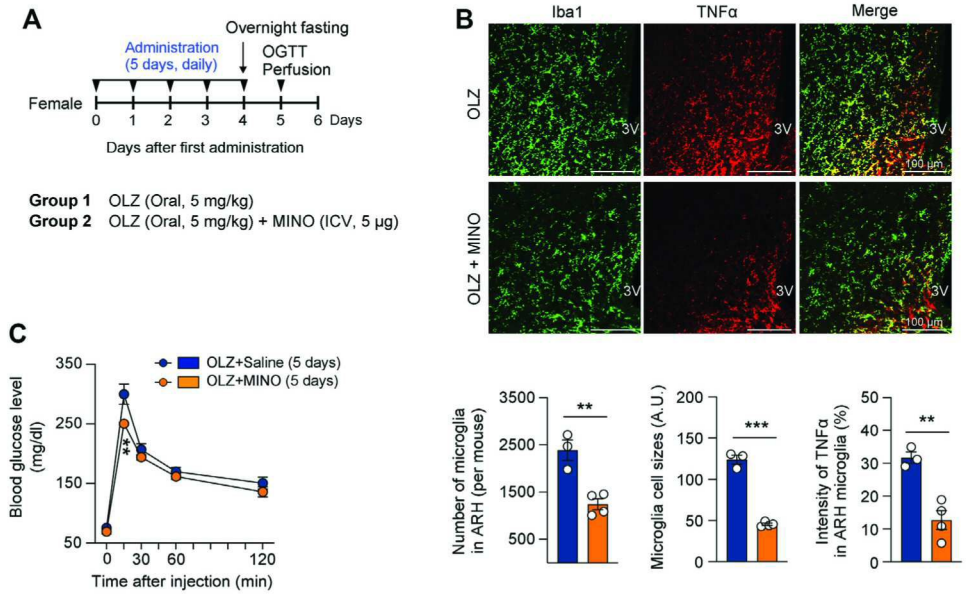
도면2


A Female
B Male
Vehicle
OLZ
OLZ + MET
Iba1
Anterior
Posterior
3V
100 μm
25 μm
C
Number of microglia in ARH (per mouse)
Female
Male
D
p=0.228
Microglia sizes (A.U.)
Vehicle
OLZ (5 days)
OLZ+MET (5 days)

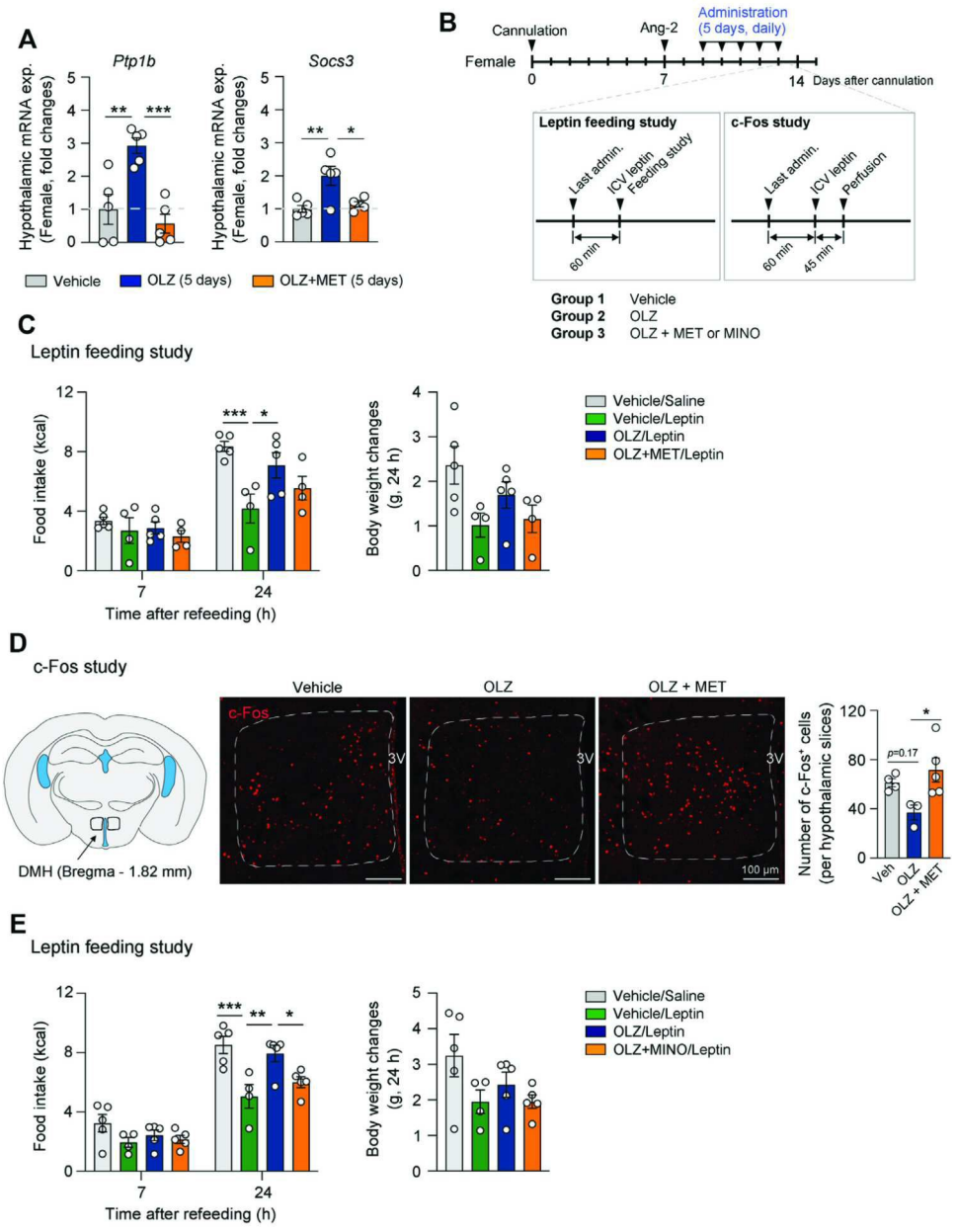
도면3


A
Female
Hypothalamic mRNA expressions (fold changes)
Il-1β
Il-6
Tnfα
Il-4
Il-10
Pro-inflammation
Anti-inflammation
B
Male
C
Vehicle
OLZ
OLZ + MET
Iba1
TNFα
Merge
3V
100 μm
Female
Intensity of TNFα in ARH microglia (%)
Number of microglia in ARH (per mouse)
Microglia cell sizes (A.U.)
Vehicle
OLZ (5 days)
OLZ+MET (5 days)

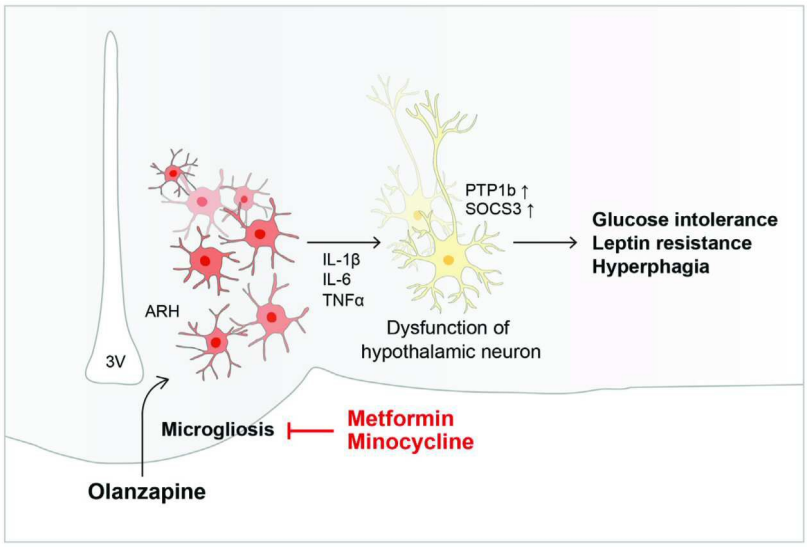
도면4


A
Overnight fasting
Administration
(5 days, daily)
OGTT
Perfusion
Female
0 1 2 3 4 5 6 Days
Days after first administration
Group 1 OLZ (Oral, 5 mg/kg)
Group 2 OLZ (Oral, 5 mg/kg) + MINO (ICV, 5 μg)
B
Iba1
TNFα
Merge
OLZ
OLZ + MINO
3V
100 μm
C
OLZ+Saline (5 days)
OLZ+MINO (5 days)
Blood glucose level (mg/dl)
Time after injection (min)
Number of microglia in ARH (per mouse)
Microglia cell sizes (A.U.)
Intensity of TNFα in ARH microglia (%)

도면5


A
Ptp1b
Socs3
Hypothalamic mRNA exp. (Female, fold changes)
Vehicle
OLZ (5 days)
OLZ+MET (5 days)
B
Cannulation
Ang-2
Administration (5 days, daily)
Female
Days after cannulation
Leptin feeding study
c-Fos study
Last admin.
ICV leptin
Feeding study
Perfusion
60 min
45 min
Group 1 Vehicle
Group 2 OLZ
Group 3 OLZ + MET or MINO
C
Leptin feeding study
Food intake (kcal)
Time after refeeding (h)
Body weight changes (g, 24 h)
Vehicle/Saline
Vehicle/Leptin
OLZ/Leptin
OLZ+MET/Leptin
D
c-Fos study
DMH (Bregma - 1.82 mm)
Vehicle
OLZ
OLZ + MET
c-Fos
3V
100 μm
Number of c-Fos+ cells (per hypothalamic slices)
p=0.17
Veh
OLZ
OLZ + MET
E
Leptin feeding study
Food intake (kcal)
Time after refeeding (h)
Body weight changes (g, 24 h)
Vehicle/Saline
Vehicle/Leptin
OLZ/Leptin
OLZ+MINO/Leptin

도면6


PTP1b ↑
SOCS3 ↑
Glucose intolerance
Leptin resistance
Hyperphagia
IL-1β
IL-6
TNFα
ARH
3V
Dysfunction of
hypothalamic neuron
Microgliosis
Metformin
Minocycline
Olanzapine