



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](#)

생활과학석사학위논문

비타민 D가 고지방식을 섭취한
비만 마우스의 골수유래 수지상세포의
분화 및 성숙에 미치는 영향

**The Effects of Vitamin D on Differentiation and Maturation
of Bone Marrow-derived Dendritic Cells
from High-Fat Diet-induced Obese Mice**

2018 년 2 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

차 경 선

국 문 초 록

비타민 D가 고지방식을 섭취한 비만 마우스의 골수유래 수지상세포의 분화 및 성숙에 미치는 영향

서울대학교 대학원
식품영양학과
차 경 선

비타민 D는 수지상세포의 분화와 성숙을 억제한다고 보고되었으며, 비만은 비타민 D 대사의 조절 이상 및 수지상세포의 기능 부전과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 비타민 D에 의한 수지상세포의 조절 효과가 비만에 의해 어떠한 영향을 받는지는 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 비만 마우스의 골수세포로부터 유도된 수지상세포(골수유래 수지상세포, bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)의 분화와 성숙에 미치는 비타민 D의 효과를 확인하고자 하였다. 5주령 C57BL/6N 마우스를 두 군으로 임의 배정한 후 대조식이 또는 고지방식이 (10% 또는 45% kcal fat, CON 또는 HFD)를 15주 동안 공급하였다. 희생 후 대퇴골과 경골에서 분리한 골수세포를 *in vitro* 상에서 rmGM-CSF (20 ng/mL)의 존재 하에 7일간 수지상세포로 분화시키는 과정 중 최종 농도가 1 nM 또는 10 nM이 되도록 활성형 비타민 D인 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃]를 처리하였다. 대조 배지에는 1,25(OH)₂D₃ 용해 시 사용된 ethanol을 최종 농도 (0.1%)가 동일하도록 추가하였다. 수지상세포의 성숙은 배양 마지막 24시간 동안

LPS (50 ng/mL)를 처리하여 유도되었다. 회수된 세포는 유세포분석을 통해 CD11c, MHC class II, CD80, 및 CD86의 세포 표면 발현을 확인하였고, 수지상세포의 성숙과 관련된 유전자 (*Cd40*, *Cd83*, 및 *Ccr7*)와 사이토카인 및 케모카인 유전자 (*Il10*, *Il12b*, *Ccl5*, 및 *Ccl22*) 발현을 real-time PCR로 측정하였다. 10 nM 농도의 1,25(OH)₂D₃ 조건으로 배양하였을 경우 CON군과 HFD군 모두에서 골수유래 수지상세포로의 분화 (CD11c⁺%)가 억제되었고, 성숙한 수지상세포의 비율 (MHCII^{high}CD11c⁺ 및 CD86^{high}CD11c⁺ cells)이 감소하였다. 한편 LPS로 자극한 골수유래 수지상세포에서 MHC class II 및 CD86의 세포 표면 발현은 CON군에 비하여 HFD군에서 높았다. *Cd40*, *Cd83*, 및 *Ccr7* 유전자 발현 역시 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 억제되었다. 그러나 CON군에서는 10 nM 농도의 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에 성숙을 유도시킨 골수유래 수지상세포의 *Il10* 발현이 104% 증가하였으나, HFD군에서는 이러한 효과가 나타나지 않았다. HFD군의 골수유래 수지상세포에서 성숙한 수지상세포의 비율이 높았음에도 불구하고, LPS로 자극한 골수유래 수지상세포의 *Il12b* mRNA 수준은 CON군에 비해 HFD군에서 낮았다 (vehicle이 처리된 경우 49%, 10 nM 1,25(OH)₂D₃가 처리된 경우 78% 낮음). 결론적으로 1,25(OH)₂D₃는 대조 마우스뿐만 아니라 비만 마우스에서도 골수유래 수지상세포의 분화와 성숙을 억제하였다. 대조 마우스에 비해 비만 마우스에서 성숙한 골수유래 수지상세포의 MHC class II 및 CD86 표면 발현은 높지만 *Il12b* 유전자 발현은 낮다는 결과를 통해 비만으로 인해 수지상세포의 기능 부전이 나타날 수 있음을 확인하였다. 또한 LPS로 성숙을 유도한 골수유래 수지상세포에서 1,25(OH)₂D₃ 처리로 인한 *Il10* 발현 변화가 비만 마우스에서 관찰되지 않은 것은 비만이 수지상세포의 기능 조절에 영향을 미쳤기 때문으로 사료된다.

주요어: 비타민 D, 비만, 골수유래 수지상세포, 성숙, *Il10*

학번: 2015-21710

목 차

국문 초록.....	i
목 차.....	iii
표 목 차.....	v
그림 목 차.....	vi
약어 목록.....	vii
I. 서 론.....	1
II. 문헌 고찰.....	4
1. 수지상세포.....	4
1) 수지상세포의 분화 및 성숙.....	5
2) 수지상세포의 기능.....	6
2. 비타민 D가 수지상세포에 미치는 영향.....	7
3. 비만이 수지상세포에 미치는 영향.....	12
III. 연구 방법.....	14
1. 실험 동물.....	14
2. 실험 식이.....	15
3. 희생 및 시료 수집.....	17
4. 1,25(OH) ₂ D ₃ 용액의 준비.....	18
5. 골수유래 수지상세포의 <i>in vitro</i> 배양.....	19
6. 세포 생존도 측정.....	22
7. 유세포분석.....	23
8. 세포 내 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR.....	24
9. 통계 분석.....	27

IV. 실험 결과	28
1. 체중, 체지방량 변화 및 식이섭취량.....	28
2. 세포 배양 과정의 1,25(OH) ₂ D ₃ 처리가 골수세포의 생존도에 미치는 영향	30
3. 대조 또는 비만 마우스로부터 분리한 골수세포의 배양 중 1,25(OH) ₂ D ₃ 처리가 수지상세포로의 분화에 미치는 영향.....	32
4. 대조 또는 비만 마우스의 골수유래 수지상세포의 배양 중 1,25(OH) ₂ D ₃ 처리가 수지상세포의 성숙과 관련된 표현형에 미치는 영향	34
5. 대조 또는 비만 마우스의 골수유래 수지상세포의 배양 중 1,25(OH) ₂ D ₃ 처리가 성숙한 수지상세포의 기능과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향	38
6. 대조 또는 비만 마우스의 골수유래 수지상세포의 배양 중 1,25(OH) ₂ D ₃ 처리가 사이토카인 및 케모카인 유전자의 발현에 미치는 영향	40
 V. 고찰	 42
 VI. 요약	 48
 참고 문헌	 51
Abstract	56

표 목 차

Table 1. Phenotypic and functional modifications induced by VDR ligands in human myeloid dendritic cells.....	10
Table 2. Composition of the experimental diets.....	16
Table 3. Primer sequences used in real-time PCR.....	26
Table 4. Body weight, weight gain, adipose tissue weight, and dietary intake of mice in the CON and HFD groups	29
Table 5. Effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on the phenotype related to DC maturation in BMDCs from the CON and HFD groups	36

그림 목 차

Figure 1. Vitamin D [1,25(OH)₂D₃] and dendritic cell function during different stages of immune activation	11
Figure 2. The experimental design and cell culture process.....	21
Figure 3. Effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on cell viability of bone marrow cells.....	31
Figure 4. Effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on DC differentiation in bone marrow cells from the CON and HFD groups	33
Figure 5. Inhibitory effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment and enhance effects of HFD feeding on DC maturation in BMDCs	37
Figure 6. Effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on the expression of genes related to the function of mature DCs in BMDCs from the CON and HFD groups.....	39
Figure 7. Effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on the gene expression of cytokines and chemokines in BMDCs from the CON and HFD groups.....	41

약어 목록

1,25(OH)₂D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃
25(OH)D₃, 25-hydroxyvitamin D₃
BMDCs, bone marrow-derived dendritic cells
cDCs, conventional dendritic cells
CON, control diet
DCs, dendritic cells
FACS, fluorescence-activated cell sorting
rmGM-CSF, recombinant murine granulocyte-macrophage
colony-stimulating factor
HFD, high-fat diet
LPS, lipopolysaccharide
MHC, major histocompatibility complex
MoDCs, monocyte-derived dendritic cells
mTOR, mammalian/mechanistic target of rapamycin
PAMPs, pathogen associated molecular patterns
pDCs, plasmacytoid dendritic cells
PRRs, pattern recognition receptors
Th1 cell, T helper 1 cell
TLRs, toll-like receptors
Treg cell, regulatory T cell
VDR, vitamin D receptor

I. 서 론

수지상세포 (dendritic cells, DCs)는 핵심적인 항원제시세포 (antigen presenting cells)이며 내재면역과 적응면역 반응 모두에서 중요한 역할을 한다 (Banchereau and Steinman 1998). 수지상세포는 골수의 혈구전구세포 (hematopoietic progenitor cells)로부터 생성되며 혈액을 통해 대부분의 조직으로 이동하여 존재하다가 병원체와 손상된 세포로부터 항원을 인식하고 활성화된다. 자극을 받은 수지상세포는 주조직 적합성 복합체 (major histocompatibility complex, MHC) class II와 CD40, CD80, CD86과 같은 공동자극분자를 세포 표면에 발현하고, 림프 조직으로 이동하여 미성숙 (naïve) T 세포를 활성화시킨다. 또한 수지상세포는 흉선에서 자기 항원 (self-antigens)에 반응하는 림프구를 없애고, 말초조직에서는 regulatory T (Treg) 세포를 발생시켜 자가면역관용 (self-tolerance)을 유도한다 (Lutz and Schuler 2002; Manicassamy and Pulendran 2011).

비타민 D는 T 세포, B 세포, 단핵구 및 대식세포와 특히 수지상세포를 포함한 면역계 전반에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 (Mora *et al.* 2008; van Etten and Mathieu 2005). 많은 연구들에서 *in vitro* 상의 비타민 D 또는 비타민 D 유사체 처리가 사람의 말초혈액단핵구로부터 유도되는 수지상세포 (단핵구유래 수지상세포, monocyte-derived dendritic cells, MoDCs) 또는 마우스의 골수세포로부터 유도되는 수지상세포 (골수유래 수지상세포, bone marrow derived-dendritic cells, BMDCs)의 분화와 성숙을 억제하는 것이 관찰되었다 (Brosbol-Ravnborg *et al.* 2013; Canning *et al.* 2001; Griffin *et al.* 2000; van der Does *et al.* 2014). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃, 생리활성형 비타민 D]를 처리하여 분화와 성숙을 유도한 골수유래 수지상세포에서 표면의 MHC class II 및 CD86, CD80 발현이 억제되었고 대조 세포에 비하여 *Il6* 유전자 발현과 및 *IL-12*의 생성이 낮았다 (Ferreira *et al.* 2011). 이와 유사하게 단핵구유래 수지상세포에서도 1,25(OH)₂D₃의 처리로 인해 MHC class II 및 CD80의

세포 표면 발현이 감소되는 것을 관찰하였다 (Canning *et al.* 2001). 즉, 비타민 D는 수지상세포의 항원 제시 능력, 세포 표면 마커의 발현, 사이토카인 생성 등을 조절하며, 이로 인해 naïve T 세포가 effector T 세포보다 Treg 세포로 분화되도록 유도한다 (Lutz and Schuler 2002). 이와 같이 semi-mature 상태의 수지상세포는 면역관용 수지상세포라 하며, 자가면역반응을 예방하는데 중요한 역할을 한다 (Mahnke *et al.* 2002).

비만은 면역계의 이상과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 수지상세포의 분포 및 기능 변화를 초래하는 것으로 보고되었다 (de Heredia *et al.* 2012; Samartín and Chandra 2001). 비장면역세포 중 수지상세포 (MHCII⁺CD11c⁺ cells)의 비율은 정상 마우스보다 에너지 대사와 관련된 아디포카인인 렙틴을 유전적으로 결핍시킨 비만 마우스에서 높은 반면, *in vitro* 상에서 allogenic T 세포를 자극하여 활성화시키는 골수유래 수지상세포의 능력은 유전자 변형 비만 마우스에서 낮은 것으로 나타났다 (Macia *et al.* 2006). 또한 고지방식으로 유도된 비만 마우스에서도 비장면역세포 중 수지상세포의 비율은 높았으나 T 세포의 증식을 유도하는 수지상세포의 기능은 오히려 낮았다 (James *et al.* 2012). 비록 비만에 의한 수지상세포의 비율 변화와 기능 저하의 메커니즘이 정확히 밝혀지지 않았으나, 일부 연구자들은 비만에 의한 렙틴 불균형과 혈구전구세포의 기능 변화를 그 원인으로 제시하였다 (Macia *et al.* 2006; Singer *et al.* 2014).

비만은 체내 비타민 D 결핍 등의 비타민 D 대사 변화와도 관련이 있는 것으로 보인다 (Foss 2009). 여러 임상연구에 따르면 비만한 사람에서 혈중 25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃, 활성 전의 비타민 D 대사체]의 수준이 낮은 경우가 빈번하게 관찰되었다 (Lagunova *et al.* 2009; Wortsman *et al.* 2000). 비만으로 인한 비타민 D의 결핍과 관련된 메커니즘으로는 에너지 대사의 변화, 활동량 감소에 의한 햇빛 노출 감소, 지방 조직 내의 비타민 D 축적 등이 제시되었다 (Vanlint 2013). 게다가 비만과 비타민 D 결핍, 자가면역반응 사이의 관계가 보고됨에

따라 (Versini *et al.* 2014), 비타민 D에 의한 수지상세포의 기능 조절이 비만에 의해 영향을 받는지를 확인할 필요가 있다.

Gomaa and El-Aziz (2017)는 대조 랫드에 비해 고지방식으로 유도된 비만 랫드에서 혈청 C-reactive protein 수준 및 비장 조직 내 CD86 발현 등이 높은 것을 관찰하였고, 경구를 통한 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 보충을 통해 이러한 변화가 일부 회복되었다고 보고하였다. 그러나 해당 연구는 수지상세포의 기능 조절에 초점을 두고 비타민 D의 효과를 확인하지 않았으며, 비타민 D와 비만이 수지상세포의 기능에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 대조 마우스와 고지방식으로 비만을 유도한 마우스의 골수세포로부터 수지상세포를 분화시키는 과정에서 *in vitro*상의 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리가 골수유래 수지상세포의 표현형 및 기능에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 이를 위해 수지상세포의 분화 및 성숙과 관련된 세포 표면 마커의 발현 및 수지상세포의 기능과 관련된 유전자의 발현을 측정하였다.

II. 문헌 고찰

1. 수지상세포

수지상세포는 내재면역을 일으키고 적응면역을 유도하는 골수 유래 면역세포이다. 1868년에 피부에서 수지상세포의 일종인 랑게르한스 세포(Langerhans cells)가 처음 확인된 이후 (Banchereau and Steinman 1998), 여러 연구를 통해 수지상세포의 특징과 기능이 밝혀져 왔다. 비록 수지상세포는 전체 림프구 중 1 ~ 2% 내외의 낮은 분포를 보이지만 (Steinman and Cohn 1973), T 세포와 B 세포를 효율적으로 활성화시키기 때문에 가장 중요한 항원제시세포로서 기능한다 (Mellman and Steinman 2001). 수지상세포는 골수에서 생성된 이후에 전신을 순환하며 바이러스 및 박테리아, 손상된 세포 등에서 유래된 항원 또는 사이토카인 등의 신호를 인식하고 활성화된다. 수지상세포는 림프구를 활성화시키는 것 외에도 자기 항원에 대한 면역 관용 (self-tolerance)를 유도하는 중요한 역할을 한다 (Manicassamy and Pulendran 2011).

다양한 아형이 존재하지만 주요한 두 가지 기능에 따라 수지상세포를 크게 conventional dendritic cells (cDCs)와 plasmacytoid dendritic cells (pDCs)로 구분할 수 있다. cDCs는 모든 조직에 존재하며 항원을 포식하고 T 세포 반응을 일으키는 항원제시세포이며, 일반적으로 언급되는 수지상세포이다. 반면 pDCs는 cDCs와 달리 주로 바이러스를 인식하고 1형 인터페론을 생성하는 수지상세포이다. cDCs는 다시 조직 내 위치에 따라 다양한 종류로 구분될 수 있다. 점막, 흉선, 간, 소장, 폐 등 장기에 따라 수지상세포를 분류하며 특히 피부와 점막에 존재하는 수지상세포의 아형은 랑게르한스 세포라 한다. 이 외에도 수지상세포 표면에 발현하는 마커에 따라 다양한 아형으로 구분된다 (Wu and Liu 2007).

1) 수지상세포의 분화 및 성숙

골수 내의 혈구전구세포로부터 유래된 수지상세포는 혈액과 림프 조직을 통해 전신을 순환하며 미성숙한 수지상세포로 존재한다. 미성숙한 수지상세포는 항원 등의 인식을 통해 활성화되고 성숙한 수지상세포로 변한다 (Murphy *et al.* 2008).

미성숙 수지상세포 (immature dendritic cells)

미성숙한 수지상세포는 세포 내 이입과 식균작용 능력이 커서 주로 항원을 포획하는 기능을 수행하며, 표면의 MHC class II 및 공동자극분자 발현은 낮다. 미성숙한 수지상세포는 다양한 케모카인 수용체 (CCR1, CCR5, CCR6 등)를 발현하고 있으며, 미생물에 의한 침입이나 조직 손상에 의해 생성된 케모카인 등에 반응하여 조직을 이동한다. 그리고 toll-like receptors (TLRs) 등과 같은 패턴 인지 수용체 (pattern recognition receptors, PRRs)를 통해 병원체 관련 분자 패턴 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs)을 인식하거나 손상된 조직에서 생성된 염증 물질을 인식하고 활성화된다 (Sato and Fujita 2007).

성숙 수지상세포 (mature dendritic cells)

항원 또는 염증 물질을 인식하여 활성화된 수지상세포는 다량의 염증성 사이토카인을 분비하며 성숙한 표현형을 띄게 된다 (Murphy *et al.* 2008). 이때 DEC205 같은, 항원을 포획하는 수용체들의 발현은 감소하고 MHC class II 및 공동자극분자인 CD40, CD80, CD86의 발현이 크게 증가한다. 또한 기존의 케모카인 수용체 발현이 감소하는 대신 CCR7 발현이 증가한다. 즉, 활성화된 수지상세포는 CCR7을 이용하여 림프관을 따라 림프절로 이동하면서 성숙한 표현형으로 변화하고, 림프 조직 내의 T 세포 중 수지상세포가 제시하는 항원에 대해 특이적으로 반응하는 T 세포만을 활성화시켜 effector T 세포로 분화시킨다 (Sato and Fujita 2007).

2) 수지상세포의 기능

항원제시세포: 내재면역 및 적응면역의 연결

수지상세포는 면역감시자로서 항원을 포획한 후 면역반응을 일으키고 naïve 또는 memory T 세포 및 B 세포의 활성을 유도한다. B cell receptor를 통해 직접 항원을 인식할 수 있는 B 세포와 달리 T 세포는 항원제시세포를 통해 가공되어 제시되는 항원만을 인식할 수 있기 때문에 수지상세포의 역할이 매우 중요하다 (Murphy *et al.* 2008). 수지상세포는 T 세포의 T cell receptor에 항원과 MHC 분자 복합체를 제시한다. 바이러스 등의 세포 내 항원은 MHC class I를 통해 제시되어 cytotoxic T 세포를, 박테리아 등의 세포 외 항원은 MHC class II를 통해 제시되어 helper T 세포를 자극한다 (Banchereau and Steinman 1998).

면역관용 (immune tolerance)

수지상세포는 흉선에서 자기 항원을 제시하고 이에 대한 반응성이 높은 T 세포를 제거하는데 관여한다 (central tolerance). 또한 말초 조직에서도 수지상세포에 의해 Treg 세포가 유도되면서 면역관용이 발생한다 (peripheral tolerance). 이러한 수지상세포는 세포 외부에 존재하는 자기 항원 또는 사멸된 자기 세포의 파편 등을 포획하고 가공하여 자기 항원과 MHC 복합체를 제시하지만 T 세포의 활성화에 필요한 공동자극분자는 발현하지 못한다. 따라서 자기 항원에 대한 반응성이 있는 T 세포는 활성화되지 못한 채 무반응성 상태 (anergy)가 되어 면역관용이 유도된다 (Banchereau and Steinman 1998).

2. 비타민 D가 수지상세포에 미치는 영향

비타민 D는 스테로이드 비타민으로, 그 활성형인 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는 핵 내의 비타민 D 수용체 (vitamin D receptor, VDR)와 결합하여 표적 유전자의 전사과정을 조절한다. VDR이 면역세포를 포함한 다양한 세포에서 발현되는 것으로 밝혀지면서, 전통적으로 알려진 비타민 D의 칼슘 및 골대사 조절 작용 외에 면역세포의 기능 조절에 대해서도 연구되고 있다 (DeLuca 2004). 비타민 D는 내재면역과 적응면역 모두에 영향을 미치며, 각 면역세포마다 다른 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 비타민 D는 단핵구와 대식세포의 활성을 유도하여 내재면역을 강화시키는 반면에, 수지상세포의 성숙은 억제하고 IL-10 생성을 촉진시킴으로써 적응면역 반응에 영향을 미친다. 또한 비타민 D는 naïve T 세포가 T helper 1 (Th1) 세포로 분화되는 것을 저해하고 대신 Treg 세포로 분화하도록 유도하며, B 세포가 plasma 세포로 분화되는 것을 억제함으로써 적응면역 반응을 조절한다. 활성화된 T 세포만이 VDR을 발현하는 것과 달리, 단핵구 및 대식세포와 수지상세포는 지속적으로 VDR을 발현하는 것으로 알려져 있다 (Mora *et al.* 2008).

비타민 D에 의한 수지상세포의 분화 및 성숙 억제 효과는 많은 *in vitro* 선행연구들에서 일관성 있게 보고되었다 (Ferreira *et al.* 2011; Penna *et al.* 2007; van Etten *et al.* 2004). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 처리한 경우 골수유래 수지상세포 및 단핵구유래 수지상세포에서 MHC 분자 및 공동자극분자들의 표면 발현은 억제되며, 림프 조직으로의 이동에 필요한 CCR7의 발현 또한 감소된다고 알려져 있다 (Adorini *et al.* 2004). 이 외에도 수지상세포의 항원 포획 등 다양한 기능이 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에 의해 조절되며, IL-12 생성은 저해되고 IL-10의 생성은 촉진되어 면역관용성 수지상세포가 유도된다는 것이 관찰되었다 (van Etten and Mathieu 2005). VDR에 의해 사람의 수지상세포에서 표현형과 기능 등이 어떻게 조절되는지 **Table 1**에 제시하였다.

유전적으로 *ApoE*를 결핍시킨 마우스에 경구로 1,25(OH)₂D₃를 투여하였을 때, 림프 조직 내 수지상세포 비율이 감소하고 Treg 세포가 유도될 뿐만 아니라 죽상동맥경화 병변이 감소했다는 연구가 있으나 (Takeda *et al.* 2010), 이 외에 비타민 D를 경구로 혹은 식이를 통해 보충하였을 때 *in vivo* 상에서 발생하는 수지상세포의 기능 조절에 대한 연구는 많지 않은 실정이다.

한편, 대식세포와 수지상세포 등의 면역세포는 비타민 D의 활성화에 필요한 두 단계의 효소인 25-hydroxylase (Cyp27a1) 및 1-hydroxylase (Cyp27b1)를 발현하며 (Bscheider and Butcher 2016), 특히 수지상세포에서 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의한 TLR 신호에 의해 1-hydroxylase의 발현이 더욱 증가되는 것으로 알려져 있다 (Enioutina *et al.* 2008). Kundu *et al.* (2014)은 수지상세포가 비타민 D를 활성화시키는 수준이 대식세포의 경우에 비해 낮지만 대식세포에서 생성한 1,25(OH)₂D₃ 농도에서도 수지상세포의 기능이 조절된다고 보고하였으며, 주변 면역세포에 의한 비타민 D의 paracrine 활성을 통해 수지상세포의 기능이 조절될 가능성을 제시하였다. 이와 같은 수지상세포의 비타민 D 활성화 기능을 포함하여 면역학적 활성 단계에 따라 비타민 D와 수지상세포 기능 사이의 관계를 **Figure 1**에 나타내었다.

VDR 유전자를 결핍시킨 마우스를 이용한 선행연구들에서 골수유래 수지상세포에서의 MHC class II와 CD40, CD80, CD86과 같은 공동자극분자의 발현, IL-12p40 생성, T 세포 활성 유도 능력은 VDR의 존재 여부와 관계가 없었다고 보고되었다 (Griffin *et al.* 2001; Vanherwegen *et al.* 2016). 그럼에도 불구하고 비타민 D 유사체를 처리하였을 때 VDR 결함 마우스의 경우와 달리 정상 마우스의 골수유래 수지상세포에서만 CD80 및 CD86의 median fluorescence intensity가 감소되었다 (Griffin *et al.* 2001). 그러나 비만이 아닌 당뇨 마우스 (non-obese diabetic mouse) 모델에서 VDR이 결핍된 경우에는 VDR을 발현하는 경우보다 흉선과 림프절 내 수지상세포에서 CD86 발현이 낮았고, *in vitro* 상에서 유도된

골수유래 수지상세포를 분석하였을 때는 MHC class II 및 CD86 발현이 VDR 결핍 마우스의 경우에서 높다는 반대의 연구 결과도 보고되었다 (Gysemans *et al.* 2008). 이와 같이 일관되지 않은 결과로 인해 VDR의 결핍이 수지상세포에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하지만, 비타민 D가 VDR을 통하여 수지상세포의 분화, 성숙 및 기능을 조절한다는 것을 알 수 있다.

Table 1. Phenotypic and functional modifications induced by VDR ligands in human myeloid dendritic cells (Adorini *et al.* 2004)

Phenotype / function	Effect
Maturation marker expression	
CD83	Decreased
DC-LAMP	Decreased
Antigen uptake	
Mannose receptor expression	Increased
Costimulatory molecule expression	
CD40	Decreased
CD80	Decreased
CD86	Decreased
Inhibitory molecule expression	
ILT3	Increased
ILT4	Unmodified
B7-H1	Unmodified
Cytokine production	
IL-10	Increased
IL-12	Decreased
Chemokine production	
CCL2	Increased
CCL17	Decreased
CCL18	Increased
CCL20	Decreased
CCL22	Increased
Chemokine receptor expression	
CCR7	Decreased
Apoptosis	
Maturation-induced	Increased
T cell activation	
Response to alloantigens	Decreased

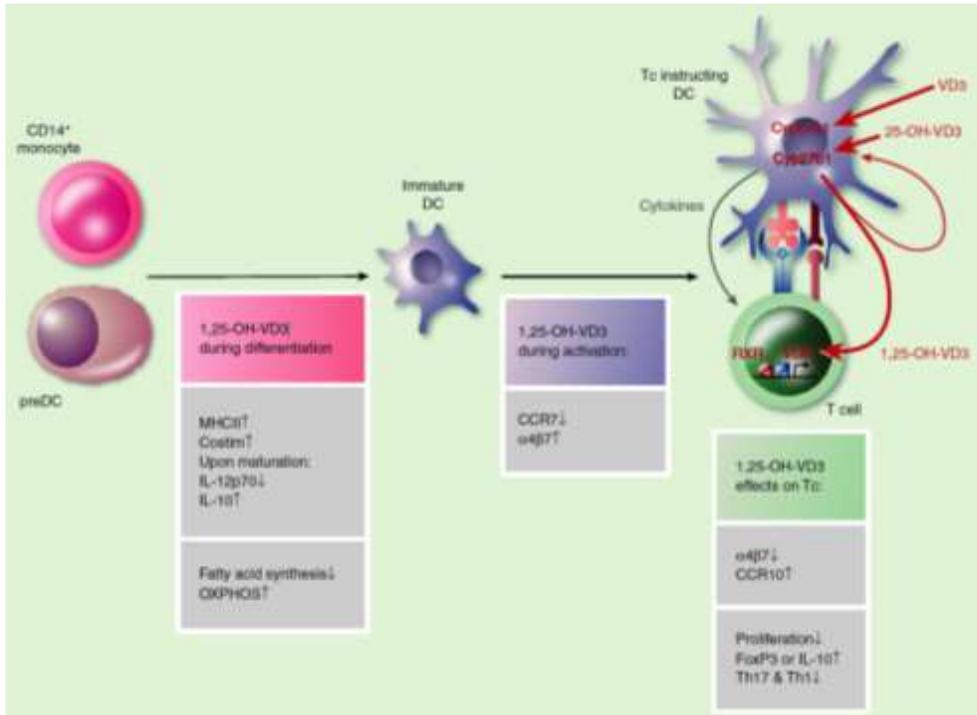


Figure 1. Vitamin D [1,25(OH)₂D₃] and dendritic cell function during different stages of immune activation (Bscheider and Butcher 2016) ¹

¹ Cyp27a1, 25-hydroxylase; Cyp27b1, 1-hydroxylase; OXPHOS, oxidative phosphorylation; preDC, DC precursor; RXR, retinoid X receptor; Th, T helper cell; VDR, vitamin D receptor.

3. 비만이 수지상세포에 미치는 영향

비만은 체지방이 과도하게 축적된 상태로 정의되며, 당뇨병 등과 같은 대사질환의 발병 및 건강 상태의 변화와 더불어 면역기능 부전과도 관련이 있다 (Samartín and Chandra 2001). 비만한 경우 정도의 염증 상태가 만성적으로 존재하며, 과다한 체지방은 면역력 저하와 관련이 있기 때문에 비만에 의해 바이러스 등에 대한 감염 위험이 증가하는 것으로 알려져 있다 (Milner and Beck 2012). 이러한 면역기능 이상 중에서 비만에 의한 수지상세포의 기능 변화는 실험동물과 사람 모두에서 확인된 바 있다 (O'Shea *et al.* 2013; Smith *et al.* 2009).

렙틴 결핍 마우스를 이용한 연구에 따르면 정상 마우스에 비해 렙틴 결핍 마우스에서 비장 내 수지상세포의 비율과 피부의 랑게르한스 세포의 수는 증가한 반면, 골수유래 수지상세포를 이용한 allogenic T 세포 반응이나 랑게르한스 세포의 이동 등 기능적인 측면은 저하된 것으로 관찰되었다. 또한 랑게르한스 세포의 이동 능력이 렙틴 투여에 의해 회복됨에 따라 렙틴 불균형이 수지상세포의 기능 저하의 원인으로 제시되었다 (Macia *et al.* 2006). 또한 고지방식으로 유도한 비만 마우스를 이용해 수지상세포의 기능을 탐구한 연구들에서도 대조 마우스에 비해 비만 마우스에서 비장 내 수지상세포 비율이 높았으며, 골수유래 수지상세포로의 분화는 증가하였으나 T 세포 증식을 유도하는 능력은 저하되었다고 보고하였다 (James *et al.* 2012; Singer *et al.* 2014). 이와 같이 비만에 의해 나타나는 면역기능 변화는 체내 렙틴 증가 및 아디포넥틴 감소, 혈중 지방산 등 지질 수치가 상승하여 TLRs이 과다 활성화되는 지방독성 (lipotoxicity) 현상 등으로 설명되고 있다. 또한 영양소 과다 및 지방세포 팽창에 의한 소포체의 과다 스트레스나 과다 증식한 지방 조직에 의한 저산소증 (hypoxia)도 그 원인으로 제시되었다 (de Heredia *et al.* 2012).

비만은 비타민 D 대사의 조절 결함과도 관련이 있는 것으로 보인다.

비타민 D 결핍이 비만의 원인과 관련성이 큰 것으로 연구되었으며, 여러 임상연구 결과에 따르면 비만한 사람에서 혈청 25(OH)D₃ 및 1,25(OH)₂D₃ 농도가 낮은 경우가 더 많이 관찰되었다 (Foss 2009; Lagunova *et al.* 2009; Wortsman *et al.* 2000). 그러나 매일 일정한 식사요법을 유지시킨 경우 비만하지 않은 사람에 비해 비만한 피험자의 혈청 25(OH)D₃는 낮은 반면, 1,25(OH)₂D₃ 수준은 더 높았다는 반대되는 결과를 제시한 연구도 존재한다 (Bell *et al.* 1985). 이처럼 비만에 의한 비타민 D 대사 변화는 체내 비타민 D 수준에 영향을 미치며, 이러한 간접적 경로를 통해 비만이 수지상세포의 기능에 변화를 야기할 가능성이 존재한다.

Ⅲ. 연구 방법

1. 실험 동물

5주령의 수컷 마우스 (C57BL/6N)를 (주)중앙 실험 동물 (Seoul, Korea)에서 구입하여 서울대학교 수의과대학 동물사육장 specific pathogen free (SPF) room에서 사육하였다. 사육 환경은 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 명암 12시간 주기 조건으로 일정하게 유지하였다. 실험 동물은 대조식을 이용하여 4일 간의 적응 기간을 가진 후, 군당 평균 체중이 유사하도록 10마리씩 두 군 (대조식이군: control diet, CON; 고지방식이군: high-fat diet, HFD)으로 임의 배정하였다. 실험 동물은 총 15주 동안 사육하였고 식이 섭취량은 주 4회, 체중은 주 1회 측정하였다.

실험 동물의 구입 및 사육, 희생의 전 과정은 서울대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee of Seoul National University)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다 (승인번호: SNU-170404-10).

2. 실험 식이

실험 식이는 지방 급원으로부터의 열량이 전체 열량의 10%인 대조식이와 45%인 고지방식이 두 가지로 제공되었다. 두 식이는 모두 Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ, USA)에서 제조되었으며 대조식은 #D12450B 제품을, 고지방식으로는 #D12451 제품을 이용하였다. 실험 식이의 조성은 **Table 2**에 제시하였다. 식이는 실험 동물에게 제공되기 전까지 4°C에서 보관하였고, 실험 식이와 멸균된 식수를 자유급여 (*ad libitum*)로 제공하였다.

Table 2. Composition of the experimental diets

	Control diet (g) (10% kcal Fat)	High fat diet (g) (45% kcal Fat)
Casein, 30 Mesh	200	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	315	72.8
Maltodextrin 10	35	100
Sucrose	350	172.8
Cellulose, BW200	50	50
Soybean Oil	25	25
Lard	20	177.5
Mineral Mix ¹	10	10
DiCalcium Phosphate	13	13
Calcium Carbonate	5.5	5.5
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	16.5
Vitamin Mix ²	10	10
Choline Bitartrate	2	2
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0
FD&C Red Dye #40	0	0.05
Total	1055.05	858.15
kcal/g diet	3.85	4.73

Resource: Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA

¹ 10 g of Mineral Mix (Research Diets, Inc., #S10026) provides 1.0 g of Na, 1.6 g of Cl, 0.5 g of Mg, 0.33 g of S, 59 mg of Mn, 37 mg of Fe, 29 mg of Zn, 6.0 mg of Cu, 2.0 mg of Cr, 1.6 mg of Mo, 0.16 mg of Se, 0.9 mg of Fl, 0.2 mg of I, and 3.99 g of sucrose.

² 10 g of Vitamin Mix (Research Diets, Inc., #V10001) provides 4000 IU of vitamin A, 1000 IU of vitamin D₃, 50 IU of vitamin E, 0.5 mg of menadione, 0.2 mg of biotin, 10 µg of vitamin B₁₂, 2 mg of folic acid, 30 mg of niacin, 16 mg of pantothenic acid, 7 mg of vitamin B₆, 6 mg of vitamin B₂, 6 mg of vitamin B₁, and 9.78 g of sucrose.

3. 희생 및 시료 수집

15주의 사육 기간이 완료된 후 모든 실험 동물을 12시간 동안 금식시켰고, CO₂ 과다 흡입 방법을 이용하여 안락사 시켰다. 희생 직후 백색 지방 (신주위지방, 후복강지방, 부고환지방 및 피하지방)을 적출한 뒤 무게를 측정하고 -80°C에서 보관하였다. 또한 대퇴골과 경골이 손상되지 않도록 주의하여 적출한 뒤 골수세포 분리 전까지 FBS (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)가 2% 함유된 complete RPMI 배지 (2% complete RPMI)에 보관하였다. Complete RPMI 배지는 RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, MD, USA)에 2 mM 농도의 L-glutamine (GibcoBRL), 100,000 U/L 농도의 penicillin (GibcoBRL), 100 mg/L 농도의 streptomycin (GibcoBRL), 50 μM 농도의 β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 조성이 되도록 각 성분을 추가하여 제조되었다.

4. 1,25(OH)₂D₃ 용액의 준비

10 μM 농도의 stock solution을 제조하기 위해서 1,25(OH)₂D₃ (Sigma Aldrich)를 0.22 μm 필터로 여과한 100% ethanol에 용해시켰다. 1,25(OH)₂D₃ stock solution은 1회 사용 분량으로 소분한 뒤 차광하여 -20°C에 보관하였다. 실험 직전에 1,25(OH)₂D₃ solution을 complete RPMI 배지로 희석하여 세포 배양에 필요한 농도로 준비한 뒤 사용하였다.

5. 골수유래 수지상세포의 *in vitro* 배양

수지상세포는 마우스의 골수세포로부터 유도되었다. 먼저 대퇴골과 경골을 70% ethanol에 5분간 담가 소독한 뒤 2% complete RPMI 배지로 헹구어 준비하였다. 뼈의 양 끝을 가위로 자른 뒤 26 gauge needle을 연결한 주사기를 이용하여 뼈 내부를 2% complete RPMI 배지로 씻어내었다. 분리된 골수는 강하게 pipetting하여 최대한 풀어준 다음 1200 rpm, 상온 조건으로 8분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 ACK buffer (GibcoBRL)를 분주하고 pipetting한 다음 2분 동안 차갑게 두어 적혈구를 용해시켰다. 이후 2% complete RPMI 배지를 추가 분주하여 세포가 손상되는 것을 최소화하였고, 세포 현탁액을 70 μm nylon cell strainer로 통과시켜 단일 세포로 분리시켰다. 분리된 골수세포는 2% complete RPMI 배지로 washing하고 일부를 trypan blue로 염색한 뒤 혈구계수기 (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 counting하였다.

골수세포는 10% FBS 및 20 ng/mL 농도의 recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rmGM-CSF) (Peprotech, Princeton, NJ, USA)가 되도록 각 성분을 추가한 complete RPMI 배지 2 mL에 1×10^6 cells/mL 농도로 현탁된 후 6-well plate에 배양되었다. 이때 비타민 D로 처리할 세포에는 희석한 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 용액을 1 nM 또는 10 nM 농도가 되도록 추가한 배지를 사용하였다. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 용해 시 용매로 사용된 ethanol을 0.1% 농도로 추가한 배지는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리 배지에 대한 대조 배지 (vehicle 배지)로 사용되었다. 세포는 37°C, 5% CO_2 농도가 유지되는 습윤한 조건에서 7일 동안 배양되었다.

배양 기간 중 배양 3일과 5일차에 배지를 교체하였다. 이때 배양 중인 세포가 손실되지 않도록 조심스럽게 배양액 1 mL를 제거한 후 10% FBS, 20 ng/mL rmGM-CSF 및 배양 조건에 맞는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 포함한 complete RPMI 배지를 3 mL 추가하였다. 배양 6일차에 TLR4의 리간드인 LPS (50 ng/mL, Sigma Aldrich)를 배지에 추가하여 배양 중인 세포를

자극하거나 동량의 배지를 추가하였다. 배양 7일에 배양액을 이용하여 비-부착세포와 약하게 부착된 세포를 회수하였고, 이후의 실험을 통해 골수유래 수지상세포를 분석하였다. 골수유래 수지상세포의 배양 과정은 **Figure 2**에 나타내었다.

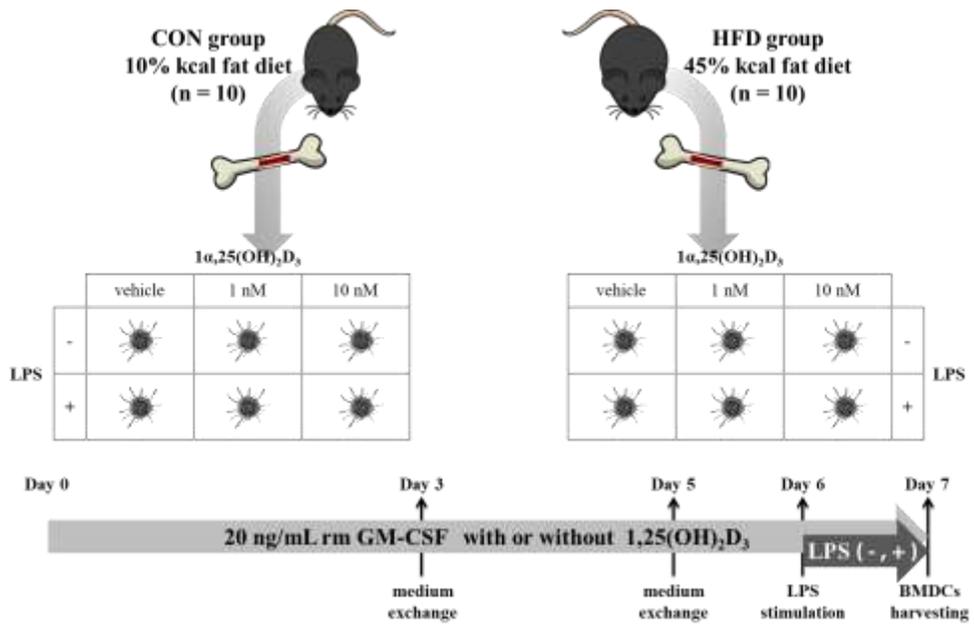


Figure 2. The experimental design and cell culture process

6. 세포 생존도 측정

골수세포를 flat-bottom 96-well plate에 well 당 5×10^4 cells로 분주한 뒤, FBS (10%)와 rmGM-CSF (20 ng/mL) 를 포함하는 vehicle 배지 또는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 추가 배지 (1 nM 또는 10 nM)로 처리하여 배양하였다. 72시간 배양 후 배지를 모두 제거한 뒤, 5 mg/mL 농도의 MTT (3-(2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 용액 10 μL 와 10% FBS를 포함하는 complete RPMI 배지 100 μL 를 추가하여 4시간 더 배양하였다. 원심 분리 및 배지 제거 후 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich)를 50 μL 씩 분주하여 formazan crystals을 용해시키고, microplate spectrophotometer (SpectraMax 190, Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 광학 밀도 (optical density)를 측정하였다.

7. 유세포분석

골수유래 수지상세포의 표현형을 확인하기 위해서 7일 동안 배양한 세포를 fluorescence-activated cell sorting (FACS) 타입인 FACSCalibur II (BD Biosciences, SA, USA) 장비로 분석하였다. 샘플 당 5×10^5 cells의 세포를 cluster tube에 분주한 뒤 1500 rpm, 5 min, 4°C 조건으로 원심 분리하여 배지를 제거하였다. 세포 pellet을 FACS staining buffer (1% FBS 및 0.09% sodium azide가 포함된 PBS) 100 μ L로 재현탁한 후 BD PharMingen (San Diego, CA, USA)에서 구입한 항체를 1:100의 비율로 분주하여 잘 혼합하였고 차광한 상태로 4°C에서 30분 동안 incubation하였다. 실험에 사용된 항체는 다음과 같다: FITC-conjugated anti-mouse I-A/I-E (MHC class II), PE-conjugated anti-mouse CD11c, PerCP-CyTM5.5 anti-mouse CD80, 및 APC-conjugated anti-mouse CD86.

30분 간의 항체 염색이 끝난 세포들을 400 μ L의 FACS staining buffer로 washing하고 50 μ L의 fixer buffer (4% formaldehyde가 포함된 PBS)를 분주하여 염색된 세포를 고정시켰다. FACS staining buffer을 400 μ L로 분주하여 washing하였고, 300 μ L에 재현탁하여 cell strainer snap cap이 있는 tube로 옮긴 뒤 FACSCalibur II를 사용하여 염색 결과를 확인하였다. 데이터는 FlowJo software version 10 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

8. 세포 내 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR

1) RNA 추출

회수한 골수유래 수지상세포에서 RNAiso Plus (Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 RNA를 추출하였다. Pellet 상태의 골수유래 수지상세포에 RNAiso Plus 용액 1 mL를 분주하고 2분간 강하게 vortexing하여 균질화 (homogenization)한 뒤 5분 동안 상온에서 incubation하였다. 200 μ L의 chloroform (Sigma Aldrich)을 분주하고 30초간 vortexing한 후 다시 3분 동안 상온에 두었다가 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 15분간 원심 분리하고 무색 투명한 상층액만 취하여 새로운 tube에 옮겼다. Isopronaol (Sigma Aldrich)을 500 μ L씩 넣고 vortexing한 후 상온에 10분 동안 두었다가 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 10분간 원심 분리하여 pellet을 얻었다. 상층액을 버린 후에 pellet을 1 mL의 75% ethanol로 가볍게 washing하고, 7500 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 2분간 원심 분리한 뒤 상층액을 제거하였다. 남은 pellet은 상온에서 건조시킨 후에 0.05% diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated distilled water (DW) 15 μ L로 완전히 용해시켰다. 이 중 일부를 취하여 2배 희석한 후 nano-spectrophotometer (NANO-200, BIOAND Co., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 RNA 농도 및 순도를 확인하였다. 이후 agarose 전기영동으로 RNA의 질을 확인한 뒤에 cDNA 합성 전까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

2) cDNA 합성

보관된 RNA는 PrimeScriptTM 1st strand cDNA synthesis kit (Takara)를 이용하여 cDNA로 합성되었다. 0.5 μ g/ μ L로 준비된 RNA stock 3 μ L, dNTP Mixture (10 mM each) 1 μ L, Oligo dT Primer (50 μ M) 1 μ L, RNase free DW 5 μ L를 PCR tube에 넣고 spin down하여 총 10 μ L의 RNA-primer mixture를 만들었다. 그리고 순차적으로 65 $^{\circ}$ C 및 4 $^{\circ}$ C 조건에서 각각 5분 동안 incubation한 후 해당 tube에 5 X PrimeScript Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, PrimeScript RTase (200 U/ μ L) 1 μ L, RNase free DW 4.5 μ L를

추가하여 총 20 μL 의 reaction mixture를 만들었다. Spin down 후 vortexing하여 잘 혼합하고 다시 spin down한 뒤에 mixture가 담긴 tube를 상온에 두어 10분 동안 incubation하였다. 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 42°C에서 50분, 95°C에서 5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 4°C로 냉각시킨 후에 분석 전까지 -20°C 조건으로 보관하였다.

3) Real-time PCR

Quantitative real-time PCR을 위해 0.2 mL짜리 8-tube strip에 10배 희석한 cDNA 1 μL 와 SYBR Premix Ex Taq (2X) 10 μL , ROX reference dye (50X) 0.4 μL , forward 및 reverse primer 각각 0.4 μL , autoclaved DW 7.8 μL 를 분주한 뒤 pipetting으로 거품을 최소화하며 부드럽게 혼합하고 8-cap strip을 끼웠다. 공기방울이 발생한 경우에는 이를 완전히 제거하고 spin down한 후에 StepOne™ Real-time PCR system (Applied Biosystems)을 이용하여 반응시켰다. SYBR Premix 및 ROX dye는 Takara 사에서 구입하였고, primer는 본 연구에서 확인하고자 하는 유전자의 서열과 시약 반응에 필요한 조건 등에 맞게 구성된 염기 서열을 확인한 뒤 Biomedic 사 (Bucheon, Korea)를 통해 제작하였다. 각 유전자 별 primer 염기 서열은 **Table 3**에 제시하였다. 반응 조건으로 95°C에서 30초간 유지 후 (initiation step), 95°C에서 10초 동안 변성 (denaturation step)시키고 60°C에서 30초간 결합 및 증폭을 일으키는 단계 (annealing step)를 40회 반복하였다. 이후 melt curve를 통해 각 유전자당 하나의 특이적인 peak가 나오는지 확인하였다. 모든 실험은 duplicate으로 분석한 뒤 평균값을 얻었고, house-keeping 유전자인 *Gadph*의 발현량으로 보정하였다. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 계산법으로 vehicle 배지에서 LPS 자극 없이 배양된 CON군 마우스의 골수유래 수지상세포의 유전자 발현량에 대비하여 상대정량 하였다.

Table 3. Primer sequences used in real-time PCR

Gene ¹	Forward primer	Reverse primer
<i>Cd40</i>	GGCAGGGATGACAGACGGTA	AAGGAGGGCACCCGAGAAT
<i>Cd83</i>	GATGTGCCCTTGGCTTTGTA	TGCTCTTCTCTCTGGTTGTTTTTC
<i>Ccr7</i>	TGTGGGAGCATTAGAGAGACTG	CCAAAACGACAGCCAAAAGT
<i>Il10</i>	CCAAGGAGTTGTTTCCGTTAGC	AGTGGAGCAGGTGAAGAGTGA
<i>Il12b</i>	CGGGTCTGGTTTGATGATGT	AGCAGTAGCAGTTCCCCTGA
<i>Ccl5</i>	CTTGAACCCACTTCTTCTCTGG	TGCTGCTTTGCCTACCTCTC
<i>Ccl22</i>	GAAACTTGGGAGGTGTGTGG	AGATGAGACCAGCGTCCTTG
<i>Gapdh</i>	GGAGAAACCTGCCAAGTA	AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG

¹ *Cd40*, cluster of differentiation 40; *Cd83*, cluster of differentiation 83; *Ccr7*, C-C chemokine receptor type 7; *Il10*, interleukin 10; *Il12b*, interleukin 12p40; *Ccl5*, chemokine ligand 5; *Ccl22*, chemokine ligand 22; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

9. 통계 분석

모든 통계 분석은 SPSS Statistics version 23 software (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다. 체중 및 식이 결과를 비교하기 위해 독립 t 검정을, 세포 생존도 차이를 확인하기 위해 일원배치 분산분석 (One-way ANOVA)을 실시하였다. 골수유래 수지상세포 실험 결과에서 세포 배양 과정의 비타민 D 처리 및 고지방식이 섭취에 의한 영향을 분석하기 위해서는 이원배치 분산분석 (Two-way ANOVA)를 수행하였다. 분산분석 결과가 유의적일 경우, Fisher's least significant difference (LSD) 검정으로 사후검정 하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (means \pm SEM)로 표기되었으며, 통계 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 이루어졌다.

IV. 실험 결과

1. 체중, 체지방량 변화 및 식이섭취량

실험동물의 체중, 체지방량, 식이섭취량 결과를 **Table 4**에 제시하였다. 초기 체중은 CON군과 HFD군 사이에 유의적인 차이가 없었으나, 15주 체중은 HFD군이 CON군보다 25% 더 높았다 ($P < 0.001$). HFD군의 체중증가량 ($P < 0.001$) 및 백색지방량 ($P < 0.001$) 또한 CON군의 값보다 유의적으로 높게 나타났다. 평균 에너지 섭취량은 CON군에 비해 HFD군이 14% 높았다 ($P < 0.001$).

Table 4. Body weight, weight gain, adipose tissue weight, and dietary intake of mice in the CON and HFD groups

	CON (n = 10)	HFD (n = 10)	<i>P</i> value ²
Body weight at 0 week (g)	19.5 ± 0.3 ¹	19.6 ± 0.3	0.918
Body weight at 15 week (g)	32.4 ± 0.7	40.5 ± 1.2	< 0.001
Weight gain (g)	12.8 ± 0.6	21.0 ± 1.1	< 0.001
WAT weight ³ (g)	3.04 ± 0.19	5.58 ± 0.23	< 0.001
Average dietary intake (g/day)	3.08 ± 0.02	2.87 ± 0.06	< 0.01
Average energy intake (kcal/day)	11.9 ± 0.1	13.6 ± 0.3	< 0.001

¹ The data are presented as means ± SEM, n = 10 for each group.

² Student's *t* test was used to determine the significant effect of obesity.

³ WAT includes perirenal, intraperitoneal, epididymal, and subcutaneous fat.

2. 세포 배양 과정의 1,25(OH)₂D₃ 처리가 골수세포의 생존도에 미치는 영향

1,25(OH)₂D₃가 골수세포 생존도에 영향을 미치는지 확인하고자 MTT 분석을 실시하였다 (Figure 3). 72시간 동안 1 nM 또는 10 nM의 1,25(OH)₂D₃로 처리된 골수세포의 생존도는 vehicle 배지에서 배양된 세포의 경우와 비교하여 각각 9% 또는 3% 높았으며, 통계적으로 유의적인 차이는 없었다 ($P = 0.645$). 이를 통해 골수세포의 *in vitro* 배양 과정에 1,25(OH)₂D₃를 1 nM 또는 10 nM 농도로 처리하여도 세포 독성이 없음을 확인하였다.

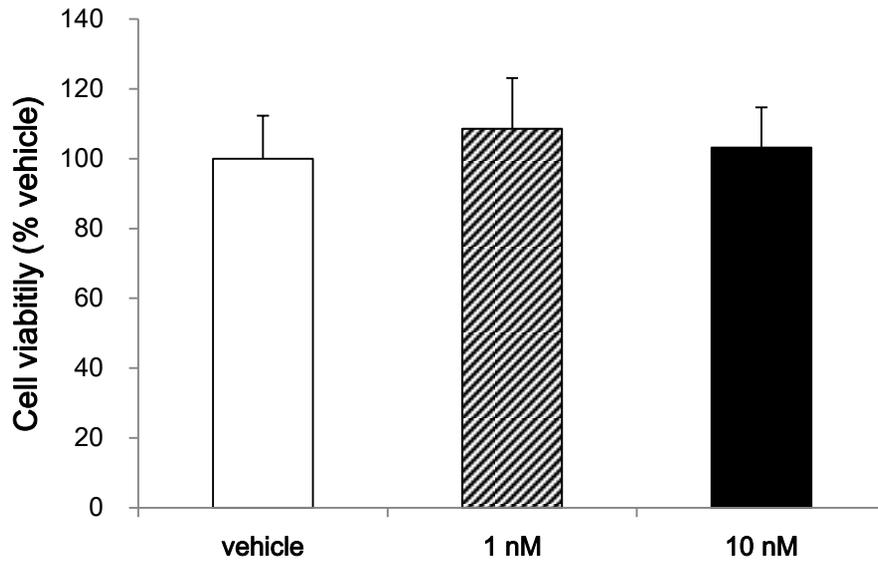


Figure 3. Effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on cell viability of bone marrow cells

Bone marrow cells isolated from murine femurs and tibias were treated with vehicle (0.1% ethanol) or 1,25(OH)₂D₃ (1 or 10 nM) for 72 h. The data are presented as mean ± SEM (n = 4 per group). One-way ANOVA was used to determine statistical difference.

3. 대조 또는 비만 마우스로부터 분리한 골수세포의 배양 중 1,25(OH)₂D₃ 처리가 수지상세포로의 분화에 미치는 영향

In vitro 상의 1,25(OH)₂D₃ 처리와 고지방식이 섭취가 골수유래 수지상세포로의 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해서, CON 군과 HFD 군 마우스의 골수세포를 수지상세포로 분화시키는 과정에 1,25(OH)₂D₃ 를 다양한 조건 (0, 1, 10 nM)으로 처리하였다. 이 경우에는 LPS 자극으로 수지상세포의 성숙을 유도하지 않았으며, 최종적으로 회수된 세포에서 CD11⁺ (수지상세포의 마커) 세포의 비율을 분석하였다 (**Figure 4**). 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 수지상세포로의 분화가 유의적으로 억제되었으나 ($P < 0.001$), 식이 지방량에 의한 효과는 없었다. Vehicle 배지로 처리된 세포와 비교할 때 10 nM 농도로 1,25(OH)₂D₃ 를 처리한 세포에서 CD11c⁺ 세포 비율이 CON 군과 HFD 군 모두에서 유의적으로 낮았다 (각각 15.5% 및 24.2%).

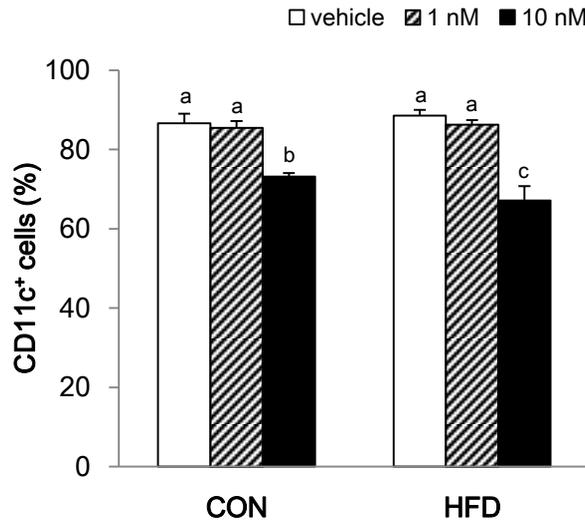


Figure 4. Effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on DC differentiation in bone marrow cells from the CON and HFD groups

The percentage of CD11c⁺ cells (as a DC marker) in unstimulated BMDCs was decreased by 1,25(OH)₂D₃ in both the CON and HFD groups. The data are presented as mean ± SEM (n = 9–10 per group). Two-way ANOVA was performed to determine the effects of 1,25(OH)₂D₃ and dietary fat amount. Means with different letters indicate significant differences (*P* < 0.05) according to Fisher's LSD multiple comparison test.

4. 대조 또는 비만 마우스의 골수유래 수지상세포의 배양 중 1,25(OH)₂D₃ 처리가 수지상세포의 성숙과 관련된 표현형에 미치는 영향

LPS로 자극하지 않은 골수유래 수지상세포의 분석 결과, 성숙한 수지상세포로서 CD80 분자를 발현하는 수지상세포 (CD80⁺CD11c⁺ cells)의 비율과 MHC class II 또는 CD86 분자를 고발현하는 수지상세포 (MHCII^{high}CD11c⁺ 또는 CD86^{high}CD11c⁺ cells)의 비율은 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에 유의적으로 낮았으나 ($P < 0.001$), 식이 지방량에 의한 영향은 없었다 (Table 5). CD80⁺CD11c⁺ 세포 비율은 CON군과 HFD군 모두에서 vehicle보다 10 nM의 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에 유의적으로 낮았다 (각각 25.9% 및 33.8%). MHCII^{high}CD11c⁺ 세포 비율은 vehicle 처리에 비해 1 nM 및 10 nM 농도의 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우 CON군에서는 각각 56.8% 및 97.9%, HFD군에서는 각각 46.1% 및 97.0% 낮았다. 이와 유사하게 골수유래 수지상세포 중의 CD86^{high}CD11c⁺ 세포 비율은 1 nM 및 10 nM 1,25(OH)₂D₃로 처리한 경우가 vehicle 배양보다 CON군에서는 각각 64.6% 및 97.5%, HFD군에서는 각각 59.7% 및 96.5% 낮았다.

LPS로 성숙을 유도한 골수유래 수지상세포 중의 CD80⁺CD11c⁺ 세포 비율에서는 마우스의 고지방식이 섭취 여부에 따라 1,25(OH)₂D₃ 처리의 영향이 다르게 나타났다 (Table 5). CON군의 경우 CD80⁺CD11c⁺ 세포 비율은 vehicle 처리에 비해 10 nM의 1,25(OH)₂D₃로 처리한 세포에서 10.7% 높았던 반면, HFD군의 경우에는 10 nM의 세포에서 15.1% 낮았다. 또한 10 nM 농도의 1,25(OH)₂D₃로 처리된 수지상세포 중 CD80⁺CD11c⁺ 세포 비율은 CON군에 비해 HFD군에서 21.2% 낮았다. LPS로 자극한 후 MHCII^{high}CD11c⁺ 및 CD86^{high}CD11c⁺ 세포 비율은 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에 유의적으로 낮았고, 고지방식을 섭취한 경우에 높았다. CON군과 HFD군 모두에서 1 nM 및 10 nM의 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에 MHCII^{high}CD11c⁺ 및 CD86^{high}CD11c⁺ 세포 비율이 유의적으로

낮았다 (CON군의 경우 1 nM에서 각각 58.4% 및 53.8%, 10 nM에서 각각 91.6% 및 83.6% 낮음; HFD군의 경우 1 nM에서 각각 31.4% 및 29.8%, 10 nM에서 각각 96.1% 및 89.0% 낮음). 한편 vehicle과 1 nM의 1,25(OH)₂D₃로 처리하였을 때 CON군의 경우에 비해 HFD군의 LPS 자극 골수유래 수지상세포에서 MHCII^{high}CD11c⁺ 및 CD86^{high}CD11c⁺ 비율이 유의적으로 높았다 (MHCII^{high}CD11c⁺ 세포의 경우 vehicle 및 1 nM 처리 시 40.3% 및 131.4% 높음; CD86^{high}CD11c⁺ 세포의 경우 vehicle 및 1 nM 처리 시 38.5% 및 110.5% 높음) (Table 5).

Figure 5에는 dot plots을 통해 MHC class II와 CD86 분자를 고발현하는, 성숙한 수지상세포를 gating하여 나타내었다. Table 5에 제시된 바와 같이 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 MHC class II와 CD86 분자를 높게 발현하는 성숙한 수지상세포의 비율이 감소되었다는 것을 보여주고 있으며, 그 효과는 1 nM보다 10 nM에서 크게 나타났음을 확인할 수 있다. 또한 동일한 비타민 D 조건 [vehicle 및 1 nM 1,25(OH)₂D₃]에서 LPS로 자극한 골수유래 수지상세포 중 성숙한 수지상세포의 비율은 CON군에 비해 HFD군에서 더 높은 것을 볼 수 있다.

Table 5. Effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on the phenotype related to DC maturation in BMDCs from the CON and HFD groups

	(% ¹)	CON			HFD			vitamin D treatment, <i>P</i> value	Fat amount, <i>P</i> value	Interaction, <i>P</i> value ²
		vehicle	1 nM	10 nM	vehicle	1 nM	10 nM			
LPS	CD80 ⁺ CD11c ⁺	78.1 ± 2.5 ^{1, a}	75.5 ± 1.9 ^a	57.8 ± 1.9 ^b	80.4 ± 1.9 ^a	78.3 ± 1.7 ^a	53.2 ± 4.4 ^b	< 0.001	0.93	0.28
(-)	MHCII ^{high} CD11c ⁺	19.8 ± 1.6 ^a	8.5 ± 1.3 ^b	0.4 ± 0.1 ^c	17.2 ± 1.7 ^a	9.3 ± 1.0 ^b	0.52 ± 0.04 ^c	< 0.001	0.54	0.32
	CD86 ^{high} CD11c ⁺	16.3 ± 1.3 ^a	5.8 ± 0.8 ^c	0.41 ± 0.04 ^d	14.1 ± 1.0 ^b	5.7 ± 0.4 ^c	0.5 ± 0.1 ^d	< 0.001	0.24	0.25
LPS	CD80 ⁺ CD11c ⁺	80.5 ± 3.7 ^b	87.1 ± 1.9 ^{ab}	89.1 ± 1.1 ^a	82.7 ± 1.1 ^{ab}	80.2 ± 1.2 ^b	70.2 ± 4.3 ^c	0.32	< 0.01	< 0.01
(+))	MHCII ^{high} CD11c ⁺	44.5 ± 4.8 ^b	18.5 ± 2.1 ^c	3.7 ± 0.5 ^d	62.4 ± 3.6 ^a	42.8 ± 4.5 ^b	2.4 ± 0.3 ^d	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	CD86 ^{high} CD11c ⁺	48.4 ± 4.9 ^b	22.4 ± 3.1 ^c	8.0 ± 1.1 ^d	67.1 ± 3.4 ^a	47.1 ± 4.5 ^b	7.4 ± 0.6 ^d	< 0.001	< 0.001	< 0.01

FACS analysis of BMDCs from the CON and HFD group without or with vitamin D treatment (n = 9 ~ 10 per each group).

LPS (50 ng/mL) stimulation was used for the maturation of BMDCs.

¹The data, the percentages of positive cells, are presented as means ± SEM.

²Two-way ANOVA was performed to determine the effects of vitamin D and dietary fat amount.

Means with different letters indicate significant differences (*P* < 0.05) by Fisher's LSD multiple comparison test.

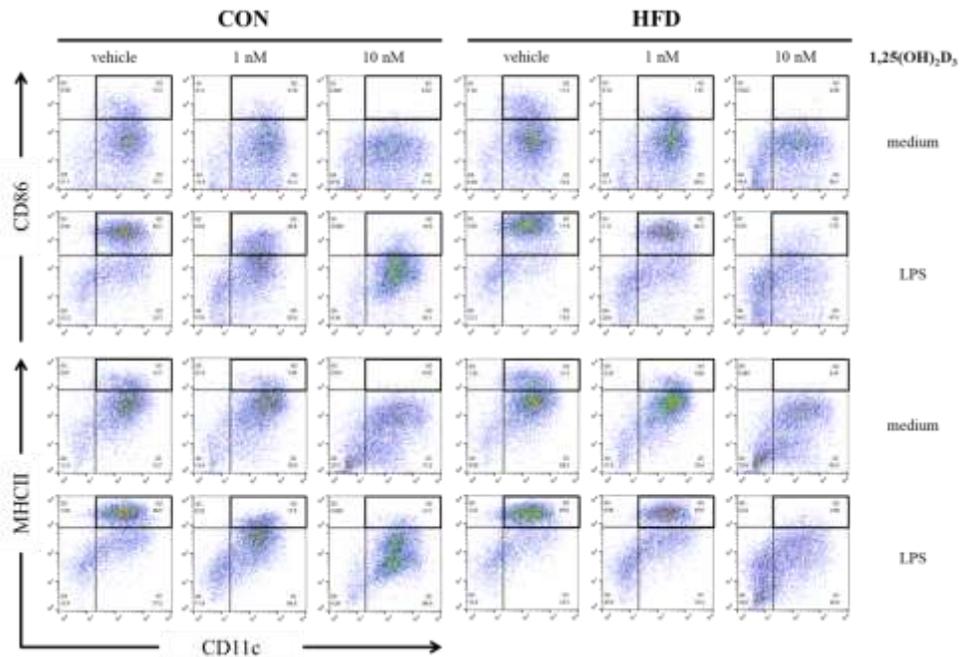


Figure 5. Inhibitory effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment and enhance effects of HFD feeding on DC maturation in BMDCs

The populations of mature DCs (MHCII^{high}CD11c⁺ and CD86^{high}CD11c⁺) in BMDCs are presented as dot plots of the FlowJo analyses. The BMDC maturation was significantly inhibited by 1,25(OH)₂D₃ treatment. Stimulated BMDCs from the HFD groups had considerably higher percentages of mature DCs than those from the CON groups in the vehicle and 1-nM 1,25(OH)₂D₃ treatment.

5. 대조 또는 비만 마우스의 골수유래 수지상세포의 배양 중 1,25(OH)₂D₃ 처리가 성숙한 수지상세포의 기능과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향

수지상세포의 성숙 기능과 관련된 유전자 중 T 세포의 활성화에 필요한 공동자극분자인 *Cd40*, 성숙한 수지상세포의 대표적인 마커인 *Cd83*, 림프기관으로의 이동에 관여하는 케모카인 수용체인 *Ccr7* 유전자 발현량을 비교하여 1,25(OH)₂D₃의 처리와 고지방식이 섭취가 미치는 효과를 확인하고자 하였다. LPS로 자극하지 않은 골수유래 수지상세포에서 *Cd40*, *Cd83*, 및 *Ccr7* mRNA 수준은 1,25(OH)₂D₃로 처리한 경우에 유의적으로 낮았다 ($P < 0.001$) (**Figure 6-A**). Vehicle 배지와 비교하였을 때 1 nM 및 10 nM의 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에서 *Cd40* 및 *Cd83* 발현량이 CON군 (*Cd40*의 경우 1 nM 및 10 nM에서 43.8% 및 91.0% 낮음; *Cd83*의 경우 1 nM 및 10 nM에서 33.8% 및 85.7% 낮음)과 HFD군 (*Cd40*의 경우 1 nM 및 10 nM에서 55.2% 및 92.3% 낮음; *Cd83*의 경우 1 nM 및 10 nM에서 50.1% 및 85.9% 낮음)에서 모두 낮았다. CON군에 비해 HFD군에서 *Cd40* mRNA 수준이 높은 경향성을 보인 반면 ($P = 0.096$), *Cd83* 및 *Ccr7* 유전자 발현량은 CON군에 비해 HFD군의 경우에서 낮은 경향이 있었다 ($P = 0.064$ 및 $P = 0.063$).

LPS 자극 후의 골수유래 수지상세포에서도 *Cd40* 및 *Cd83* mRNA 발현 수준은 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에 낮았으며 ($P < 0.001$), CON군의 경우에 비해 HFD군의 세포에서 두 유전자의 발현이 유의적으로 낮았다 (**Figure 6-B**). vehicle 배지에서 배양된 세포에 비해 10 nM의 1,25(OH)₂D₃로 처리한 경우에서 *Cd40* mRNA 수준이 낮았으며, 그 정도는 CON군의 경우 39.0%, HFD군의 경우 91.1%이었다. *Cd83* 유전자 발현은 CON군보다 HFD군에서 낮았으며, vehicle 배지에서는 20.5%, 10 nM 처리에서는 72.0% 수준이었다. *Ccr7* 유전자 발현은 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 억제되었다 ($P < 0.01$).

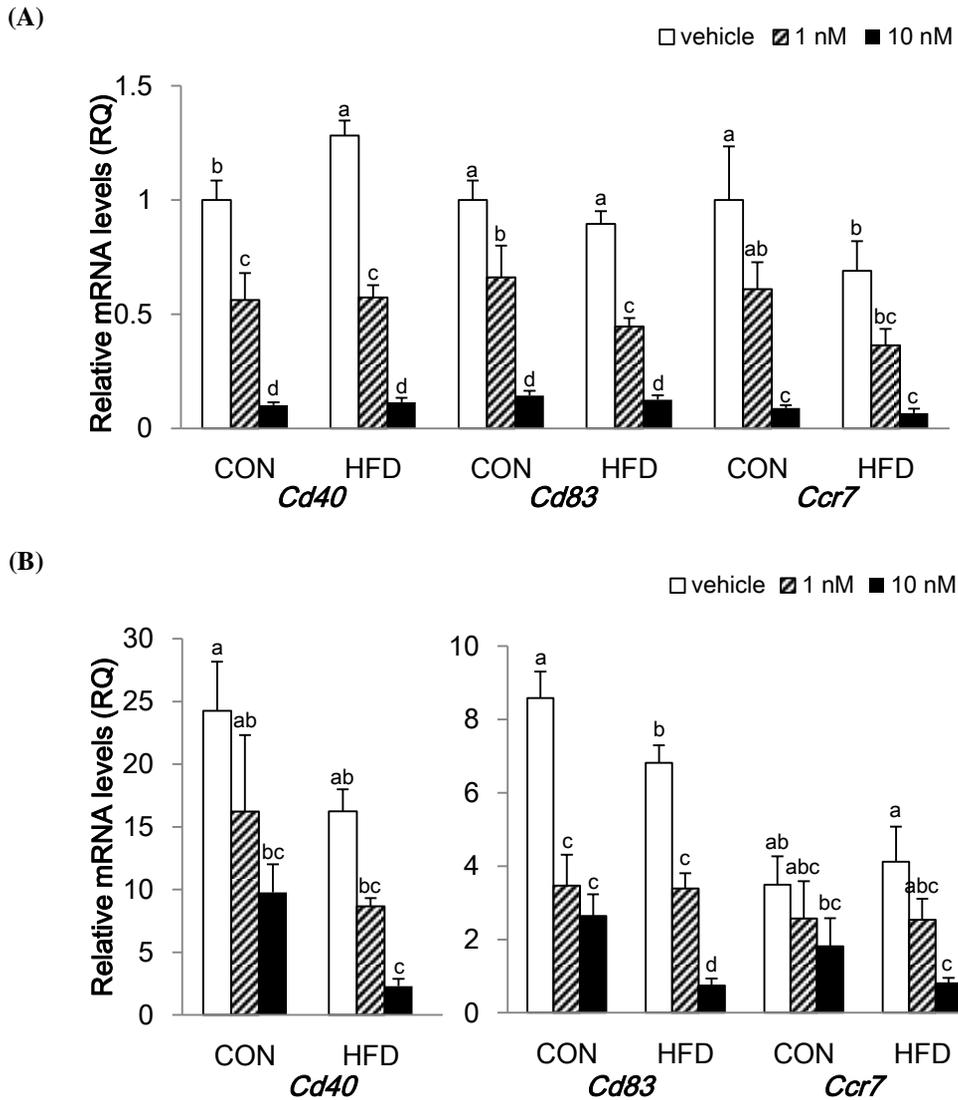


Figure 6. Effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment on the expression of genes related to the function of mature DCs in BMDCs from the CON and HFD groups

The mRNA levels of *Cd40*, *Cd83*, and *Ccr7* in unstimulated BMDCs (A) and LPS-stimulated BMDCs (B). The data are presented as mean \pm SEM ($n = 7-8$ per group). Two-way ANOVA was performed to determine the effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and dietary fat amount. Means with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to Fisher's LSD multiple comparison test. All values were normalized to the levels of housekeeping gene *Gapdh* and expressed as relative mRNA levels compared with the average levels of the BMDCs derived from the CON group without $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and LPS.

6. 대조 또는 비만 마우스의 골수유래 수지상세포의 배양 중 1,25(OH)₂D₃ 처리가 사이토카인 및 케모카인 유전자의 발현에 미치는 영향

In vitro 상의 1,25(OH)₂D₃ 처리와 고지방식이 섭취가 골수유래 수지상세포의 *Il10*, *Il12b*, *Ccl5*, 및 *Ccl22* 발현에 미치는 영향을 확인하였다. LPS로 자극하지 않은 수지상세포의 *Il10* 유전자 발현은 CON군과 비교하였을 때 HFD군에서 전체적으로 낮았고 ($P < 0.05$), 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 억제되었다 ($P < 0.001$) (**Figure 7-A**). LPS로 자극하지 않은 수지상세포의 *Il12b* 유전자 발현은 1,25(OH)₂D₃ 처리한 경우에 낮았고 ($P < 0.001$), CON군보다 HFD군에서 낮은 경향성을 보였다 ($P = 0.072$). *Il12b* 유전자 발현은 1 nM과 10 nM 농도의 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에 CON군에서는 각각 45.8% 및 87.3%, HFD군에서는 65.3% 및 89.7% 낮은 것으로 나타났다 (**Figure 7-B**). *Ccl5* 및 *Ccl22* 유전자 발현 역시 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 억제되었으나 ($P < 0.001$), 식이 지방량에 의한 영향은 없었다 (**Figure 7-C, D**).

LPS 자극 후에는 골수유래 수지상세포의 *Il10* mRNA 발현에 미치는 1,25(OH)₂D₃ 처리의 효과가 고지방식이 섭취 여부에 따라 다르게 나타났다 (**Figure 7-A**). CON군의 경우 *Il10* 유전자 발현이 vehicle 배지로 배양된 세포보다 10 nM 농도의 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에 104.1% 높았으나, HFD군에서는 이러한 1,25(OH)₂D₃의 효과를 확인할 수 없었다. LPS로 자극한 수지상세포의 *Il12b* 유전자 발현은 CON군에 비해 HFD군에서 낮았으며, vehicle 배지에서는 49.8%, 10 nM의 1,25(OH)₂D₃ 처리에서는 78.4% 낮았다 (**Figure 7-B**). *Ccl5* mRNA 수준은 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 억제되는 경향성을 보였다 ($P = 0.065$) (**Figure 7-C**). *Ccl22* 유전자 발현은 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 유의적으로 억제되었으며 ($P < 0.001$), 식이 지방량에 따른 차이는 없었다 (**Figure 7-D**).

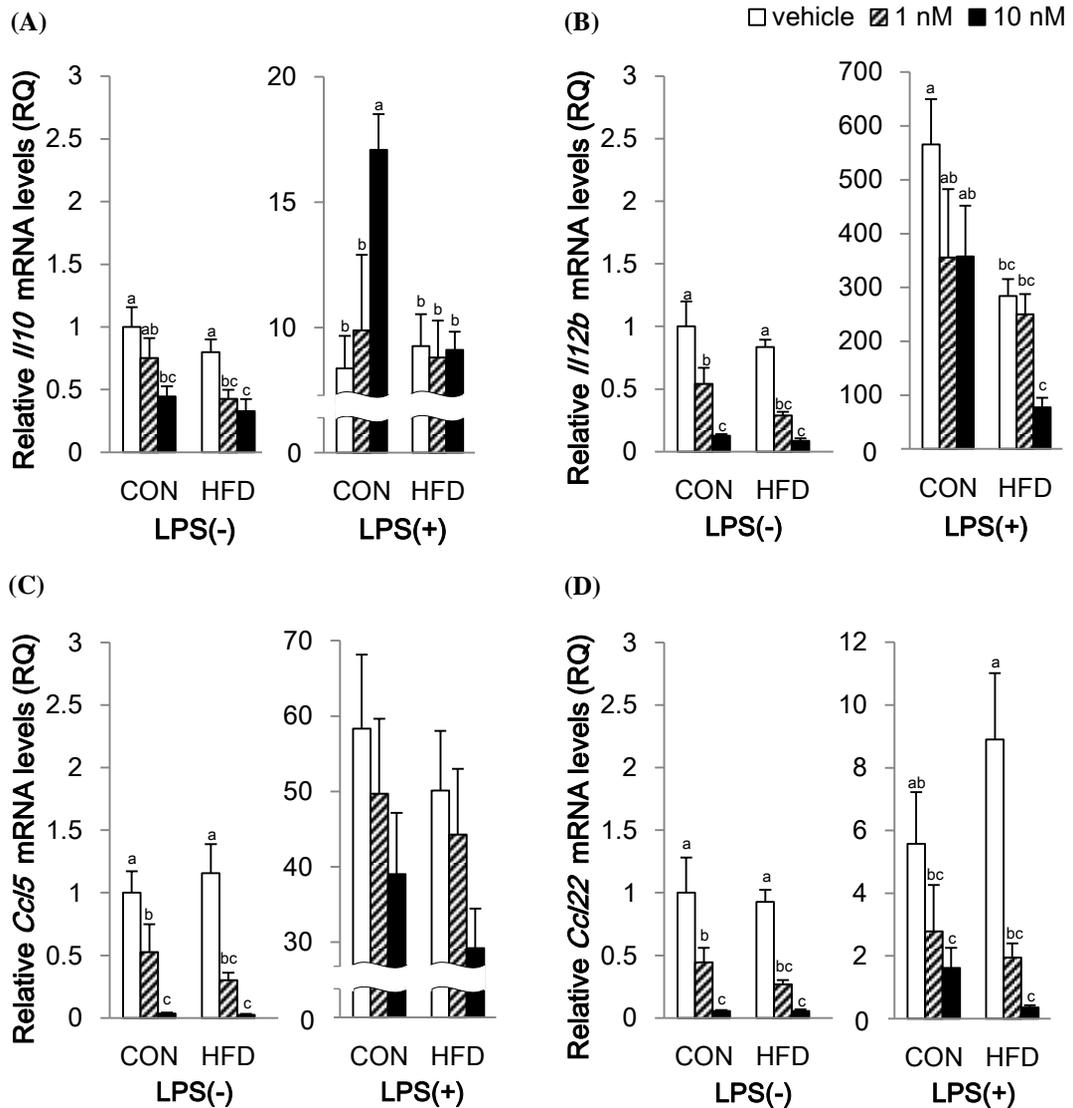


Figure 7. Effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on the gene expression of cytokines and chemokines in BMDCs from the CON and HFD groups

The mRNA levels of *Il10* (A), *Il12b* (B), *Ccl5* (C), and *Ccl22* (D) in BMDCs. The data are presented as mean ± SEM (n = 8 per group). Two-way ANOVA was performed to determine the effects of 1,25(OH)₂D₃ and dietary fat amount. Means with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to Fisher's LSD multiple comparison test. All values were normalized to the levels of housekeeping gene *Gapdh* and expressed as relative mRNA levels compared with the average levels of the BMDCs derived from the CON group without 1,25(OH)₂D₃ and LPS.

V. 고찰

본 연구에서는 *in vitro* 상의 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리가 대조 마우스와 고지방식이로 유도한 비만 마우스의 골수유래 수지상세포의 분화와 세포 표면의 MHC class II 및 공동자극분자 발현을 억제하고, 수지상세포의 기능과 관련된 유전자 발현을 조절한다는 것을 확인하였다. LPS로 성숙을 유도하지 않은 수지상세포의 표면 마커 발현에서는 비만에 의한 영향을 확인할 수 없었으나, LPS로 성숙을 유도한 경우에는 대조 마우스에 비해 비만 마우스의 수지상세포에서 성숙한 표현형을 나타내는 수지상세포 (MHCII^{high}CD11c⁺ cells, CD86^{high}CD11c⁺ cells)의 비율이 높았다. 그러나 비만 마우스의 골수유래 수지상세포에서는 대조 마우스의 경우보다 성숙한 수지상세포에서 증가된다고 알려진 *Il12b* 유전자가 낮게 발현되었다. 비록 *in vitro* 상의 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의해 대조 마우스와 비만 마우스 모두에서 LPS로 자극된 수지상세포의 MHC class II 및 CD86 표면 발현과 *Il12b* 유전자 발현이 억제되었으나, *Il10* 유전자 발현 촉진 효과는 오직 대조 마우스의 세포에서만 관찰되었다.

본 연구에서는 대조 마우스에서와 같이 비만 마우스의 골수유래 수지상세포에서도 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 처리하였을 때 수지상세포로의 분화 및 성숙과 관련된 표면 마커 발현이 억제된다는 것을 확인하였다. 여러 선행연구에 따르면 정상 마우스와 비만이 아닌 당뇨 마우스의 골수유래 수지상세포 및 랑게르한스 세포, 사람의 단핵구유래 수지상세포에서 성숙과 관련된 표면 마커의 발현이 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의해 억제된다는 사실이 일관성 있게 보고된 바 있다 (Bscheider and Butcher 2016; Fujita *et al.* 2007; van Etten *et al.* 2004). 또한 세포 배양 과정의 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의해 수지상세포의 분화가 억제된다는 것이 골수유래 수지상세포와 단핵구유래 수지상세포 모두에서 입증되었다 (Griffin *et al.* 2000; Penna. G and Adorini 2001). 그러나 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 가 비만의 영향을 받은

수지상세포의 표현형에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바가 없었다. 렙틴 결핍 마우스와 고지방식이로 유도된 비만 마우스 모두에서 대조 마우스보다 비장면역세포 내 수지상세포의 비율이 높은 것으로 보고됨에 따라 (James *et al.* 2012; Macia *et al.* 2006), 비만에 의해 야기되는 이러한 수지상세포의 비율 변화가 비타민 D 보충으로 조절될 가능성이 있다.

1,25(OH)₂D₃는 VDR을 통한 유전자 전사 수준에서 수지상세포의 표현형뿐만 아니라 항원 포획, 사이토카인과 케모카인 생성, 케모카인 수용체 발현, apoptosis, T 세포 활성화 등의 기능 또한 조절하는 것으로 알려져 있다 (Adorini *et al.* 2004). 본 연구에서는 마우스가 섭취한 사료 내 지방 함량과는 관계 없이 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 *Cd40*, *Cd83*, 및 *Ccr7* 유전자 발현이 억제된다는 것을 확인하였다. 즉, 고지방식을 통해 비만을 유도한 경우에도 1,25(OH)₂D₃가 수지상세포의 성숙과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향은 다르지 않았다고 할 수 있다. 한편 지방조직 내에 존재하는 수지상세포는 비만으로 인한 염증과 관련이 있으며, 마우스 모델에서 고지방식을 섭취하는 동안 수지상세포의 CCR7의 발현이 증가되어 수지상세포가 지방 조직 내로 축적된다는 연구 결과가 보고되었다 (Cho *et al.* 2016). 따라서 비타민 D 보충은 비만한 경우 수지상세포에서 CCR7 발현이 증가하는 것을 억제하여 지방조직 내로 수지상세포가 축적되는 것을 예방하고, 비만에서 나타나는 낮은 수준의 만성염증을 개선하는데 긍정적인 효과를 가져올 가능성이 있다.

또한 본 연구 결과를 통해 비만 마우스의 성숙을 유도하지 않은 골수유래 수지상세포에서 사이토카인 및 케모카인 유전자 (*Il10*, *Il12b*, *Ccl5*, 및 *Ccl22*) 발현이 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 억제된다는 것을 확인하였다. LPS를 이용하여 수지상세포의 성숙을 유도한 후 *Il12b* 유전자 발현은 1,25(OH)₂D₃뿐만 아니라 고지방식이 섭취한 경우에도 억제되었다. 이는 식이로 유도된 비만 마우스에 인플루엔자 바이러스를 감염시켰을 때 림프절 내의 수지상세포에서 *Il12b* 유전자 발현이 낮았다는 선행연구의 결과와 일치한다 (Smith *et al.* 2009). 비만한 사람의

경우 감염에 취약한 것으로 알려져 있으며 (Milner and Beck 2012), 이는 본 연구 및 선행연구에서 관찰된 비만 개체의 수지상세포에서 *III2b* 발현이 낮았다는 결과로 일부 설명할 수 있다. 즉, 비만의 영향을 받은 수지상세포는 병원성 인자의 침입에도 불구하고 효과적으로 Th1 세포를 유도하지 못하기 때문에 비만한 사람에서 감염 위험이 증가될 수 있다.

IL-10은 항염증성 사이토카인으로, 수지상세포가 naïve T 세포를 분화시키는 과정에서 effector T 세포 대신 Treg 세포를 유도하여 면역관용을 유지하는데 필요한 인자이다 (Manicassamy and Pulendran 2011). 본 연구에서는 LPS로 성숙을 유도하지 않은 경우 대조 마우스에 비해 비만 마우스의 수지상세포에서 *III0* 발현이 전체적으로 낮다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 성숙을 유도한 후에는 대조 마우스의 경우와 달리 비만 마우스의 수지상세포에서는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 처리하여도 *III0* 발현이 촉진되지 않았다. 이러한 결과에서 비만한 경우 수지상세포에서 IL-10 생성과 관련된 기능이 저하되어 자가면역반응을 통제하는데 문제가 발생할 수 있음을 유추할 수 있다. 이는 선행연구에서 제시된 염증성 장질환과 다발성 경화증과 같은 자가면역질환과 비만 사이의 유의한 상관관계를 설명하는데 도움이 될 수 있다 (Versini *et al.* 2014). 또한 본 연구에서 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 처리하여도 비만 마우스의 수지상세포에서는 *III0* 유전자 발현이 촉진되지 않았기 때문에 비타민 D를 이용한 면역치료의 결과가 정상 체중인 사람에 비해 비만인 사람에서 효과적이지 않을 가능성이 있다.

수지상세포에서 CCL5와 CCL22 등의 케모카인 발현을 조절하는 비타민 D의 영향은 연구에 따라 다양한 결과가 보고된 바 있다. 일부 연구에서는 *in vitro* 상의 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의해 수지상세포의 CCL22 생성이 증가되었다고 하였으나 (Adorini *et al.* 2004; Penna *et al.* 2007), 대조 세포에 비해 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 처리한 랭게르한스 세포에서 CCL5의 분비는 증가하고 CCL22 생성은 감소하였다는 연구 결과도 존재한다 (Fujita *et al.* 2007). 본 연구에서는 CON군과 HFD군 모두에서 골수유래 수지상세포의

Ccl5 및 *Ccl22* mRNA 수준이 비타민 D에 의해 억제되었다. 이와 더불어 CD40 및 CD86과 같은 다른 마커들의 발현에서도 종종 반대되는 결과가 보고되었다. 예를 들어 1,25(OH)₂D₃를 처리하였을 때 비만이 아닌 당뇨 마우스의 골수유래 수지상세포의 CD40 발현에는 변화가 없었다는 연구 결과 (van Etten *et al.* 2004)와 단핵구유래 수지상세포의 CD86 발현이 높아졌다는 결과 (Canning *et al.* 2001)가 존재하지만, 이는 대부분의 연구에서 비타민 D에 의해 CD40 및 CD86의 발현이 감소한다고 보고했던 결과와는 차이가 있다. 본 연구에서도 선행연구와 달리 LPS로 자극한 경우 대조 마우스의 수지상세포에서는 비타민 D 처리에 의해 CD80 발현이 증가한 것으로 나타났다. 수지상세포에서 분화 및 성숙 단계에 따라 유전자 전사의 변화가 있으며 (Szeles *et al.* 2009) 연구마다 수지상세포의 분화 및 성숙 방법과 1,25(OH)₂D₃의 처리 방법 (처리 농도, 시기 및 기간) 등 실험 프로토콜의 차이가 있기 때문에 위와 같이 연구마다 다양한 결과가 보고된 것으로 사료된다.

항원제시세포로서 제 기능을 다 하기 위해서는 수지상세포가 naïve T 세포의 활성화에 필요한 세 가지 신호 (신호 1, 2, 3)를 모두 생성해야 한다 (Reis e Sousa 2006). 그러나 본 연구에 의하면 비만 마우스의 LPS로 자극된 골수유래 수지상세포는 대조 마우스의 경우와 비교하여 표면의 MHC class II (신호 1) 및 CD86 (신호 2)를 높게 발현하는 반면, *Cd40* (신호 2)와 *Il12b* (신호 3)의 유전자 발현은 저하되어 있었다. 비록 Erik *et al.* (2010)은 고지방식으로 유도한 비만 마우스에 2차 인플루엔자 바이러스를 접종한 경우 면역반응이 저하된 것을 수지상세포의 기능 이상보다는 memory T 세포의 기능 부전 때문이라고 설명하였으나, T 세포 활성화를 위한 DC의 자극 기능 약화 때문이라고 보고한 연구도 있다 (James *et al.* 2012). 본 연구의 결과는 비만과 관련된 수지상세포의 기능 부전의 메커니즘을 이해하는데 도움을 줄 수 있다.

일부 연구에서는 비타민 D에 의한 면역관용성 수지상세포의 유도 기전을 세포 내의 대사 변화로 설명하고 있다 (Ferreira *et al.* 2015; Sim *et*

al. 2016). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는 mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) 경로를 억제하는데, 이 mTOR 경로는 영양소, 에너지 및 스트레스 등과 같은 환경 신호들을 통합하고 세포의 증식, 성장, 분화를 조절하는 역할을 한다 (Lisse and Hewison 2011). 본 연구에서 관찰된 골수유래 수지상세포의 변화 역시 비타민 D에 의해 mTOR 경로가 조절되었기 때문으로 설명할 수 있으며, CON군과 HFD군의 골수유래 수지상세포에서 나타난 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 효과의 차이는 비만에 의한 mTOR 경로의 조절장애와 관련이 있을 수 있다 (Cai *et al.* 2016). 이후의 연구에서는 비타민 D와 비만에 의한 수지상세포 변화의 메커니즘을 규명하는 것이 필요하다.

본 연구는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리와 고지방식이 섭취로 유도된 비만이 수지상세포에 미치는 효과를 함께 확인하였다는 의의가 있으나, *in vivo* 상에서의 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 보충 효과가 아니라는 한계점이 있다. 그러나 관련된 선행연구가 부족하였기 때문에 *in vitro* 상에서 골수유래 수지상세포와 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 이용한 실험이 선행될 필요가 있었다. 또한 본 연구에서는 10 nM뿐만 아니라 1 nM의 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에서도 수지상세포의 변화를 확인할 수 있었다. 선행연구에 따르면 1,000 IU vitamin D/kg of diet를 섭취한 정상 마우스의 혈중 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 농도는 0.2~0.3 nM 수준인 것으로 보고되었다 (Fleet *et al.* 2008). 또한 본 연구실에서 진행 중인 연구에서 10,000 IU vitamin D/kg of diet를 이용해 12주 동안 비타민 D를 경구 보충하여 사육한 마우스들의 혈중 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 농도는 0.4~0.5 nM로 확인되었다. 이는 본 연구에서 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리 효과를 확인한 1 nM에는 미치지 못하는 수준이다. 그러나 LPS 자극에 의해 활성화된 수지상세포에서 1-hydroxylase의 발현이 증가하며, *in vitro* 실험이지만 대식세포에 의해 활성화된 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 수준 (0.6~0.8 nM)에서도 수지상세포의 기능이 조절될 수 있다는 선행연구 결과가 보고되었다 (Enioutina *et al.* 2008; Kundu *et al.* 2014). 이에 근거하였을 때 면역 세포가 존재하는 국소적인 수준에서

1,25(OH)₂D₃ 농도가 상승함으로써 수지상세포의 성숙이 조절될 수 있음을 유추할 수 있다. 즉, 본 연구에서 확인한 1 nM의 1,25(OH)₂D₃ 처리 결과가 *in vivo* 내에서 재현될 가능성이 있다.

결론적으로, 본 연구에서는 *in vitro* 상의 1,25(OH)₂D₃ 처리를 통해 대조 마우스와 비만 마우스의 골수유래 수지상세포의 분화와 성숙이 억제되며 공동자극분자, 사이토카인, 케모카인 등을 포함한 유전자 발현이 조절된다는 것을 확인하였다. 성숙을 유도한 후 비만 마우스의 골수유래 수지상세포에서 성숙한 수지상세포의 비율은 증가하였으나 *Cd40* 및 *Il12b* 유전자 발현 감소 등이 나타남에 따라 비만의 영향을 받은 수지상세포는 항원제시세포로서 적절한 기능을 수행하지 못할 가능성이 있다고 사료된다. 성숙을 유도한 경우 수지상세포의 *Il10* 유전자 발현에 미치는 1,25(OH)₂D₃의 효과는 대조 마우스와 비만 마우스의 세포 사이에 차이가 있었으며, 이는 비타민 D에 의한 수지상세포의 기능 조절이 비만에 의해 영향을 받을 수 있음을 시사한다.

VI. 요약

본 연구에서는 고지방식이로 유도된 비만 여부에 따라 세포 배양 과정의 비타민 D 처리에 의한 수지상세포의 성숙 및 기능 조절 효과가 다르게 나타나는지를 알아보려고 하였다. 15주 동안 대조식이와 고지방식을 먹인 마우스 (10% 및 45% kcal fat, CON 및 HFD군)에서 골수세포를 분리한 후 *in vitro* 상에서 vehicle 배지 또는 비타민 D 추가 배지 [1 또는 10 nM 농도의 1,25(OH)₂D₃] 하에서 rmGM-CSF를 이용해 수지상세포로 분화시켰으며, LPS 자극을 통해 성숙을 유도하였다. 비타민 D와 고지방식이 섭취 효과는 수지상세포 표면 마커 및 유전자 발현을 비교하여 확인하였다.

- 1) 15주 후 CON군보다 HFD군의 체중, 체중증가량, 백색지방량이 유의적으로 높았다.
- 2) 골수세포에 비타민 D를 처리하여도 [1 또는 10 nM 1,25(OH)₂D₃] 세포 생존도에 영향을 미치지 않았다.
- 3) CON군과 HFD군 모두에서 배양 중 10 nM의 1,25(OH)₂D₃ 처리를 통해 골수세포로부터 수지상세포로의 분화가 억제되었다.
- 4) LPS로 성숙을 유도하지 않은 골수유래 수지상세포의 표면 성숙 마커 (MHC class II, CD86, CD80) 발현은 비타민 D 처리에 의해 유의적으로 감소하였으나 식이 지방량에 의해서는 영향을 받지 않았다. LPS로 자극한 수지상세포의 표현형에서는 비타민 D 및 고지방식이 섭취의 효과가 마커에 따라 다르게 나타났다. CON군에서는 비타민 D를 처리한 골수유래 수지상세포에서 CD80⁺CD11c⁺ 세포 비율이 높은 반면, HFD군에서는 해당 세포의 비율이 낮았다. MHCII^{high}CD11c⁺ 및 CD86^{high}CD11c⁺ 세포 비율은 CON군과 HFD군 모두에서 비타민 D를 처리한 경우에 낮았고, CON군의 경우보다 HFD군의 경우에서 유의적으로 높았다.

- 5) 성숙한 수지상세포의 기능과 관련된 유전자 *Cd40*, *Cd83*, 및 *Ccr7*의 경우, LPS로 자극하지 않은 수지상세포에서는 비타민 D 처리에 의해 해당 유전자들의 발현이 유의적으로 억제되었다. 성숙을 유도한 수지상세포에서의 *Cd40* 및 *Cd83* 유전자 발현은 CON군보다 HFD군의 경우에 유의적으로 낮았으며, 비타민 D 처리에 의해 억제되었다. 한편 *Ccr7* 유전자에서는 비타민 D 처리에 의한 발현 억제 효과가 확인되었다.
- 6) 사이토카인 *Il10* 및 *Il12b*와 케모카인 *Ccl5* 및 *Ccl22* 유전자 발현은 LPS로 성숙을 유도하지 않은 골수유래 수지상세포에 비타민 D를 처리함에 따라 유의적으로 억제되었다. 또한 *Il10*의 발현은 전체적으로 CON군보다 HFD군에서 낮았다. LPS로 자극한 골수유래 수지상세포의 *Il10* 유전자 발현에서는 고지방섭취 여부에 따라 비타민 D의 효과가 달랐다. 10 nM의 비타민 D를 처리한 경우, CON군에서는 *Il10* 발현이 증가하였으나 HFD군에서는 이러한 효과가 없었다. *Il12b* 유전자 발현은 비타민 D 처리에 의해 억제되었으며, CON군에 비해 HFD군의 경우에서 유의적으로 낮았다. 비타민 D 처리에 의해 *Ccl5* 발현은 감소되는 경향성을, *Ccl22* 발현에서는 유의적인 억제 효과를 관찰하였다.

위의 결과를 통해 대조 마우스를 이용한 선행연구에서 제시된 바와 같이 비만 마우스에서도 비타민 D 처리에 의한 골수유래 수지상세포의 분화 및 성숙 억제 효과를 확인할 수 있었다. 또한 비만한 경우에는 골수유래 수지상세포의 성숙 정도가 높다는 것을 재확인하였다. 한편 성숙을 유도한 골수유래 수지상세포에서의 *Cd40*, *Il12b* 등의 유전자 발현이 대조 마우스의 경우보다 비만 마우스의 수지상세포에서 낮았다는 결과는 비만의 영향을 받은 수지상세포에서 T 세포를 활성화 시키기 위해 필요한 신호를 불충분하게 생성할 수 있음을 의미한다. 즉, 비만한 경우 수지상세포의 기능 부전이 발생할 가능성을 확인하였다. 한편 비만

마우스의 성숙한 수지상세포에서는 대조 마우스의 경우와 달리 비타민 D를 처리하여도 *III10* 유전자 발현 촉진 효과가 나타나지 않았다. 이는 수지상세포의 기능에 미치는 비타민 D의 효과가 비만에 의해 영향을 받았기 때문으로 보인다.

참 고 문 헌

- Adorini L, Penna G, Giarratana N, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC and Uskokovic M. "Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands." *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90(1-5): 437-441. 2004.
- Banchereau J and Steinman RM. "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392(6673): 245-252. 1998.
- Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ and Shaw S. "Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects." *J Clin Invest* 76(1): 370-373. 1985.
- Brosbol-Ravnborg A, Bundgaard B and Hollsberg P. "Synergy between vitamin D(3) and Toll-like receptor agonists regulates human dendritic cell response during maturation." *Clin Dev Immunol* 2013: 807971. 2013.
- Bscheider M and Butcher EC. "Vitamin D immunoregulation through dendritic cells." *Immunology* 148(3): 227-236. 2016.
- Cai H, Dong LQ and Liu F. "Recent Advances in Adipose mTOR Signaling and Function: Therapeutic Prospects." *Trends Pharmacol Sci* 37(4): 303-317. 2016.
- Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C and Drexhage HA. "1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes." *Eur J Endocrinol* 145(3): 351-357. 2001.
- Cho KW, Zamarron BF, Muir LA, Singer K, Porsche CE, DelProposto JB, Geletka L, Meyer KA, O'Rourke RW and Lumeng CN. "Adipose Tissue Dendritic Cells Are Independent Contributors to Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance." *J Immunol* 197(9): 3650-3661. 2016.
- de Heredia FP, Gomez-Martinez S and Marcos A. "Obesity, inflammation and the immune system." *Proc Nutr Soc* 71(2): 332-338. 2012.
- DeLuca HF. "Overview of general physiologic features and functions of vitamin D." *Am J Clin Nutr* 80(6 Suppl): 1689S-1696S. 2004.
- Enioutina EY, Bareyan D and Daynes RA. "TLR ligands that stimulate the metabolism of vitamin D3 in activated murine dendritic cells can function as effective mucosal adjuvants to subcutaneously administered vaccines."

- Vaccine 26(5): 601-613. 2008.
- Ferreira GB, van Etten E, Verstuyf A, Waer M, Overbergh L, Gysemans C and Mathieu C. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 alters murine dendritic cell behaviour in vitro and in vivo." *Diabetes Metab Res Rev* 27(8): 933-941. 2011.
- Ferreira GB, Vanherwegen A-S, Eelen G, Gutiérrez ACF, Van Lommel L, Marchal K, Verlinden L, Verstuyf A, Nogueira T and Georgiadou M. "Vitamin D3 induces tolerance in human dendritic cells by activation of intracellular metabolic pathways." *Cell reports* 10(5): 711-725. 2015.
- Fleet J, Gliniak C, Zhang Z, Xue Y, Smith K, McCreedy R and Adedokun S. "Serum Metabolite Profiles and Target Tissue Gene Expression Define the Effect of Cholecalciferol Intake on Calcium Metabolism in Rats and Mice." *J. Nutr* 138(6): 1114-1120. 2008.
- Foss YJ. "Vitamin D deficiency is the cause of common obesity." *Med Hypotheses* 72(3): 314-321. 2009.
- Fujita H, Asahina A, Komine M and Tamaki K. "The direct action of 1 α ,25(OH)₂-vitamin D3 on purified mouse Langerhans cells." *Cell Immunol* 245(2): 70-79. 2007.
- Gomaa AM and El-Aziz EA. "Vitamin D reduces high-fat diet induced weight gain and C-reactive protein, increases interleukin-10, and reduces CD86 and caspase-3." *Pathophysiology* 24(1): 31-37. 2017.
- Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ and Kumar R. "Dendritic cell modulation by 1 α ,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(12): 6800-6805. 2001.
- Griffin MD, Lutz WH, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ and Kumar R. "Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs." *Biochem Biophys Res Commun* 270(3): 701-708. 2000.
- Gysemans C, van Etten E, Overbergh L, Giulietti A, Eelen G, Waer M, Verstuyf A, Bouillon R and Mathieu C. "Unaltered diabetes presentation in NOD mice lacking the vitamin D receptor." *Diabetes* 57(1): 269-275. 2008.
- James BR, Tomanek-Chalkley A, Askeland EJ, Kucaba T, Griffith TS and Norian LA. "Diet-induced obesity alters dendritic cell function in the presence and

- absence of tumor growth." *J Immunol* 189(3): 1311-1321. 2012.
- Karlsson EA, Sheridan PA and Beck MA. "Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection." *J Immunol* 184(6): 3127-3133. 2010.
- Kundu R, Chain BM, Coussens AK, Khoo B and Noursadeghi M. "Regulation of CYP27B1 and CYP24A1 hydroxylases limits cell-autonomous activation of vitamin D in dendritic cells." *Eur J Immunol* 44(6): 1781-1790. 2014.
- Lagunova Z, Porojnicu AC, Lindberg F, Hexeberg S and Moan J. "The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season." *Anticancer Res* 29(9): 3713-3720. 2009.
- Lisse TS and Hewison M. "Vitamin D: a new player in the world of mTOR signaling." *Cell Cycle* 10(12): 1888-1889. 2011.
- Lutz MB and Schuler G. "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" *Trends Immunol* 23(9): 445-449. 2002.
- Macia L, Delacre M, Abboud G, Ouk TS, Delanoye A, Verwaerde C, Saule P and Wolowczuk I. "Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice." *J Immunol* 177(9): 5997-6006. 2006.
- Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH and Jonuleit H. "Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells." *Immunol Cell Biol* 80(5): 477-483. 2002.
- Manicassamy S and Pulendran B. "Dendritic cell control of tolerogenic responses." *Immunol Rev* 241(1): 206-227. 2011.
- Mellman I and Steinman RM. "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* 106(3): 255-258. 2001.
- Milner JJ and Beck MA. "The impact of obesity on the immune response to infection." *Proc Nutr Soc* 71(2): 298-306. 2012.
- Mora JR, Iwata M and von Andrian UH. "Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage." *Nat Rev Immunol* 8(9): 685-698. 2008.
- Murphy KP, Travers P, Walport M and Janeway C. Janeway's Immunobiology, Garland Science. 2008.
- O'Shea D, Corrigan M, Dunne MR, Jackson R, Woods C, Gaoatswe G, Moynagh PN, O'Connell J and Hogan AE. "Changes in human dendritic cell number and

- function in severe obesity may contribute to increased susceptibility to viral infection." *Int J Obes (Lond)* 37(11): 1510-1513. 2013.
- Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S and Adorini L. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells." *J Immunol* 178(1): 145-153. 2007.
- Penna. G and Adorini L. "1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells." *J Immunol* 164(5): 2405-2411. 2001.
- Reis e Sousa C. "Dendritic cells in a mature age." *Nat Rev Immunol* 6(6): 476-483. 2006.
- Samartín S and Chandra RK. "Obesity, overnutrition and the immune system." *Nutrition Research* 21(1): 243-262. 2001.
- Sato K and Fujita S. "Dendritic cells: nature and classification." *Allergol Int* 56(3): 183-191. 2007.
- Sim WJ, Ahl PJ and Connolly JE. "Metabolism Is Central to Tolerogenic Dendritic Cell Function." *Mediators Inflamm* 2016: 2636701. 2016.
- Singer K, DelProposto J, Morris DL, Zamarron B, Mergian T, Maley N, Cho KW, Geletka L, Subbaiah P, Muir L, Martinez-Santibanez G and Lumeng CN. "Diet-induced obesity promotes myelopoiesis in hematopoietic stem cells." *Mol Metab* 3(6): 664-675. 2014.
- Smith AG, Sheridan PA, Tseng RJ, Sheridan JF and Beck MA. "Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8+ T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus." *Immunology* 126(2): 268-279. 2009.
- Steinman RM and Cohn ZA. "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* 137(5): 1142-1162. 1973.
- Szeles L, Keresztes G, Torocsik D, Balajthy Z, Krenacs L, Poliska S, Steinmeyer A, Zuegel U, Pruenster M, Rot A and Nagy L. "1,25-dihydroxyvitamin D3 is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype." *J Immunol* 182(4): 2074-2083. 2009.
- Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, Ishida T and

- Hirata K. "Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(12): 2495-2503. 2010.
- van der Does AM, Kenne E, Koppelaar E, Agerberth B and Lindbom L. "Vitamin D3 and phenylbutyrate promote development of a human dendritic cell subset displaying enhanced antimicrobial properties." *J Leukoc Biol* 95(6): 883-891. 2014.
- van Etten E, Dardenne O, Gysemans C, Overbergh L and Mathieu C. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 alters the profile of bone marrow-derived dendritic cells of NOD mice." *Ann N Y Acad Sci* 1037: 186-192. 2004.
- van Etten E and Mathieu C. "Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts." *J Steroid Biochem Mol Biol* 97(1-2): 93-101. 2005.
- Vanherwegen AS, Ferreira GB, Smeets E, Yamamoto Y, Kato S, Overbergh L, Gysemans C and Mathieu C. "The phenotype and function of murine bone marrow-derived dendritic cells is not affected by the absence of VDR or its ability to bind 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3." *J Steroid Biochem Mol Biol* 164: 239-245. 2016.
- Vanlint S. "Vitamin D and obesity." *Nutrients* 5(3): 949-956. 2013.
- Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E and Shoenfeld Y. "Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander." *Autoimmun Rev* 13(9): 981-1000. 2014.
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z and Holick MF. "Decreased bioavailability of vitamin D in obesity." *Am J Clin Nutr* 72(3): 690-693. 2000.
- Wu L and Liu YJ. "Development of dendritic-cell lineages." *Immunity* 26(6): 741-750. 2007.

Abstract

The Effects of Vitamin D on Differentiation and Maturation of Bone Marrow-derived Dendritic Cells from High-Fat Diet-induced Obese Mice

Kyeong Sun Cha

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Vitamin D has been reported to regulate maturation and function of dendritic cells (DCs). Obesity has been shown to be associated with dysregulation of vitamin D metabolism and impaired DCs function. We investigated the effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment on phenotype and expression of genes related to function in bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) from control and high fat diet (HFD)-induced obese mice. Five weeks old C57BL/6N mice were fed control diet (10% kcal fat, CON) or HFD (45% kcal fat) for 15 weeks. Bone marrow cells were isolated and cultured with rmGM-CSF (20 ng/mL) for 7 days to generate BMDCs with or without 1,25(OH)₂D₃ (0, 1 or 10 nM). To induce maturation, differentiated DCs were cultured with LPS (50 ng/mL) during the last 24 h. The surface expression of CD11c, MHC class II, CD80, and CD86 on BMDCs was measured by FACS analysis. The mRNA levels of *Cd40*, *Cd83*, and *Ccr7* were determined by real-time PCR as maturation markers. The expression of *Il10*, *Il12b*, *Ccl5*, and

Ccl22 was determined for cytokine and chemokine production of DCs. 1,25(OH)₂D₃ at 10 nM concentration inhibited BMDCs differentiation (CD11c⁺ %) and decreased the percentage of mature DCs (MHCII^{high}CD11c⁺ and CD86^{high}CD11c⁺ cells) in CON and HFD groups. The expression of MHC class II and CD86 in LPS-stimulated BMDCs was higher in the HFD groups compared with the CON groups. Expression of *Cd40*, *Cd83*, and *Ccr7* was suppressed by 1 and 10 nM of 1,25(OH)₂D₃ treatment. The *Il10* expression in stimulated BMDC from the CON group was increased by 104% with 10 nM 1,25(OH)₂D₃ treatment, but not in those from the HFD group. Despite the increased population of mature DCs, *Il12b* mRNA levels in stimulated BMDCs were lower in the HFD group compared with the CON group (49% lower in vehicle treated groups and 78% lower in 10 nM 1,25(OH)₂D₃ treated groups). 1,25(OH)₂D₃ inhibited differentiation and maturation of BMDCs from control and obese mice. LPS-stimulated BMDCs from obese mice had elevated surface expression of MHC class II and CD86 and diminished *Il12b* expression, which might suggest DC malfunction associated with obesity. The differential *Il10* expression response to 1,25(OH)₂D₃ treatment in LPS-stimulated BMDCs also indicate the impact of obesity on BMDC function.

Keywords: vitamin D; obesity; bone marrow-derived dendritic cell;
maturation; *Il10*

Student Number: 2015-21710