



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPAR $\gamma$ pathway                                |
| Author(s)    | 川井, 正信                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2007, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/47474">https://hdl.handle.net/11094/47474</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                                    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | かわい まさのぶ<br>川 井 正 信                                                                                                                                                                |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                          |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 0 9 6 1 号                                                                                                                                                                      |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 19 年 3 月 23 日                                                                                                                                                                   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br><br>医学系研究科生体統合医学専攻                                                                                                                                             |
| 学 位 論 文 名     | Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPAR $\gamma$ pathway<br>(成長ホルモンは Stat5A/5B-PPAR $\gamma$ 経路を介して 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を刺激する) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 大 藁 恵 一<br><br>(副査)<br>教 授 宮 崎 純 一      教 授 下 村 伊 一 郎                                                                                                                  |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [ 目 的 ]

成長ホルモン (growth hormone : GH) 欠損症児の脂肪組織では、脂肪細胞数の減少と脂肪細胞サイズの増大を認め、GH 補充により改善する。GH 補充により脂肪細胞数が正常化することから、GH は脂肪細胞分化促進作用を持つと考えられる。また、GH の下流シグナルである signal transducer and activator of transcription (Stat) 5A/5B のノックアウトマウスでは、脂肪組織量が野生型の 20%に減少しており、GH は Stat5A/5B を介して脂肪細胞分化を促進することが示唆される。しかし、GH の脂肪細胞分化促進作用機序に関しては不明な点が多い。今回、我々は GH の脂肪細胞分化促進作用機序に関して、GH-Stat5A/5B シグナル経路の役割を中心に検討を行った。

#### [ 方法ならびに成績 ]

前脂肪細胞セルラインである 3T3-L1 細胞を用いた。この細胞は、MDI (3-isobutyl-1-methylxanthin : 0.5 mM、dexamethasone : 1  $\mu$  M、insulin : 5  $\mu$  g/ml) で処理すると脂肪細胞分化が誘導される。また、GH は胎仔ウシ血清に含有されているため、無血清培地 (5  $\mu$  g/ml insulin、5  $\mu$  g/ml transferrin、2 nM triiodothyronine、30 ng/ml epidermal growth factor、1  $\mu$  M biotin、and 200  $\mu$  g/ml fetuin) を導入した。脂肪滴を染色するオイルレッド O 染色で検討したところ、無血清培養下で、GH は MDI による脂肪細胞分化を促進した。その際、GH は脂肪細胞分化マーカーである CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)  $\beta$  /  $\delta$  の発現誘導には変化を与えなかったが、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  2 の発現を早期に誘導した。次に、GH の脂肪細胞分化促進作用における Stat5 の役割を検討するために、脂肪細胞分化過程における Stat5 の細胞内局在を検討した。Stat5 は GH 添加群において分化誘導後 3 時間で核内での発現を認めたが、GH 非添加群でも分化誘導 24 時間以降に核内での発現を認めた。以上から、脂肪細胞分化過程では GH 依存性と非依存性の Stat5 活性化機序が存在すると考えられた。Stat5 の GH の脂肪細胞分化促進作用における役割の検討を行うため、GH-Stat5A/5B の両経路を競合的に阻害する Stat5A 変異体 (Stat5A-YF) を作成した。アデノウイルスベクターを用い、Stat5A-YF を強制発現させると、Stat5-YF は GH の脂肪細胞分化促進作用を抑制し、PPAR $\gamma$  2 の誘導を抑制した。また、Stat5A/5B を強制発現させると脂肪細胞

分化を促進し、PPAR $\gamma$ 2 の発現を増強した。次に Stat5 と C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ 、PPAR $\gamma$  の相互作用を検討するため、アデノウイルスベクターを用いて C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ 、PPAR $\gamma$  を強制発現させ脂肪細胞分化を誘導し、Stat5 を共発現させ検討を行った。Stat5A/5B は C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  による脂肪細胞分化を促進し、PPAR $\gamma$  プロモーターに対する C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  の転写活性を増強した。また、Stat5 は PPAR $\gamma$  で誘導される脂肪細胞分化も促進し、PPAR $\gamma$  の転写活性を増強した。次に GH の脂肪細胞分化促進作用を網羅的に解析するため、MDI による脂肪細胞分化誘導下で GH の影響を受ける遺伝子をマイクロアレイにて解析した。検索した 4,277 遺伝子のうち、18 遺伝子が発現増強し、19 遺伝子が減弱していた。発現増強群には PPAR $\gamma$  が含まれていた。また、成長因子やその受容体をコードする遺伝子の発現が変化しており、GH の作用が cell growth の調節を介している可能性が示唆された。

[ 総 括 ]

GH-Stat5A/5B シグナル伝達経路は、2つの異なる段階（1、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  の転写活性を増強 2、PPAR $\gamma$  の転写活性の増強）を経て脂肪細胞分化を促進することが明らかとなった。また、マイクロアレイの解析から、GH の脂肪細胞分化に関する新しい知見が得られる可能性があると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

成長ホルモン（GH）欠損症患者では、脂肪細胞数が減少しており、GH 補充により正常化する。このことは、GH の脂肪細胞分化促進作用を示唆するが、その詳細な機序は不明である。GH は MDI による 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を促進し、この作用はドミナントネガティブ Stat5 により抑制された。次に、Stat5A/B と C/EBP $\beta/\delta$ 、PPAR $\gamma$  の相互作用を検討した。Stat5A/B は C/EBP $\beta/\delta$  により誘導される脂肪細胞分化を促進し、PPAR $\gamma$  プロモーターにおける C/EBP $\beta/\delta$  の機能を増強した。また、Stat5A/B は PPAR $\gamma$  により誘導される脂肪細胞分化を促進し、PPAR $\gamma$  の転写活性を増強した。更に、脂肪細胞分化過程で GH により発現が変化する遺伝子の検索をマイクロアレイで行った。成長因子やその受容体の遺伝子の発現が変化していた。この論文は、GH の脂肪細胞促進作用の機序を明らかにしたという点で学位に値すると思われる。