



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The effect of hibernating phase serum on osteoclastogenic and osteogenic differentiation in-vitro in Japanese black bears [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Nasoori, Alireza
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14547号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81653
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Alireza_Nasoori_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：Alireza Nasoori

審査委員	主査	教授	坪	田	敏	男
	副査	教授	滝	口	満	喜
	副査	准教授	岡	松	優	子
	副査	准教授	下	鶴	倫	人

学位論文題名

The effect of hibernating phase serum on osteoclastogenic and osteogenic differentiation *in-vitro* in Japanese black bears (ツキノワグマにおける *in-vitro* での破骨細胞および骨芽細胞への分化に対する冬眠期血清の効果)

冬眠は、特定の動物種で見られる謎の多い生理学的反応である。冬眠中の哺乳類は、環境温度の低下や食物不足に対応してエネルギーを節約するために代謝を低下させる。寒冷という厳しい気候条件に対して、冬眠中の哺乳類は長期間冬眠穴に身を隠すのである。冬眠中のクマは、他の冬眠性哺乳類とは異なり、食物の摂取、排泄および排尿をせずに、およそ 4～5 ヶ月間活動を停止する。これに匹敵する状態は、人や他の動物種では深刻な健康問題を引き起こす可能性がある。クマの不使用性骨粗鬆症に対する耐性について、画像検査、組織学的検査ならびに生化学的検査により、さまざまな研究者によって研究がなされてきた。それによると、冬眠中のクマの骨格系は、長期の運動不足や餌の摂取不足、さらには排泄しないことなどの影響をほとんど受けないことが明らかにされている。これらのことから、冬眠中のクマは、冬眠期を通じて安定したホメオスタシスを維持していると言える。

本研究では、クマ由来の血清を添加してクマ由来の細胞を *in-vitro* 条件下で培養し、クマ血清が冬眠状態を引き起こすかどうかを知ることが目的とした。そのために、*in-vitro* で破骨細胞化および骨形成分化（骨芽細胞化）する末梢血単核細胞（PBMC）および脂肪由来幹細胞（ADSC）をそれぞれ使用した。試料は、麻酔導入後の飼育下ニホンツキノワグマ（*Ursus thibetanus japonicus*、以下クマと略）から採取した。PBMC および ADSC を単離した後、第 1 章および第 2 章に記載されているように、細胞を適切な培地で培養した。

第 1 章では、3 頭のクマから単離した PBMC を用いた。各クマの PBMC は、4 頭の活動期クマと 4 頭の冬眠期クマの 10% 血清で個別に培養された（各クマの血清はクマ 1 頭からの PBMC で評価された）。PBMC は、破骨細胞形成因子であるマ

クロファージコロニー刺激因子および NF- κ B リガンド受容体活性化因子を添加した培地で培養された。細胞は、培地を用いて 37°C、5%CO₂ 下で 11 日間培養された。活動期クマ血清で培養した PBMC は、多核化した細胞形態と tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色陽性で特徴づけられる破骨細胞様細胞に完全に分化していた。しかし、冬眠期クマ血清で培養した PBMC は破骨細胞様細胞を形成せず、活動期血清と比較して TRAP 染色の程度が有意に低かった。

第 2 章では、3 頭のクマから単離した ADSC を用いた。各クマ ADSC は、活動期 7 頭と冬眠期 7 頭のクマ 10%血清で個別に培養された（各クマの血清はクマ 1 頭からの ADSC で評価された）。ADSC は、デキサメタゾン、L-アスコルビン酸および β -グリセロリン酸を添加した培地で培養された。細胞は、培地を用いて 37°C、5%CO₂ 下で 34 日間培養された。アリザリンレッド、アルカリフォスファターゼおよびシリウスレッド染色された骨形成分化は、活動期クマ血清で培養した細胞と冬眠期クマ血清で培養した細胞との間で、14 日目、24 日目および 34 日目において類似していた。

第 1 章と第 2 章の結果を総合すると、冬眠期クマ血清は破骨細胞の形成を阻害する一方で、正常な（活動期クマ血清と同様の）骨形成分化作用を有しており、冬眠期クマ血清は両方の効果を示すことが示唆された。これらの結果は、冬眠中に骨量を維持するためのメカニズムとして、骨形成が進行している一方で破骨細胞の形成が抑制されていることを示している。このことは、冬眠中のクマが骨減少症や骨粗鬆症にならないことを示した過去の研究と一致するものである。また、本研究の結果は、冬眠期クマ血清を *in-vitro* で使用することで冬眠に似た状態を作ることができる可能性を示したと言える。さらに、*in-vitro* 試験を利用することで、クマの健康や動物福祉への影響を最小限に抑えてクマの冬眠研究を可能とすることも示すことができた。

本研究で得られた知見は、冬眠中のクマの生理学と恒常性反応をさらに研究することの重要性を示した。このような研究は、生物学的・医学的分野に重要な洞察をもたらすであろう。さらに、新たな発見の源としての野生生物の重要性を示しており、野生生物は保護されなければならない資産であることを示している。

以上、本研究により、飼育下ツキノワグマから採取した血液および脂肪組織を用いた *in-vitro* 試験において、冬眠中の骨吸収と骨形成に関する重要な知見を得ることができた。また、クマ類の PBMC および ADSC の細胞培養実験系を確立することができた。これらの研究成果は、クマ類の冬眠の生理・代謝機構の解明に貢献するとともに、冬眠という生命科学を解き明かす上で一つのエポックを築いたといえよう。よって審査員一同は、上記学位論文提出者アリレザ・ナスーリ (Alireza Nasoori) 氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。