

## 論文内容要旨（甲）

論文題名 選択的 COX-2 阻害薬の破骨細胞分化過程に及ぼす阻害効果

掲載雑誌名 昭和学会雑誌 第 74 巻 3 号 (2014 年) 掲載予定

病理系薬理学 (医科薬理学分野) 専攻 龍 家圭

炎症性サイトカインや機械的刺激により誘導されるプロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) は、骨代謝に重要な役割を持つことが報告されている。COX-2 により生成されるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は、骨芽細胞を介して間接的に破骨細胞形成に作用するばかりでなく、その受容体を介して破骨細胞分化に直接影響するとされる。しかしながら、他の細胞の混入の可能性のない条件化での COX-2 阻害による作用の報告はない。マクロファージ系株細胞である RAW264.7 細胞は単独で破骨細胞に分化する細胞である。本研究は、RAW264.7 細胞を用いて選択的 COX-2 阻害薬であるセレコキシブの *in vitro* での破骨細胞分化抑制過程における影響を明らかにすることを目的として行った。

マクロファージ株細胞である RAW264.7 細胞に、可溶性 NF- $\kappa$ B リガンド (100 ng/ml) を添加し、37°C、湿度 95%、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養を行い、6 日間培養することによって、破骨細胞へと分化誘導する実験系を使用した。培養後、細胞を固定し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色陽性で核が 3 個以上の多核細胞を破骨細胞として、形成された破骨細胞数を計測した。その結果、セレコキシブ添加群 (2.5~10  $\mu$ M) は、濃度依存的に破骨細胞形成数が減少した。また活性型破骨細胞の指標となるアクチンリングを持つ破骨細胞数もセレコキシブ濃度依存的に顕著に減少した。骨吸収評価のため、Corning Osteo Assay Surface microplate (CORNING

社、米国) を使用した。このプレート上で、破骨細胞誘導実験と同じ条件で培養した。培養細胞は RAW264.7 細胞と ddY マウスの大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞を用いた。これらの細胞を 8 日間培養した。セレコキシブは、0、2.5、10  $\mu\text{M}$  を培養開始時より添加させ、培地交換時も同様に添加した。8 日間の培養後に細胞を除去し、骨吸収評価のために Von Kossa 染色を行った。RAW264.7 細胞由来の破骨細胞は骨吸収活性が低かった。骨髄細胞由来の破骨細胞は、骨吸収活性が強く、セレコキシブ未添加群では、骨吸収率は 92.32%を示した。骨髄細胞由来の破骨細胞の骨吸収率はセレコキシブ濃度依存的に減少した。

本研究により、混入細胞のない単一の細胞である RAW264.7 細胞株から破骨細胞誘導分化する実験系に、COX-2 選択的阻害薬であるセレコキシブを添加することで、破骨細胞が発現する COX-2 を標的とした破骨細胞分化抑制が認められた。したがって、COX-2 活性阻害を介して、マクロファージ系株細胞から破骨細胞への分化を抑制する経路が明らかにされた。