

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

昭和大学医学部薬理学講座（医科薬理学部門）

龍 家 圭 小口 勝司

昭和大学医学部薬理学講座（臨床薬理学部門）

三邊 武彦

昭和大学歯学部歯科薬理学講座

天 野 均

昭和大学薬学部社会健康薬学講座（医薬品評価薬学部門）

亀井 大輔 岩井 信市

（平成 26 年 6 月 28 日）

昭和学会雑誌第 74 巻第 3 号別刷

原 著 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

昭和大学医学部薬理学講座 (医科薬理学部門)

龍 家 圭 小口 勝司

昭和大学医学部薬理学講座 (臨床薬理学部門)

三 邊 武彦

昭和大学歯学部歯科薬理学講座

天 野 均

昭和大学薬学部社会健康薬学講座 (医薬品評価薬学部門)

亀井 大輔 岩井 信市*

抄録：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 E₂ (PGE₂) 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。本研究は、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の機序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- κ B リガンド (sRANKL; 100 ng/ml) を添加し 6 日間培養することによって、破骨細胞へ分化誘導する実験系を使用した。酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色陽性の核が 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測定した。セレコキシブ添加群 (2.5 ~ 10 μ M) は、濃度依存的に破骨細胞形成数が減少した。活性化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顕著に濃度依存的に減少した。ハイドロキシアパタイトコーティングした培養皿を用いた実験系においても、セレコキシブは濃度依存的にマウス骨髄細胞由来破骨細胞による吸収窩形成を抑制した。本研究により、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。

キーワード：破骨細胞, RAW264.7, COX-2 選択的阻害薬, セレコキシブ

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は骨形成と骨吸収の両方にとっても関わっている化合物であることは知られている¹⁾。破骨細胞分化に対する PGE₂ の影響は、マクロファージコロニー刺激因子-1 (CSF-1/M-CSF) と可溶性 NF- κ B リガンド (sRANKL) の存在下でのマウス骨髄細胞から破骨細胞分化において、PGE₂ 添加により細胞に発現する PGE₂ 受容体を介した情報伝達系の観察をすることによって示された²⁾。骨組織では、骨吸収刺激により産生される IL-1, IL-6 および TNF- α を含むサイトカインの存在下にて、cyclooxygenase-2 (COX-2) によって、

骨芽細胞や間質細胞のアラキドン酸から PGE₂ は産生される³⁻⁵⁾。最近の研究では、骨芽細胞よりも破骨細胞において COX-2 の局在が恒常的かつ強力に認められた⁶⁾。

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は、歯科臨床において、歯の痛みを減少させ、急性・慢性の歯周炎治療を目的に使用される。Karakawa らは、COX 非選択的阻害薬である 2-(2, 6-dichloroanilino)-phenylacetate (ジクロフェナクナトリウム) は、NF- κ B の転写を抑制することによって、破骨細胞分化抑制を行うことを示した⁷⁾。一方、Mofezolac

*責任著者

(選択的 COX-1 阻害薬) は、骨吸収を抑制しなかった⁸⁾。4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide (セレコキシブ) は、COX-2 にみられる疎水性ポケットと強く結合するようにドラッグデザインされた⁹⁾。そのため、COX-1 を阻害しない濃度で、ヒトに初めて使用することが許可された COX-2 選択的、かつ強力に阻害する新しいタイプの抗炎症薬である¹⁰⁾。セレコキシブは、リウマチ様関節炎 (RA) と骨関節炎 (OA) の患者に治療薬として、広く使用されている¹¹⁻¹³⁾。Igarashi らは、セレコキシブが新生児マウス頭蓋冠骨からのカルシウム放出が抑制されること、炎症性サイトカインによって刺激された骨髄細胞と骨芽細胞の共培養系を用いた破骨細胞分化誘導を抑制されることを示した¹⁰⁾。その為、彼らは、骨芽細胞が COX-2 阻害薬の標的であるとした。しかしながら、COX-2(-/-) マウスにおいては、生体内の PGE₂ 産生の減少と骨組織中の破骨細胞形成抑制に伴う骨吸収抑制を示した^{14,15)}。このことから COX-2 遺伝子が、破骨細胞形成に直接抑制的な関与している可能性がある。COX 阻害薬が、破骨細胞に直接作用して分化抑制するのか、骨芽細胞を介する間接作用であるのかは、未だ不明である。

本研究は COX-2 選択的阻害薬であるセレコキシブの、破骨細胞分化抑制の作用機序を明確にさせることを目的に行った。

研究方法

1. 細胞と材料

マクロファージ系の株細胞である RAW264.7 細胞は ECACC (英国) より購入した。マウスは、東京実験動物 (東京) より購入し、実験は「昭和大学動物実験実施指針」に基づき行った (承認番号; 13041)。セレコキシブは、Sigma-Aldrich 社 (MO, 米国) から購入した。CSF-1/M-CSF および sRANKL は Peprotech 社 (NJ, 米国) より購入した。

2. 破骨細胞形成

96 穴プラスチックプレートに α MEM (pH7.0) 10% FBS 培地を 150 μ l/well 加え、RAW264.7 細胞を 2×10^3 個/well になるよう細胞浮遊液をよく混和しながら加えた。そこに sRANKL 100 ng/ml、セレコキシブ最終濃度が 2.5, 5, 10 μ M になるよう添加した。37°C、湿度 95%、5% CO₂ 存在下で

培養を行い、培地は 3 日に一度交換した。培養 6 日後、4% パラホルムアルデヒドで固定した。

3. ローダミンファロイジンおよび TRAP 染色

活性型破骨細胞への分化を調べる目的で、F-アクチンの局在を観察した。固定した細胞を PBS で洗浄した後、0.1% Triton X 溶液を加え 5 分間暗所に静置した。その後 PBS で再び洗浄し 0.3 mM rhodamine-conjugated phalloidin を加え、F-アクチンを染色した。リング状に形成された F-アクチンバンドは Zeiss Axiophot 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss AG, ドイツ) の下に観察した。リング状構造を持つ破骨細胞の数をカウントし、アクチンリング数とした。

酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色は 50 mM 酒石酸含有緩衝液を用いて 37°C で 15 分間インキュベートすることで破骨細胞を染色した。光学顕微鏡下で TRAP 陽性多核細胞のうち、3 核以上のものを破骨細胞としてカウントした。

4. 骨吸収評価

破骨細胞形成と同じ条件で、RAW264.7 細胞を Corning Osteo Assay Surface Polystyrene 1 \times 8 Stripwell 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 8 日間培養した。さらに ddY マウス (5 週齢) の大腿骨と脛骨から Sepadex G10 カラム (GE ヘルスケア・ジャパン; 東京) により骨髄細胞を採取した。この細胞 (1×10^5 個/well) を 15% FBS, CSF-1/M-CSF (25 ng/ml) および sRANKL (100 ng/ml) を添加し、37°C、湿度 95%、5% CO₂ 飽和の CO₂ インキュベーターで 8 日間培養し、培地は 2 日おきに交換を行った。セレコキシブは、0, 2.5, 10 μ M で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、超純水にて洗浄、1 M アンモニア水にて 1 晩固定した。骨吸収評価のために Von Kossa 染色を行うために、5% 硝酸銀を添加後、紫外線光源下で 60 分間室温で放置したのちに、5% チオ硫酸ナトリウム溶液にて処理、最後に超純水にて洗うことによって、Stripwell microplate の未吸収部分が黒色に染色され、吸収部位は透明になった。吸収領域は光学顕微鏡にて観察後、Adobe Photoshop Elements 9 (Adobe Systems 社, 米国) を使用することにより吸収した面積を定量化した。

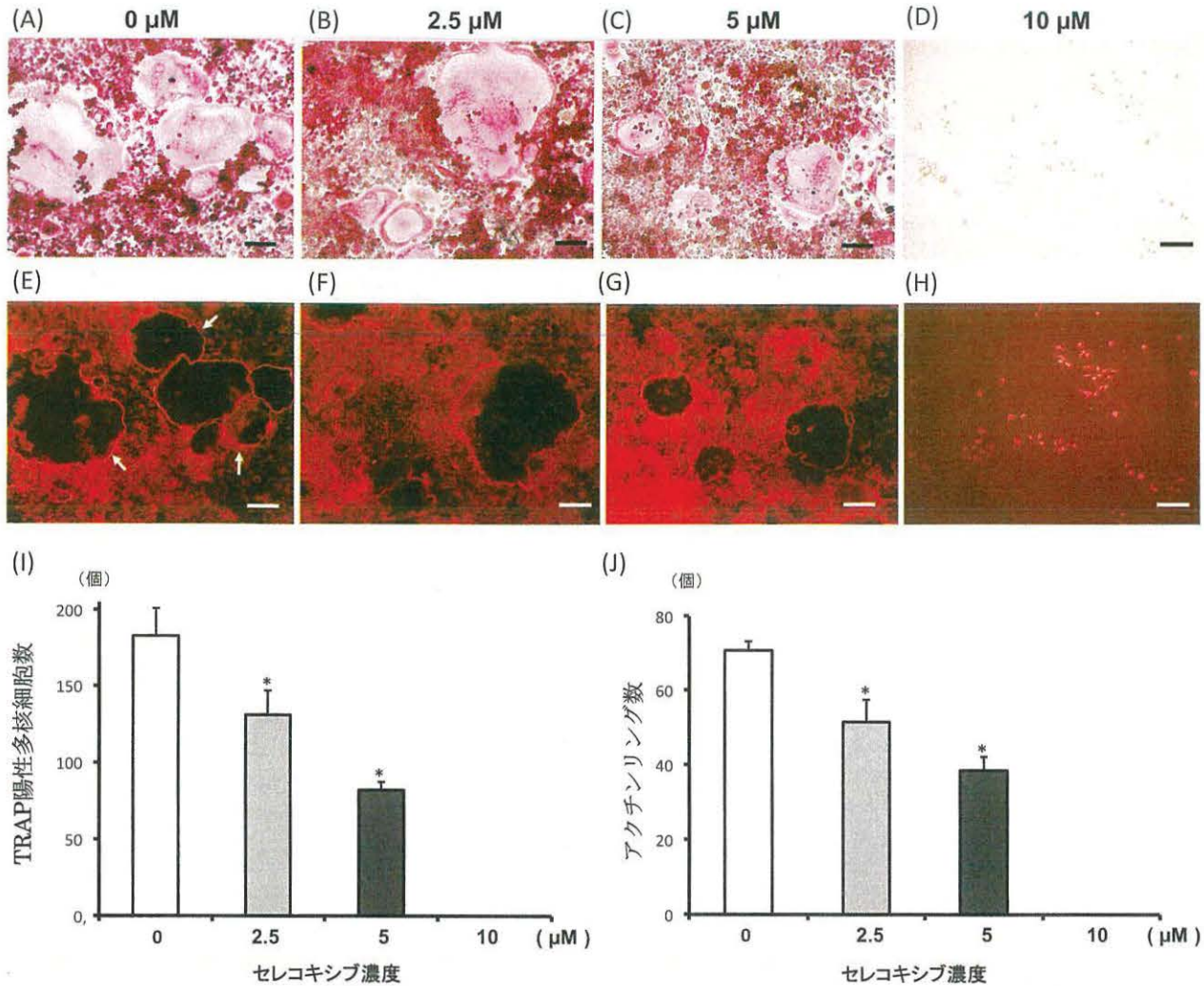


図1 RAW264.7細胞を用いた破骨細胞誘導

RAW264.7細胞を96穴プレートに 2×10^3 個/wellになるよう播種し, sRANKL 100 ng/ml添加し, 6日間培養した. A, E: セレコキシブ未添加群 (0 μM), B, F: セレコキシブ 2.5 μM 添加群, C, G: セレコキシブ 5 μM 添加群, D, H: セレコキシブ 10 μM 添加群. A~D: 培養6日後のTRAP染色像(赤色) E~H: 同部位のローダミンファロイジン染色像. 白矢印はリング状に蛍光発色しているアクチンリングを示す(E). 図のスケールは200 μMを示す. (I)はTRAP陽性かつ3核以上の多核細胞の数を縦軸に, セレコキシブの濃度を横軸とした. (J)は活性化している破骨細胞の指標となるアクチンリング数を縦軸に, セレコキシブの濃度を横軸とした. (I, J)のグラフの値は, 平均値±標準誤差で示した. n = 6. *: p < 0.05 vs セレコキシブ 0 μM

5. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した. 統計分析には, 統計ソフトウェアPASW Statistics18 (日本IBM社, 東京)を使用し, 統計学的有意差はp値 < 0.05を持って統計学的有意差ありと判定した. 多群間における統計学的な有意差解析は, 一元配置分散分析を用いてBonferroniの補正を行った.

結果

1. RAW264.7細胞培養による破骨細胞分化

本研究の条件下にてRAW264.7細胞の培養を行うと6日目において多核巨大破骨細胞を認めた. それらをTRAP染色にて観察した. セレコキシブの濃度の上昇により, 形成された破骨細胞が小さくなることが観察された(図1A~D). 同様にローダミンファロイジン染色による蛍光観察において, 活

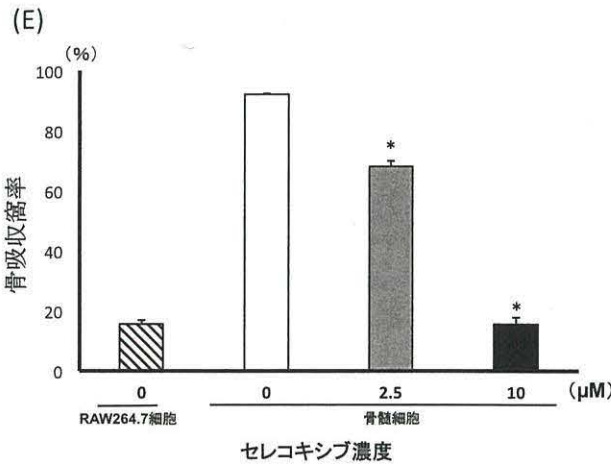
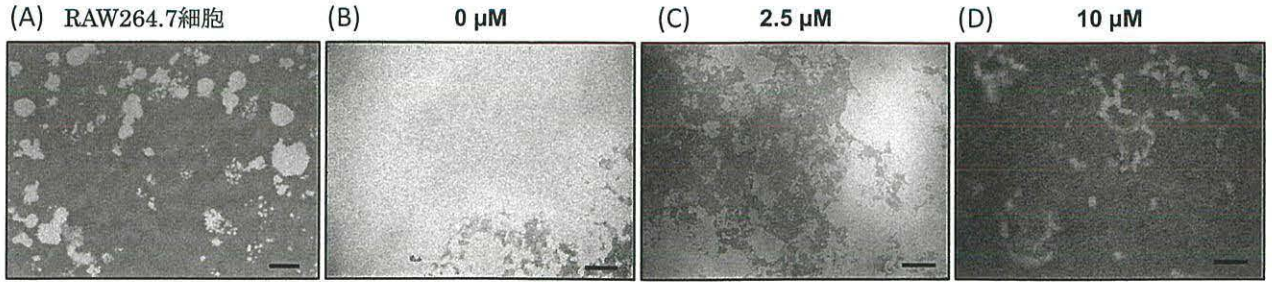


図 2 骨吸収能評価

骨吸収能評価は Corning Osteo Assay Surface Polystyrene 1 × 8 Stripwell microplate を使用した。このプレート上で RAW264.7 細胞またはマウス骨髄細胞を、破骨細胞誘導実験と同じ条件で 8 日間の培養後に、von Kossa 染色を施した。プレートのコーティングされているハイドロキシアパタイト部分は黒く染まる（未吸収部分）。白く抜けている部分は骨吸収窩である。A：RAW264.7 細胞による骨吸収窩。B～D：骨髄細胞由来の破骨細胞における骨吸収窩。A, B：セレコキシブ未添加群（0 μM）。C：セレコキシブ 2.5 μM 添加群。D：セレコキシブ 10 μM 添加群。図のスケールは 200 μm を示す。(E) は破骨細胞による骨吸収領域割合を示したグラフである。縦軸に骨吸収窩率、横軸にセレコキシブ濃度とした。グラフの値は、平均値 ± 標準誤差で示した。n = 6。* : p < 0.05 vs 骨髄細胞セレコキシブ 0 μM

性化している破骨細胞の指標となるアクチンリング数も、セレコキシブの濃度依存的に、リングのサイズおよび数が減少した（図 1E～H）。また実際の細胞数を計測したところ、破骨細胞形成数はセレコキシブ 0 μM のとき 183.0 ± 17.85 個であった。セレコキシブ濃度依存的に数は減少、セレコキシブ 2.5 μM のとき 139.50 ± 27.32 個、セレコキシブ 5 μM のとき 88.83 ± 11.71 個、セレコキシブ 10 μM では観察できなかった（図 1I）。アクチンリング数も同様にセレコキシブ濃度依存的に数は減少、セレコキシブ 0 μM のとき 69.17 ± 3.16 個、セレコキシブ 2.5 μM のとき 59.33 ± 9.98 個、セレコキシブ 5 μM のとき 41.0 ± 4.40 個、セレコキシブ 10 μM では観察できなかった（図 1J）。

2. セレコキシブの骨吸収抑制

RAW264.7 細胞での骨吸収評価実験は、セレコキシブを添加していない群において、骨吸収がわずかであった。従って、セレコキシブによる骨吸収能抑制が明瞭には観察できなかった（図 2A）。そこで、初代骨髄細胞より破骨細胞へ分化させた実験系を用いた。その骨吸収能は、光学顕微鏡下での観察において、骨吸収能の低下が顕著であり、von Kossa 染

色されたプレートの、黒い部分が未吸収部位、白く抜けている部分が吸収窩であるが、その吸収窩がセレコキシブの濃度上昇につれて減少し、プレートが黒くなっていく様子が観察された（図 2B～D）。RAW264.7 細胞を用いた実験でセレコキシブ 0 μM は、骨吸収率 15.65 ± 1.31% であったのに対して、骨髄細胞由来の破骨細胞でセレコキシブ 0 μM のとき、92.32 ± 0.25% の骨吸収率を示した。セレコキシブ 2.5 μM では骨吸収率 68.15 ± 1.87%、セレコキシブ 10 μM では骨吸収率 15.59 ± 2.24% であり濃度依存性が認められた（図 2 E）。

考 察

われわれは、今回セレコキシブが濃度依存的に前破骨細胞様細胞から破骨細胞に分化することを抑制することを明らかにした。RAW264.7 細胞株、混入細胞のない単一の細胞から破骨細胞誘導分化し、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 を標的とした結果であることを示した。Kawashima らのヒト単球細胞を用いた研究報告によるとセレコキシブは 50 μM の濃度でも細胞毒性が認められていない⁸⁾。

また、本研究でも RAW264.7 細胞株の破骨細胞分化以外の形態変化は認められなかった。したがって、セレコキシブの細胞毒性による破骨細胞分化抑制ではなく、COX-2 阻害作用によるものであると考える。さらに、マウスの骨髄細胞由来の実験系では、100%の単一細胞ではないため、少なからず含まれている間質細胞を初めとした様々な細胞の影響の可能性を否定できない。しかしながら、RAW264.7 細胞による破骨細胞誘導系は、誘導された破骨細胞の骨吸収活性が低いことが示された (図 2 A, E)。従って、RAW264.7 細胞由来の破骨細胞が COX-2 選択的阻害薬による、骨吸収抑制を示すことが出来なかった。これにより、骨吸収能評価の実験系においてはマウスの骨髄細胞を使用した。骨髄細胞由来の破骨細胞による骨吸収能は高く、8 日間の培養によってプレートのおよそ 92% の領域は骨吸収されていた (図 2B, E)。

PGE₂ 合成にかかわっていることが報告されている prostaglandin E synthases (PGESs) には、cytosolic PGES (cPGES), microsomal PGES-1 (mPGES-1), そして mPGES-2 という 3 つのタイプがある¹⁶⁾。とくに mPGES-1 は、炎症性刺激にたいして生成される PGE₂ と深くかかわっている。細胞培養において様々な炎症性刺激によって、COX-2 と mPGES-1 の発現が PGE₂ の発現に比例して上昇することが示されている¹⁷⁻²⁰⁾。また、COX-2 の発現も、mPGES-1 の発現に比例して上昇する^{17, 18, 20)}。COX-2 選択的阻害薬は、COX-2 の発現を抑制することで mPGES-1 の発現を抑制し、生体内の PGE₂ 産生の減少と骨組織中の破骨細胞形成抑制に伴う骨吸収抑制を示す¹⁴⁻¹⁵⁾。

最終分化した破骨細胞は、骨吸収するだけでなく bone morphogenetic protein (BMP) や Wnt, Sclerostin の産生を介して骨吸収と骨形成のカップリングを果たす重要な細胞である²²⁾。従って、ビスフォスホネート製剤のように破骨細胞をアポトーシスさせてしまうと、骨吸収後の骨形成がうまく行われず、ときには顎骨壊死のような深刻な副作用をきたすことがある。COX-2 選択的阻害薬は破骨細胞を吸収できない (アクチンリングのない) 破骨細胞へ誘導することで骨吸収を減少させている。元々 COX-2 選択的阻害薬は、消化器障害を生じさせないように改良された NSAIDs である。現在、セレ

コキシブは、胃腸に対する副作用が少ない RA や OA の治療をはじめとする抗炎症薬²³⁻²⁵⁾ として使われている¹¹⁻¹³⁾。COX-2 選択的阻害薬は、顎骨壊死などの深刻な副作用のない理想的な骨粗鬆症の治療薬になる可能性が示された。

利益相反

本研究に関し、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, *et al.* Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:4580-4585.
- 2) Fujita D, Yamashita N, Iita S, *et al.* Prostaglandin E2 induced the differentiation of osteoclasts in mouse osteoblast-depleted bone marrow cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 68:351-358.
- 3) Chen QR, Miyaura C, Higashi S, *et al.* Activation of cytosolic phospholipase A2 by platelet-derived growth factor is essential for cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 synthesis in mouse osteoblasts cultured with interleukin-1. *J Biol Chem.* 1997;272:5952-5958.
- 4) Tai H, Miyaura C, Pilbeam CC, *et al.* Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation. *Endocrinology.* 1997;138: 2372-2379.
- 5) Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, *et al.* IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol.* 1996;156:758-764.
- 6) Lin HN, O'Connor JP. Immunohistochemical localization of key arachidonic acid metabolism enzymes during fracture healing in mice. *PLoS One* (Internet). 2014;9:e88423. (accessed 2014 Feb 25) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088423>
- 7) Karakawa A, Fukawa Y, Okazaki M, *et al.* Diclofenac sodium inhibits NFkappaB transcription in osteoclasts. *J Dent Res.* 2009;88:1042-1047.
- 8) Kawashima M, Fujikawa Y, Itonaga I, *et al.* The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on human osteoclast precursors to influence osteoclastogenesis in vitro. *Mod Rheumatol.* 2009;19:192-198.
- 9) DeWitt DL. Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol.* 1999;55:625-

- 631.
- 10) Igarashi K, Woo JT, Stern PH. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on bone resorption and osteoclastogenesis in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2002;63:523-532.
 - 11) Chan FK, Lanas A, Scheiman J, *et al.* Celecoxib versus omeprazole and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis (CONDOR): a randomised trial. *Lancet.* 2010; 376:173-179.
 - 12) Gonzalez EB. ACP Journal Club. Celecoxib reduced GI events more than diclofenac plus omeprazole in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 2011; 154:JC1-9.
 - 13) Hirayama A, Tanahashi N, Daida H, *et al.* Assessing the cardiovascular risk between celecoxib and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Circ J.* 2013;78:194-205.
 - 14) Zhang X, Morham SG, Langenbach R, *et al.* Evidence for a direct role of cyclo-oxygenase 2 in implant wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res.* 2001;16:660-670.
 - 15) Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, *et al.* Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. *Endocrinology.* 1999;140:2685-2695.
 - 16) Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, *et al.* Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 291:884-889.
 - 17) Soler M, Camacho M, Escudero JR, *et al.* Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ Res.* 2000;87:504-507.
 - 18) Stichtenoth DO, Thoren S, Bian H, *et al.* Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol.* 2001;167:469-474.
 - 19) Murakami M, Naraba H, Tanioka T, *et al.* Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2000;275:32783-32792.
 - 20) Sandee D, Sivanuntakorn S, Vichai V, *et al.* Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in COX-1 and COX-2 knock-out mouse fibroblast cell lines. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009;88:111-116.
 - 21) Kamei D, Murakami M, Sasaki Y, *et al.* Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contributes to tumour growth, invasion and metastasis. *Biochem J.* 2009;425:361-371.
 - 22) Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, *et al.* Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:20764-20769.
 - 23) 木本愛之, 花岡晃郎, 笹又理央, ほか. 新規シクロオキシゲナーゼ-2 選択的阻害薬セレコキシブ (セレコックス錠) の薬理学的特性および臨床試験成績. *日薬理誌.* 2008;131:127-136.
 - 24) Simon LS, Lanza FL, Lipsky PE, *et al.* Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor: efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1591-1602.
 - 25) Simon LS, Weaver AL, Graham DY, *et al.* Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1999;282: 1921-1928.

EFFECT OF SELECTIVE COX-2 INHIBITOR FOR OSTEOCLAST FORMATION

Takei RYU, Takehiko SAMBE and Katsuji OGUCHI

Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

Hitoshi AMANO

Department of Pharmacology, Showa University School of Dentistry

Daisuke KAMEI and Shinichi IWAI

Department of Healthcare and Regulatory Sciences, Showa University School of Pharmacy

Abstract — Prostaglandin E₂ (PGE₂) an inflammatory cytokine, produced by cyclooxygenase-2 (COX-2) acts on not only osteoclast formation but also bone resorption. The aim of this study was to investigate whether celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, has a direct effect on osteoclast differentiation. RAW264.7 cells, which are from a macrophage cell line, were cultured with pH 7.0 α MEM containing 10% FBS, with 5% CO₂ at 37°C, which includes recombinant human soluble receptor activator, a soluble type of nuclear factor- κ B ligand (sRANKL) (100 ng/ml), with or without celecoxib (2.5–10 μ M). After 6 days, cells were differentiated to tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive multinucleated osteoclasts. TRAP-positive multinucleated cells displaying more than three nuclei were considered to be osteoclasts. The number of osteoclasts was decreased by celecoxib in a dose-dependent manner. The number of actin rings, a characteristic feature of osteoclasts, was also decreased by celecoxib in a dose-dependent manner. After 8 days, pit formation assay using mouse bone marrow-derived osteoclasts showed that bone resorption was suppressed by celecoxib in a dose-dependent manner. These results showed that the activity of COX-2 inhibitor may directly inhibit the osteoclastogenesis and differentiation of RAW264.7 cells. The COX-2-dependent signaling pathway might be involved in the process of osteoclast differentiation.

Key words: osteoclasts, RAW264.7, COX-2 inhibitor, celecoxib

[受付：2月26日，受理：3月6日，2014]