

慢性関節リウマチの発症とサイトカインバランス

岡本能弘,* 西田幹夫

名城大学薬学部, 〒468-8503 名古屋市天白区八事山 150

Cytokine Balance in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis

Yoshihiro OKAMOTO* and Mikio NISHIDA

Faculty of Pharmacy, Meijo University, 150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan

(Received July 21, 2000; Accepted November 6, 2000)

Rheumatoid arthritis (RA) is a common, frequently severe, chronic inflammatory disease. Although the cause of RA remains unknown, recent advances in understanding its pathogenesis have been substantial. Despite the use of a variety of medications, the treatment of RA is not fully effective in most patients. A T-helper type 1 (Th1)/T-helper type 2 (Th2) cytokine imbalance has been suggested to be of pathogenic importance in several diseases. In this review, the information of cytokine balance in both the experimental model of arthritis and patients with arthritis were summarized. Furthermore, to characterize the cytokine balance at a single cell level, we analyzed the subtypes of cytokine-secreting cells in an experimental model of arthritis using a dual color enzyme-linked immunospot assay (Stardust assay) which we newly developed. These information including our findings might provide us the clue for diagnosis and therapy of arthritis.

Key words—arthritis; cytokine balance; ELISPOT assay; collagen-induced arthritis

1. はじめに

慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis, RA) は原因不明の慢性炎症性疾患である。有病率は世界人口の1% (約5,000万人), 日本では人口の約0.3% (約35万人) であり, 最も頻度の高い膠原病である。¹⁾ 多くの患者は罹病年数とともに関節の機能障害を来し, 日常生活に支障を来す。しかし, 現行の薬物治療や外科治療では, 根本的な治癒をもたらすことはできないと考えられている。¹⁾ 近年, RAの発症, 病態形成に内因性の免疫制御物質であるサイトカイン類の産生量が末梢血中,²⁻¹²⁾ あるいは炎症局所^{2,6,7,13-21)} で増減していることが明らかとなってきた。本報告ではRAの病態変化とサイトカインバランスの変動について現在に至る新しい知見を概説し, 加えて我々の開発した効果的なサイトカインバランス解析法を用いた実験結果を紹介し, RAの発症原因解明や治療方法開発の手がかりを求める。

2. サイトカインバランス

サイトカインは主に免疫システムの制御に中心的な働きを担う生体内情報伝達物質の総称である。²²⁾ サイトカインは様々な種類の細胞により産生されるが, その中でもヘルパーT (Th) リンパ球は免疫系の特異的反応を司っていることからサイトカイン産生細胞として, 極めて重要な細胞である。1986年にT. Mosmann²³⁾ らは産生するサイトカインの種類によってヘルパーTリンパ球が2種類の亜集

団, すなわち, 主に細胞性免疫機構を活性化するサイトカインであるインターロイキン (IL)-2やインターフェロン (IFN)- γ を分泌するTh1細胞と, 主に体液性免疫機構を活性化するIL-4, IL-5, IL-10などを産生するTh2細胞に分類できることを見出した。その後, 更に両方のタイプのサイトカイン類を分泌するTh0細胞が存在することも報告されている。^{24,25)} これら亜集団の分化及び特徴をFig. 1に示した。近年, これら亜集団のうち, どの亜集団がより活性化するか, 言い換えれば, どのヘルパー

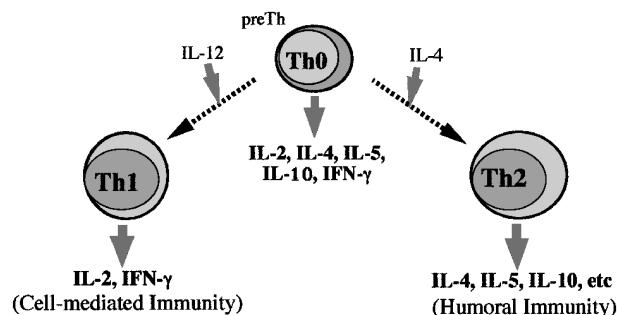


Fig. 1. The Cytokines Produced by Th1, Th2, and Th0 Lymphocytes and the Differentiation of Th Cells

IL-12 and IL-4 induce the differentiation of Th0 cells to Th1 and Th2 respectively. The principal sources of IL-12 are activated macrophages and dendritic cells, whereas IL-4 is produced by antigen-stimulated T cells themselves. preTh: undifferentiated CD4⁺ T cell, Th: T helper cells.

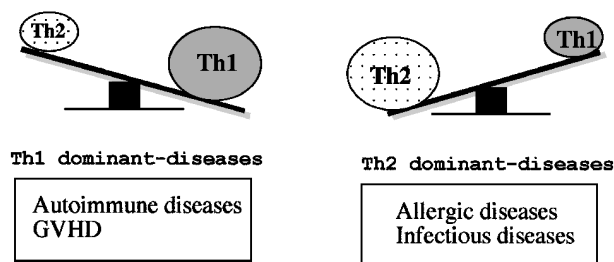


Fig. 2. Cytokine Balance in Diseases

The outcomes of several diseases including infectious, allergic, and autoimmune disorders have been linked to the balance between Th1 and Th2 cytokine production by Th cell-subsets.

Th: T helper cells, GVHD: graft versus host diseases.

T細胞亜集団がより数を増やし、その集団に属するサイトカインをより多く産生しているか、すなわちサイトカインバランスによって感染防御免疫、^{26,27)}自己免疫²⁸⁻³⁰⁾などの生体の免疫反応の性質が決まると考えられるに至った。更に、両亜集団のサイトカインバランスの不均衡が様々な疾患の原因になると考えられるようになった³¹⁾ (Fig. 2)。例えば、サイトカインバランスが Th1 型に偏向する疾患として、各種自己免疫疾患³²⁻³⁴⁾や移植片対宿主病 (graft versus host disease)³⁵⁾があり、逆に、Th2 型に偏向する疾患としてはアレルギー性疾患、³⁶⁾ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) 感染^{37,38)}などの感染症が知られている。

3. RA 病態モデル動物とサイトカインバランス RA の発症、病態形成に伴いサイトカインバラン

スがどのように変動するかを解析するために、病態モデル動物を用いた実験が重要な役割を果たしてきた。RA の病態モデルとして最も広く使われているものはコラーゲン関節炎 (Collagen Induced Arthritis, CIA) マウスである。この病態モデルは RA 患者の血液や関節液中に抗原としてコラーゲン中、特に関節軟骨に多く存在する II 型コラーゲンに対する抗体が検出される事実に基づき、³⁹⁾Trentham らが動物に II 型コラーゲンを投与することにより、ヒト RA によく似た多発性関節炎を発症させることを見出した動物実験モデルである。³⁹⁾

現在のところ、Th1 細胞、Th2 細胞、Th0 細胞それぞれを特異的に区別できる細胞表面抗原はいまだ見い出されていないため、それぞれの Th サブセットを表面抗原の発現のみでは明確に区別することはできない。したがって、その識別は各々の細胞が産生するサイトカインの検出によって行われている。すなわち、病態モデル動物の炎症を起こした関節局所に浸潤したリンパ球のサイトカイン産生 (発現) 状態、あるいは、脾臓やリンパ節など免疫担当組織のリンパ球のサイトカイン産生状態を調べることによって、Th1、Th2 のどちらのタイプのサイトカインがより優位になっているかを知ることができる。⁴⁰⁻⁴²⁾また、遺伝子組み換えサイトカイン⁴³⁻⁴⁸⁾あるいは抗サイトカイン抗体⁴⁹⁻⁵²⁾を CIA マウスに直接投与することによって病状がどのように変化するかを観察する方法なども考えられる。これらの方法を用いたコラーゲン関節炎マウスの解析により、これまでに得られている知見を Table 1 にまとめ

Table 1. Studies Using the Mice with Collagen Induced Arthritis (CIA)

Experiments	Summary of results	References
Quantification of cytokine production by lymphocytes	• Before onset of arthritis: Th1 type cytokine (IFN- γ) \uparrow • After onset of arthritis: Th2 type cytokines (IL-4, IL-10) \uparrow :	(40), (41)
Immunohistochemical analysis (Joint histology of CIA mice)	• Before onset of arthritis: Presence of Th1 type cytokine (IFN- γ) • After onset of arthritis: Absence of both types of cytokines:	(42)
Administration of recombinant(r) cytokines	• rIFN- γ :	1. Exacerbation of arthritis: (43) 2. Suppression of arthritis: (44)
	• rIL-4:	Suppression of arthritis: (45), (46)
	• rIL-10:	Suppression of arthritis: (46), (47), (48)
Administration of anti-cytokine antibody	• anti-IFN- γ :	1. Dual effects on arthritis according to the clinical phase: (49) 2. Exacerbation of arthritis: (50)
	• anti-IL-4:	Exacerbation of arthritis: (51)
	• anti-IL-10:	Exacerbation of arthritis: (52)
Transfer of cytokine gene into CIA mice	• IL-4:	Suppression of arthritis: (53), (54)
	• IL-10:	Suppression of arthritis: (55), (56), (57)
The study using gene targeting mice	• IFN- γ RKO:	1. Suppression of arthritis: (58) 2. Exacerbation of arthritis: (59), (60)

CIA, IL, IFN- γ : see text, KO: knockout, R: receptor, \uparrow : increase.

た。これらの結果を総合すると、関節炎の発症時(前)にはTh1型が優位となり、発症後Th2型が優位となる。Th1型のサイトカイン(IL-2, IFN- γ)は恐らく関節炎発症に促進的な役割を果たしていると考えられる。しかし、IFN- γ 、あるいは抗IFN- γ 抗体の投与実験結果^{43,44,49,50}からIFN- γ は必ずしも関節炎発症に促進的にのみ働くと結論づけることはできないようである。IFN- γ は関節炎の発症促進、抑制の両面的な役割を果たしている可能性が推察される。関節炎発症後にTh2型サイトカインであるIL-4やIL-10の産生(発現)は増加していくが、これは崩壊したサイトカインバランスを生体が修正しようとする現象、すなわち関節炎が治癒しようとする方向への変化を捉えていると考えられる。なぜなら、Th2型サイトカイン(IL-4, IL-10)の投与により、関節炎の発症が抑制され、⁴⁵⁻⁴⁸逆に抗IL-4抗体や抗IL-10抗体の投与は症状を悪化させるという

実験結果^{51,52}が報告されているからである。

さらに将来のRAの遺伝子治療を視野に入れたコラーゲン関節炎マウスへのサイトカイン遺伝子導入実験も行われている。これらの研究ではTh2型サイトカインであるIL-4^{53,54}、IL-10⁵⁵⁻⁵⁷の遺伝子を組み込んだウイルスベクターをコラーゲン関節炎マウスに全身的あるいは局所的に投与することにより関節炎が抑制・治癒される可能性を報告している。

近年、発生工学、遺伝子工学の進歩により、様々な遺伝子改変動物が作製されるようになった。遺伝子改変動物は、特定の遺伝子を過剰発現させたり(例:トランスジェニックマウス)、欠損させること(例:ノックアウトマウス)により、その遺伝子の機能を*in vivo*で明確に解析できる極めて優れた方法の1つである。これまでに行われているサイトカイン遺伝子ノックアウトマウスを用いたコラーゲン関節炎誘導実験は全てIFN- γ 受容体を欠損させた

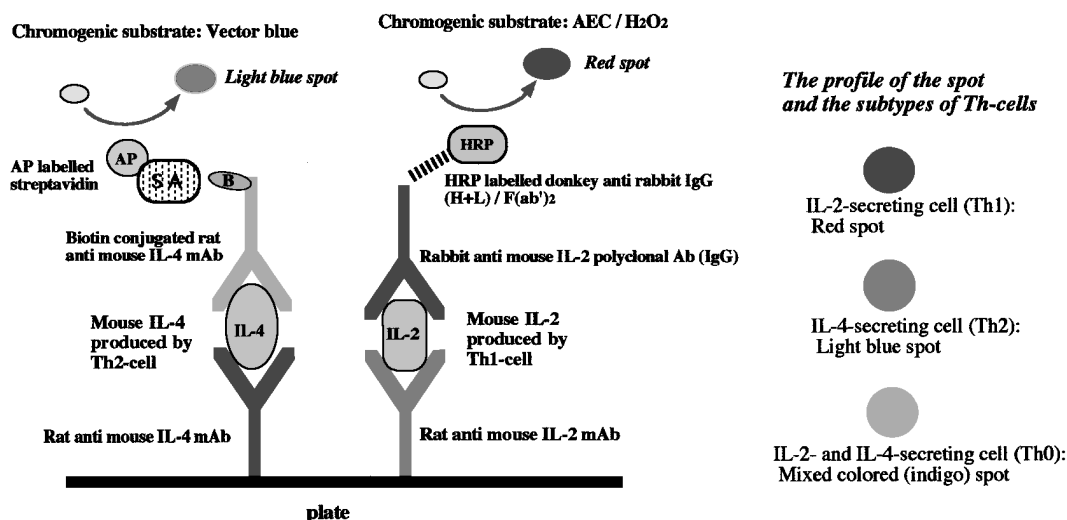


Fig. 3. The Schematic Representation of a Dual Color Detection (Stardust Assay)

Abbreviations: mAb: monoclonal antibody, AP: alkaline phosphatase, HRP: horseradish peroxidase, SA: streptavidin, B: biotin.

Reprinted from immunopharmacology, Vol. 39, Y. Okamoto *et al.*, Development of a dual color enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of murine T helper type 1-and T helper type 2-cells, p. 107-116, Copyright (1998), with permission from Elsevier Science.

Table 2. Methods for Analysis of Cytokine Balance at Single Cell Level

	Mechanism	Procedure	Cost	Time	Simultaneous detection of multi-kinds of cytokines	Analysis for large number of samples
Stardust assay	Application of ELISPOT assay	simple	lowest	1-2 days	possible	possible
Analysis by T cell cloning	The analysis for the cytokine production of each clone after the T cell cloning	complicated	expensive	long time (a few weeks)	impossible	difficult
Assay for intra-cellular cytokines	Analysis by flow cytometer	simple	most expensive, requirement of expensive equipment (flow cytometer)	short time (several hours)	possible	possible

動物を用いている。⁵⁸⁻⁶⁰ これらの研究結果の中には研究グループにより相反するものが報告されている。この原因は不明であるが、前述したように、Th1 型サイトカインである IFN- γ は、必ずしも関節炎を増悪する方向にのみ働くのではなく、関節炎の治癒過程にも重要な役割を果たしているようである。⁵⁸⁻⁶⁰

4. サイトカインバランスの新規解析法 (Stardust 法) の開発

サイトカイン類はホルモン類と異なり、サイトカイン自らが産生された局所での機能が生理的に重要である。個々の細胞から分泌されたサイトカインの種類と同定と定量がより生体の状況を反映した結果となる。すなわち、血液中や、リンパ球培養液中のサイトカイン量を測定するのではなく、その分泌を司る細胞数を計測する方法がより有用な情報をもたらすと考えられる。著者らはこれまでに複数種のサイトカイン分泌細胞数を同時分別定量を可能とする Dual Color Enzyme-linked Immunospot (ELISPOT) 法 (通称: Stardust 法, すなわち本法を行った際, stardust のように見えるサイトカイン産生細胞の存在を示す痕跡像が得られることに基づき, 著者らが命名した。)を開発している。⁶¹ 本法は従来の

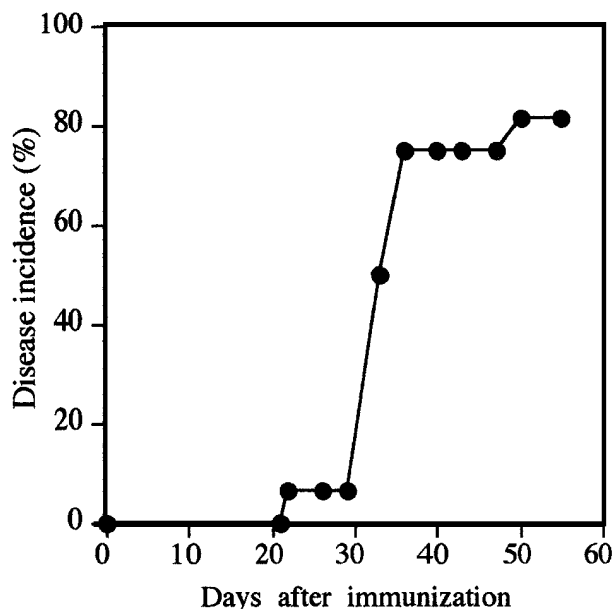


Fig. 4. Incidence and Time Onset of Arthritis in DBA/1J Mice

Male DBA/1J mice were injected intradermally in the right footpad with 200 μ g of bovine collagen type II (CII) emulsified in Freund's complete adjuvant, followed on day 21 by an intraperitoneal injection of 200 μ g of CII dissolved in phosphate buffered saline. The clinical onset of collagen induced arthritis (CIA) was estimated by the erythema and edema of paws other than the right foot. Results represent the percent of mice with clinical arthritis in one or more joints ($n=16$).

Reprinted from Journal of Interferon & Cytokine Research, Vol. 20, Y. Okamoto *et al.*, Characterization of the cytokine network at a single cell level in mice with collagen-induced arthritis using a dual color ELISPOT assay, p. 55-61, Copyright (2000), with permission from Mary Ann Libert, Inc.

ELISPOT 法⁶²を応用し、Th1 型サイトカイン分泌細胞, Th2 型サイトカイン分泌細胞, さらに両方の型のサイトカインを分泌する細胞である Th0 細胞を同時分別計数できる方法である。本法の測定原理は Fig. 3 に示すように、IL-2 分泌細胞 (Th1 細胞) と IL-4 分泌細胞 (Th2 細胞) の存在を 2 種類の発

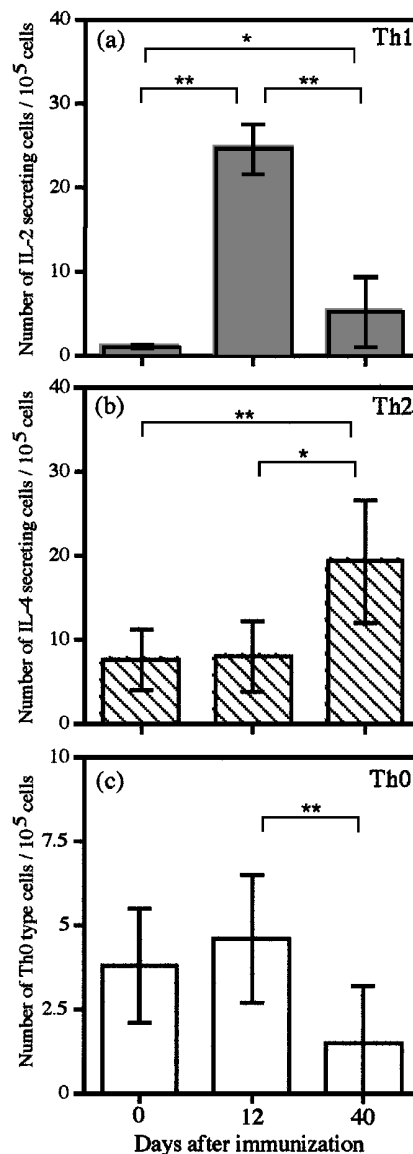


Fig. 5. The Frequency of Th Cells in Lymph Nodes of Mice with Collagen Induced Arthritis (CIA)

Dual color ELISPOT assay was carried out on lymph node cells obtained from mice with CIA at different times after collagen type II (CII)-immunization. Cells were incubated with CII (50 μ g/ml) in a well coated with a mixture of anti IL-2 antibody and anti IL-4 antibody for 18 hours, and subsequently, spots were developed. (a): The frequency of IL-2- secreting cells (Th1 cell), (b): The frequency of IL-4-secreting cells (Th2 cells), (c): The frequency of cells (Th0) secreting both cytokines. The results are expressed as mean \pm SD of six assay wells. Significant differences were determined by Kruskal-Wallis non-parametric one-way analysis of variance and Scheffe's F test. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Reprinted from Journal of Interferon & Cytokine Research, Vol. 20, Y. Okamoto *et al.*, Characterization of the cytokine network at a single cell level in mice with collagen-induced arthritis using a dual color ELISPOT assay, p. 55-61, Copyright (2000), with permission from Mary Ann Libert, Inc.

色システムを用いて、同時に分別検出を可能とする方法である。すなわち、Th1細胞上(周辺)に存在する分泌された直後のIL-2はAminoethylcarbazol(AEC)/H₂O₂を発色基質としたペルオキシダーゼにより赤色のスポットとして、Th2細胞に分泌されたIL-4はVector blue(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)を発色基質としたアルカリホスファターゼにより青色のスポットとして染め分ける。さらに、IL-2、IL-4両方のサイトカインを分泌する細胞(Th0細胞)は赤と青の混合色(紫)のスポットとして検出することができる。本法は、サイトカインバランスを(1)細胞単位で、(2)包括的に(3種類のヘルパーT細胞亜集団を同時に)、(3)フローサイトメーターなどの高価な測定機器の使用、あるいは、細胞のクローニングなどの煩雑な実験操作なしに、簡便に、かつ、(4)高感度に(通常のELISA法では単細胞由来の極微量なサイトカインを検出することは不可能であるがELISPOT法では細胞周囲に高濃度のサイトカインがあるので解析可能である。)解析が可能である。Table 2には細胞レベルでのサイトカインバランスの各種解析方法につ

いてその特徴をまとめた。著者らは、これまでにStardust法を利用し、マウスの系統(遺伝的背景の違い)によるサイトカインバランスの相違を明らかにした成果を得ている。⁶¹⁾すなわち、BALB/cとDBA/2マウスは、C57BL/6やC3H/He系に比較し、Th1型細胞が優位に誘導されるということを明らかにしている。さらに著者らは本法をコラーゲン関節炎マウスのサイトカインバランスの解析に応用した。すなわち、Fig. 4にはコラーゲン関節炎の発症経過、Fig. 5にはリンパ節に含まれるサイトカイン分泌細胞数の経時的な推移を示した。その結果、関節炎発症前にTh1型(IL-2分泌細胞)及びTh0型細胞が増加し、発症後にTh2型(IL-4分泌細胞)が増加するという明確な結果が同時包括的に得られた。このTh1優位な状況からTh2優位な状況へのシフトはこれまでに散発的な報告から推定されていた変化であったが、改めて、病態の推移に伴い、細胞単位でのサイトカインバランスの変動が実際に生じていることを証明した初めての報告である。⁶³⁾

5. 臨床におけるRAとサイトカインバランス ヒトにおけるRA発症へのサイトカインバランス

Table 3. Cytokine Balance in the Patients with Arthritis

Experiments	Summary of results	References
1. Analysis using peripheral blood		
# Measurement for serum cytokine level	• serum IL-10 level ↑ :	(2)
# Analysis using peripheral lymphocytes		
• production of cytokines into culture medium	• Production of Th1 type cytokines (IFN- γ , IL-2) ↓ :	(3), (4), (5), (6)
• Analysis for intracellular cytokines by flow cytometer	• 1. Frequency of Th1 cell (IFN- γ producing cell) ↑ :	(7), (8)
	• 2. Frequency of Th1 cell (IFN- γ producing cell) ↓ :	(9)
	• 3. No change:	(10)
• Expression of cytokine genes	• 1. Th1 type cytokine (IFN- γ) gene expression ↓ :	(11)
	• 2. Th1 type cytokine (IFN- γ) gene expression ↑ :	(12)
	• 3. Th2 type cytokines (IL-4, IL-10) gene expression ↑ :	(2)
2. Analysis using local tissues (regional joints)		
# Cytokine level in the synovial fluid from the patient	• IL-10 ↑ :	(2)
# Analysis for the infiltrating lymphocytes in the regional joints		
• Production of cytokines into culture medium	• Production of Th1 type cytokine (IFN- γ) ↑ :	(13)
• Analysis for intracellular cytokines by flow cytometer	• Frequency of Th1 cell (IFN- γ producing cell) ↑ :	(7), (8), (14)
• Immunohistochemical analysis	• Detection of both types of cytokines (IFN- γ , IL-4):	(15)
• Expression of cytokine gene	• Th1 type cytokine (IFN- γ) gene expression ↑ :	(16), (17), (18)
3. Others		
# Detection of cytokine-secreting cells by ELISPOT assay	• Frequency of Th1 cell (IFN- γ secreting cell) in the regional joints are greater than those of peripheral lymphocytes.:	(19)
# Analysis of T cell clone in the patient	• Frequency of Th1 cell (IFN- γ producing cell) in the regional joints ↑ :	(20), (21)

変動の関与についても多くの研究報告がある (Table 3). RA 患者のサイトカインバランスを解析する場合, 用いることのできる試料は末梢血 (peripheral blood)²⁻¹²⁾, あるいは炎症を起こした関節局所の滲出液 (synovial fluid)²⁾ や生検組織 (regional joint tissue)^{7,8,13-18)} である. 患者末梢血や関節組織を解析試料として用いたこれまでの研究報告を Table 3 にまとめた. これらの報告結果を総合すると, RA を罹患している患者では Th1 型が優位となると考えられる. 次に, 炎症局所では病状の寛解とともに Th1 型サイトカインの産生低下が検出される⁷⁾ など明確な変動が生じている. したがって, ヒトに関しても Th1 型ヘルパー T 細胞は病態形成に大きな役割を果たしていると考えられる. しかし, 患者末梢血を用いた解析結果に関しては, 研究グループにより, 全く異なる結果が報告されている.²⁻¹²⁾ この原因を考察すると以下の点が考えられる. (1) 関節炎の発症に伴い, 局所では大きなサイトカインバランスの変動が生じているが, 全身的に大きな変動を引き起こすには至っていない可能性, (2) 臨床研究では動物実験と異なり発症前から経時的に解析を行うことは難しい. したがって, これらの研究では各報告によって患者の病状の進行ステージが同一ではないことがある.

臨床現場では末梢血は最も入手しやすい検体の 1 つであり, これを用いたサイトカインバランスの解析が有効となれば診断法として極めて有用なものとなるであろう. ヒト末梢血を試料とする場合, 微量なサイトカインをいかに高い精度で検出できるかが成功の分岐点である. 血中 (血清, 血漿) の IL-2, IL-4 などのサイトカイン量は極めて微量であり, 検出が困難であるので, 細胞の数を計数する Stardust 法をヒト末梢血サイトカインバランス解析に応用することを検討している.

6. おわりに

マウス, ヒトに関する RA の病態を理解する手段として, 最新の研究結果に基づき, サイトカインバランス変動の意義を紹介した. RA の発症にサイトカインバランスが関与していること, 特に, Th1 細胞が関節炎の発症に関わっていること, Th2 細胞は関節炎の治癒に重要であることは確かである. かたや, 多種のサイトカイン産生細胞を包括的に計数定量することによりサイトカインバランスを効果的に解析する新しい方法について著者らの成果の一部を紹介した. 昨年 (1999 年), オランダでは実際に Th2 型サイトカイン IL-10 を慢性リウマチの治療に用いる臨床研究が行われ始めた.⁶⁴⁾ この研究グループによる報告では関節炎症状の改善はなかった. しかしながら, サイトカインを用いた RA の治療に関しては, 始まったばかりである. 治療対象患者の病状の特定, 投与方法の工夫など, 今後まだまだ検討すべき点は多い.

将来の展望として, 従来の患者体液中, あるいはリンパ球培養液中のサイトカイン量を定量する測定結果と, 著者らの開発した Stardust 法によるサイトカイン産生細胞数の測定結果を併せて解析することにより, サイトカインバランスと病態の関係に関して, 新たな知見をもたらす可能性がある. そして最終的にはサイトカインバランスの人為的制御による疾患の治療法の開発につながることを期待される.

REFERENCES

- 1) Kano S., *Current Therapy*, **17**, 8-15 (1999).
- 2) Cush J., Splawski J., Thomas R., McFarlin J., Schulze-Koops H., Davis L., Fujita K., Lipsky P., *Arthritis Rheum.*, **38**, 96-104 (1995).
- 3) Haddad A., Bienvenu J., Miossec P., *J. Clin. Immunol.*, **18**, 399-403 (1998).
- 4) van Roon J., Verhoef C., van Roy J., Gmelig-Meyling F., Huber-Bruning O., Lafeber F., Bijlsma J., *Ann. Rheum. Dis.*, **56**, 656-660 (1997).
- 5) Ruschen S., Stellberg W., Warnatz H., *Clin. Exp. Immunol.*, **89**, 32-37 (1992).
- 6) Sadouk M., Vaquero C., de la Tour B., Amor B., Toubert A., *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **56**, 37-45 (1990).
- 7) Kusaba M., Honda J., Fukuda T., Oizumi K., *J. Rheumatol.*, **25**, 1466-1471 (1998).
- 8) van der Graaff W., Prins A., Niers T., Dijkmans B., van Lier R., *Rheumatology (Oxford)*, **38**, 214-220 (1999).
- 9) Mangg H., Felsner P., Herrmann J., el-Shabrawi Y., Liebmann P., Schauenstein K., *Immunobiology*, **200**, 290-294 (1999).
- 10) Bourg V., Portales P., Fiorito S., Combe B., Jorgensen C., Sany J., Clot J., *J. Autoimmun.*, **13**, 415-422 (1999).
- 11) Loubet-Lescoulie P., Constantin A., Mazieres B., Tkaczuk J., de Preval C., Cantagrel A., *Scand. J. Rheumatol.*, **28**, 244-251 (1999).
- 12) Schulze-Koops H., Lipsky P., Kavanaugh A., Davis L., *J. Immunol.*, **155**, 5029-5037 (1995).
- 13) Dolhain R., van der Heiden A., ter Haar N., Breedveld F., Miltenburg A., *Arthritis Rheum.*, **39**, 1961-1969 (1996).
- 14) Isomaki P., Luukkainen R., Lassila O., Toivanen P., Punnonen J., *Immunology*, **96**, 358-364 (1999).
- 15) Dolhain R., ter Haar N., Hoefakker S., Tak P., de Ley M., Claassen E., Breedveld F., Miltenburg A., *Br. J. Rheumatol.*, **35**, 24-32 (1996).
- 16) Kotake S., Schumacher H. J., Yarboro C.,

- Arayssi T., Pando J., Kanik K., Gourley M., Klippel J., Wilder R., *Proc. Assoc. Am. Physicians*, **109**, 286–301 (1997).
- 17) Klimiuk P., Goronzy J., Bjornsson J., Beckenbaugh R., Weyand C., *Am. J. Pathol.*, **151**, 1311–1319 (1997).
- 18) Bucht A., Larsson P., Weisbrot L., Thorne C., Pisa P., Smedegard G., Keystone E., Gronberg A., *Clin. Exp. Immunol.*, **103**, 357–367 (1996).
- 19) Ronnelid J., Berg L., Rogberg S., Nilsson A., Albertsson K., Klareskog L., *Br. J. Rheumatol.*, **37**, 7–14 (1998).
- 20) Miltenburg A., van Laar J., de Kuiper R., Daha M., Breedveld F., *Scand. J. Immunol.*, **35**, 603–610 (1992).
- 21) Quayle A., Chomarat P., Miossec P., Kjeldsen-Kragh J., Forre O., Natvig J., *Scand. J. Immunol.*, **38**, 75–82 (1993).
- 22) Kikuchi K., *Ikamen-ekigaku*, 205–219 (1989).
- 23) Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L., *J. Immunol.*, **136**, 2348–2357 (1986).
- 24) Firestein G. S., Roeder W. D., Laxer J. A., Townsend K. S., Weaver C. T., Hom J. T., Linton J., Torbett B. E., Glasebrook A. L., *J. Immunol.*, **143**, 518–525 (1989).
- 25) Street N. E., Schumacher J. H., Fong T. A. T., Bass H., Fiorentino D. F., Leverah J. A., Mosmann T. R., *J. Immunol.*, **144**, 1629–1639 (1990).
- 26) Clerici M., Hakim F. T., Venzon D. J., Blatt S., Hendrix C. W., Wynn T. A., Shearer G. M., *J. Clin. Invest.*, **91**, 759–765 (1993).
- 27) Pope M., Chuang S. W., Mosmann T. R., Leibowitz J. L., Gorczynski R. M., Levy G. A., *J. Immunol.*, **156**, 3342–3349 (1996).
- 28) Murray L. J., Lee R., Martens C., *Eur. J. Immunol.*, **20**, 163–170 (1990).
- 29) Segal R., Bermas B., Dayan M., Kalush F., Shearer G., Mozes E., *J. Immunol.*, **158**, 3009–3016 (1997).
- 30) Shirai A., Conover J., Klinman D. M., *Autoimmunity*, **21**, 107–116 (1995).
- 31) Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A., *Nature*, **383**, 787–793 (1996).
- 32) Leonard J. P., Waldburger K. E., Goldman S. J., *J. Exp. Med.*, **181**, 381–386 (1995).
- 33) Trembleau S., Penna G., Bosi E., Mortara A., Gately M. K., Adorini L., *J. Exp. Med.*, **181**, 817–821 (1995).
- 34) Neurath M. F., Fuss I., Kelsall B. L., Stuber E., Strober W., *J. Exp. Med.*, **182**, 1281–1290 (1995).
- 35) Clerici M., Shearer G. M., *Immunol. Today*, **14**, 107–111 (1993).
- 36) Chehimi J., Starr S. E., Frank I., D'Andrea A., Ma X., MacGregor R. R., Sennelier J., Trinchieri G., *J. Exp. Med.*, **179**, 1361–1366 (1994).
- 37) Via C. S., Rus V., Gately M. K., Finkelman F. D., *J. Immunol.*, **153**, 4040–4047 (1994).
- 38) Biancone L., Andres G., Ahn H., Lim A., Dai C., Noelle R., Yagita H., De Martino C., Stamenkovic I., *J. Exp. Med.*, **183**, 1473–1481 (1996).
- 39) Trentham D. E., Townes A. S., Kang A. H., *J. Exp. Med.*, **146**, 857–868 (1977).
- 40) Doncarli A., Stasiuk L. M., Fournier C., Abehsira-Amar O., *Eur. J. Immunol.*, **27**, 1451–1458 (1997).
- 41) Yoshino S., *Br. J. Pharmacol.*, **123**, 237–242 (1998).
- 42) Mussener A., Litton M. J., Lindroos E., Klareskog L., *Clin. Exp. Immunol.*, **107**, 485–493 (1997).
- 43) Mauritz N. J., Holmdahl R., Jonsson R., Van der Meide P. H., Scheynius A., Klareskog L., *Arthritis Rheum.*, **31**, 1297–1304 (1988).
- 44) Nakajima H., Takamori H., Hiyama Y., Tsukada W., *Clin. Exp. Immunol.*, **81**, 441–445 (1990).
- 45) Horsfall A. C., Butler D. M., Marinova L., Warden P. J., Williams R. O., Maini R. N., Feldmann M., *J. Immunol.*, **159**, 5687–5696 (1997).
- 46) Joosten L., Lubberts E., Durez P., Helsen M., Jacobs M., Goldman M., van den Berg W., *Arthritis Rheum.*, **40**, 249–260 (1997).
- 47) Walmsley M., Katsikis P., Abney E., Parry S., Williams R., Maini R., Feldmann M., *Arthritis Rheum.*, **39**, 495–503 (1996).
- 48) Tanaka Y., Otsuka T., Hotokebuchi T., Miyahara H., Nakashima H., Kuga S., Nemoto Y., Niuro H., Niho Y., *Inflamm. Res.*, **45**, 283–288 (1996).
- 49) Boissier M., Chiochia G., Bessis N., Hajnal J., Garotta G., Nicoletti F., Fournier C., *Eur. J. Immunol.*, **25**, 1184–1190 (1995).
- 50) Williams R., Williams D., Feldmann M., Maini R., *Clin. Exp. Immunol.*, **92**, 323–327 (1993).
- 51) Yoshino S., *J. Immunol.*, **160**, 3067–3071 (1998).
- 52) Kasama T., Strieter R., Lukacs N., Lincoln P.,

- Burdick M., Kunkel S., *J. Clin. Invest.*, **95**, 2868–2876 (1995).
- 53) Boyle D., Nguyen K., Zhuang S., Shi Y., McCormack J., Chada S., Firestein G., *Gene Ther.*, **6**, 1911–1918 (1999).
- 54) Lubberts E., Joosten L., van Den Bersselaar L., Helsen M., Bakker A., van Meurs J., Graham F., Richards C., van Den Berg W., *J. Immunol.*, **163**, 4546–4556 (1999).
- 55) Apparailly F., Verwaerde C., Jacquet C., Auriault C., Sany J., Jorgensen C., *J. Immunol.*, **160**, 5213–5220 (1998).
- 56) Whalen J., Lechman E., Carlos C., Weiss K., Kovesdi I., Glorioso J., Robbins P., Evans C., *J. Immunol.*, **162**, 3625–3632 (1999).
- 57) Ma Y., Thornton S., Duwel L., Boivin G., Giannini E., Leiden J., Bluestone J., Hirsch R., *J. Immunol.*, **161**, 1516–1524 (1998).
- 58) Kageyama Y., Koide Y., Yoshida A., Uchijima M., Arai T., Miyamoto S., Ozeki T., Hiyoshi M., Kushida K., Inoue T., *J. Immunol.*, **161**, 1542–1548 (1998).
- 59) Manoury-Schwartz B., Chiocchia G., Bessis N., Abehsira-Amar O., Batteux F., Muller S., Huang S., Boissier M., Fournier C., *J. Immunol.*, **158**, 5501–5506 (1997).
- 60) Vermeire K., Heremans H., Vandeputte M., Huang S., Billiau A., Matthys P., *J. Immunol.*, **158**, 5507–5513 (1997).
- 61) Okamoto Y., Abe T., Niwa T., Mizuhashi S., Nishida M., *Immunopharmacology*, **39**, 107–116 (1998).
- 62) Czerkinsky C., Nilson L-A., Nygren H., Ouchtarony O., Tarkowski A., *J. Immunol. Methods*, **65**, 109–121 (1983).
- 63) Okamoto Y., Gotoh Y., Tokui H., Mizuno A., Kobayashi Y., Nishida M., *J. Interferon & Cytokine Res.*, **20**, 55–61 (2000).
- 64) Smeets T., Kraan M., Versendaal J., Breedveld F., Tak P., *J. Rheumatol.*, **26**, 2089–2093 (1999).