慢性関節リウマチ患者滑膜における シクロオキシゲナーゼ 1 および 2 の発現

佐野 統・川人 豊^{*1)}, 日下義章^{*2)}, 木村 茂・
浅井 清・向井滋彦・加藤治樹・近藤元治^{*1)}

The expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis

Cyclooxygenase(COX), or prostaglandin(PG)H synthase, is the first enzyme of the pathway in which arachidonic acid is oxidized to PGs. We previously reported that high levels of immunoreactive COX were present in synovia from patients with rheumatoid arthritis(RA), but not in synovia from patients with osteoarthritis(OA) or normal subjects. An inducible isoform of COX, COX2, has recently been identified.

So we examined the expression and modulation of both COX1 and COX2 in rheumatoid synovial tissues and cultured synoviocytes. COX1 and 2 mRNA were present in synovia from RA patients by RT-PCR method. Immunostaining with anti-COX1 and 2 antibodies showed that high levels of COX1 and 2 polypeptides were expressed in rheumatoid synovial tissues(synovial lining cell layer, inflammatory mononuclear cells, fibroblast-like cells, vascular endothelial cells). Significantly less staining of COX1 and 2 was noted in OA synovia. In cultured rheumatoid synoviocytes under basal condition, both COX1 and 2 mRNA were present at low levels. COX2 mRNA was markedly increased by treatment with IL-1 β or PMA. Dexamethason(Dex)suppressed the induction of COX2 mRNA. In sharp contrast, COX1 mRNA was not induced with IL-1 β , and Dex did not have suppressive effects.

We suggest that the regulation of COX2 by IL-1 β and corticosteroids may be important mechanisms to regulate inflammation in synovial tissues from RA patients.

Rec. 12/19/1994, Acc. 3/6/1995, pp 241~247

*Hajime Sano・Yutaka Kawahito^{*1)}, Yoshiaki Kusaka^{*2)}, Shigeru Kimura・
Kiyoshi Asai・Shigehiko Mukai・Haruki Kato・Motoharu Kondo^{*1)}*

*key words : cyclooxygenase 1, cyclooxygenase 2, interleukin 1,
rheumatoid arthritis, synovium*

プロスタグランジン(PGs)は炎症反応において重要な役割を演じる。アラキドン酸はシクロオキシゲナーゼ(COX)により PGH₂ へ変換され、さらに種々の PGs へと合成される¹⁾。

最近, COX の第二のアイソフォームである

COX2 の存在が証明された^{2,3)}。従来の COX1 は種々の組織や細胞にはじめから存在する constitutive type であり, COX2 は種々の刺激により発現する inducible type である^{2,3)}。アミノ酸配列のホモロジーは約 60%であり, 別々の遺伝子産物であることが証明されている^{2,3)}。しかし, 活性中心のアミノ酸配列やアセチル化を受けるセリン残基の場所, C 末端のアミノ酸配列などきわめて類似の構造をしている^{2,3)}。

PGs は慢性関節リウマチ(RA)患者滑膜炎を誘導することが知られている⁴⁾。また, 非ステロイド性抗炎症剤(NSAIDs)は COX の働きを抑えるこ

^{*1)} Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine 京都府立医科大学第一内科学教室

^{*2)} Department of Orthopaedic Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine 京都府立医科大学整形外科教室
Offprint requests to : Hajime Sano, Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kawaramachidori-Hirokoji-agaru, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan.

とにより, RA の滑膜炎を抑制すると考えられている⁵⁾. PGE_2 は RA 患者滑膜で産生され, 破骨細胞を活性化し骨・軟骨を破壊すると考えられている⁶⁾.

一方, IL-1 は RA 患者の滑液や末梢血中に存在する主要な炎症惹起サイトカインである^{7,8)}. IL-1 は関節組織において PG 産生を増強させ, 滑膜炎を惹起すると考えられる⁹⁾. コルチコステロイドも滑膜での PGs 産生を抑制することにより, RA の炎症を著明に抑えると考えられているが詳細は不明である. しかしながら, 最近の *in vitro* の実験ではコルチコステロイドが COX と Phospholipase A_2 の発現をも抑制することにより, PG産生を抑制することが示されている^{10,11)}.

COX2の同定される以前, 筆者らは COX が RA 患者滑膜において, 変形性関節症(OA)患者や正常ヒト滑膜にくらべ有意に強く発現すること, Streptococcal cell wall(SCW)関節炎やアジュバント関節炎を起こした Lewis ラットの滑膜においても著明に発現し, デキサメサゾン投与により炎症とともに COX 発現も抑えられることを報告した¹²⁾. 今回, COX1 および 2 特異的抗体や cDNA を用いて, RA 患者滑膜における COX1 および 2 の役割を検討し, 興味ある知見を得たので報告する.

方 法

(1) ヒト滑膜組織

RA 患者 19 例, OA 患者 11 例の滑膜組織を手術時(関節置換術, 関節鏡下滑膜除去術)に採取し, 一部は 10%ホルマリン固定後, パラフィン包埋し, 切片をスライドガラス上にコートし免疫染色に用いた. また, 一部より RNA を抽出し, ほかは無菌的に滑膜細胞を分離し, 10% FBS(Gibco 社), 10%ヒト AB 血清(Biowhitaker 社), Penicillin(100 U/ml), Streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を含む DMEM 液で培養し細胞株を作った.

(2) 抗 COX1 および 2 抗体

抗 COX1 および 2 抗体は米国赤十字 Holland 研究所の T. Hla 博士より供与された. 抗 COX1 はヒト COX1 ペプチド(DHHILHVAVDV)をウサギに免疫して作られた. 抗 COX2 抗体はヒト COX2 のカルボキシル末端の insert 部位

表 1 The primers of PCR

Human COX-1 : sense	5'-TGCCCAGCTCCTGGCCC-GCCGCTT-3'
antisense	5'-GTGCATCAACACAGGC-GCCTCTCTTC-3'
Human COX-2 : sense	5'-TTCAAATGAGATTGT-GGGAAAATTGCT-3'
antisense	5'-AGATCATCTCTGCCT-GAGTATCTT-3'
Human G3PDH : sense	5'-CCACCCAYGGCAAATT-CCATGGCA-3'
antisense	5'-TCTAGAGGGCAGGT-CAGGTCCACC-3'

図 1 PCR 法による RA 患者滑膜における COX1 および 2 mRNA の検索

(LDDINPTVLLKER)で同様に免疫してつくられた. 両抗体の特異性は COX1 および 2 の cDNA をトランスフェクトした Cos 細胞を用いた免疫沈降法により確認された¹³⁾.

(3) 免疫染色法¹²⁾

Vectastain ABC キット(Vector 社)を用いて, ペルオキシダーゼ染色により滑膜組織における COX1 および 2 の発現を調べた. 各組織は 0.3% ペルオキシドで内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックし, さらに BSA, 正常ヤギ血清により非特異的蛋白結合をブロックした.

つぎに, 抗 COX1 または 2 抗体(PBS で 100 倍希釈), 正常ウサギ血清(100 倍希釈)と 30 分間, 常温で反応させた. PBS で洗浄後, ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG と 30 分間反応させ, 洗浄後, さらにアビジン DH とビオチン化ワサビペルオキシダーゼとの複合体と 45 分間反応させた. 洗浄後, 0.05% DAB(Sigma 社), 0.01% H_2O_2 , 0.04% 塩化ニッケルを含む 0.05 M Tris 液(pH 7.4)と 2 ~ 7 分間反応させ発色させた. 核染色は 0.5% ラ

図2 RA患者滑膜におけるCOX1の発現

A: COX1は滑膜表層細胞, 炎症性単核球, フィブロblast様細胞において免疫染色された, ($\times 100$)

B: COX1は血管内皮細胞において免疫染色された, ($\times 200$)

イトグリーン SFで行った。陽性組織は黒色に、陰性組織は淡緑色に染色された。各組織のCOX発現の程度は陽性細胞数と染色の強さにより、0～4+の間で判定した^{12,14)}。

(4) RT-PCR法によるCOX1および2 mRNAの検出

RA患者滑膜組織から Chirgwin らの方法¹⁵⁾によりRNAを抽出した。PCR解析のため、まずGeneAmp RNA PCR キット(Perkin Elmer Cetus社)を用いて、ランダムヘキサマーでtotal RNA $1\mu\text{g}$ からcDNAをつくった。cDNAは $100\mu\text{l}$ に希釈し、同じものをすべてのPCR実験に用いた。PCRは $5\mu\text{l}$ のcDNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 2 mM MgCl_2 , 200 μM のdATP, dCTP, dGTP, dTTP, [α - ^{32}P]-dCTP 3,000 Ci/mmol(New England Nuclear-Dupon

図3 RA患者滑膜におけるCOX2の発現

A: COX2は滑膜表層細胞, 炎症性単核球, フィブロblast様細胞において免疫染色された, ($\times 100$)

B: COX2は血管内皮細胞, フィブロblast様細胞において免疫染色された, ($\times 200$)

社), 2 ng/ml のCOX1 または2のセンスとアンチセンス・PCRプライマー(表1), 5UのTaq polymeraseを含む $50\mu\text{l}$ の反応液で行った。

増幅は 97°C 1分間, 65°C 1分間, 72°C 1分間で35サイクル(COX1, 2), または25サイクル(G3PDH)で行った。増幅反応物は1.5%アガロースゲル上で電気泳動したのち、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行い、コダックXARフィルムで露光した。

(5) 種々の刺激に対するCOX1および2 mRNA発現の検討

RA患者から手術時に滑膜組織を取り出し、col-

lagenase (Type III) 4 mg/ml で処理して得られた単離細胞を DMEM 液で 37°C, 24 時間 CO₂ インキュベーターにて培養した。さらに, 10 ng/ml の interleukin (IL)-1 β (Genzyme 社), または 20 ng/ml の PMA (Sigma 社) とデキサメサゾン (Sigma 社) 10⁻⁶M を添加するものとししないもので 4 時間培養したあと, Tri-Reagent™ (Molecular Research Center 社) を用いて滑膜培養細胞から RNA を抽出した。

COX1 および 2 mRNA の発現は Northern blot 法で調べた。まず, 20 μ g の RNA を 1.5% アガロース/4% ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動し, ナイロン膜へ転写した。

つぎに, 2~5 $\times$ 10⁶ cpm/ml の COX1 または 2 の cDNA プローブと 42°C, 24 時間, 50% ホルムアミド中でハイブリダイゼーションを行った。洗浄後, -80°C で 2 週間オートラジオグラフィーを行い, コダック XAR フィルムに露光した。バンドの強さは Molecular Dynamics 社の scanner で判定した。

(6) 統計学的検討

有意差検定は Wilcoxon rank sum test により行い, 危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

結 果

(1) RT-PCR 法による RA 患者滑膜における COX1 および 2 mRNA の検出

5 例の RA 患者滑膜組織では全例 COX1 および 2 mRNA の存在が証明された (図 1)。

(2) RA および OA 患者滑膜における COX1 および 2 蛋白発現の検索

RA および OA 患者滑膜組織を抗 COX1 または 2 抗体を用いて免疫染色した。RA 患者滑膜では COX1 および 2 蛋白ともに, 表層細胞層, 血管内皮細胞, 炎症性単核球, フィブロblast 様細胞において強く発現していた (図 2A, B, 3A, B)。

一方, OA 患者では図 4A, B のように, 滑膜表層細胞において抗 COX1 および 2 抗体でわずかに免疫染色されるのみであった。

COX 発現の強さを統計学的に検討した。図 5 に示すように, COX1, 2 ともに RA 患者滑膜では OA 患者にくらべ, 有意に発現が増強していた (P<0.01)。

図 4 OA 患者滑膜における COX1 および 2 の発現
A: 抗 COX1 抗体による免疫染色 (×100)
B: 抗 COX2 抗体による免疫染色 (×100)

(3) 培養 RA 滑膜細胞における種々の刺激による COX1 および 2 mRNA の発現とデキサメサゾンによる抑制効果

未刺激の培養 RA 滑膜細胞では Northern blot 法により, COX1 および 2 mRNA の発現がわずかに認められた (図 6)。IL-1 β の刺激により, COX2 mRNA は 10 倍以上に増加した。デキサメサゾンは IL-1 β による COX2 mRNA の発現を完全に抑制した。また, PMA 刺激でも COX2 mRNA の著明な発現増強がみられた。デキサメサゾンは 10⁻⁹~10⁻⁶M の濃度で PMA による COX2 mRNA の発現を抑制した (一部成績未発表)。

一方, COX1 mRNA は IL-1 β 刺激による影響をまったく受けなかった。PMA 刺激では COX1 mRNA のわずかな発現増強がみられた。またデキサメサゾンは未刺激での COX1 mRNA にも IL-1 β や PMA 刺激後の COX1 mRNA にもまったく影響を与えなかった。

図5 滑膜組織における COX1 および 2 発現の統計学的検索

A: RA および OA 患者における COX2 発現の強さを Wilcoxon rank sum test で比較した。

B: RA および OA 患者における COX1 発現の強さを Wilcoxon rank sum test で比較した。

図6 培養 RA 滑膜細胞における種々の刺激に対する COX1 および 2 mRNA の発現の検索
IL-1β (10 ng/ml) または PMA (20 ng/ml) で培養 RA 滑膜細胞をデキサメサゾン (10⁻⁶M) の存在下または非存在下に 6 時間刺激したあと、Northern Blot 法により COX1 および 2 mRNA の発現を調べた。

考 察

本研究により、RA 患者滑膜組織において COX1 および 2 蛋白が著明に発現していること、その存在部位に差がないこと、RT-PCR 法により COX1 および 2 mRNA が存在することなどが示された。RT-PCR では COX2 の mRNA 量が

COX1 に比べやや少ないことが示唆された。しかし、COX2 mRNA は非常に速く変性することが知られており¹⁶⁾、その影響があると考えられる。

一方、COX1 mRNA は非常に安定して複製される。すなわち、COX1 と COX2 mRNA の転換には差があり、mRNA 量が酵素活性を正確にあらわしているとはいえない。

さらに、本研究で筆者らは、培養 RA 滑膜細胞における COX アイソホームの発現様式が種々の刺激で異なるか否かを検討した。COX1 および 2 mRNA は未刺激でも発現しており、IL-1β や PMA 刺激により著明な増加を認めた。一方、COX1 mRNA はまったく影響を受けなかった。さらに、デキサメサゾンは種々の刺激による COX2 mRNA の発現を著明に抑制した。

一方、COX1 mRNA はデキサメサゾンの影響をまったく受けなかった。アクチノマイシン D は未刺激、IL-1β 刺激後の COX2 mRNA 発現を抑制した(成績未発表)。これも、COX2 mRNA の転換が非常に速いことを示している。

COX2 の発見により、これまでの COX に関する種々の実験結果を COX1 および 2 にわけて検討する必要がある。3T3 線維芽細胞では PMA 刺

激により COX1 mRNA の増加がみられる¹⁷⁾。ヒト臍帯血内皮細胞では IL-1 α 刺激により、COX1 mRNA や蛋白の増加がみられる¹⁸⁾。Masferer らは腹腔内マクロファージにおいて、LPS 刺激により IL-1 や TNF α などのサイトカイン産生が誘導されるとともに、COX2 蛋白が合成されることを示した¹⁹⁾。筆者らの成績と同様に、種々の細胞においてサイトカインやマイトゲンによる COX2 の誘導とデキサメサゾンによる COX2 発現の抑制が報告されている^{3,20)}。

本研究により、RA 患者滑膜における COX1 および COX2 の発現増強、培養滑膜細胞での IL-1 刺激による COX2 の発現増強などが証明された。今後、種々のサイトカインによる PG 産生誘導について、COX1 および COX2 の個々の役割をさらに検討する必要がある。

筆者らはこれまで、デキサメサゾンがラットのアジュバントおよび SCW 関節炎の発症と COX 発現を抑制することを報告した¹²⁾。コルチコステロイドは視床下部—下垂体—副腎(HPA)系の最終産物であり、もっとも強力な内因性炎症抑制剤である²¹⁾。IL-1, IL-6, TNF α などのサイトカインは HPA 系を活性化させ、コルチコステロイド産生を増強させる^{22,23)}。

RA 患者では種々の HPA 系の機能異常が知られている^{24,25)}。また、末梢血リンパ球のグルココルチコイドレセプターの減少も報告されている²⁶⁾。さらに、RA 患者では滑膜細胞における IL-1 の著明な産生や炎症に対するコルチゾールの産生低下が認められている²⁵⁾。それらが RA 患者滑膜での COX2 の著明な発現の原因となっているのかもしれない。

RA の治療には NSAIDs がもっとも多く使用されている。しかし、大部分の NSAIDs は COX2 と同時に COX1 も抑制するため、COX1 の存在する胃粘膜や腎乳頭部に障害を与え、胃潰瘍や腎障害などの副作用を引き起こす³⁾。最近開発された NSAID の NS-398 は COX2 を特異的に抑制すると報告されている²⁷⁾。

筆者らも NS-398 がアジュバント関節炎を抑えるとともに、COX2 の発現を関節組織においても抑えることを確認した(成績未発表)。今後、COX2 を特異的に抑える NSAIDs が副作用も少

なく、安心して使える RA の治療薬としてますます開発されるであろう。

本論文の要旨は、第 15 回日本炎症学会(1994 年 7 月、東京)において発表した。また、本研究の一部は平成 5、6 年度文部省科学研究費一般研究 C (No. 05807042)、平成 5 年度日本リウマチ財団調査・研究費、平成 6 年稲盛財団助成金によって行われた。

文 献

- 1) DeWitt, D. L.: Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1083: 121-134, 1991.
- 2) Xie, W., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L., Simmons, D. L.: Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2692-2696, 1991.
- 3) Hla, T., Neilson, K.: Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7384-7388, 1992.
- 4) Davies, P., Bailey, P. J., Goldenberg, M. M., Ford-Hutchinson, A. W.: The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 335-357, 1984.
- 5) Abramson, S. B., Weissmann, G.: The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 32: 1-9, 1989.
- 6) Robinson, D. R., Tashjian, A. H. J., Levine, L.: Prostaglandin-stimulated bone resorption by rheumatoid synovia: a possible mechanism for bone destruction in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 56: 1181-1188, 1975.
- 7) Eastgate, J. A., Symons, J. A., Wood, N. C., Grinlinton, F. M., di Giovine, F. S., Duff, G. W.: Correlation of plasma interleukin-1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* ii: 706-709, 1988.
- 8) Bucala, R., Ritchlin, C., Winchester, R., Cerami, A.: Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Exp. Med.* 173: 569-574, 1991.
- 9) Mizel, S. B., Dayer, J. M., Krane, S. M., Mergenhagen, S. E.: Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2472-2477, 1981.
- 10) Fu, J. I., Masferrer, J. L., Seivert, K., Raz, A., Needleman, P.: The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 265: 16737-16740, 1990.
- 11) Koehler, L., Hass, R., DeWitt, D. L., Resch, K., Goppelt-Strube, M.: Glucocorticoid-induced

- reduction of prostanoid synthesis in TPA-differentiated U937 cells is mainly due to a reduced cyclooxygenase activity. *Biochem. Pharmacol.* 40 : 1307-1316, 1990.
- 12) Sano, H., Hla, T., Maier, J. A. M., Crofford, L. J., Case, J. P., Maciag, T., Wilder, R. L. : *in vivo* cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J. Clin. Invest.* 89 : 97-108, 1992.
- 13) Crofford, L. J., Wilder, R. L., Ristmaki, A., Sano, H., Remmers, E. F., Epps, H. R., Hla, T. : Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues : effects of interleukin-1 β , phorbol ester, and corticosteroids. *J. Clin. Invest.* 93 : 1095-1101, 1994.
- 14) Sano, H., Engleka, K., Mathern, P., Hla, T., Crofford, L. J., Goldmuntz, E., Maciag, T., Wilder, R. L. : Coexpression of phosphotyrosine-containing proteins, platelet-derived growth factor-B, and fibroblast growth factor-1 *in situ* in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and Lewis rats with adjuvant or streptococcal cell wall arthritis. *J. Clin. Invest.* 91 : 553-565, 1993.
- 15) Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., Rutter, W. J. : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 : 5294-5299, 1979.
- 16) Ristmaki, A., Garfinkel, S., Wessendorf, J., Maciag, T., Hla, T. : Induction of cyclooxygenase by interleukin-1 α : evidence for post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 269 : 11769-11775, 1994.
- 17) Lin, A. H., Bienkowsky, M. J., Gorman, R. : Regulation of prostaglandin H synthase mRNA levels and prostaglandin biosynthesis by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 264 : 17379-17383, 1989.
- 18) Maier, J. A. M., Hla, T., Maciag, T. : Cyclooxygenase in an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265 : 10805-10808, 1990.
- 19) Masferrer, J. L., Seibert, K., Zweifel, B., Needleman, P. : Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 3917-3921, 1992.
- 20) Lee, S. H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sum, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D., Hwang, D. : Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 267 : 25934-25938, 1992.
- 21) Abramson, S. B., Weissman, G. : The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 32 : 1-9, 1989.
- 22) Sapolsky, R., River, C., Yamamoto, G., Plotsky, P., Vale, W. : Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin releasing factor. *Science* 238 : 524-526, 1987.
- 23) Harbuz, M. S., Stephanou, A., Sarlis, N., Lightman, S. L. : The effects of recombinant human interleukin(IL)-1 α , IL-1 β , or IL-6 on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation. *J. Endocrinology* 133 : 349-355, 1992.
- 24) Cash, J. M., Crofford, L. J., Gallucci, W. T., Sternberg, E. M., Gold, P. W., Chrousos, G. P., Wilder, R. L. : Pituitary-adrenal responsiveness to ovine corticotropin releasing hormone in patients with rheumatoid arthritis treated with low dose prednisone. *J. Rheumatol.* 19 : 1692-1696, 1992.
- 25) Chikanza, I. C., Petrou, P., Kingsley, G., Chrousos, G. P., Panayi, G. S. : Defective hypothalamic response to immune and inflammatory stimuli in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35 : 1281-1288, 1991.
- 26) Schlaghecke, R., Kornely, E., Wollenhaupt, J., Specker, C. : Glucocorticoid receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35 : 740-744, 1992.
- 27) Futaki, N., Takahashi, S., Yokoyama, M., Arai, I., Higuchi, S., Otomo, S. : NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase(COX-2) activity *in vitro*. *Prostaglandins* 47 : 55-59, 1994.