

サルコイドーシス患者肺胞リンパ球の Interleukin-2 receptor α (IL-2R α) mRNA の 発現に関する研究

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

西 崎 浩

(平成 5 年 11 月 16 日受稿)

Key words : sarcoidosis, interleukin-2 receptor α ,
reverse transcription-polymerase chain reaction,
alveolar lymphocyte, *Propionibacterium acnes*

緒 言

サルコイドーシス(サ症)は未だ原因不明の疾患であるが、気管支肺胞洗浄法(bronchoalveolar lavage; BAL)の進歩と、これにより得られた細胞等の免疫学的研究により、その病態はしだいに明らかにされつつある^{1,2)}。サ症患者の肺局所ではTリンパ球、特に helper T-cell が増加し、組織学的には T-cell alveolitis より非乾酪性類上皮細胞肉芽腫形成へと進展し、サ症の病巣形成にはTリンパ球が中心的な役割をはたしていると考えられている^{3,4)}。これらTリンパ球の増殖には Interleukin-2 (IL-2) の分泌と、細胞表面への Interleukin-2 receptor (IL-2R) の発現が必要とされている⁵⁾。今回著者は BAL により得られた肺胞リンパ球を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR 法) を用いて IL-2R α (p55) mRNA の発現を分子生物学的に検討した^{6,7,8)}。更に本症病巣より高頻度に検出される *Propionibacterium acnes* (P. acnes)⁹⁾ の肺胞リンパ球 IL-2R α mRNA の発現への関与についても検討した。

対 象 と 方 法

1. 対 象

対象は未治療サ症患者 8 例、うち男性 3 例、女性 5 例で、年齢は 23 歳から 54 歳であった (Table

1)。胸部 X 線病期は、I 期 6 例、II 期 2 例で、喫煙者は 3 例であった。7 例が経気管支的肺生検により組織学的にサ症と診断され、残りの 1 例は臨床的にサ症と診断した。PPD 皮内反応は 6 例が陰性、血清アンギオテンシン変換酵素 (ACE) は 8 例中 5 例が高値を示し、平均 26.6 ± 7.8 IU/L で、血清リゾチーム活性は検査を行った 6 例全例が高値を示し、平均 19.9 ± 7.4 μ g/ml と上昇していた。対照として健常人 5 例に BAL を施行した。

2. 方 法

BAL は右中葉気管支に気管支鏡を挿入し、生理食塩水 50ml による洗浄を 4 回繰り返す、合計 200ml にて洗浄を行った。得られた有核細胞は RPMI 1640 で洗浄したのちプラスチックシャーレ中で反応後、付着細胞を除去し、非付着細胞をリンパ球分画として採取した。採取したリンパ球はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄したのち 3×10^5 個を用いて、Kawasaki らの方法に従って cytoplasmic RNA を抽出した⁸⁾。すなわち 0.5% Nonidet P-40, 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0.1% Diethylpolycarbonate を含む isotonic high-pH buffer 100 μ l 中で細胞膜を融解し、12,000G, 4℃, 2 分間、遠沈して核を分離し、さらに上清を 90℃, 5 分間加熱した後、蛋白を遠沈除去して cytoplasmic RNA を抽出した。得られた

Table 1 Patients characteristics

Case	Sex	Age	Stage	Smoking	Histological diagnosis	PPD skin test	ACE* activity	Lysozyme activity
1	F	46	I	—	+	—	19.4	13.0
2	F	33	I	+	+	—	28.5	14.5
3	F	54	I	—	+	—	26.9	ND
4	F	43	I	—	—	+	20.9	15.9
5	M	23	II	+	+	—	34.7	34.2
6	F	39	I	—	+	+	15.0	16.6
7	M	50	I	—	+	—	40.9	ND
8	M	37	II	+	+	—	26.7	25.6

* Angiotensin converting enzyme

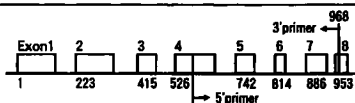
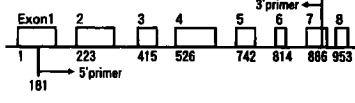
Molecule	Amplified DNA size	Primer sequences and primer location
IL-2R	398b	5'primer: 5'GAATTTATCATTTCGTGGTGGGCA3' 3'primer: 5'TCTTCTACTCTCTCTGTCTCCG3' 
IL-2R	777b	5'primer: 5'ATGGATTCATACCTGCTGAT3' 3'primer: 5'GAGCCCACTCAGGAGGAGGA3' 
β actin	319b	5'primer: 5'ATCATGTTTGAGACCTTCAA3' 3'primer: 5'CATCTCTTGCTCGAAGTCCA3' 

Fig. 1 Primer sequences for amplification of IL-2R α and β actin.

cytoplasmic RNA に50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 4 mM MgCl₂, 1 mM dATP (Takara), 1 mM dGTP (Takara), 1 mM dCTP (Takara), 1 mM dTTP (Takara), 2.5 μ M random hexamer (Takara), placental RNase inhibitor (Takara) (1 u/ μ l), reverse transcriptase (RAV-2, Takara) (0.3u/ μ l) を加え42℃, 1時間反応させ, cDNA を合成した。95℃, 5分間加熱することにより逆転写酵素を不活化したのち, cDNA 溶液をそのまま用いて PCR を行った。合成した cDNA 溶液20 μ l にそれぞれ Fig. 1に示す5'primer 50 pmoles, 3'primer 50pmole と Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) 3 uを加え, denature を95℃にて1分間, annealing を55℃にて1分間, extending を72℃にて3分間行い, これを1 cycle として計35cycle の PCR を行っ

た。最後にクロロホルム抽出により PCR 産物を得た。IL-2R α primer として, 2種類の primer を用いた (Fig. 1)。1つは CLONTECH Laboratories 社製で, 5'側は exon 4 内の25 base が, 3'側が exon 8 から exon 7 内の24 base が設定され, 塩基配列により398 base の cDNA が増幅される。もう1つは DNA合成機 (Applied Biosystem) を用いて作製した primer で, exon 1 に含まれる20 base と, exon 7 内の20 base で, PCR により777 base の cDNA が増幅されるように塩基配列を選択した。また内部対照として β actin の mRNA を検出するため, 319 base の cDNA が増幅されるような primer も合成した (Fig. 1)。PCR 産物は1%アガロースゲル中 (FMC) で電気泳動した後, エチジウムブロマイドで発色した。電気泳動したアガロースゲルは, Vacu Gene XL (Pharmacia LKB)

を用いて Gene screen plus (DuPont) に転写した。転写後 α 32 P dCTP (ICN) を用い、 32 P で標識した IL-2R α exon 4 (320 base : Oncor) と β actin (770 base : Oncor) を probe として Southern blot 法により hybridization を行った。Membrane は洗浄した後、autoradiography を24時間行い得られたシグナルを photodensitometer (FAST SCAN ; Molecular Dynamics) にて測定し、mRNA の相対的な発現量を比較した。また採取したサ症肺胞リンパ球の一部をそれぞれ同一条件下で無刺激群、P. acnes PER (Propionibacterium acnes pyridine extract residue) 5 μ g/ml 添加群、PHA (Phytohemagglutinin P ; BACTO) 10 μ g/ml 添加群に分けた後、12時間培養し、同様に IL-2R α (p55) mRNA の発現を検討した。

結 果

1. 気管支肺胞洗浄液中細胞成分

サ症8例ではBALにより $27.1 \pm 13.2 \times 10^6$ 個の有核細胞が得られた。有核細胞のうちリンパ球比率は $28.6 \pm 20.3\%$ と健康人に比し著明に増加していた。リンパ球サブセットをみるとCD4陽性リンパ球の増加が認められ、CD4/CD8は 8.53 ± 4.86 と高値を示していた。健康人では

$26.6 \pm 23.1 \times 10^6$ 個の有核細胞が得られ、リンパ球比率は $6.6 \pm 3.6\%$ であった (Table 2)。

2. MT-1 細胞における IL-2R α mRNA の検出

IL-2R α を恒常的に発現している HTLV-1 感染細胞株 MT-1 を用いて RT-PCR 法により IL-2R α mRNA の検出ができるか否かについて検討した。MT-1 細胞の細胞濃度希釈系列を作り、398 base の cDNA が増幅される IL-2R α primer と β actin primer を用いて RT-PCR を行った。アガロースゲル上のバンドと Southern blot 法で hybridization した結果を比較すると、アガロースゲル上の398 base のバンドに一致して hybridization し、細胞数に比例して mRNA の発現の増加が認められた (Fig. 2)。しかし、陰性対照として用いた K-562 細胞には発現が認められなかった。また逆転写反応を行わなかった場合もシグナルは認められず、genomic DNA の混入でないことも確認された。アガロースゲル上のバンドは IL-2R α mRNA 由来であり、発現陽性細胞数と IL-2R α mRNA 発現量に正の相関が認められたことより、本法により同一条件下で mRNA の発現量の比較が可能と考えられた。

Table 2 Cellular components of bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis and healthy individuals

Case		Number of cells	Cell population (%)		Lymphocyte subset (%)			
		($\times 10^6$)	Macro.	Lym.	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
Sarcoidosis	1	54.4	26.3	73.7	81.2	73.8	5.7	12.95
	2	31.0	79.6	20.4	85.4	74.4	12.3	6.05
	3	11.1	84.5	15.5	85.5	72.9	3.8	19.20
	4	21.4	84.5	15.5	56.8	69.7	5.9	11.81
	5	31.4	50.4	45.6	97.8	72.6	20.8	3.47
	6	10.5	94.1	5.0	87.6	71.6	10.0	7.16
	7	23.7	70.8	28.0	61.9	45.7	9.5	4.81
	8	33.0	73.7	25.3	91.4	63.1	22.6	2.79
Control	1	12.9	91.9	7.6	69.9	32.6	42.1	0.77
	2	71.8	99.0	0.8	73.3	34.1	42.4	0.80
	3	24.4	94.2	5.8	75.1	59.1	26.2	2.25
	4	12.3	89.7	6.7	93.3	71.4	21.2	3.37
	5	11.8	86.4	12.0	83.1	62.7	20.3	3.09

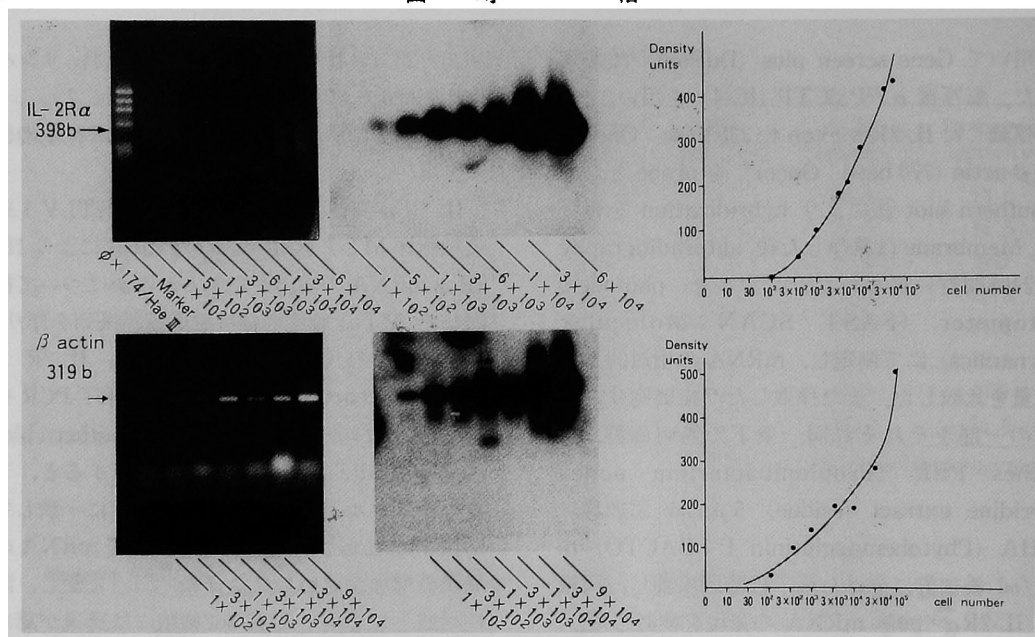


Fig. 2 IL-2R α and β actin gene expression of MT1 cells using RT-PCR. The intensities of IL-2R α gene expression were closely correlated to the cell numbers applied to RT-PCR.

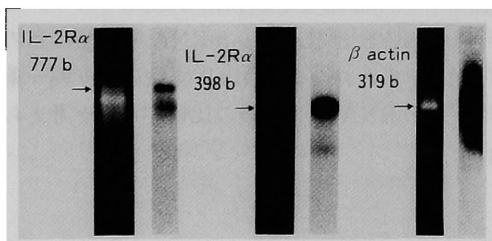


Fig. 3 IL-2R α gene and β actin gene expression of lymphocytes recovered from BALF of Case. 2 using RT-PCR.

3. ヒト肺胞リンパ球における IL-2R α mRNA の発現

症例 2 の肺胞リンパ球を用いて IL-2R α mRNA の発現を RT-PCR で検討した。アガロースゲル中で、エチジウムブロマイドにて発色させると、用いた 2 種の IL-2R α primer に対応して 398 base と 777 base の部位にバンドが認められた。Southern blot 法を行うと、アガロースゲル上に認められたバンドに一致して、IL-2R α mRNA の発現が認められた。また内部対照として用いた β actin primer も 319 base の部位に一致してバンドが認められた (Fig. 3)。本法によりサ症肺胞リンパ球は IL-2R α mRNA

を発現していることが確認された。BAL により得られる細胞数、特にリンパ球数には限度はあるものの、RT-PCR 法を用いれば限られた細胞数であっても、mRNA 発現の検討が可能と考えられた。

4. サルコイドーシス患者肺胞リンパ球における IL-2R α mRNA の発現

8 例のサ症患者肺胞リンパ球を用いて 398 base の primer による RT-PCR を行ったところ、mRNA のシグナルの発現強度に差はあるものの、8 例全例に IL-2R α mRNA の発現が認められた。しかし対照健常人は同数の肺胞リンパ球を用いても発現は認められなかった (Fig. 4)。 β actin はサ症患者、対照健常人のいずれにも認められた。即ち対象サ症患者 8 例と対照健常人 5 例の肺胞リンパ球の IL-2R α mRNA の発現は、サ症では 8 例全例に IL-2R α mRNA 由来 cDNA (398 base, 777 base) の発現が認められたが、健常人では 5 例ともその発現は認められなかった (Table 3)。なお内部対照として用いた β actin はサ症患者、対照健常人ともに発現が認められ、サ症患者においては健常人に比し IL-2R α mRNA の発現が亢進していることが

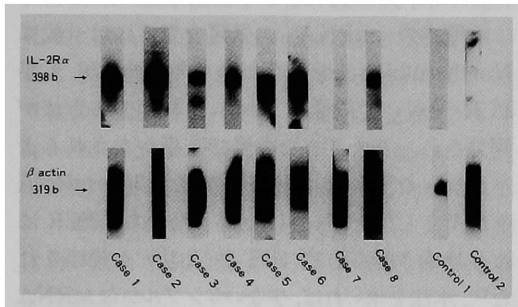


Fig. 4 IL-2R α gene expression of lymphocytes recovered from BALF using RT-PCR. Southern blot analysis shows that patients with pulmonary sarcoidosis had increased expression of IL-2R α mRNA compared with healthy individuals.

Table 3 Gene expression for IL-2R α mRNA (777b and 398b) in Southern blot analysis followed by RT-PCR of pulmonary sarcoidosis and healthy individuals

Case No.	Primers for IL-2 mRNA		
	777b	398b	
Sarcoidosis	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	ND	+
	6	ND	+
	7	ND	+
	8	ND	+
Control	1	ND	—
	2	ND	—
	3	—	ND
	4	—	ND
	5	—	ND

+ : Expression was positive in Southern blot analysis followed by RT-PCR

- : Expression was negative

ND : Assay was not done

認められた。

5. サルコイドーシス患者肺胞リンパ球における P. acnes 刺激, PHA 刺激による IL-2R α mRNA の発現

サ症患者肺胞リンパ球では, すでに IL-2R α mRNA の発現が亢進していることが認められたが, 刺激による発現の違いを比較するためサ症

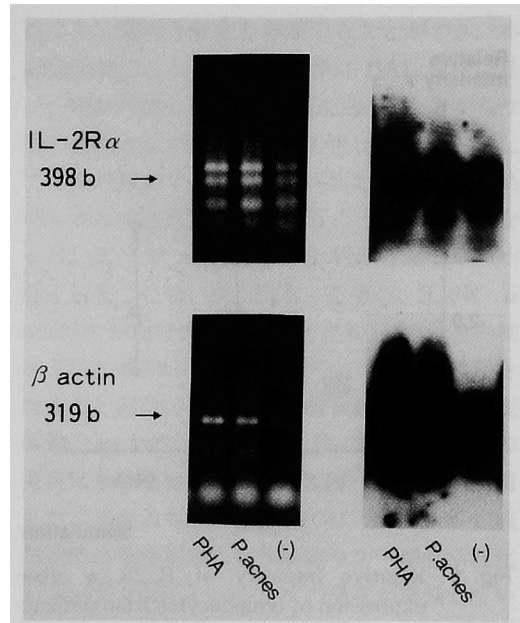


Fig. 5 IL-2R α gene and β actin gene expression using RT-PCR of alveolar lymphocytes of case 6 incubated with PHA, P. acnes and stimulant for 12 hours.

患者 8 例中 6 例で, RPMI 1640 のみの無刺激群, P. acnes PER 5 μ g/ml 添加群, PHA 10 μ g/ml 添加群の 3 群に分け 12 時間培養したのち cytoplasmic RNA を抽出し, RT-PCR を行い IL-2R α (398 base) および β actin mRNA 由来の cDNA を増幅し電気泳動, 転写後, Southern blot 法を行い, photodensitometer にて測定し相対的な発現量を比較した。症例 6 における IL-2R α mRNA および β actin mRNA の発現を Fig. 5 に示した。またこれら 6 症例における P. acnes, PHA 刺激時の IL-2R α mRNA の発現を photodensitometer にて測定して, 無刺激時との相対的な発現量を比較した。

その結果無刺激時を 1.0 とした場合, P. acnes 刺激では 2.23 ± 1.46 となり 6 例中 5 例で発現が増加し, PHA 刺激では 2.14 ± 0.61 と 4 例全例で増加が認められた。P. acnes 刺激した場合, PHA 刺激した場合と同程度の発現の増強が認められた (Fig. 6)。

考 察

サ症は原因不明の全身性肉芽腫性疾患である。

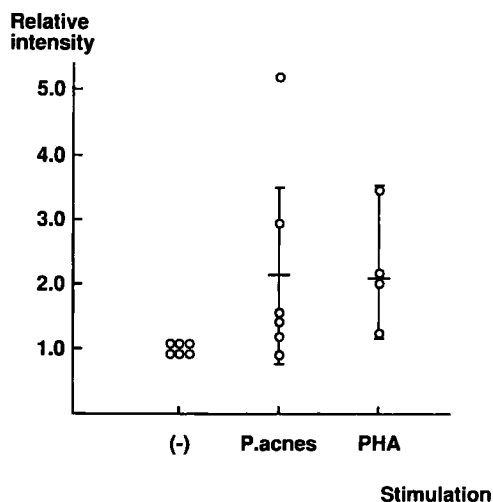


Fig. 6 Relative intensity of IL-2R α gene expression of lymphocytes from patients with pulmonary sarcoidosis after 12 hours incubation with PHA, P. acnes and no stimulant.

その多くに肺病変の合併が認められ、肺局所ではリンパ球、特に helper T-cell が増加し、T-cell alveolitis を経て類上皮細胞肉芽腫形成に至ると考えられている^{2,3,4)}。これらT細胞の増殖には、IL-2 の産生、分泌亢進とリンパ球表面への IL-2R の増加が必要とされている⁵⁾。活性化T細胞表面には高親和性および低親和性 IL-2R が検出されるが、高親和性 IL-2R は、IL-2R α (p55, Taq 抗原) ならびに IL-2R β (p70-55) が非共有結合性に会合して形成されるヘテロダイマーと考えられ、 α 鎖の発現が β 鎖に比べはるかに多いため β 鎖と会合しなかった α 鎖そのものが低親和性 IL-2R として検出される。IL-2R α の発現はT細胞活性化刺激に依存し、高親和性 IL-2R 形成の on/off スイッチとして機能し、IL-2R β は構成的に発現し IL-2 に対する増殖シグナルの伝達を担っていると推定されている¹⁰⁾。このように IL-2R α はT細胞が活性化し増殖する場合重要な役割をはたしている。著者らはこれまでサ症肺胞リンパ球の IL-2 産生、分泌が亢進し、さらに IL-2R の発現も亢進していることを報告してきた¹¹⁾。これらの現象が細胞内においていかなる段階での亢進かを検討するため IL-2R α に注

目し、mRNA の発現を分子生物学的に検討した。

細胞内の mRNA の発現を見るには一般に Northern blot 法が行われてきた^{12,13)}が、近年 PCR を用いて微量の DNA を検出する方法が開発され、さまざまな分野で応用がなされるようになった⁷⁾。さらに逆転写酵素を用い mRNA を鋳型として cDNA に変換したのち、PCR により増幅させる方法 (RT-PCR 法) が提唱された¹⁴⁾。本法を用いれば、少ないサンプルから mRNA の発現を検出可能であると考え、気管支肺胞洗浄により得られた肺胞リンパ球から IL-2R α mRNA の検出を試みた。RT-PCR を行う場合も total RNA、さらには mRNA にまで精製して行うのが一般的であるが、本実験では NP-40 により細胞膜を融解して cytoplasmic RNA を取り出し、逆転写酵素により mRNA を直接 cDNA に変換し、この cDNA を IL-2R α primer を用いて PCR により目的の DNA を増幅させた。そして RT-PCR 法によれば BALF 中リンパ球 IL-2R α mRNA の検出が十分行えることが確認できた。

本法では 2 回の酵素反応を行い増幅させ、また用いた材料も培養細胞などに比較して不均一なため、発現の定量性には問題が残る。最近の RT-PCR 法における mRNA の定量に関しても、相対的定量による比較が試みられているが、諸家の報告はさまざまである^{15,16)}。今回は内部対照として β actin mRNA の検出を同時に行い、これらを比較することにより、IL-2R α mRNA のバンドが検出されなかった場合の反応の良否を決定した。

サ症患者および対照健康人に気管支肺胞洗浄を行い、得られた肺胞リンパ球を用いて RT-PCR 法により IL-2R α mRNA の発現の検討を行ったところ、サ症患者 8 例全例に発現が認められたが対照健康人 5 例には認められなかった。理論的には対照健康人でも IL-2R α mRNA は量的に少なくとも存在していると考えられるが本法では検出できなかった。また内部対照として用いた β actin はサ症患者、対照健康人のいずれにも認められており、サ症肺胞リンパ球では spontaneous に IL-2R α mRNA が発現していることが確認できた。Muller-Quernheim ら¹³⁾も

Northern blot 法により、サ症肺胞リンパ球に IL-2R α mRNA が spontaneous に発現していることを報告しており、さらに Konishi ら¹²⁾はサ症末梢血のリンパ球にも IL-2R α mRNA が spontaneous に発現していることを認めている。活動期サ症では、IL-2R α mRNA を有するリンパ球が肺局所より末梢血に移行し、さらに肺に再び戻って IL-2 により、更に増殖している可能性がある¹²⁾。

今回検討したサ症 8 例は、いずれも肺胞リンパ球の CD 4/CD 8 が高値の症例で活動期と考えられる症例である。活動期サ症の肺胞リンパ球、特に CD 4 陽性 T リンパ球は非刺激下でも IL-2 を産生していることが報告されており¹⁷⁾、その結果 autocrine に IL-2R 陽性細胞が増殖していると考えられる。これらのことは、soluble IL-2R が肺局所に増加していることから裏付けられる^{18,19)}。

IL-2R 分子を構成するサブユニットのなかでも、IL-2R α の発現は抗原など T 細胞活性化刺激に依存し、迅速かつ一過性に発現し高親和性 IL-2R を形成し機能することが知られている^{10,20)}。今回のサ症肺胞リンパ球の増加と IL-2R α の mRNA レベルでの発現の増強は、何らかの外的刺激を受けて肺胞リンパ球が活性化されることが推察される。

サ症の病因は不明であるが、ある種の細菌、ウイルスなどによる外的病因説がある。本間らを中心とした文部省サルコイドーシス研究班はサルコイドーシス病巣から細菌の分離培養を行い、高頻度かつ高濃度に *P. acnes* を分離しサ症病態への関与を推察している⁹⁾。この嫌気性細菌は生体常在菌で細胞壁にミコール酸を有し、アジュバンド活性を示すことが知られており、サ症免疫機構において有力な感作抗原として想定されている²¹⁾。中田らは未治療サ症の肺胞リンパ球に *P. acnes* PER を混合培養するとリンパ球の幼若化が亢進することを報告している^{22,23)}。

更に著者らはサ症肺胞リンパ球は *P. acnes* 刺激により IL-2 の産生分泌が亢進され¹¹⁾、リンパ球増殖反応が亢進することを認め²²⁾、本症の病態への *P. acnes* の関与を報告してきた。またモルモットに *P. acnes* を経気道的感作すること

により、肺肉芽腫症を作製することができ、本動物実験でもヒトサ症と同様に BAL 液中にリンパ球が増加し IL-2 産生の亢進することからサ症の病因としての可能性を示唆している²⁴⁾。そして今回の検討で、肺胞リンパ球はすでに mRNA のレベルで活性化されていることが明らかになった。更に *P. acnes*、PHA 刺激で肺胞リンパ球を培養した後 RT-PCR を用い IL-2R α mRNA の相対的な発現量を比較したが、その結果 PHA 刺激によって肺胞リンパ球が活性化されるのと同様に *P. acnes* 刺激によってもサ症肺胞リンパ球は活性化され IL-2R α mRNA の発現は無刺激時よりさらに増強することが判明した。すなわち、サ症患者では *P. acnes* が経気道的に抗原刺激となり肺胞リンパ球を活性化し IL-2R mRNA レベルでの発現が増強している可能性が推察された。

しかし、*P. acnes* はヒトにおいては常在菌であり、一方サ症発症の頻度はきわめて低いことから内的免疫異常の関与が考えられる。サ症患者では病因物質となりうる抗原刺激に暴露され、さらに免疫応答の異常があってはじめて IL-2 の産生、IL-2R の発現がおこり T 細胞の増殖を引き起こし、一連のサ症の病態を形成している可能性が示唆される。

このように遺伝子レベルでの解明はサ症発症の原因物質へ一歩近づけるものと考えられ、*P. acnes* と他のサイトカインの mRNA への関与についても検討中である。

結 論

サ症患者肺胞リンパ球における IL-2R α (p55) mRNA の発現を RT-PCR を用いて検討した。さらに *P. acnes* 刺激による発現強度の比較も試み以下の成績を得た。

1. IL-2R α を恒常的に発現している MT-1 を用いて、実験に用いた細胞数と RT-PCR 法による IL-2R α mRNA の発現強度を比較した。この結果、細胞数に比例して mRNA の発現が認められ、本法によれば同一条件下で mRNA の発現量の比較が可能と考えられた。

2. サ症患者 8 例と健常者 5 例で RT-PCR 法により気管支肺胞洗浄により得られた肺胞リン

パ球の IL-2R α mRNA の発現を検討したところ、サ症患者では IL-2R α mRNA の発現は検討した 8 例全例に認められたが、健常者 5 例では認められず、サ症患者肺胞リンパ球 IL-2R α は mRNA レベルで活性化されていることが判明した。

3. サ症患者肺胞リンパ球を *P. acnes* 添加培養すると、IL-2R α mRNA の発現の増強が認められ、*P. acnes* のサ症病態への関与が窺われた。

以上より活動期サ症肺局所ではリンパ球が活性化されており、T-cell alveolitis を来とし、さらには類上皮細胞肉芽腫へと進展していくと考えられた。

本論文を撰筆するにあたり、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また、終始御懇篤なる御指導を賜った片岡幹男講師、大槌泰亮助教授、医療短期大学部中田安成教授に深謝します。

文 献

- 1) The BAL Cooperative Group Steering Committee : Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison group. *Am Rev Respir Dis* (1990) **141**, 169—202.
- 2) 長井苑子 : サルコイドーシスの臨床と検査所見 ; BALF 所見 — 病態生理学的考察. *最新医学* (1988) **43**, 1507—1515.
- 3) Huminghake GW and Crystal RG : Pulmonary sarcoidosis ; A disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N Engl J Med* (1981) **35**, 429—434.
- 4) Thomas PD and Hunninghake GW : State of art : Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* (1987) **135**, 747—760.
- 5) Wakasugi H, Bertoglio J, Tursz T and Fradelizi D : IL 2 receptor induction on human T lymphocytes : Role for IL 2 and monocytes. *J Immunol* (1985) **135**, 321—327.
- 6) Leonard WJ, Depper JM, Kanehisa M, Kronke M, Peffer NJ, Svetlik PB, Sullivan M and Greene WC : Structure of the human interleukin-2 receptor gene. *Science* (1985) **230**, 633—639.
- 7) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T : In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction ; in *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Irwin N ed, New York Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York (1989) pp 1—35.
- 8) Kawasaki ES : Sample preparation from blood, cells, and other fluids ; in *PCR protocols*, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ eds, New York Academic Press, New York (1990) pp 146—151.
- 9) 本間日臣 : サルコイドーシスの発生機構に関する研究 ; 難病の発生機構, 文部省特定研究難病班, 豊倉康夫編, 東大出版会, 東京 (1981) pp 245—304.
- 10) 畠山昌則 : インターロイキン 2 受容体 —— 新たなレセプターファミリーの形成. *実験医学* (1990) **8**, 19—27
- 11) 森 由弘, 中田安成, 片岡幹男, 江尻東伍, 飛岡 徹, 前田 剛, 細谷茂衛, 大槌泰亮, 木村郁郎 : サルコイドーシス肺胞リンパ球の *Propionibacterium acnes* 刺激による Interleukin-2 産生及び Interleukin-2 receptor 発現の検討. *日胸疾会誌* (1989) **27**, 42—50.
- 12) Konishi K, Moller DR, Saltini C, Kirby M and Crystal RG : Spontaneous expression of the interleukin 2 receptor gene and presence of functional interleukin 2 receptor on T lymphocytes in the blood of individuals with active pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* (1988) **82**, 775—781.
- 13) Muller-Quernheim J, Kronke M, Strausz J, Schykowski M and Ferlinz R : Interleukin-2 receptor gene

- expression by bronchoalveolar lavage lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* (1989) **140**, 82—88.
- 14) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (1988) **239**, 487—491.
 - 15) Wang M, Doyle MV and Mark DF : Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci* (1989) **86**, 9717—9721.
 - 16) 牧野鈴子 : PCR を用いた特定 mRNA の定量的検出. *Cell Science* (1990) **6**, 29—33.
 - 17) Saltini C, Spurzem JR, Lee JJ, Pinkston P and Crystal RG : Spontaneous release of interleukin-2 by lung T lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis is primarily from the Leu3+DR+T cell subset. *J Clin Invest* (1986) **77**, 1962—1970.
 - 18) Keicho N, Kitamura K, Takaku F and Yatsumoto H : Serum concentration of soluble Interleukin-2 receptor as a sensitive parameter of disease activity in sarcoidosis. *Chest* (1990) **98**, 1125—1129.
 - 19) 伊奈康孝, 高田勝利, 野田正治, 佐藤俊英, 羽柴初美, 宮地厚雄, 伊藤伸介, 飯島直人, 山本正彦, 森下宗彦 : サルコイドーシスにおける血中遊離 IL-2 レセプター 特にその起源に関する検討. *日胸疾会誌* (1991) **29**, 316—321.
 - 20) 畠山昌則, 谷口維紹 : IL-2 システムの分子生物学. *免疫薬理* (1987) **5**, 35—47.
 - 21) 三上理一郎 : 日本におけるサルコイドーシス研究の歩み. *最新医学* (1988) **43**, 1553—1561.
 - 22) 中田安成, 江尻東伍, 岸 俊行, 小林洋三, 藤田道雄, 大熨泰亮, 木村郁郎 : サルコイドーシス肺胞リンパ球の *Propionibacterium acnes* に対する反応性の検討. *日胸疾会誌* (1985) **23**, 413—419.
 - 23) 木村郁郎, 中田安成, 多田慎也, 江尻東伍, 小林洋三, 森 由弘 : サルコイドーシスの成因に関する検討 — *Propionibacterium acnes* の関与 —. 厚生省特定疾患間質性肺疾患調査研究班, 昭和59年度研究報告書 (1985) pp 167—172.
 - 24) 木村郁郎, 中田安成, 多田慎也, 江尻東伍, 森 由弘 : サルコイドーシス肉芽腫形成における *Propionibacterium acnes* の関与 — *P. acnes* 感作による実験的肺肉芽腫モルモットの肺胞リンパ球の動態 —. 厚生省特定疾患間質性肺疾患調査研究班, 昭和61年度研究報告書 (1987) pp 171—173.

Interleukin-2 receptor α (p55) mRNA expression in alveolar lymphocytes of patients with sarcoidosis

Hiroshi NISHIZAKI

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

T-lymphocytosis was detected in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. To clarify the mechanism of this phenomenon, interleukin-2 receptor (IL-2R) α gene expression of lymphocytes recovered from bronchoalveolar lavage fluid was investigated in 8 patients with sarcoidosis and 5 healthy individuals, using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Cytoplasmic RNA derived from alveolar lymphocytes was reverse transcribed by RAV-2 reverse transcriptase to cDNA. The cDNA produced by reverse transcription was subjected to PCR. The primers of IL-2R α were utilized and a template derived from IL-2R mRNA was amplified by PCR. Southern blot analysis using ^{32}P labeled cDNA probe for IL-2R α was performed followed by PCR. The intensities of IL-2R mRNA expression in Southern blot analysis were closely correlated to the cell numbers determined in RT-PCR.

All patients with sarcoidosis had higher expression of IL-2R α mRNA transcript in alveolar lymphocytes compared with healthy individuals. Moreover, the expression increased after stimulation by *Propionibacterium acnes* in 5 of 6 patients with sarcoidosis.

These findings suggest that alveolar T-lymphocytes in the patients with sarcoidosis were activated and played a central role in the pathogenesis of sarcoidosis.