

<図17>

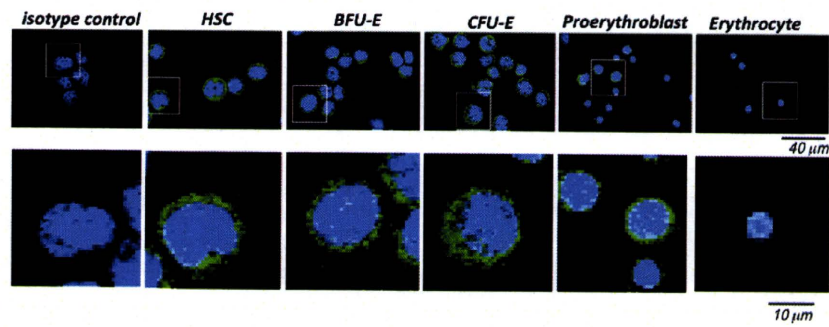


図17: マウス胎仔肝臓の赤血球分化における*Hmgn2*発現

*Hmgn2*タンパク質発現を免疫組織化学的に調べた。胎生12.5日目の造血幹細胞、BFU-E、CFU-E、赤芽球、赤血球のサイトスピン標本を作製後、*Hmgn2*抗体を用いて染色し、共焦点顕微鏡で観察した。*Hmgn2*はグリーン、TOTO-3はブルーで示した。下段のパネルは上段ボックス中の拡大図。スケールバーは上段40μm、下段10μmである。

<図18>

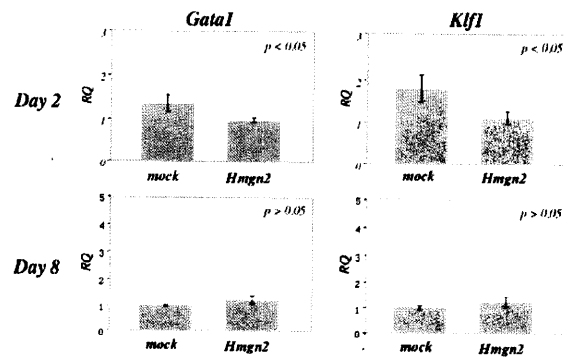


図18:フレンド赤白血病細胞におけるHmgn2過剰発現実験-1

赤血球分化制御転写因子*Gata1*, *Klf1*の発現。

Hmgn2-GFP挿入プラスミドをエレクトロポレーションにて遺伝子導入した。分化培養2日後のGFP陽性

(Hmgn2導入)細胞における*Gata1*, *Klf1*発現は、Mockコントロールと比較して低かった($p < 0.05$)。分化培養

8日後ではHmgn2導入、Mock導入間でそれらの発現レベルに有意差は認められなかった($p > 0.05$)。

<図19>

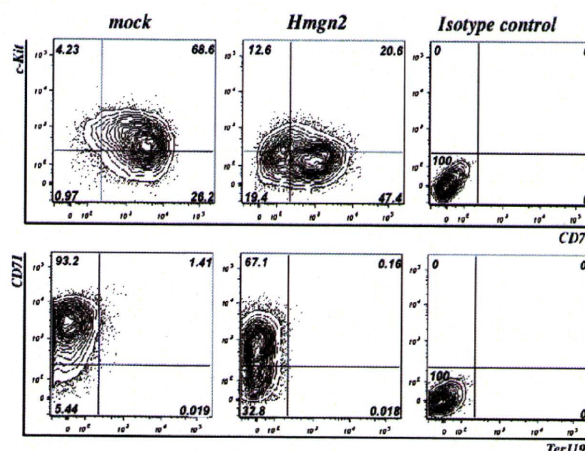


図19:フレンド赤白血病細胞におけるHmgn2過剰発現実験-2

フローサイトメトリーによる、c-Kit, CD71, Ter119の発現確認。

Hmgn2-GFP挿入プラスミドをエレクトロポレーションにて遺伝子導入した。

Hmgn2導入細胞を2日後にGFP

を指標に選別し、分化培養8日後に表面抗原の発現を確認した。

Mockコントロールでは69%のc-Kit+/CD71+細胞(CFU-Eに相当)と4.2%のc-Kit+/CD71-(BFU-Eに相当)が認められたのに対し、Hmgn2導入細胞では21.0%のc-Kit+/CD71+細胞(CFU-Eに相当)と12.6%のc-Kit+/CD71-(BFU-Eに相当)が認められた。Hmgn2導入細胞のCD71+/Ter119+(proerythroblastsに相当)の割合(1.4%)はMockコントロール(0.16%)よりも低い値を示した。

<図20>

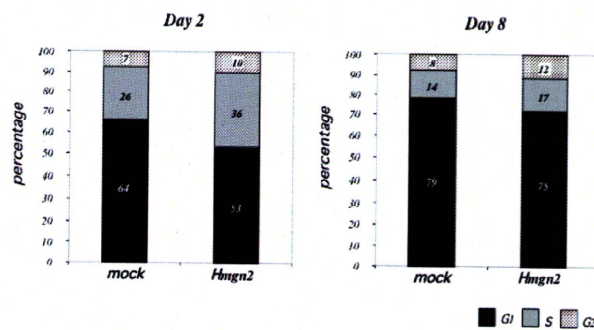


図20:フレンド赤白血病細胞における細胞周期の検討。

Hmgn2遺伝子導入2日後、GFP陽性Hmgn2導入細胞ではS期の割合は36%で、Mockコントロールでは26%であった ($p < 0.05$)。分化培養8日後ではHmgn2導入、Mock導入細胞間のS期の割合(14%, 17%)に有意差は認められなかった。

<図21>

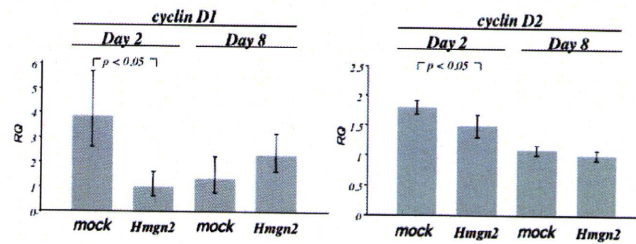


図21:フレンド赤白血病細胞におけるG1期特異的遺伝子の発現検討。
G1期特異的遺伝子(サイクリンD1,D2)の発現をqPCR法にて調べた。
Hmgn2導入2日後の細胞ではサイクリンD1,D2の発現抑制が認められた
($p < 0.05$)ものの、8日後ではHmgn2導入、Mock導入細胞で両者のmRNA発
現レベルに有意差は認められなかった。

<図22>

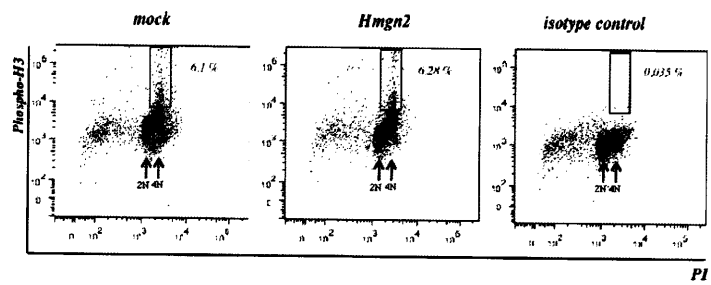


図22:フレンド赤白血病細胞における有糸分裂解析。

フローサイトメトリー法にて、G2期から後期の指標としてセリン10のリン酸化ヒストンH3の解析を行った。

遺伝子導入2日後における有糸分裂細胞の割合はHmgn2導入、Mock導入細胞で有意差は認められなかった($p>0.05$)。

<図23>

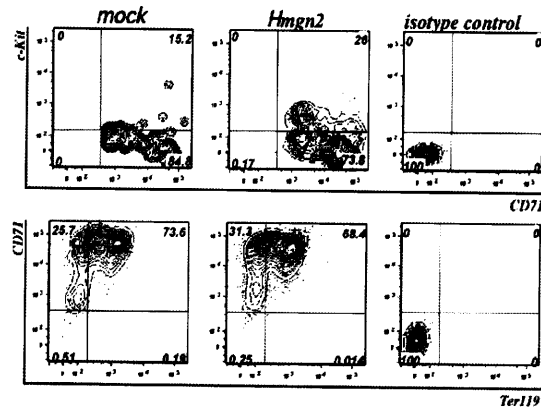


図23: マウス胎仔肝臓におけるHmgn2過剰発現実験-1

フローサイトメトリーによる、c-Kit, CD71, Ter119の発現確認。

胎齢12.5日目のFLより単離した単核球へ、エレクトロポレーションによりHmgn2の導入実験を行った。導入2日後に、GFP陽性Hmgn2導入細胞のうちCD71+Ter119-細胞をソートし、SCF, IL-3, EPO下で7日間培養した。、Hmgn2導入c-Kit+/CD71+細胞の割合は26%であり、Mockコントロールでの同細胞の割合は15.2%であった。またHmgn2導入CD71+/Ter119+細胞の割合は68.4%であり、はMockコントロールにおける同細胞の割合は73.6%であった。

<図24>

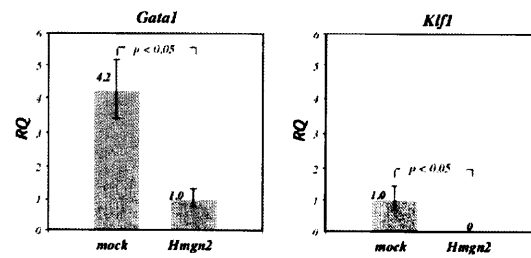
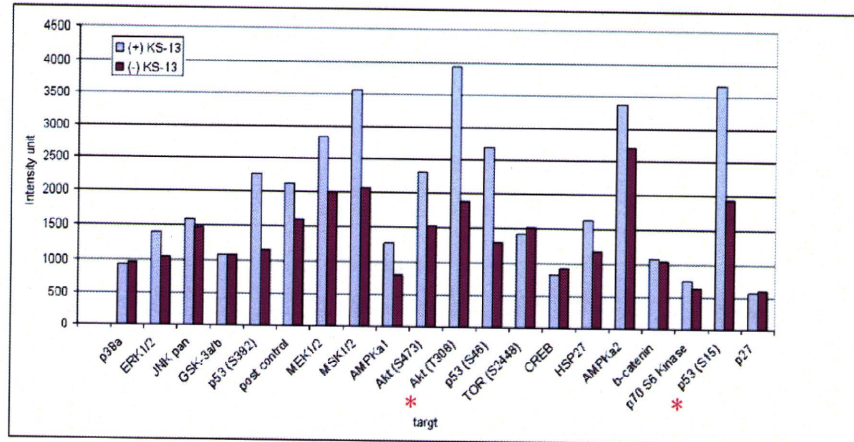


図24:マウス胎仔肝臓におけるHmgn2過剰発現実験-2

赤血球分化制御転写因子*Gata1*, *Klf1*の発現。

図23と同様の方法で培養後、Hmgn2導入細胞ではMockコントロールに比べ、*Gata1*の発現レベルが4.2倍低く、*Klf1* 発現はHmgn2導入細胞では検出されなかった。

<図25>



KS-13によるAktとp53のリン酸化

図25: 臍帯血CD34陽性細胞を用いたPhospho-Kinase array

ヒト臍帯血CD34陽性細胞をKS-13添加無血清培地X-VIVO10で24時間培養し、Phospho-Kinase array kit (R&D社)を用いてリン酸化の解析を行った。KS-13はAktとp53をリン酸化する事が明らかになった。

<図26>

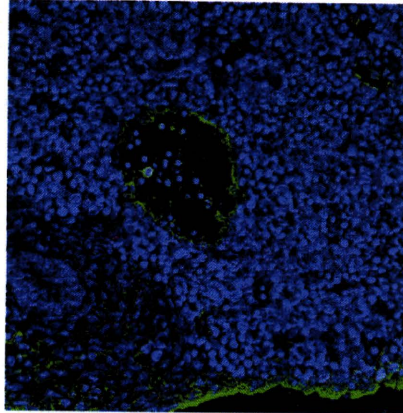


図26: 胎仔肝臓組織におけるKS-13及びKS-13前駆体の発現
胎齢14.5日目マウス胎仔肝臓を抗KS-13抗体で免疫染色した。
緑はKS-13発現細胞。肝臓被膜、類洞血管内皮、一部の血液細胞が陽性だった。

<図27>

Mm1
マウス骨髓性白血病細胞株

PE-Cy7:
Gr-1(顆粒球マーカー)

APC:
F4-80(マクロファージマーカー)

PE:
Mac-1(骨髓球マーカー)

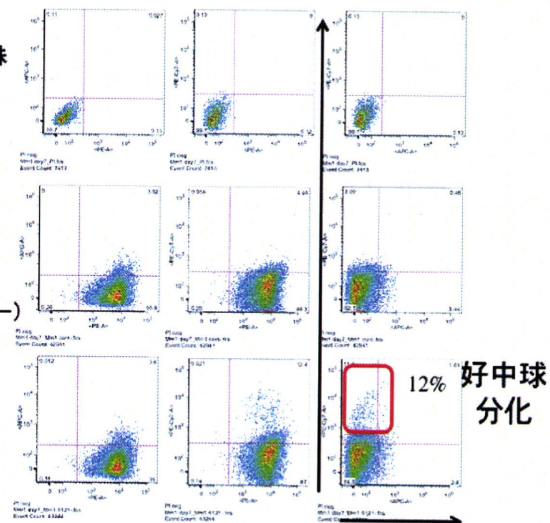


図27:抗KS-13抗体の分化誘導効果

マウス骨髓急性白血病細胞株Mm1へ抗KS-13抗体を添加し培養した。
7日後に12%の細胞がGr-1陽性顆粒球へ分化した。

<図28>

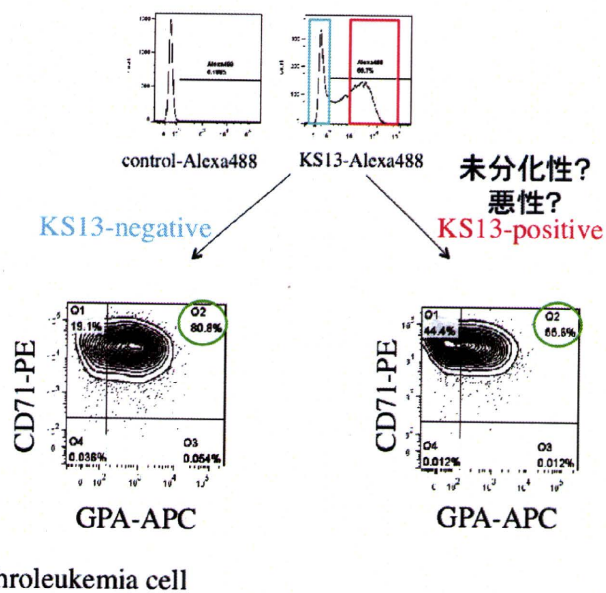


図28:ヒト白血病細胞株K562におけるKS-13及びKS-13前駆体の発現解析

Flow cytometry法でヒト白血病細胞株K562におけるKS-13の発現解析を行った。69%のK562細胞がKS-13あるいはKS-13前駆体を細胞表面に発現していた。更に、K562細胞株をKS-13陽性／陰性分画に分離・採取し、NaB添加培養により赤血球分化を誘導したところ、培養4日目にKS-13陽性細胞株はGlycophorin Aを62.1%発現し、陰性細胞株よりも低い赤血球分化能保持する事が明らかになった。

<図29>

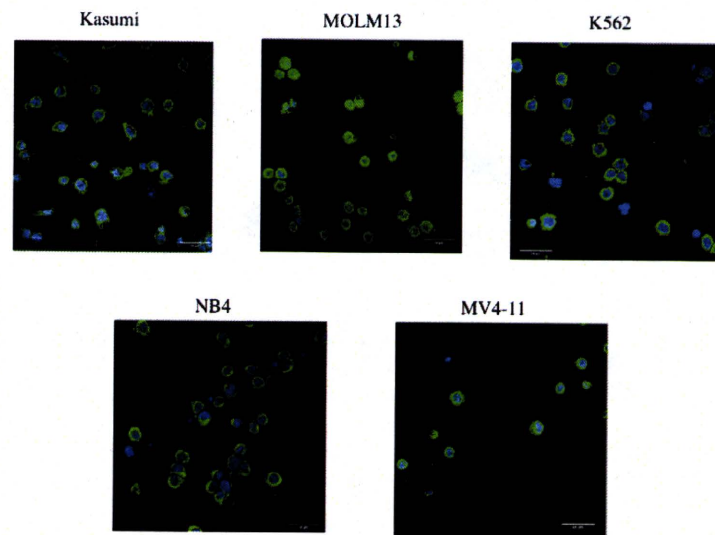


図29:ヒト白血病細胞株におけるKS-13及びKS-13前駆体の発現

免疫染色法を用いて、ヒト白血病細胞株におけるKS-13の発現解析を行った。すべての株において、概ね70%の細胞がKS-13あるいはKS-13前駆体陽性であり、その発現は細胞表面と細胞質に認められる事が明らかになった。

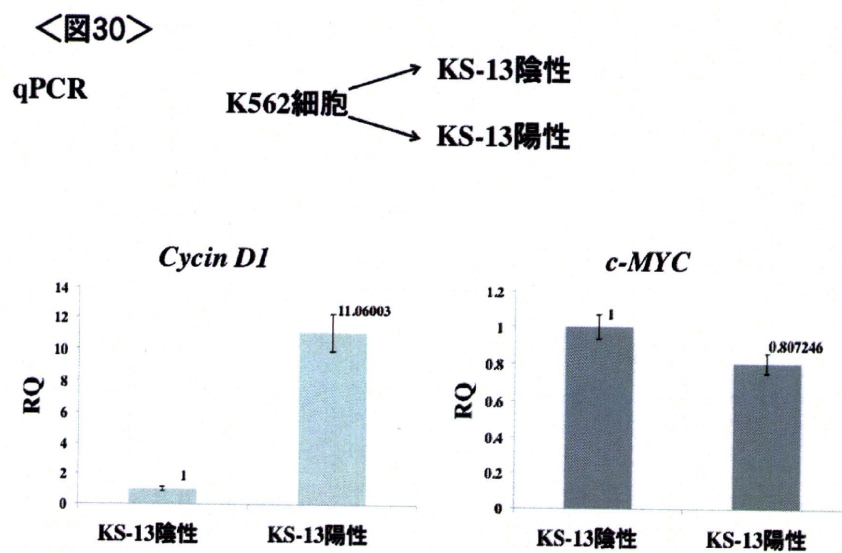


図30:KS-13陽性群・陰性群における遺伝子発現比較解析

図28に準じてK562細胞をKS-13陽性群・陰性群に分離・採取し、qPCR法で遺伝子発現解析を行った。

KS-13陽性K562細胞株は陰性細胞株の11.1倍の*CyclinD1*遺伝子発現、0.8倍の*c-Myc*遺伝子発現を認めた。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugiyama D, Kulkeaw K, Mizuochi C, Horio Y, Okuyama S.	Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production	Biochem Biophys Res Commun			In press
Inoue T, Kulkeaw K, Okuyama S, Tani K and Sugiyama D.	Variation in Mesodermal and Hematopoietic Potential of Adult Skin-derived Induced Pluripotent Stem Cell Lines in Mice.	Stem Cell Reviews and Reports			In press
Kulkeaw K, Ishitani T, Kanemaru T, Ivanovski O, Nakagawa M, Mizuochi C, Horio Y, Sugiyama D.	Cold exposure down-regulates zebrafish pigmentation.	Genes to Cells	16(4)	358-367	2011
Inoue T, Sugiyama D, Kurita R, Oikawa T, Kulkeaw K, Kawano H, Miura Y, Okada M, Suehiro Y, Takahashi A, Marumoto T, Inoue H, Komatsu N, and Tani K.	APOA-1 is a novel marker of erythroid cell maturation from hematopoietic stem cells in mice and humans.	Stem Cell Reviews and Reports	7(1)	43-52	2011
Sasaki T, Mizuochi C, Horio Y, Nakao K, Akashi K and Sugiyama D.	Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/c-kit signaling in embryonic mouse.	Development	137(23)	3941-3952	2010

Title: Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production

Author(s):

Daisuke Sugiyama^{a,*}, Kasem Kulkeaw^a, Chiyo Mizuochi^a, Yuka Horio^a, and Satoko Okayama^a

Author affiliations:

^a Division of Hematopoietic Stem Cells, Advanced Medical Initiatives, Department of Advanced Medical Initiatives, Kyushu University Faculty of Medical Sciences, Fukuoka 812-8582 Japan

*** Corresponding author:**

Daisuke Sugiyama, MD, PhD
 Division of Hematopoietic Stem Cells
 Advanced Medical Initiatives, Department of Advanced Medical Initiatives
 Kyushu University Faculty of Medical Sciences
 Station for Collaborative Research1 4F
 3-1-1 Maidashi, Higashi-Ku, Fukuoka 812-8582 Japan
 Tel: +81-92-642-6146/6210
 Fax: +81-92-642-6146
 E-mail: ds-mons@yb3.so-net.ne.jp

Running title: Hepatoblasts regulate fetal liver erythropoiesis

Abstract word count: 126

Text word count: 3705

Number of figures: 3

Number of Tables: 0

Number of references: 31

Abstract

In mammals, definitive erythropoiesis first occurs in fetal liver (FL), although little is known about how the process is regulated. FL consists of hepatoblasts, sinusoid endothelial cells and hematopoietic cells. To determine niche cells for fetal liver erythropoiesis, we isolated each FL component by flow cytometry. mRNA analysis suggested that Dlk-1-expressing hepatoblasts primarily expressed *EPO* and *SCF*, genes encoding erythropoietic cytokines. EPO protein was detected predominantly in hepatoblasts, as assessed by ELISA and immunohistochemistry, and was not detected in sinusoid endothelial cells and hematopoietic cells. To characterize hepatoblast function in FL, we analyzed *Map2k4*^{-/-} mouse embryos, which lack hepatoblasts, and observed down-regulation of *EPO* and *SCF* expression in FL relative to wild-type mice. Our observations demonstrate that hepatoblasts comprise a niche for erythropoiesis through cytokine secretion.

Keywords: Hepatoblasts, Erythropoiesis, Fetal Liver

Introduction

Hematopoiesis is the process by which pluripotent hematopoietic stem cells (HSCs) are generated, differentiate into specific progenitors, and ultimately mature into numerous blood cell types, including erythrocytes, megakaryocytes, lymphocytes, neutrophils, and macrophages [1]. In the mouse embryo, HSCs and hematopoietic progenitors (HPCs) are generated in the aortic region, known as the para-aortic Splanchnopleura (p-Sp)/Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) region, the yolk sac (YS), and the placenta [2-9]. In mid-gestation, hematopoiesis, particularly erythropoiesis, occurs in fetal liver (FL) [2,9,10]. Erythropoiesis has been classically described as occurring in two waves: first primitive and then definitive erythropoiesis [4]. Primitive erythropoiesis supports a transient wave of embryonic erythropoiesis in the yolk sac, while definitive erythropoiesis contributes to adult-type erythropoiesis. In mammals, definitive erythropoiesis occurs first in FL and then shifts to adult bone marrow (BM) shortly before birth [11]. There are greater numbers of erythroid progenitors, such as burst-forming unit-erythroids (BFU-E) and colony-forming unit-erythroids (CFU-E), in FL than in BM [12]. In addition, in mice, the number of mature erythroid cells in circulation dramatically increases from 12.5 to 16.5 day post-coitum (dpc), suggesting that massive expansion of both erythroid progenitors and terminally differentiated erythroid cells occurs in FL [13]. Erythropoietin (EPO) is a cytokine that regulates erythroid cell differentiation, maturation, proliferation and survival, and is primarily produced by adult kidney cells, where production is up-regulated by hypoxia [14].

Terminal proliferation and differentiation of CFU-E is stimulated by EPO, whereas BFU-E, which are more immature than CFU-E, respond to stem cell factor (SCF), insulin-like growth factor (IGF)-1, corticosteroids, interleukin (IL)-3 and IL-6, in addition to EPO [15]. Although FL is the most active organ for erythropoiesis, little is known about how erythropoiesis is regulated in that tissue.

Here, in order to identify niche cells for erythropoiesis, we used flow cytometry based on surface molecule expression to separate cells in early FL into hepatoblasts (HBs), sinusoid endothelial cells (SECs) and hematopoietic cells (HCs), and then evaluated cytokine expression in each fraction.

Materials and methods

Animals. ICR and C57BL/6J mice were purchased from Nihon SLC (Hamamatsu, Japan) and Kyudo (Tosu, Japan), respectively. *Map2k4*^{+/-} mice were provided by RIKEN BioResource Center (Tsukuba, Japan). Noon of the day of the plug was defined as 0.5 day post-coitum (dpc). Embryos at 12.5 and 14.5 dpc were dissected in PBS under a stereomicroscope. Animals were handled according to Guidelines for Laboratory Animals of Kyushu University.

Flow cytometry. For hepatoblasts and sinusoid endothelial cells, fetal livers at 12.5 and 14.5 dpc were digested in 1mg/mL collagenase (Washington Biochem Co., Freehold, New Jersey) in alpha-MEM containing 20% FBS, filtered through 40-μm nylon mesh, and washed once with PBS. Cells were stained with a FITC-conjugated anti-mouse Dlk-1 Ab (MBL, Nagoya, Japan), a PE-conjugated anti-mouse Lyve-1 Ab (MBL), an APC-conjugated anti-mouse CD31 Ab (Biolegend, San Diego, CA), a PE-Cy7-conjugated anti-mouse CD45 Ab (eBioscience, San Diego, CA), and a PE-Cy7-conjugated anti-mouse Ter119 Ab (eBioscience).

Real time-PCR. RNA was extracted from sorted and fetal liver samples using a RiboPure™ kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) and mRNA was reverse transcribed using a High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Life Technologies). cDNA synthesis quality was evaluated by amplifying mouse *β-actin* by PCR. Thirty thermal cycles were employed as follows: denaturation at 95°C for 10 seconds, annealing at 60°C for 20