



[ウイルス感染症と免疫不全症]

限られたウイルスに易感染性を示す免疫不全症

石村匡崇* 高田英俊** 原 寿郎*

はじめに

ウイルスに対する感染防御において、ウイルス核酸を認識してインターフェロン (IFN) 産生を誘導する初期の自然免疫応答と、T/NK 細胞による細胞性免疫活性化が重要である。T 細胞機能不全症を示す重症複合免疫不全症や毛細血管拡張性小脳失調症、Wiskott-Aldrich 症候群などでは、種々のウイルスに対して特異的応答ができずに易感染性を示す。自然免疫応答において、細胞質に存在する RIG-I や MDA5 は細胞質内に存在するウイルス由来核酸を認識して IFN 産生を誘導するが、エンドソームに存在する Toll 様受容体 (TLR) 3 は、細胞質外に存在する 2 本鎖 (ds) RNA を認識し、IFN 産生を誘導する。

近年、単純ヘルペスウイルス (HSV) による脳炎や Epstein-Barr ウイルス (EBV) による血球貪食性リンパ組織球症 (HLH)、ヒトパピローマウイルス (HPV) による難治性疣贅など、ウイルス特異的な免疫不全症を示す疾患が明らかとなり、新たな原発性免疫不全症として分類されている¹⁾。本稿では、限られたウイルスに対して易感染性を示す免疫不全症について概説する。

I. HSV 脳炎を発症する原発性免疫不全症

HSV は、ヒトヘルペス科ウイルス α 亜科に属する約 152 kbp の 2 本鎖 DNA ウイルスの一種であり、一般的に 1 型は口唇・眼、2 型は性器に感染をひき起こし、通常は神経節に潜伏感染している。小児の急性脳炎のうち、HSV によるものは約 10% であり、6 歳未満に多く、発熱、けいれん、意識障害を呈する。以前より家族内で HSV 脳炎を発症する家系が知られており、何らかの遺伝的背景が存在すると考えられていた。

1. UNC93B1 欠損症

Casanova らは、2006 年に血族婚の両親より出生し HSV 脳炎を発症した 2 例で *UNC93B1* のホモ接合性変異を見出し、常染色体劣性遺伝形式をとる *UNC93B1* 欠損症を報告した²⁾。*UNC93B1* 欠損症患者ではウイルスに対する IFN 反応が欠損しており、易感染性を示すと考えられた。本報告が出た時点では *UNC93B1* の機能は明らかになっていなかったが、後に、*UNC93B1* は定常時は TLR と小胞体で結合しており、刺激により TLR をリガンドの認識の場であるエンドライソソームへと輸送する蛋白であることが報告され、*UNC93B1* 欠損症ではエンドライソソームへ TLR が輸送されないために TLR が機能せず、ウイルス感染への易感染性を示すと考えられた³⁾。

2. TLR3 欠損症

2007 年に、HSV 1 型による脳炎を発症した 2 家系の解析で、*TLR3* 変異が見出された⁴⁾。*TLR3* は脳内、樹状細胞、上皮細胞に発現しており、*TLR3*

ISHIMURA Masataka TAKADA Hidetoshi HARA Toshiro

* 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 (小児科)

[〒 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1]

TEL 092-642-5421 FAX 092-642-5435

E-mail: ischi@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp

** 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学

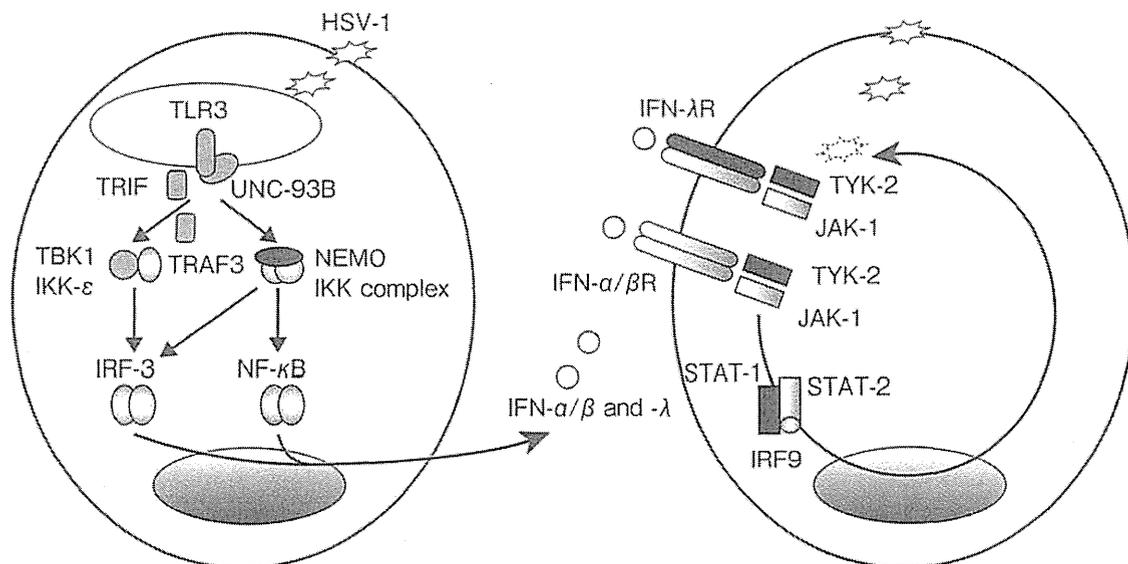


図1 ニューロン、オリゴデンドロサイト他中枢神経系細胞における HSV 感染による IFN 応答
 UNC93B1/TLR3/TRAF3/TRIF/TBK1 欠損症では HSV 脳炎のみ発症する。NEMO/TYK2/STAT1
 変異では HSV 脳炎以外に、抗酸菌や細菌、ウイルスに対して易感染性を示す。STAT2 変異ではウイ
 ルスに対して易感染性を示す。
 (Zhang ら⁶⁾, 2013)

欠損により HSV をはじめとするウイルス増殖を抑制できず、脳炎を発症すると考えられた。脳炎以外のヘルペスウイルス感染に関しては TLR3 以外の生体防御機構により対応し、易感染性を示さないのではないかと考えられたが、UNC93B1 欠損症と同様に、HSV 脳炎のみが特異的に発症する理由については明らかではなかった。

3. iPS 細胞を用いた UNC93B1 欠損症, TLR3 欠損症における HSV 脳炎の病態解明

誘導多能性幹細胞 (iPS) 細胞の登場により、HSV 脳炎の様に臓器特異的な易感染性を示す原発性免疫不全症の病態解析が可能となった。UNC93B1 欠損患者および TLR3 欠損患者が HSV 脳炎のみを発症するのは、その機序として中枢神経系に存在する非血液系細胞が発症に関わるのではないかと考えられた。

そこで、UNC93B1 欠損患者および TLR3 欠損患者由来 iPS 細胞から分化誘導し、神経幹細胞、ニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトを作製し、機能解析および HSV-1 感染実験がそれぞれの細胞集団で行われた⁵⁾。HSV-1 感染実験では、UNC93B1 欠損ニューロンとオリゴデンドロサイトで IFN-β および IFN-λ1 誘導が

障害されており、HSV-1 への感染感受性がみられたが、神経幹細胞やアストロサイトでは正常対照群と同等であった。また、TLR3 欠損ニューロンは同様に HSV-1 に感染感受性を示した。これらの感染感受性は外因性の IFN-α/β によりレスキューされたことより、UNC93B1 欠損症、TLR3 欠損症では中枢神経系の主としてニューロンやオリゴデンドロサイトでの、HSV-1 に対する TLR3 および UNC93B1 依存性 IFN-α/β の障害により HSV 脳炎を発症することが明らかとなった。

4. 自然免疫系と HSV 脳炎

現時点で原発性免疫不全症として、HSV 脳炎を示す疾患として UNC93B1 および TLR3 欠損症のほかに、TRAF3 欠損症、TRIF 欠損症および TBK1 欠損症が報告されている。これらの分子はすべて HSV 感染後に、TLR3 から IFN 産生に関与する経路のシグナル伝達物質である (図 1)。これまで原発性免疫不全症は造血系の免疫担当細胞の機能不全により易感染性を示すと考えられていたが、iPS 細胞を用いた HSV 脳炎の病態解析により、非造血系細胞の機能障害によって病原体および臓器特異的な易感染性を示すことが明らかとなり、原発性免疫不全症の新たな一面が見出されたことは

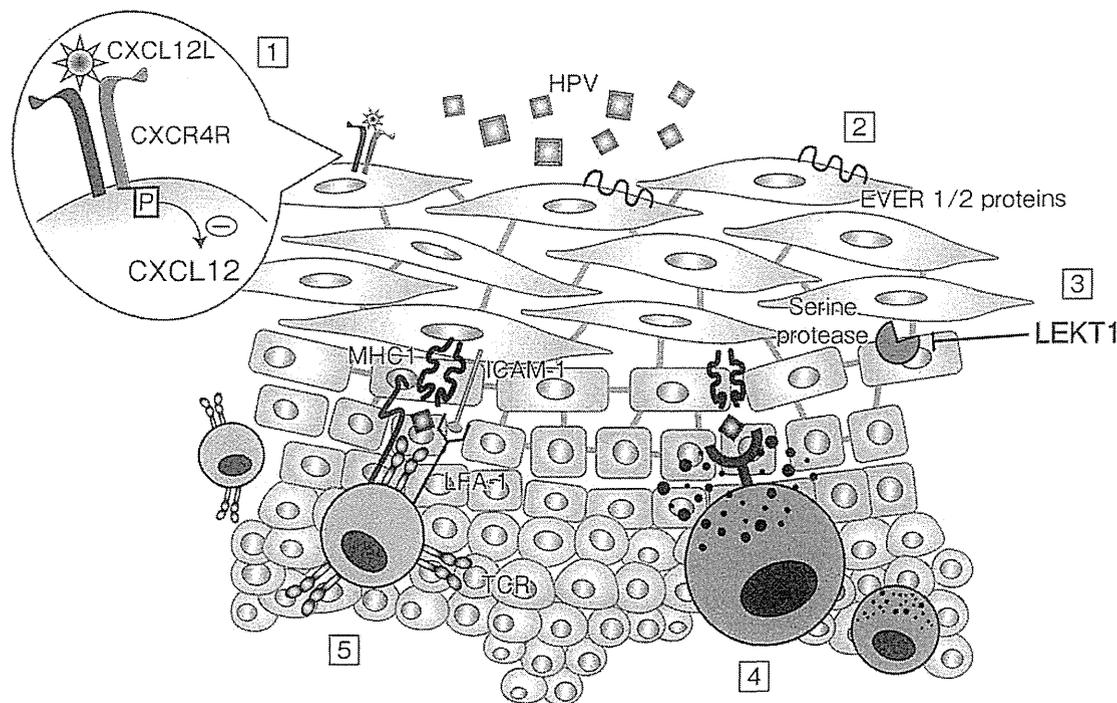


図 2 HPV に易感染性を示す疾患の病態
 ① WHIM 症候群 ② EV ③ Netherton 症候群 ④, ⑤ CD8 陽性 T 細胞および NK 細胞によるウイルス排除
 (Leiding ら⁹⁾, 2012 を改変)

非常に大きな知見である。

II. EBV に易感染性を示す原発性免疫不全症

EBV は 2 本鎖 DNA ウイルスであり、主として B 細胞に感染して伝染性単核症を発症するが不顕性感染も多く、感染後は生涯にわたり潜伏する。T 細胞や NK 細胞に感染すると、EBV 関連 HLH や慢性活動性 EBV 感染症を発症する。一方で、悪性疾患との関連がみられ、Burkitt リンパ腫で EBV は高率に陽性となる。また、上皮に感染して上咽頭癌の原因ともなる。EBV による致死的感染症や HLH を発症する原発性免疫不全症が知られている。

1. X 連鎖リンパ球増殖症 (XLP)

XLP は Duncan 病ともよばれ、致死的 EBV 感染症、異常グロブリン血症、悪性リンパ腫を特徴とし、HLH をきたす。現在 2 型が知られており、原因遺伝子は X 染色体上に存在する *SH2D1A* と *BIRC4* であり、それぞれ SAP/XIAP をコードする。SAP は SLAM と結合して T 細胞や NK 細胞におけ

る細胞傷害活性を亢進し、EBV 感染 B 細胞の排除に働く。XIAP はアポトーシスを抑制する蛋白であり、XIAP 欠損症患者由来リンパ球はアポトーシスを誘導されやすいが、なぜ EBV に易感染性を示すかは明らかではない⁷⁾。

2. 常染色体劣性遺伝形式をとる XLP 様疾患

EBV に対して易感染性を示す、常染色体劣性遺伝形式をとる XLP 様疾患の原因遺伝子として *ITK* および *CD27* の変異が近年同定された。これらの欠損症では、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、および NKT 細胞機能不全により EBV に対する易感染性を示すと考えられている⁸⁾。

III. HPV に対し易感染性を示す原発性免疫不全症

HPV はヒト乳頭腫ウイルスともよばれる 2 本鎖 DNA ウイルスであり、100 種類以上の型があることが知られている。上皮（皮膚および粘膜、とくに性器）に感染する。HPV の防御には CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞が重要で、多くの場合は一

過性の感染でウイルスは排除されるが、一部で疣贅、尖圭コンジローマ、子宮頸癌の原因となる。高IgE症候群の一つであるDOCK8欠損症などのT細胞機能不全症では、HPVに対して易感染性を示すが、そのほか疣贅を発症の特徴とする原発性免疫不全症が知られている(図2)。

1. WHIM 症候群

WHIM 症候群は wart (疣贅), hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, myelokathexis (骨髄中の顆粒球系細胞過形成を伴う好中球減少) を特徴とする症候群で、ケモカインレセプターであるCXCR4の機能獲得型変異による疾患である。CXCL12によるシグナル伝達が欠損し、白血球遊走能が阻害されHPVに易感染性を示し疣贅を発症する。

2. epidermodysplasia verruciformis (EV)

EVはLewandowsky-Lutz dysplasiaともよばれ、HPVに易感染性を示す症候群であり、EVER1またはEVER2の変異が同定されている。EVER1/EVER2は膜貫通型蛋白で、亜鉛の恒常性を制御しておりHPVの増殖抑制に関与している。

3. Netherton 症候群

Netherton 症候群はSPINK5変異により、重層上皮に発現するセリンプロテアーゼインヒビターであるLEKTIが欠損し、皮膚 integrity が不十分となりHSV、HPVなどの皮膚ウイルス感染症を発症する。

IV. 細胞融解型ウイルスに対し易感染性を示す原発性免疫不全症

細胞融解型ウイルスであるエンテロウイルス(ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス)、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルスなどでは、ウイルスが細胞外に遊離されるため、T細胞に加え抗体が感染防御に重要である。そのため、X連鎖無ガンマグロブリン血症などの抗体産生不全症では、細胞融解型ウイルスに対し易感染性を示す¹⁰⁾。

おわりに

HSV脳炎や、HPVによる難治性疣贅など、近年ウイルス特異的のみならず、組織特異的な原発性免疫不全症が見出されている。その原因として、造血系免疫担当細胞のみならず、非造血系細胞の機能障害によって病原体および臓器特異的な易感染性を示すことが明らかとなり、ウイルス特異的な易感染性を示す患者の診断のためには臓器特異性も考慮する必要がある。

また、原発性免疫不全症の病態解析のためにiPS細胞が用いられるようになり、患者由来iPS細胞を各組織へ分化誘導することで*in vitro*での解析が可能となり、今後ますます重要なツールとして用いられるだろう。

Key Points

- ① 限られたウイルスに対し易感染性を示す原発性免疫不全症が存在する。
- ② ウイルス特異的のみならず、臓器特異性を認める原発性免疫不全症が見出されている。
- ③ 易感染性の原因として造血系免疫担当細胞のみならず、非造血系細胞の機能障害によることもあることが明らかとなってきた。
- ④ 病態解析のためにiPS細胞が用いられるようになり、患者由来iPS細胞を分化誘導することで*in vitro*での解析が可能となっている。

文献

- 1) Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al : Primary immunodeficiency diseases : an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*, 2014 Apr 22 ; 5 : 162 doi : 10.3389/fimmu.2014.00162
- 2) Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, et al : Herpes simplex virus encephalitis in human UNC93B deficiency. *Science* 314 (5797) : 308-312, 2006
- 3) Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, et al : UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452 (7184) : 234-238, 2008

4) Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, et al : TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* **317** (5844) : 1522-1527, 2007

5) Lafaille FG, Pessach IM, Zhang SY, et al : Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. *Nature* **491** (7426) : 769-773, 2012

6) Zhang SY, Herman M, Ciancanelli MJ, et al : TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr Opin Immunol* **25** : 19-33, 2013

7) Pachlopnik Schmid J, Canioni D, Moshous D, et al : Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type

1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood* **117** : 1522-1529, 2011

8) Veillette A, Pérez-Quintero LA, Latour S : X-linked lymphoproliferative syndromes and related autosomal recessive disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **13** : 614-622, 2013

9) Leiding JW, Holland SM. : Warts and all : human papillomavirus in primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* **130** : 1030-1048, 2012

10) Fried AJ, Bonilla FA : Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev* **22** : 396-414, 2009

雑誌『小児内科』46巻9号(2014年9月増大号) 定価(5,400円+税)

特集 けいれん・意識障害

〔けいれん・意識障害の治療と管理〕

けいれん・意識障害への救急対応
 けいれん・意識障害のファーストエイド
 家族、救急隊からの連絡があったとき何を聞くか
 救急室への連絡と準備すること
 けいれん重積・意識障害を起こす疾患は何を考
 えるか
 患児が到着した。さあ何から始めるか
 けいれん・意識障害の診断・治療の進め方
 診察・問診のポイント
 検体検査の選択と解釈
 画像検査の選択と解釈
 生理検査の選択と解釈
 抗けいれん薬投与の選択と手順
 ジアゼパムの使い方と注意点
 ミダゾラムの使い方と注意点
 フェントイン、ホスフェントインの使い方と注意点
 静注用フェノバルビタールの使い方と注意点
 リドカインの使い方と注意点
 抱水クロラルの使い方と注意点
 チアマラル、チオペンタールの使い方と注意点
 けいれん抑制のための全身麻酔薬の使い方
 脳浮腫、頭蓋内圧亢進症の治療法は
 入院の適応はどのように判断するか
 入院後のモニタリングはどうするか
 けいれん停止後の再発予防はどうするか
 来院時、けいれん・意識障害が消失している
 ときにはどう対処するか
 けいれんに関する知識
 けいれんの定義と種類
 けいれんの機序と原因

てんかん重積(けいれん重積)状態とけいれん群発
 けいれんと間違えやすい生理的運動・異常行動
 けいれんを起こす疾患の鑑別診断
 抗てんかん薬の作用機序と副作用
 抗てんかん薬の薬物動態・薬剤相互作用
 抗てんかん薬と他の薬剤、食事との相互作用
 けいれん重積の治療ガイドライン
 家庭、学校でのけいれんへの対応
 意識障害に関する知識
 意識・意識障害の定義
 意識障害の機序と病態
 意識障害の種類と意識レベルの判定
 意識障害と脳幹反応
 意識障害とバイタルサイン
 脳浮腫、頭蓋内圧の評価
 意識障害を起こす疾患の鑑別診断
 浸透圧脳圧降下薬の作用機序と使用上の注意点
 脳循環・代謝改善薬の有用性
 選延性意識障害とその治療・管理
 〔けいれん・意識障害を起こす疾患の治療管理の
 ポイント〕

脳炎・髄膜炎、髄膜炎
 急性脳炎・急性脳症/細菌性髄膜炎
 脳血管障害、外傷、腫瘍
 脳血管性疾患/頭部外傷/脳腫瘍
 変性脱髄性疾患
 多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎
 てんかん、脳の機能的疾患

けいれんを主症状とするてんかん/意識障害を主
 症状とするてんかん/熱性けいれん/憤怒けいれ
 ん/良性乳児けいれん/胃腸炎関連けいれん

他臓器疾患、代謝障害による二次的脳障害
 失神発作/心・肺疾患によるけいれん・意識障
 害/電解質異常によるけいれん・意識障害/糖
 尿病性昏睡/先天代謝異常によるけいれん・意
 識障害/ミトコンドリア病/腎疾患に伴うけい
 れん・意識障害

薬剤・中毒・事故
 治療用薬剤によるけいれん・意識障害/向精神薬・
 睡眠薬・抗てんかん薬の中毒/農薬、エタノール、
 ニコチンの中毒/銀杏中毒/鉛中毒/低酸素脳
 症/熱中症/虐待による乳幼児頭部外傷
 精神心理疾患

転換性障害
 【トピック】
 インフルエンザ脳症の最近の話題



先天性免疫不全症と低栄養

九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野

戸田尚子 *Toda, Naoko* 原 寿郎 *Hara, Toshiro*

POINT ポイント

- 原発性（先天性）免疫不全症（PID）では栄養摂取量低下とエネルギー消費量増加により栄養収支バランスが崩れ、低栄養状態となり、結果として二次性免疫不全という悪循環に陥る。
- PID に対しても、一般的な食中毒予防対策と同様の常識的な衛生管理のもと、バランスのとれた食事、栄養を十分摂取するのが基本である。
- 慢性の低栄養状態では、不適切な栄養導入で代謝障害や呼吸循環器系、神経学のおよび血液学的合併症を生じる refeeding syndrome に留意する。



はじめに

免疫不全症とは、生体を構成する正常な組織・細胞と異なる物質や細胞を排除し生体を防御する機構が破綻し、種々の病原体に対する易感染性を示す疾患群である。遺伝的要因によるものを原発性（先天性）免疫不全症（primary immunodeficiency ; PID）、HIV などのウイルス感染・抗癌剤や免疫抑制剤などの薬物・栄養障害などに続発して起こるものを続発性免疫不全症という。免疫系はBリンパ球やTリンパ球による獲得免疫機構と、食細胞や補体などが関与する自然免疫機構とから成り立っている。獲得免疫機構の障害により抗体欠乏や細胞性免疫の異常が生ずる。さらに食細胞機能不全や補体欠損など、自然免疫機構の破綻により細菌などの反復感染が起こる。PIDはこのように多種多様の疾患群であり、その重症度も疾患により異なる。また、PIDでは種々の微生物による感染の反復や遷延をまねくのみならず、自己免疫疾患や悪性腫瘍の危険性も増大する。PIDの頻度は1万人に1人程度と報告されているが、未診断の軽症例を含めると数千人に1人とされている^{1,2)}。



PID と低栄養

PIDでは全般的に低栄養状態に陥りやすい。PIDでの低栄養状態にはさまざまな要因が関連しているが、主に下記の2点があげられる（図1）。

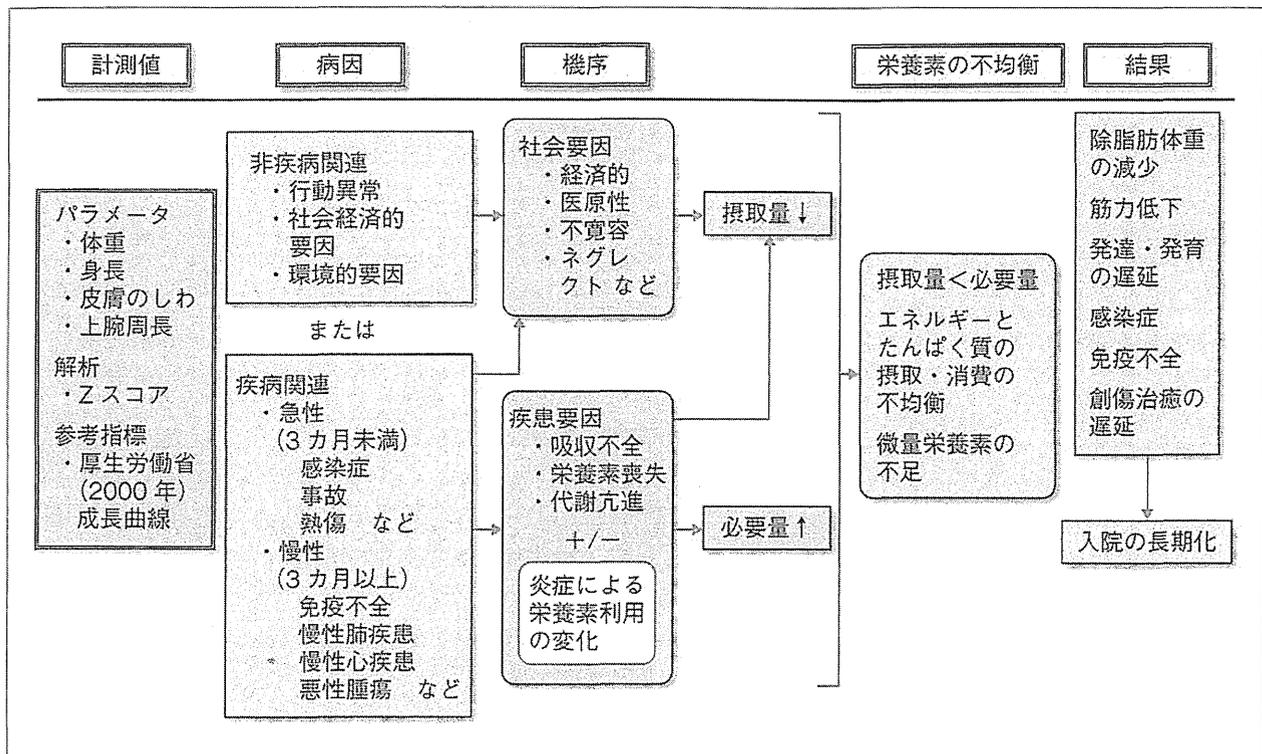
1) 栄養摂取量不足

PIDは感染を反復しやすく、多くが消化器症状を呈するほかに、悪性腫瘍の合併リスクも高く、基本的に全身状態不良がある。難治性下痢や炎症性腸疾患、悪性腫瘍の合併、薬剤の影響、また一部のPIDでみられる嚥下障害や食物アレルギーなどにより、食欲減退、食事摂取量の減少、特定の食物摂取の制限、吸収障害の結果、栄養摂取量が低下し必要な栄養素が不足する。

2) 必要栄養量の増大

感染の反復、炎症や悪性腫瘍などのストレスにより、代謝の亢進や栄養利用の変化が起こり、体が必要とする栄養素量・エネルギー量は増加する。推定エネルギー必要量の算出に用いられる活動係数、ストレス係数は、小児用の係数値は未定義であるため通常成人のものが使用されているが、感染症では1.2~1.4である。

図1 入院中の小児の低栄養



栄養評価のための計測パラメータについて、厚生労働省 2000 年の日本人小児の身長・体重成長曲線を参考に評価を行う。低栄養の背景として、非疾病関連の要因、または疾病関連の要因があり、後者であれば急性(3 カ月未満)の場合と慢性(3 カ月以上)の場合がある。栄養不良に陥る機序として、社会的要因(経済的, 医原性, 不寛容, ネグレクト, 摂食障害など)による栄養摂取の低下, 疾患要因としての吸収不全・栄養素喪失・代謝やエネルギー消費の亢進, また炎症による栄養動態の変化があり, 栄養必要量の増加が起こる。これらの結果, 栄養不均衡状態(摂取量<必要量, エネルギー不均衡, 微量栄養素不足)となり, 除脂肪体重減(筋肉量減), 筋力低下, 発達発育遅延, 感染, 免疫不全, 創傷治癒遅延などがみられ, 入院の長期化にもつながる(文献 3 を改変)。

このように、PID では栄養摂取量低下とエネルギー消費量増加により栄養収支バランスが崩れ、低栄養状態となり、結果として、筋肉量の減少、筋力低下、低身長や体重増加不良、成長障害、易感染、低栄養による二次性の免疫不全という悪循環に陥る。また、低栄養状態では造血幹細胞移植治療の成功率も低下する。よって、適宜、栄養状態のスクリーニングや検査による栄養評価を行い、必要栄養量の摂取を保つことが重要である^{3, 4)}。

PID の分類

現在、PID は 2011 年の新しい国際分類によると、①複合型免疫不全症、②免疫不全をともなう特徴的な症候群、③抗体産生不全症、④免疫調節障害、⑤食細胞の数・機能の異常症、⑥自然免

疫異常、⑦自己炎症性疾患、⑧補体欠損症、の 8 つに分類され、責任遺伝子は 200 以上が知られている^{1, 5)}。

消化器症状を示す PID

易感染性を主症状とする PID では、消化管も感染症の標的器官となるが、消化器病変の頻度や性状は疾患によって異なっており、必ずしも感染症(細菌性, ウイルス性, 真菌性, 原虫性など)のみが原因ではなく、自己免疫(潰瘍性大腸炎(UC), クローン病, セリアック症候群, アレルギ-性胃腸炎など)やその他の病態(乳糖不耐症, 膵機能不全, 亜鉛欠乏など)も存在する。診断前の PID では消化器症状以外は無症状の場合があり、難治性下痢や腸炎の反復がみられる場合は PID を疑うことも重要である。代表的な PID に

表 1 PID の各疾患でみられる消化器症状

PID 疾患名	消化器症状
複合型免疫不全症 ・ SCID ・ Omenn 症候群	小腸粘膜の絨毛萎縮, 成長障害をともなう遷延性下痢, ウイルス感染, 日和見感染 難治性下痢, 消化管感染症, 吸収不全
免疫不全をともなう特徴的な症候群 ・ 毛細血管拡張性運動失調症	嚥下障害, 誤嚥
抗体産生不全症 ・ XLA ・ 選択的 IgA 欠損症 ・ CVID ・ 高 IgM 症候群	慢性下痢, 吸収不全, エンテロウイルス感染 慢性下痢, 便秘, ジアルジア感染, リンパ節過形成, 悪性貧血 非特定要因の慢性下痢, 吸収不全, 悪性貧血, 萎縮性胃炎, 感染性下痢, リンパ節過形成, IBD, 絨毛萎縮をともなうスプール様腸疾患, 胃癌 急性・慢性下痢, 肝炎, 硬化性胆管炎, 消化管感染症, 胆嚢・肝・消化管への IgM 産生 形質細胞の浸潤, 胃癌
免疫調節障害 ・ IPEX	自己免疫性腸疾患, 乳児期早期からの水様性・血性下痢, 栄養不良, 成長障害, 絨毛萎縮, 肝疾患
食細胞の数・機能の異常症 ・ CGD	下痢(血便の場合もある), 便秘, 肉芽腫性炎症, 消化管の線維化, 消化管感染, 虫垂炎, 肝膿瘍, 肛門周囲膿瘍, 無石胆嚢炎, 脂肪便, ビタミン B ₁₂ 吸収不全, 消化管閉塞, UC, クロウン病
自然免疫異常 ・ NEMO 異常症	重篤で致命的な消化管感染症の反復, 食物不耐, 下痢, 成長障害, UC

おける下痢・腸炎の頻度は、重症複合免疫不全症 (SCID) で 28.7%, 分類不能型免疫不全症 (CVID) 11.7%, Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) 10.0%, 乳児一過性低 γ グロブリン血症 12.1% と報告されている。また、PID では炎症性腸疾患 (IBD) 発症のリスクが上昇し、アメリカの報告では一般の発症率は成人の 0.2%, 20 歳未満で 0.03~0.04% だが、選択的 IgA 欠損ではクローン病 16%, UC 8%, CVID ではクローン病 9% とされている。PID の各疾患でみられる消化器症状を表 1 に示す^{6,7)}。



複合型免疫不全症

T 細胞, B 細胞両者の機能不全があり, 細胞性免疫と液性免疫ともに障害される疾患で, PID の約 10% を占める。なかでも SCID は, 乳児期より重症感染症や発育障害を主徴として発症し, 早期に診断され早急に造血幹細胞移植などの根治治療が行われない場合には致命的な経過をたどる。発症頻度は 1~2 人/10 万人で, 慢性下痢,

肺炎などの重症感染症, アスペルギルス, ニューモシスチスなどの毒力の弱い病原体や, BCG などにも感染する。消化器症状は細菌・ウイルス感染, 非特異的腸炎, 大腸炎, 絨毛萎縮をともなう小腸炎が起きる。下痢にともなうカロリーや栄養素, ビタミン不足によって成長障害がみられる場合は, 経腸栄養や静脈栄養が必要である。



免疫不全をともなう特徴的な症候群

特徴的な臨床症状を呈する Wiskott-Aldrich 症候群, 毛細血管拡張性運動失調症, 高 IgE 症候群, Bloom 症候群などの疾患が含まれている。
・毛細血管拡張性運動失調症 (AT)

発症頻度は 1 人/10 万人とまれな退行性疾患であり, 進行性の小脳失調症, 高頻度の悪性腫瘍の発生, 免疫不全症が特徴である。悪性腫瘍は 30% に発生し, リンパ腫・急性リンパ性白血病 (ALL) が多くと報告されている。10 歳代までに口腔から喉頭の神経症状でほとんどが嚥下障害

となり、必要量の食事が摂取できなくなる。また、咳やむせのない「静かな誤嚥」が起こり、誤嚥性肺炎が致命的となりうる。下記の嚥下障害の徴候に注意が必要である。

① 飲食時に咳をしたりむせたりする、② 体重増加不良または体重減少がある、③ よだれが目立つ、④ 食事に40～45分以上かかることが多い、⑤ 以前は喜んで飲食していたものを嫌がるようになったり、摂るのが難しくなる、⑥ うまく噛めない、⑦ 肺炎の頻度が増える、または重症化する⁸⁾。

抗体産生不全症

先天性免疫不全症のなかでもっとも頻度が高く約45%を占める。B細胞の分化障害やB細胞の内因的欠陥による機能不全、T-B細胞相互間の異常などにより、抗体産生が障害される。易感染性を示す以外に消化器病変や自己免疫疾患などの合併症を示すものも多い。

・伴性遺伝型無ガンマグロブリン血症 (XLA)

ランブル鞭毛虫やカンピロバクター、ヘリコバクターピロリ菌にも易感染性を呈する。炎症性腸疾患症状に対しては脂肪制限などが必要となる。また、慢性萎縮性胃炎にともなうビタミンB₁₂欠乏性貧血、鉄欠乏性貧血を合併する場合、ビタミンや鉄剤の投与を行う。特別な食事制限は必要ない。

・高IgM症候群

難治性下痢が34%にみられ、胆汁うっ滞性肝硬変、硬化性胆管炎から肝癌発症の報告もある。クリプトスポリジウムによる重症下痢予防のため、生水は避け、煮沸した水を飲用する。慢性下痢による脱水と低栄養に注意する。

・CVID

慢性下痢が多くみられ、胃癌のリスクは健常成人の50倍との報告があり、また、自己免疫性、慢性活動性の肝炎を含め肝疾患の合併も報告されている。慢性下痢による低栄養に対しては専門医の介入が必要であり、ビタミンAや亜鉛などの微量栄養素の不足にも注意が必要である。



免疫調節障害

免疫の役割は非自己と自己とを区別し、非自己を排除して自己を保全することであるが、これには白血球をはじめとする多くの細胞が関与し、細胞単独の機能だけではなく、免疫担当細胞間の相互作用による免疫調節も重要な役割を果たしている。この作用に異常をきたしたものが免疫調節障害である。感染に対する免疫応答の異常だけでなく、自己免疫を含めたさまざまな症状を呈することが特徴である。

・多腺性内分泌不全症、腸疾患をともなう連鎖性劣性免疫調節異常 (IPEX)

主症状となる自己免疫性腸症は、食事療法・中心静脈栄養や通常の止痢薬に反応しない難治性下痢で、容易に電解質異常と脱水を生じる。腸管上皮細胞に対する自己抗体が検出されることから、自己免疫機序による下痢症と考えられている。一方で食物抗原に対するIgEが高い場合も多く、食物アレルギーの曝露を防ぐため、乳児には母乳、加水分解ミルクを用いる。授乳中の児にアレルギー一症状が出現する場合は、母親は原因食物を除去した食事にする必要がある。下痢や成長障害がみられる児では、ビタミンやミネラルも評価し、不足している場合には補充を行う。



食細胞の数・機能の異常症

食細胞は接着、遊走、貪食、殺菌という一連の作用を経て細菌・真菌感染症から生体を防御する。食細胞の数、機能、あるいはその両方に異常がみられると、ブドウ球菌などの常在細菌や真菌による重症感染症を繰り返し、易感染性の程度によっては造血幹細胞移植が必要である。

・慢性肉芽腫症 (CGD)

頻度は1/20万人で、消化器症状として腹痛、下痢、嘔気・嘔吐、便秘、消化管閉塞がみられ、IBD (クローン、UC) の発症リスクも高く、専門家の栄養指導と経管栄養などのサポートが必要となる。食事や調理における具体的な注意点としては以下のとおりである。① 生卵や生肉は厳禁であり、火の通った食物と生の食物を調理するとき

は、別々のまな板を使用する。ハンバーグなどでは内部の温度が低いと菌が残っていることがあるため、75℃以上で最低1分間加熱を心がける。②カビの生えたチーズ（ゴルゴンゾーラ、ブルーチーズ）を避ける、③生野菜はなるべく少量ずつ（部分売り）購入して、野菜室に長く保管しない。保管する場合は十分洗って土の混入がないように気をつける、④納豆、ヨーグルト、アイスクリームはとくに制限を必要としない、⑤賞味期限を必ずチェックし古い食品を摂取しない²⁾。



自然免疫異常

自然免疫系は生来遺伝的に組み込まれた免疫応答システムであり、微生物や化学物質などの刺激物質に対してさまざまな pattern recognition receptor (PRR) を介して反応し、炎症を引き起こす。自然免疫異常は、Toll-like receptor などの PRR の異常、あるいはその細胞内シグナル伝達異常による疾患である。NEMO 異常症では高頻度に IBD を合併する。



自己炎症性疾患

自己炎症性疾患は、感染などの外因によって誘発されているものではない、繰り返す、あるいは遷延する全身性炎症性疾患であり、自己免疫疾患でみられるような自己抗体や抗原特異的 T 細胞が病態に関与していない症候群であり、多くは自然免疫の機能異常による。



補体欠損症

補体は血清中と細胞膜上に存在し、自然免疫の一端として生体防御にかかわる 30 種類以上の分子の総称であり、各補体成分の欠損により、免疫不全症、全身性エリテマトーデス (SLE) 類似の自己免疫疾患、慢性腎炎、非典型溶血性尿毒症症候群など、きわめて多彩な疾患を発症する。



栄養

PID に対しても、一般的な食中毒予防対策と同様の常識的な衛生管理のもと、バランスのとれた食事、栄養を十分摂取するのが基本である。注

意点としては、CGD、細胞性免疫不全、著しい好中球減少症ではチーズなどカビの生えた食品を避ける、抗体不全ではクリプトスポリジウム対策として生水を避け煮沸した水の飲用、サルモネラ・カンピロバクター対策として生肉、生卵を摂取しない、などがあげられる。難治性下痢、吸収不全に対しては、経腸栄養が基本であるが、栄養維持が困難な場合は経静脈栄養を施行する。長期間の絶食は腸管上皮の萎縮や二糖類分解酵素活性の低下をはじめとする消化吸收機能低下による病態の悪循環をまねくため、完全静脈栄養中も経口補液・希釈成分栄養剤の経腸栄養を持続的に併用することが勧められる。また、慢性の低栄養状態では不適切な栄養導入で代謝障害や呼吸循環器系、神経学のおよび血液学的合併症を生じる refeeding syndrome に留意する。必須脂肪酸欠乏やセレンなどの微量元素欠乏にも注意が必要である^{2, 9)}。

小児においては、病的状態の回復をはかるだけでなく、発育成長を考慮して年齢に応じた栄養の質と量を決めていくことが重要となる。また、食事を楽しく行えるように、視覚的に小児の食欲や興味を引くような食器や盛りつけなどの工夫も必要であろう。

また、食品の安全性については、2012年に改訂された「造血細胞移植ガイドライン 移植後早期の感染管理 第2版」に記載されている、① HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) の考えに基づいた「大量調理施設衛生管理マニュアル」を遵守した食事は幹細胞移植患者にも安全である、②安全な調理方法として2006年WHOより出版された「Five Keys to Safer Food Manual」(食品をより安全にするための5つの鍵(清潔、生の食品と加熱済みの食品を分ける、十分な加熱、安全な温度を保つ、安全な水と原材料)マニュアル)を参考に、③食事を用意する人は安全な調理法と食品の選択方法を学習する、などは重要な情報であり参考にすべきであろう^{10, 11)}。



おわりに

原発性免疫不全症はまれな疾患ではあるが、医学の発展により救命、治療可能な症例が増加している。しかし、感染や消化器症状の合併により幼少期から低栄養状態に曝される場合もあり、今後、積極的な栄養面での介入が、予後やQOLの向上に重要な役割を果たすと考えられる。

参考文献

- 1) 原 寿郎. 免疫不全症を疑うのはどんな時か? 日本小児科学会雑誌 2011; 115: 1880-1885.
- 2) 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」班. 患者・家族のための原発性免疫不全症候群 疾患概説書. 2012. <http://pidj.rcai.riken.jp/>
- 3) Mehta NM et al. Defining pediatric malnutrition: a paradigm shift toward etiology-related definitions. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2013; 37: 460-481.
- 4) 八木雅夫. 各栄養素の投与量の決定基準. NST 完全ガイド 経腸栄養・静脈栄養の基礎と実践 改訂版. 照林社; 2009, p41-44.
- 5) 野々山恵章. 最新の免疫不全症の分類. 小児科診療 2013; 76: 355-365.
- 6) Kobrynski LJ, Mayer L. Diagnosis and treatment of primary immunodeficiency disease in patients with gastrointestinal symptoms. Clin Immunol 2011; 139: 238-248.
- 7) 村野実之, 阿部洋介, 江頭由太郎, ほか. 免疫不全状態における消化管病変の特徴——特定感染症以外の消化管病変. 胃と腸 2011; 46: 217-228.
- 8) 毛細血管拡張性運動失調症 チルドレンズ・プロジェクト 家族のためのハンドブック http://www.tmd.ac.jp/med/ped/atcp/family/handbook_08_02.html
- 9) 虻川大樹. 消化器疾患・難治性下痢症. 小児臨床栄養学. 診断と治療社; 2011, p205-208.
- 10) 海道利実. 免疫不全状態患者に対する栄養・食事管理の意義. 臨床栄養 2012; 121: 800-805.
- 11) 日本造血細胞移植学会. 造血細胞移植ガイドライン—移植後早期の感染管理(第2版)一. 2012. <http://www.jshct.com/guideline/pdf/kansentanri.pdf>

RESEARCH ARTICLE

Localized SCF and IGF-1 secretion enhances erythropoiesis in the spleen of murine embryos

Keai Sinn Tan^{1,2}, Tomoko Inoue¹, Kasem Kulkeaw¹, Yuka Tanaka^{3,4}, Mei I Lai² and Daisuke Sugiyama^{1,3,4,*}

ABSTRACT

Fetal spleen is a major hematopoietic site prior to initiation of bone marrow hematopoiesis. Morphologic analysis suggested erythropoietic activity in fetal spleen, but it remained unclear how erythropoiesis was regulated. To address this question, we performed flow cytometric analysis and observed that the number of spleen erythroid cells increased 18.6-fold from 16.5 to 19.5 days post-coitum (dpc). Among erythropoietic cytokines, SCF and IGF-1 were primarily expressed in hematopoietic, endothelial and mesenchymal-like fetal spleen cells. Cultures treated with SCF and/or IGF-1R inhibitors showed significantly decreased CD45–c-Kit–CD71+–Ter119+ erythroid cells and downregulated *Gata1*, *Klf1* and *β -major globin* expression. Administration of these inhibitors to pregnant mice significantly decreased the number of CD45–c-Kit–CD71+–Ter119+ cells and downregulated *β -major globin* gene expression in embryos derived from these mice. We conclude that fetal spleen is a major erythropoietic site where endothelial and mesenchymal-like cells primarily accelerate erythropoietic activity through SCF and IGF-1 secretion.

KEY WORDS: Fetal spleen, Erythropoiesis, Niche, Cytokines

INTRODUCTION

Erythropoiesis is defined as the process of generating mature red blood cells (McGrath and Palis, 2008). During mouse embryogenesis, primitive erythropoiesis occurs in the yolk sac from 7.5–8.5 days post-coitum (dpc), and erythroid progenitor cells mature in the circulation and enucleate between 14.5–16.5 dpc (Kingsley et al., 2004; Palis et al., 1999). Definitive erythropoiesis begins in the yolk sac at 9.0 dpc and then shifts to fetal liver, fetal spleen and bone marrow (Bertrand et al., 2005; Houssaint, 1981). Fetal liver serves as the primary organ for erythroid cell expansion and maturation at mid-gestation before bone marrow hematopoiesis initiates (Ayres-Silva et al., 2011; Ema and Nakauchi, 2000; Morrison et al., 1995). Between 14.5–15.5 dpc, fetal liver becomes a less favorable environment for

erythropoiesis, as the liver begins to switch from a predominantly hematopoietic to a metabolic function (Guo et al., 2009). Fetal spleen explants cultured *in vitro* produce hematopoietic progenitor and stem cells between 12.5–14.5 dpc, suggesting that hematopoietic cells colonize fetal spleen, which likely fills the hematopoietic “gap” between fetal liver and bone marrow (Godin et al., 1999; Sasaki and Matsumura, 1987).

For over 40 years it has been known that in adults the splenic microenvironment supports erythroid development to a greater extent than myeloid development (Wolf and Trentin, 1968). However, how embryonic spleen hematopoiesis is regulated remains unclear. The spleen is reportedly a site of active myelopoiesis during late embryonic and perinatal stages, and gradually becomes a site of lymphopoiesis after postnatal week one (Ohno et al., 1993). Between 13.5–15.5 dpc, spleen hematopoietic cells are composed primarily of myeloid and erythroid cells (Desanti et al., 2008); however, only a few investigators have analyzed fetal spleen erythropoiesis (Godin et al., 1999). One study showed that at 14.5 dpc fetal spleen stromal cells drive macrophage and B cell commitment (Bertrand et al., 2006). Microscopic observation suggests that the spleen becomes erythropoietic at between 16.0–17.0 dpc until around the first week of postnatal life (Djaldetti et al., 1972; Sasaki and Matsumura, 1988).

Cell fate is determined by intrinsic and extrinsic factors. Our group has characterized embryonic regulation of the mouse hematopoietic niche, a key extrinsic component of the hematopoietic environment (Sugiyama et al., 2011a). Particularly, extrinsic regulation through cytokine secretion, cell-cell interactions and extracellular matrix activity is required for survival, self-renewal, proliferation and differentiation of erythroid cells into mature red blood cells (Watt and Hogan, 2000). Several cytokines, such as erythropoietin (Epo), stem cell factor (SCF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), interleukin 3 (IL-3) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), are required for optimal development and terminal differentiation of erythroid cells (Emerson et al., 1989; Goodman et al., 1985; Muta et al., 1994; Umemura et al., 1989). Binding of Epo to its receptor, EpoR, which is expressed on the surface of erythroid progenitors, is particularly critical for these activities (Koury and Bondurant, 1992; Palis, 2014). SCF, a c-Kit ligand, is required for growth of burst-forming unit-erythroids (BFU-Es) under serum-free conditions (Dai et al., 1991). Also, formation of erythrocyte colony-forming units (CFU-Es) requires synergistic SCF and Epo activity (Wu et al., 1997), whereas, IGF-1 stimulates proliferation of erythroid progenitor cells in peripheral blood and bone marrow (Miyagawa et al., 2000).

In this study, we first characterized hematopoietic cell types and identified that erythropoiesis is the dominant activity in fetal spleen at both 16.5 dpc and 19.5 dpc. To investigate extrinsic factors regulating fetal spleen erythropoiesis, we focused on the

¹Department of Research and Development of Next Generation Medicine, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582 Japan. ²Department of Pathology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia, 43400 Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia. ³Center for Clinical and Translational Research, Kyushu University Hospital, Fukuoka 812-8582 Japan. ⁴Department of Clinical Study, Center for Advanced Medical Innovation, Kyushu University, Fukuoka 812-8582 Japan.

*Author for correspondence (ds-mons@yb3.so-net.ne.jp)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

effect of cytokine secretion by 16.5 dpc fetal spleen cells including hematopoietic, endothelial and unclassified (or mesenchymal-like) cells on erythropoiesis. We found that SCF and IGF-1 are the primary erythropoietic cytokines expressed in fetal spleen. Finally, *in vitro* and *in vivo* analyses using inhibitors of SCF and IGF-1R revealed that both are crucial factors that accelerate spleen erythropoiesis at 16.5 dpc.

RESULTS

Characterization of fetal spleen and liver cells

To investigate which lineage commitment is predominant in fetal spleen, we performed hematoxylin and eosin staining at 16.5 dpc and 19.5 dpc. In agreement with previous reports (Djaldetti et al., 1972), at 16.5 dpc we found that the spleen contains blastic cells morphologically defined as small cells with round, dense and deeply basophilic nuclei (Fig. 1A). By 19.5 dpc spleen contained increased numbers of red blood cells morphologically defined as eosinophilic cells lacking nuclei. Next, to quantify erythropoietic activity in spleen after 16.5 dpc, we performed flow cytometry by using the erythroid cell marker Ter119 and the common leukocyte cell marker CD45 (supplementary material Fig.

S1A,B). Ter119 marks erythroid cells at various differentiation stages (from early proerythroblasts to mature red blood cells) but does not mark cells exhibiting typical BFU-E and CFU-E activities (Kina et al., 2000). The total number of erythroid cells expressing Ter119 per fetal spleen increased 18.6-fold from 16.5 dpc to 19.5 dpc (Fig. 1B). The number of CD45-positive cells per spleen also increased 7.6-fold from 16.5 to 19.5 dpc. As in fetal liver, the total number of erythroid cells expressing Ter119 per fetal liver decreased 2.7-fold from 16.5 to 19.5 dpc (Fig. 1C), while the number of CD45-positive cells per spleen increased 1.3-fold. Thus, overall, the number of erythroid cells and leukocytes was greater in fetal liver than in fetal spleen. Nonetheless, considering the size of spleen and liver, it is clear that robust erythropoiesis occurs in spleen at these stages. To investigate how spleen erythropoiesis is regulated, we assessed fetal spleen cell cytokine secretion. Delta-like 1 homolog (DLK-1)-expressing hepatoblasts are the primary cells that express SCF and Epo proteins in fetal liver at 14.5 dpc, a time coincident with erythroid cell expansion (Sugiyama et al., 2011b). Hence, for our analysis we used DLK-1 to identify cytokine-secreting cells. We also used staining for platelet endothelial cell adhesion molecule

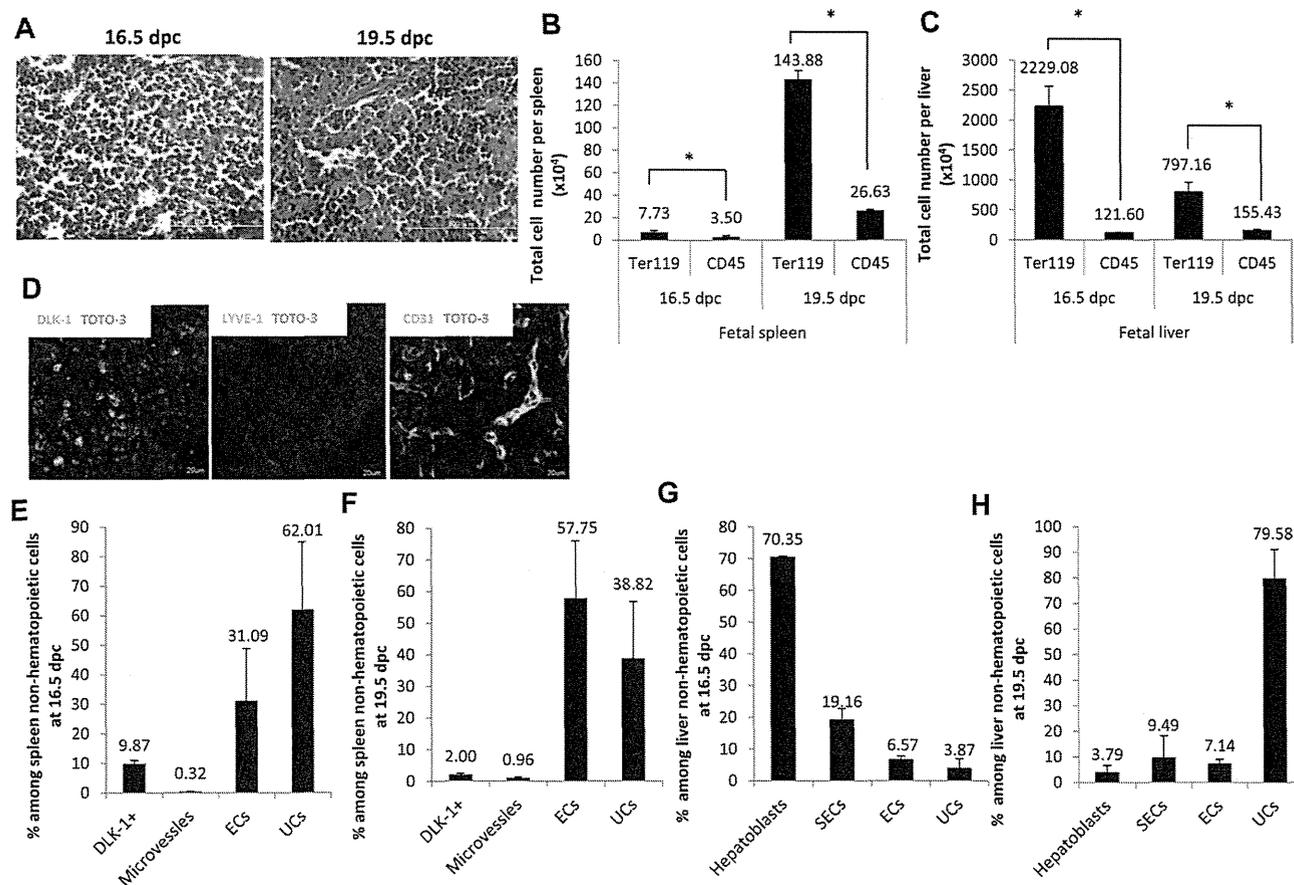


Fig. 1. Characterization of fetal spleen and liver cells. (A) Hematoxylin and eosin-stained sections of fetal spleen at 16.5 and 19.5 dpc. Scale bars: 100 μ m. (B) Graph showing total number of Ter119+ and CD45+ cells per spleen at 16.5 and 19.5 dpc (n=3). (C) Graph showing total number of Ter119+ and CD45+ cells per liver at 16.5 and 19.5 dpc (n=3). (D) Immunohistochemistry staining of CD45–Ter119– non-hematopoietic fetal spleen cells. Spleen sections were prepared from ICR mouse embryos at 16.5 dpc and stained with DLK-1 (green), LYVE-1 (green), CD31 (green) and TOTO-3 (blue). Scale bars: 20 μ m. (E,F) Graphs showing percentage of fetal spleen cells among non-hematopoietic cells at 16.5 and 19.5 dpc (n=3). Data are means \pm standard deviation (SD). (G,H) Graphs showing percentage of fetal liver cells among non-hematopoietic cells at 16.5 and 19.5 dpc (n=3). Data are means \pm standard deviation (SD). See also supplementary material Fig. S1A,B. *P<0.05.

1 (PECAM-1 or CD31) and lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1 (LYVE-1) to mark endothelial cells of blood vessels and capillaries, respectively (Neubauer et al., 2000; Tan et al., 2013). Immunohistochemistry revealed that fetal spleen cells express detectable amounts of DLK-1, CD31 and LYVE-1 proteins, suggesting that fetal spleen contains DLK-1-expressing cells and endothelial cells (Fig. 1D). To further characterize fetal spleen cells, we performed flow cytometry. As shown in supplementary material Fig. S1A, fractions of DLK-1-expressing cells, microvessels, endothelial cells and unclassified cells were sorted from fetal spleen at 16.5 dpc and 19.5 dpc based on expression of the following surface markers: (1) CD45–Ter119–DLK-1+ to define DLK-1 expressing cells, (2) CD45–Ter119–LYVE-1+CD31+ to define microvessels, (3) CD45–Ter119–LYVE-1–CD31+ to define endothelial cells, and (4) CD45–Ter119–LYVE-1–CD31– to define unclassified cells. Among CD45–Ter119– non-hematopoietic cells in fetal spleen at 16.5 dpc, 9.9±1.1% were DLK-1-expressing cells, 0.3±0.1% were microvessels, 31.1±17.8% were endothelial cells and 62.0±23.0% were unclassified cells (Fig. 1E). In 19.5 dpc fetal spleen, 2.0±0.4% were DLK-1-expressing cells, 1.0±0.4% were microvessels, 57.8±18.3% were endothelial cells and 38.9±17.9% were unclassified cells (Fig. 1F). As shown in supplementary material Fig. S1B, fractions containing hepatoblasts, sinusoidal endothelial cells, endothelial cells and unclassified cells were sorted from fetal liver at 16.5 and 19.5 dpc based on expression of the following surface markers: (1) CD45–Ter119–DLK-1+ (hepatoblasts), (2) CD45–Ter119–LYVE-1+CD31+ (sinusoidal endothelial cells), (3) CD45–Ter119–LYVE-1–CD31+ (endothelial cells), and (4) CD45–Ter119–LYVE-1–CD31– (unclassified cells). Among CD45–Ter119– non-hematopoietic cells in liver at 16.5 dpc, 70.3±0.4% were hepatoblasts, 19.2±3.6% were sinusoidal endothelial cells, 6.6±1.2% were endothelial cells and 3.9±3.1% were unclassified cells (Fig. 1G). In 19.5 dpc liver, 3.8±2.9% were hepatoblasts, 9.5±8.6% were sinusoidal endothelial cells, 7.1±1.9% were endothelial cells and 79.6±11.5% were unclassified cells (Fig. 1H). Taken together, in 16.5 or 19.5 dpc spleen, the proportion of DLK-1-expressing cells and microvessels was relatively low compared to proportions of endothelial and unclassified cells. In fetal liver, however, hepatoblasts constituted the major population at 16.5 dpc relative to other cell populations, but the percentage of hepatoblasts among non-hematopoietic cells in liver decreased by 19.5 dpc. These results suggest that endothelial and unclassified cells play important roles in erythropoiesis in 16.5 dpc spleen, while hepatoblasts have a more prominent function in erythropoiesis in fetal liver.

Cytokine expression in fetal spleen cells

Given that the total number of erythroid cells per spleen markedly increased from 16.5 dpc to 19.5 dpc, we hypothesized that spleen cells at 16.5 dpc likely accelerate erythropoiesis by providing extrinsic signals. Thus to investigate whether fetal spleen cells express erythropoietic cytokines, we performed real-time PCR to assess *Scf*, *Igf1*, *Il-3* and *Epo* mRNAs in whole spleen cells at 16.5 and 19.5 dpc (Fig. 2A). Both *Scf* and *Igf1* mRNAs were highly expressed at 16.5 dpc, while *Epo* and *Il-3* mRNAs were not. On the other hand, in 19.5 dpc whole spleen cells, *Scf* was highly expressed, while *Igf1*, *Epo* and *Il-3* transcripts were not detected. To compare the microenvironment of whole fetal spleen cells with that of whole fetal liver, we assessed expression of erythropoietic cytokines in 16.5 dpc or 19.5 dpc liver. At

16.5 dpc, *Igf1* was highly expressed in liver, while *Scf*, *Il-3* and *Epo* mRNAs were not (Fig. 2B). We then investigated SCF, IGF-1, IL-3 and EPO protein expression in both spleen and liver at 16.5 and 19.5 dpc by ELISA (Fig. 2C,D). We detected IGF-1 (12.1 pg protein/100 µg total protein) and SCF (1.3 pg protein/100 µg total protein) (Fig. 2C) in whole fetal spleen at 16.5 dpc, while at 19.5 dpc in spleen, we detected SCF (1.6 pg protein/100 µg total protein), IGF-1 (1.8 pg protein/100 µg total protein) and EPO (1.3 pg protein/100 µg total protein). IL-3 protein was not detected in spleen at either 16.5 or 19.5 dpc (Fig. 2C). In 16.5 dpc liver, IGF-1 (4.2 pg protein/100 µg total protein) was highly expressed, while we observed lower levels of SCF (0.7 pg protein/100 µg total protein) and EPO (0.6 pg protein/100 µg total protein) (Fig. 2D). In 19.5 dpc liver, we detected SCF (0.5 pg protein/100 µg total protein) and EPO (0.7 pg protein/100 µg total protein). IL-3 protein was not detected in whole fetal liver at 16.5 or 19.5 dpc, while IGF-1 protein was not detected in 19.5 dpc liver (Fig. 2D) (supplementary material Fig. S2C,D).

To investigate which spleen cell components produce SCF and IGF-1, we used real-time PCR to assess *Scf* and *Igf1* mRNAs in hematopoietic, endothelial and unclassified cells sorted from fetal spleen at 16.5 dpc. As shown in Fig. 2E,F, unclassified cells expressed 32-fold and 8-fold higher levels of *Scf* and *Igf1*, respectively, than did endothelial cells. We then investigated SCF and IGF-1 protein expression by ELISA (Fig. 2G,H). SCF protein was highly expressed in both endothelial cells (14.6 pg protein/100,000 cells) and unclassified cells (12.3 pg protein/100,000 cells) but was expressed to a lesser extent in hematopoietic cells (3.1 pg protein/100,000 cells). Likewise, IGF-1 protein was also expressed in both endothelial cells (13.4 pg protein/100,000 cells) and unclassified cells (12.9 pg protein/100,000 cells) but was expressed to a lesser extent in hematopoietic cells (1.9 pg protein/100,000 cells). Comparison of the amount of SCF and IGF-1 proteins per 100 µg of total protein indicated that protein levels corresponded with mRNA expression (supplementary material Fig. S1E,F). We conclude that spleen erythropoiesis is likely regulated extrinsically by endothelial cells and unclassified cells through SCF and IGF-1 secretion.

Unclassified cells possess mesenchymal properties

To further characterize unclassified cells in fetal spleen, we investigated this population by flow cytometry using additional mesenchymal markers (Giuliani et al., 2011). At present, there is no single surface marker available that serves as an unequivocal marker of mesenchymal cells. Thus, for our study we used several mesenchymal cell markers, including CD29 (integrin β1), CD44 (HCAM), CD51 (integrin αv), CD73 (SH3), CD90.2 (Thy1.2), CD105 (endoglin), CD106 (VCAM-1), CD140a (PDGFRα) and CD166 (ALCAM). Among unclassified cells, the percentage of cells positive for CD29 was 77.3±3.7%; for CD44 was 30.7±5.9%; for CD51 was 51.3±1.9%; for CD73 was 6.0±2.7%; for CD90.2 was 4.2±2.1%; for CD105 was 40.1±15.4%; for CD106 was 13.5±4.3%; for CD140a was 2.7±1.1%; and for CD166 was 31.1±7.1% (Fig. 3A). Overall, these findings suggest that unclassified cells possess mesenchymal properties. Among markers, we paid special attention to CD51, since it is reportedly expressed on bone marrow mesenchymal stem cells (Pinho et al., 2013). Immunohistochemistry revealed that a very large population of CD51 cells in fetal spleen at 16.5 dpc (Fig. 3B). We then performed real-time PCR with sorted CD51+ cells. As shown in Fig. 3C, CD51+ cells expressed higher levels of *Scf* and *Igf1* mRNAs than did hematopoietic cells, which served as

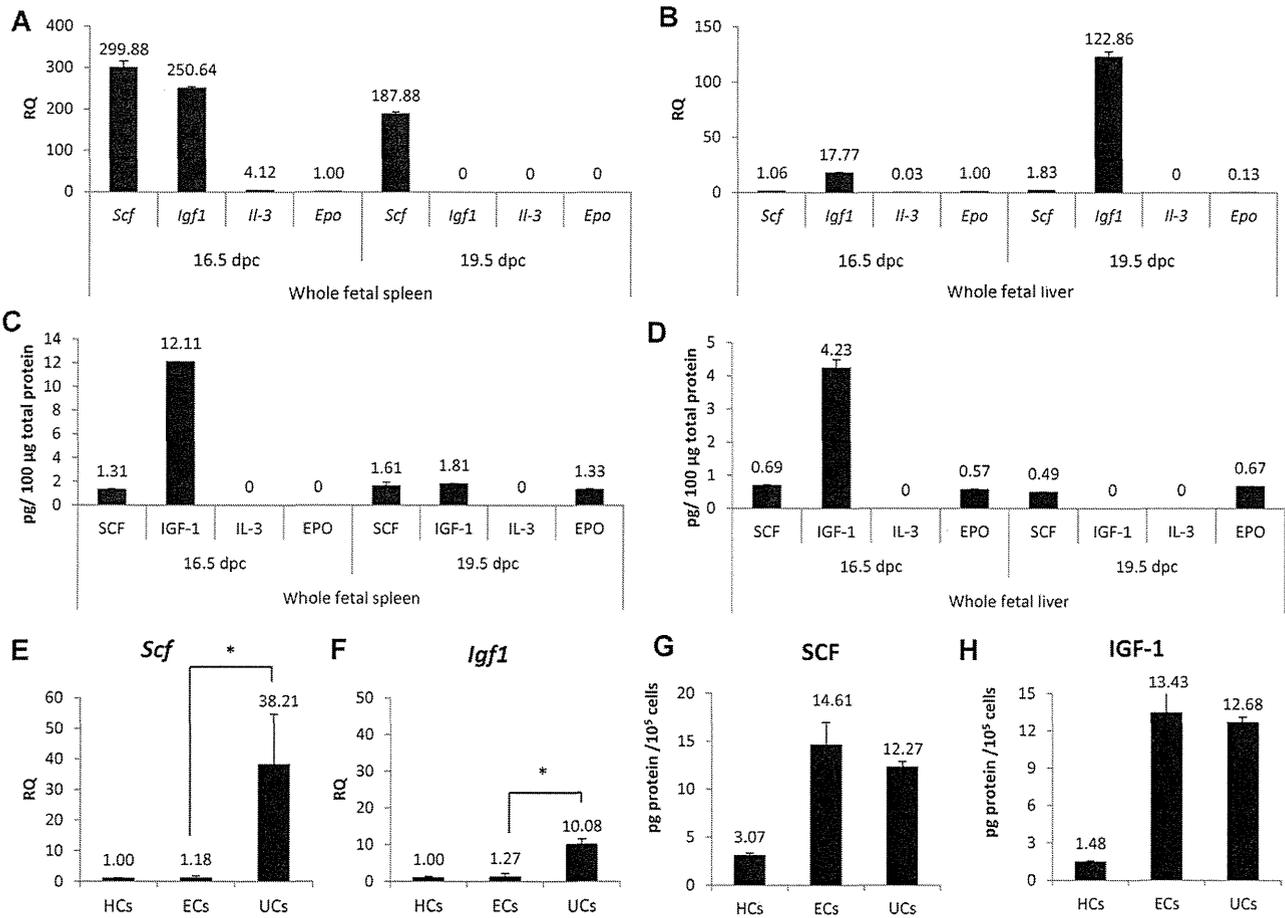


Fig. 2. Expression of cytokine mRNA and protein in fetal spleen and liver. (A) Relative expression (RQ) of stem cell factor (*Scf*), insulin-like growth factor1 (*Igf1*), interleukin-3 (*Il-3*) and erythropoietin (*Epo*) mRNAs were examined in whole fetal spleen cells at 16.5 and 19.5 dpc by real-time PCR. *Epo* expression in 16.5 dpc whole fetal spleen served as a control. (B) Relative expression (RQ) of stem cell factor (*Scf*), insulin-like growth factor1 (*Igf1*), interleukin-3 (*Il-3*) and erythropoietin (*Epo*) mRNAs was determined in whole fetal liver at 16.5 and 19.5 dpc by real-time PCR. *Epo* expression in 16.5 dpc whole fetal spleen served as a control. (C,D) Amounts of SCF, IGF-1, IL-3 and EPO protein per 100 µg total protein in spleen at 16.5 and 19.5 dpc. (D) Amounts of SCF, IGF-1, IL-3 and EPO protein per 100 µg total protein in liver at 16.5 and 19.5 dpc. (E,F) Relative expression (RQ) of *Scf* and *Igf1* mRNAs was determined by real-time PCR in hematopoietic cells (HCs), endothelial cells (ECs) and unclassified cells (UCs) sorted by flow cytometry, according to gates defined in supplementary material Fig. S1A. HCs served as controls. *Scf* and *Igf1* mRNA expression was higher in UCs than in ECs at 16.5 dpc fetal spleen ($n=3$). (G,H) Amounts of SCF and IGF-1 protein per 100,000 cells in HCs, ECs, and UCs ($n=3$). See also supplementary material Fig. S1E,F. Data are means \pm standard deviation (SD). * $P<0.05$.

controls (supplementary material Fig. S2A,B). ELISA analysis confirmed that CD51⁺ cells express SCF and IGF-1 protein (Fig. 3D; supplementary material Fig. S2C). Immunohistochemistry also showed that CD31^{+/−} and CD51^{+/−} cells express SCF and IGF-1 proteins (Fig. 3E,F), suggesting that both endothelial cells and unclassified cells with mesenchymal properties likely secrete SCF and IGF-1 secretion in fetal spleen.

Spleen stromal cells accelerate erythropoiesis *in vitro*

To investigate the function of stromal cells comprising the niche in fetal spleen erythropoiesis we undertook co-culture analysis. To do so we dissociated whole fetal spleen cells into single cells and cultured them on 0.1% gelatin-coated plates. After two hours, cells that adhered to the plates were used as stromal cells, while non-adherent cells, which contained hematopoietic cells, were collected and cultured either alone or in co-culture with the stromal cells. After 24 hours of either co-culture or culture of hematopoietic cells alone, we observed cells resembling

fibroblasts adhering to the plate (Fig. 4A). There were hematopoietic cells found among non-adherent cells and that total number of non-adherent cells cultured with stromal cells had increased in number 2.8-fold relative to cells cultured without stromal cells (Fig. 4B, left). Also, when we assessed cell viability by calculating the percentage of propidium iodide-negative cells by flow cytometry, we found that the viability of cells cultured for 24 hours with stromal cells was 68.5%, while that of cells cultured without stromal cells was 43.9% (Fig. 4B, right).

Next, we used flow cytometry to assess erythroid cells that had been co-cultured with stromal cells versus those grown without stromal cells. We measured the erythroid cell population from fetal spleen by flow cytometry using the following criteria: (1) CD45[−]c-Kit⁺CD71[−]Ter119[−] defined BFU-E equivalent cells; (2) CD45[−]c-Kit⁺CD71⁺Ter119[−] defined CFU-E equivalent cells; (3) CD45[−]c-Kit[−]CD71⁺Ter119⁺ defined terminally-differentiating erythroid cells (supplementary material Fig. S3A); and (4) CD45[−]c-Kit[−]CD71[−]Ter119⁺ defined mature

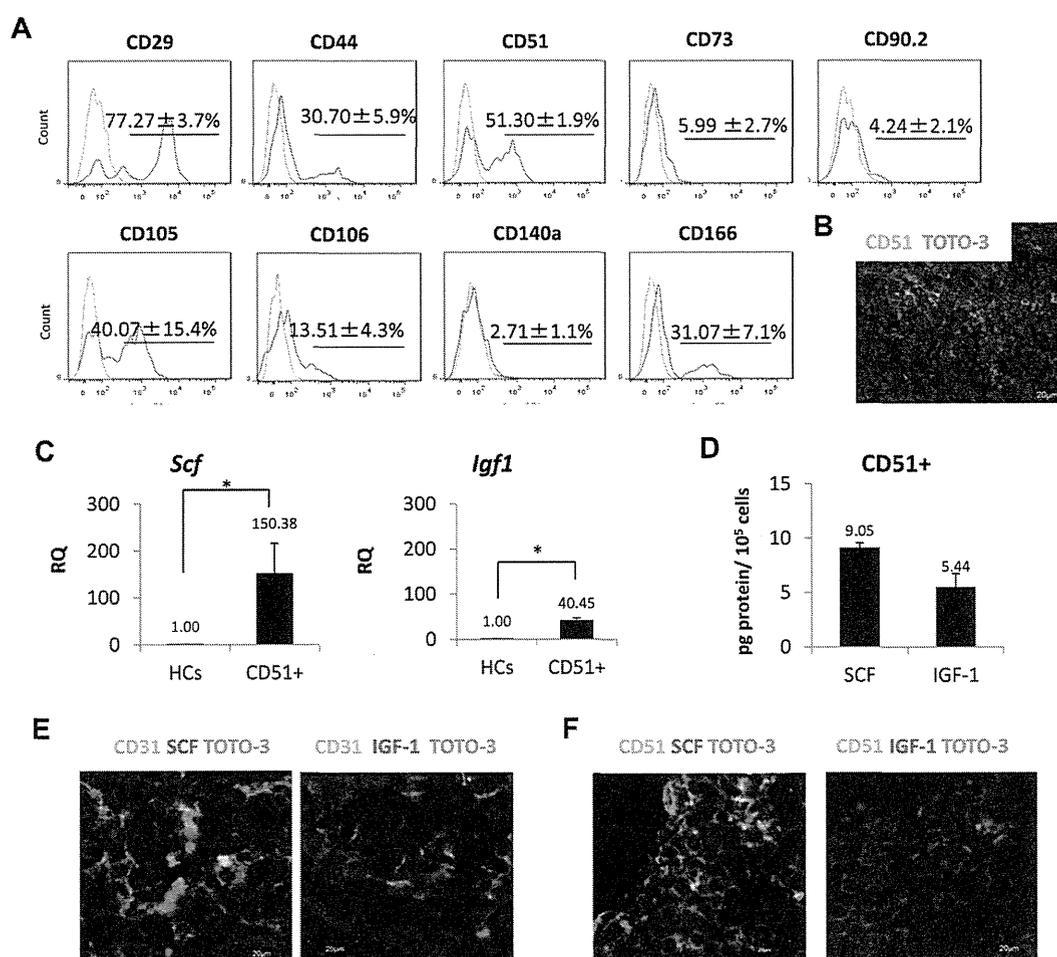


Fig. 3. Characterization of unclassified cells (UCs). (A) Analysis of the mesenchymal markers CD29, CD44, CD51, CD73, CD90.2, CD105, CD106, CD140a and CD166 among CD45–Ter119–CD31–LYVE-1– unclassified cells (n=3). (B) Spleen sections from 16.5 dpc were stained with CD51 (green) and TOTO-3 (blue). Scale bar: 20 μ m. (C) A single cell suspension was obtained from fetal spleen at 16.5 dpc. CD45–Ter119–CD31–LYVE-1–CD51+ defines CD51+ cells. Relative expression (RQ) of *Scf* and *Igf1* mRNAs was examined by real-time PCR in CD51+ cells (n=3). Hematopoietic cells (HCs) served as reference controls. (D) Amounts of SCF and IGF-1 protein per 100,000 cells in CD51+ cells. Expression of SCF and IGF-1 was higher in CD51+ cells than in HCs (n=3). (E,F) Immunohistochemistry of endothelial and mesenchymal cell markers, CD31 and CD51, respectively stained with SCF and IGF-1 at 16.5 dpc. Samples were observed under confocal microscopy. CD31+/- and CD51+/- cells expressed both SCF and IGF-1. Scale bars: 20 μ m. Data are mean \pm standard deviation (SD). *P<0.05.

red blood cells (supplementary material Fig. S3B) (Inoue et al., 2011; Socolovsky et al., 2001) (Fig. 4C). The number of BFU-E and CFU-E equivalent cells was comparable among cells cultured with or without stromal cells. The number of terminally-differentiating erythroid cells increased 10-fold and that of mature red blood cells increased 282-fold in cells cultured with stromal cells compared to those cultured without stromal cells (Fig. 4D). These findings suggest that fetal spleen erythropoiesis is accelerated through an extrinsic signal derived from stromal cells *in vitro*.

SCF and IGF-1 accelerate fetal spleen erythropoiesis *in vitro*

To identify cell types regulated by SCF and IGF-1 signals, we evaluated expression of the SCF receptor (c-Kit) and the IGF-1 receptor (IGF-1R) on erythroid cells in fetal spleen using flow cytometry (Fig. 5A,B). The erythroid cell population was analyzed using the following gating strategy: (1) CD45–CD71+Ter119– defined BFU-E and CFU-E equivalent cells; (2) CD45–CD71+

Ter119+ defined terminally differentiating erythroid cells; and (3) CD45–CD71–Ter119+ defined mature red blood cells. Of BFU-E and CFU-E equivalent cells, 54.3% were c-Kit+ cells and 7.8% were IGF-1R+. Of terminally-differentiating erythroid cells only 0.4% were c-Kit+ cells and 4.5% were IGF-1R+, while of mature red blood cells, 0.3% were c-Kit+ and 4.9% were IGF-1R+ (Fig. 5C,D). These observations indicate most c-Kit+ and IGF-1R+ cells are BFU-E and CFU-E equivalent cells.

To determine if SCF and IGF-1 accelerate fetal spleen erythropoiesis, we cultured whole fetal spleen cells with or without an SCF inhibitor, an IGF-1R inhibitor, a combination of the two or a DMSO vehicle control for 24 hours (Fig. 6A) and evaluated cell number and viability (Fig. 6B). The total cell number did not differ among all conditions, while cell viability decreased in cultures treated with the SCF inhibitor (46.0%) and cells treated with both inhibitors (47.3%) compared to cells cultured with DMSO (67.9%) or with the IGF-1R inhibitor (64.4%).

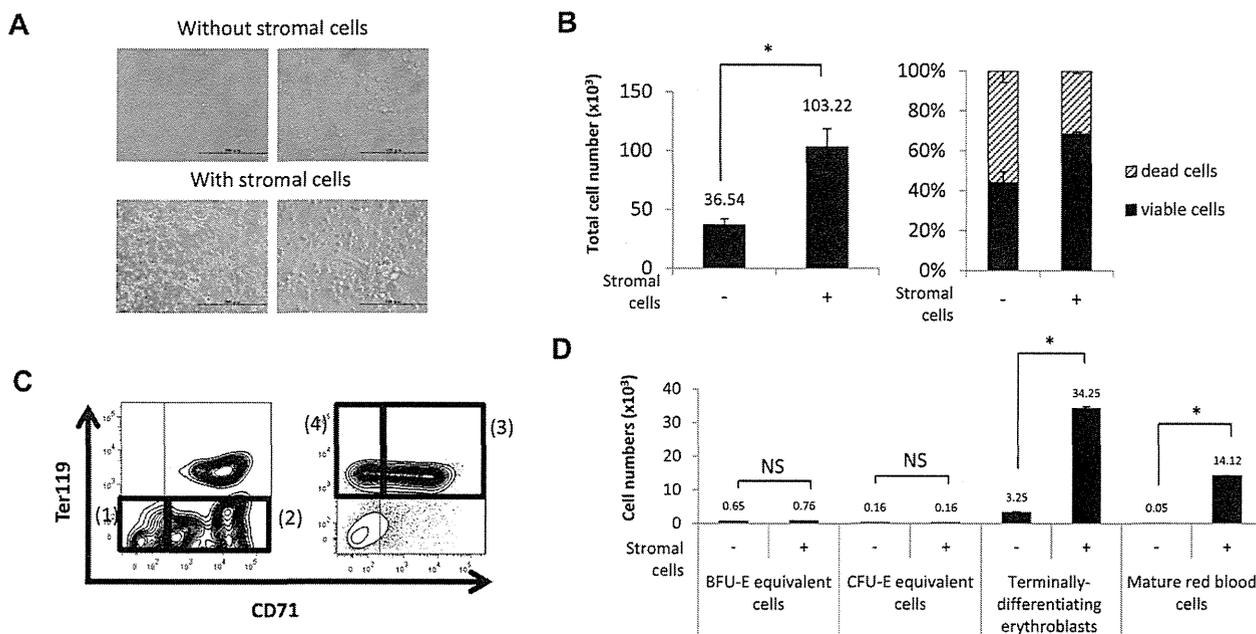


Fig. 4. Acceleration of erythropoiesis in hematopoietic cells cultured with stromal cells. (A) Microscopic images after 24 hours of culture of hematopoietic cells with or without stromal cells. Cells that adhered to a plate after two hours were used as stromal cells. Hematopoietic cells were cultured either alone or in co-culture with stromal cells. Scale bars: left, 200 μm ; right, 100 μm . (B) Graphs showing the total number of cells (left) and the percentage of viable and dead cells (right) in conditions with or without stromal cells. Both the total number and percentage of viable cells were higher among cells cultured with stromal cells ($n=3$). (C) Gating strategy of flow cytometric analysis. (1) $\text{CD45}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD71}^- \text{Ter119}^-$ defines BFU-E equivalent cells; (2) $\text{CD45}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD71}^+ \text{Ter119}^-$ defines CFU-E equivalent cells; (3) $\text{CD45}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD71}^+ \text{Ter119}^+$ defines terminally-differentiating erythroid cells; and (4) $\text{CD45}^- \text{c-Kit}^- \text{CD71}^- \text{Ter119}^+$ defines mature red blood cells. See also supplementary material Fig. S3A,B. (D) Graphs showing the number of BFU-E equivalent cells, CFU-E equivalent cells, terminally-differentiating erythroid cells and mature red blood cells after 24 hours of culture with or without stromal cells. The number of terminally-differentiating erythroid cells and mature red blood cells increased in cultures including stromal cells ($n=3$). Data are means \pm standard deviation (SD). NS, not significant. * $P < 0.05$.

Next, we used flow cytometry to measure the erythroid cell population from cultured whole fetal spleen cells grown in the presence of an SCF inhibitor, an IGF-1R inhibitor, a combination of the two or DMSO vehicle, using the gating strategy shown in Fig. 6C. $\text{CD45}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD71}^+ \text{Ter119}^+$ cells were defined as terminally-differentiating erythroid cells and mature red blood cells. The number of $\text{CD45}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD71}^+ \text{Ter119}^+$ cells decreased 2.2-fold in cultures treated with the SCF inhibitor and 2.4-fold in cultures treated with both compared to DMSO control cells (Fig. 6D). To further evaluate altered gene expression in cells cultured with inhibitors, we assessed *Gata1*, *Klf1* and β -major globin mRNA by real-time PCR in CD45^- cells (Fig. 6E). *Gata1*, *Klf1* and β -major globin expression decreased relative to the DMSO control in cultures treated with the SCF inhibitor or the IGF-1R inhibitor. In cells treated with both, *Gata1* and *Klf1* expression was undetectable, whereas that of β -major globin expression decreased to only 2% of that of controls. Collectively, treatment with both inhibitors abrogated expression of erythroid genes, suggesting that SCF and IGF-1 are required for fetal spleen erythropoiesis *in vitro*.

SCF and IGF-1 accelerate fetal spleen erythropoiesis *in vivo*

To examine SCF and IGF-1 effects *in vivo*, inhibitors (either alone or in combination) or DMSO alone was administered intravenously into pregnant ICR mice at 16.5 dpc. Two hours after inhibitor injection, injected mice were sacrificed and the spleens of their embryos were dissected for flow cytometry analysis of the erythroid cell population. The gating strategy for

that analysis is shown in Fig. 7A. Two hours after inhibitor injection, the number of $\text{CD45}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD71}^+ \text{Ter119}^+$ cells decreased 1.3-fold in SCF inhibitor-treated mouse embryos spleen, 1.6-fold in IGF-1R treated mouse embryos spleen, and 1.2-fold in mouse embryos spleen treated with both inhibitors relative to DMSO controls (Fig. 7B). To further evaluate gene expression *in vivo*, we assessed *Gata1*, *Klf1* and β -major globin mRNAs by real-time PCR in CD45^- cells sorted from fetal spleen of the embryos of injected mice (Fig. 7C). *Gata1* and *Klf1* expression did not differ significantly in fetal spleen cells taken from mice embryos treated with inhibitors or DMSO vehicle, whereas β -major globin expression decreased relative to the DMSO control in tissues taken from mice treated with the SCF inhibitor, the IGF-1R inhibitor or both.

DISCUSSION

In mice, fetal spleen forms from 11.5–13.5 dpc and becomes hematopoietic at 12.5–13.0 dpc, after initiation of fetal liver hematopoiesis (Godin et al., 1999; Green, 1967; Patterson et al., 2000; Wolber et al., 2002). As an embryo develops, different types of hematopoietic cells reside in spleen. In 15.0 dpc embryos, 40% of spleen cells are $\text{F4/80}^+ \text{Mac-1}^+$, indicating that they are macrophage cells (Bertrand et al., 2006). By one week after birth, Mac-1^+ cell reportedly decreases in spleen, whereas cells expressing the lymphoid marker B220 increase in number (Ohno et al., 1993). Furthermore, dendritic cells develop in spleen by postnatal day 4 (Hinton et al., 2011). Taken together, embryonic and perinatal spleen can support

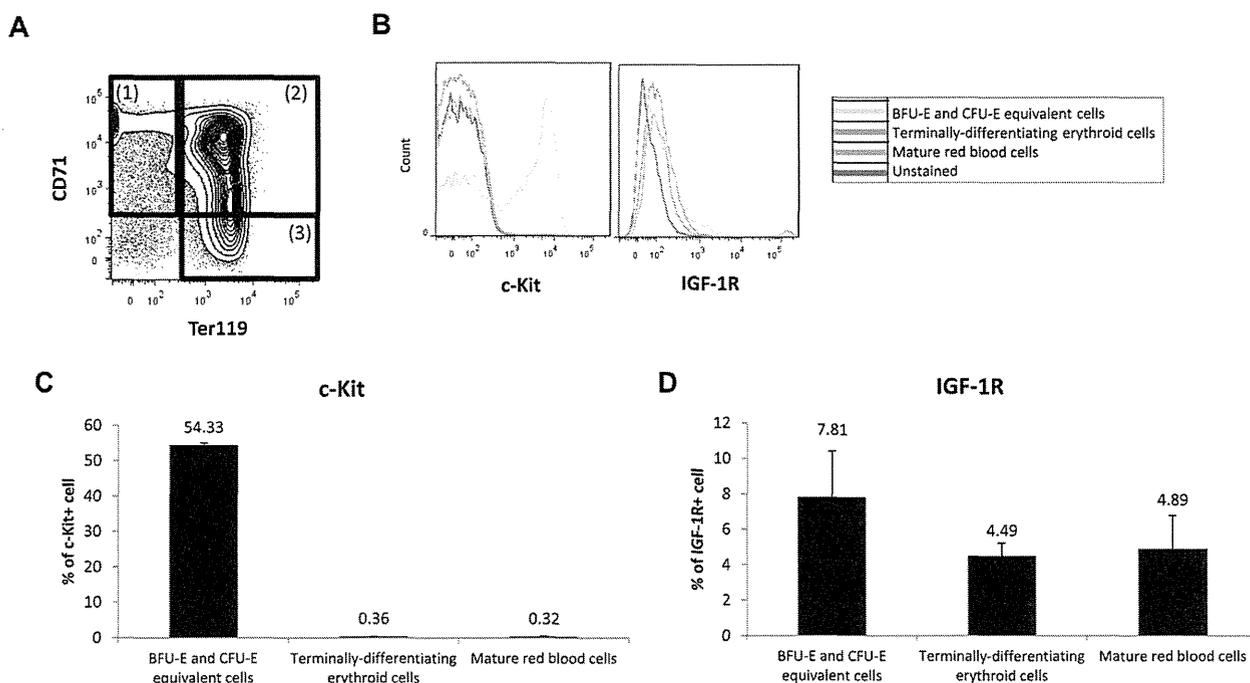


Fig. 5. Expression of c-Kit and IGF-1R on erythroid cells. (A) Gating strategy of flow cytometric analysis of c-Kit⁺ and IGF-1R⁺ cells during erythropoiesis. (1) CD45[−]CD71⁺Ter119[−] defines BFU-E and CFU-E equivalent cells, (2) CD45[−]CD71⁺Ter119⁺ defines terminally-differentiating erythroid cells, and (3) CD45[−]CD71[−]Ter119⁺ defines mature red blood cells. (B) Representative diagram of flow cytometric analysis showing cell surface expression of c-Kit and IGF-1R on erythroid cells. (C,D) Graphs showing the percentage of c-Kit⁺ or IGF-1R⁺ cells in BFU-E and CFU-E equivalent cells, terminally-differentiating erythroid cells and mature red blood cells (n=3). c-Kit⁺ and IGF-1R⁺ cells were expressed primarily in BFU-E and CFU-E equivalent cells. Data are means ± standard deviation (SD).

development of different cell lineages, particularly myeloid and lymphoid lineages. From 16.5 dpc to 19.5 dpc, we observe that spleen becomes increasingly erythropoietic, and flow cytometric analysis enabled us to quantitate fetal spleen cells, including hematopoietic cells and non-hematopoietic cells during this period. Our analysis suggests that fetal spleen is an erythropoietic organ by 16.5 dpc, a finding compatible with previous reports (Djaldetti et al., 1972; Sasaki and Matsumura, 1988).

Several reports have shown that a hematopoietic environment comprised of stromal cells functions as a niche to support hematopoietic cells. For example, OP-9, a representative stromal cell line established from osteopetrotic mice that lack macrophage colony-stimulating factor, reportedly can sustain hematopoiesis, including erythropoiesis (Kodama et al., 1994; Nakano et al., 1994). The fetal spleen environment supports macrophage and B cell development *in vitro* at 14.5 dpc (Bertrand et al., 2006). Mouse stromal cell lines established from 14.5 dpc spleen secrete macrophage colony-stimulating factor, which accelerates macrophage development (Bertrand et al., 2006). In addition, spleen stromal cell supernatants contain the anti-inflammatory cytokine transforming growth factor- β 1, which inhibits T cell proliferation (Li et al., 2006). Stromal cell lines derived from new born mouse spleen support proliferation and differentiation of erythroid cells in the presence of EPO when co-cultured with hematopoietic cells derived from 13.5 dpc fetal liver or adult bone marrow (Yanai et al., 1989). In this study, we characterized stromal cell components by flow cytometry and demonstrated that sorted endothelial and mesenchymal-like cells express the erythropoietic cytokines SCF and IGF-1 at 16.5 dpc.

Hematopoietic cells co-cultured with stromal cells of fetal spleen in the presence of an SCF inhibitor or inhibitors of both SCF and IGF-1R exhibited decreased cell viability compared to controls or cells cultured with an IGF-1R inhibitor alone, suggesting that SCF supports erythroid cell survival in fetal spleen *in vitro*.

Fetal liver and spleen are the sites where erythropoiesis occurs (Godin et al., 1999; Sugiyama et al., 2011a). In the fetal liver, mechanisms underlying that hematopoietic stem cell expansion have been well characterized with special attention to niche cells expressing cytokines such as SCF, thrombopoietin, IGF-2 and angiopoietin-like proteins 2 and 3 (Chou and Lodish, 2010; Zhang et al., 2006; Zhang and Lodish, 2004). Previously, our group reported that DLK-1⁺ hepatoblasts support fetal liver hematopoiesis, particularly erythropoiesis, through EPO and SCF secretion. Loss of DLK-1⁺ hepatoblasts in *Map2k4*^{−/−} mouse embryos resulted in decreased numbers of hematopoietic cells in fetal liver (Sugiyama et al., 2011b). Here, we showed that SCF and IGF-1 are expressed primarily in fetal spleen endothelial and mesenchymal-like cells and to lesser extent in hematopoietic cells. Among fetal spleen erythroid cells, c-Kit expression decreased with maturation, and IGF-1R expression increased. Our *in vitro* data revealed that addition of an SCF inhibitor to cell cultures decreased the number of CD45[−]c-Kit[−]CD71^{+/−}Ter119⁺ cells, while treatment with an IGF-1R inhibitor did not (Fig. 6D). However, *in vivo* we found that treatment with either inhibitor significantly decreased the number of CD45[−]c-Kit[−]CD71^{+/−}Ter119⁺ cells in fetal spleen (Fig. 7B). This difference might be due to the influence of cytokines secreted from non-splenic tissues. SCF is a key cytokine that promotes

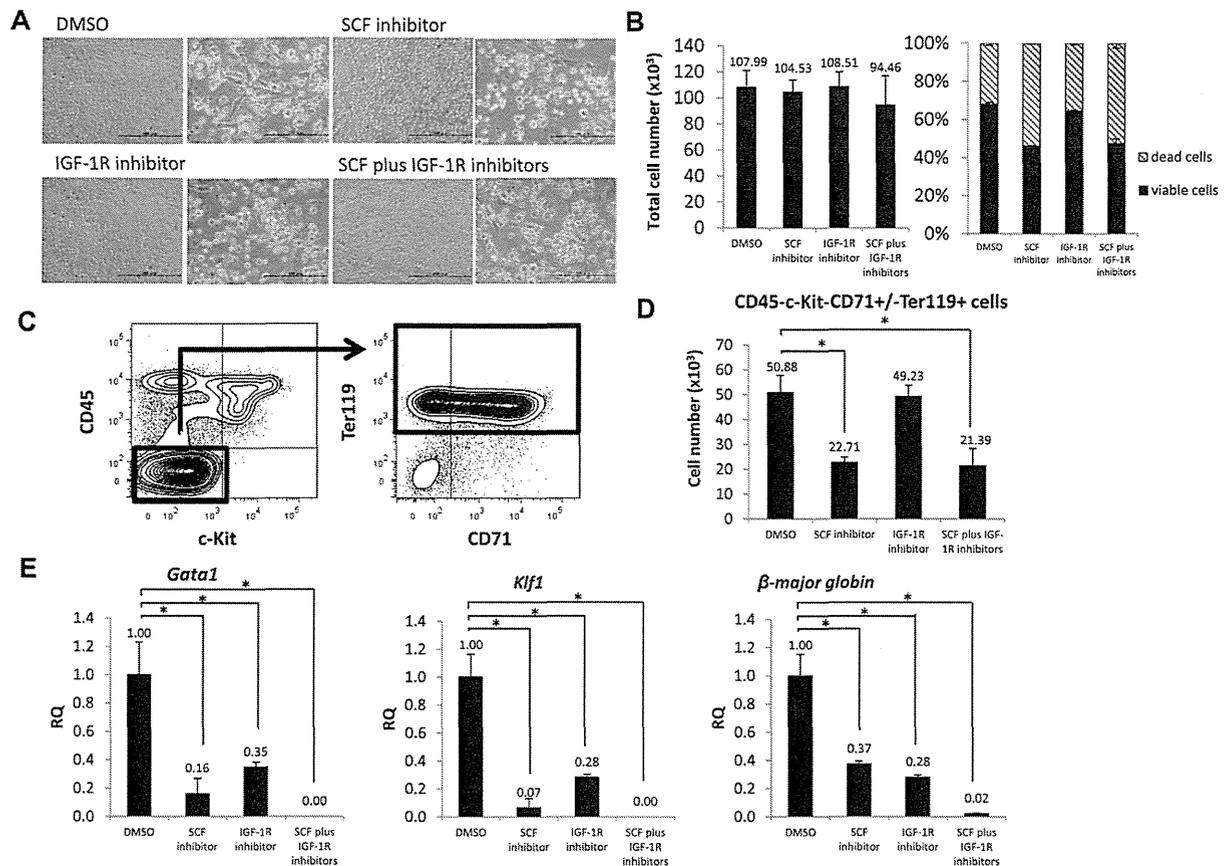


Fig. 6. SCF and IGF-1 accelerate fetal spleen erythropoiesis in vitro. (A) Microscopic images of whole fetal spleen cell cultures after 24 hours of treatment with DMSO, an SCF inhibitor, an IGF-1R inhibitor or both. Scale bars: left, 200 μ m; right, 100 μ m. (B) Graphs showing the total number of cells (left) and percentage of viable and dead cells (right) in culture with those inhibitors (n=3). (C) Gating strategy of flow cytometric analysis. CD45-c-Kit-CD71+/-Ter119+ defines terminally-differentiating erythroid cells and mature red blood cells. (D) Graph showing the number of terminally-differentiating erythroid cells and mature red blood cells in culture with DMSO, the SCF inhibitor, the IGF-1R inhibitor or both (n=3). (E) Expression of erythroid mRNAs such as *Gata1*, *Klf1* and β -major globin in sorted CD45- cells by real-time PCR. CD45- cells from DMSO-treated cultures served as controls (n=3). Data are means \pm standard deviation (SD). *P<0.05.

differentiation of erythroid progenitors expressing its receptor, c-Kit, in fetal liver and spleen. Embryos deficient in the regulatory subunit of class IA phosphatidylinositol 3-kinase, which functions in c-Kit receptor signaling, reportedly exhibit decreased numbers of BFU-E and CFU-E in fetal liver compared to wild-type controls (Munugalavada and Kapur, 2005). Here, we demonstrate that blocking SCF signaling via an inhibitor decreases the number of erythroid cells in *in vitro* and *in vivo*, suggesting that SCF signaling also regulates erythropoiesis in fetal spleen.

Our previous report showed that SCF is primarily expressed in fetal liver hepatoblasts, suggesting that hepatoblasts are key regulators for hematopoiesis in fetal liver (Sugiyama et al., 2011b). However, the present study shows that SCF is expressed in both endothelial cells and mesenchymal-like cells of fetal spleen, but not in DLK-1-positive cells, suggesting that hematopoietic regulation differs between fetal liver and spleen. At 16.5 dpc *Epo* gene expression is lower in whole fetal spleen than in fetal liver (Sugiyama et al., 2011b). Furthermore, EPO protein expression was detectable in fetal liver but not in fetal spleen at 16.5 dpc, suggesting that EPO is recruited from fetal liver to spleen at this stage (Fig. 2C,D; supplementary material Fig. S1D). As embryos develop, both fetal spleen and liver

express EPO (Fig. 2C,D). The source of EPO at later embryonic stages will be investigated in the future.

Previous investigators have shown that at the BFU-E stage of maturation, cells cannot survive without EPO signaling (Udupa and Reissmann, 1979). Here, however, our *in vitro* cultures did not contain exogenous EPO, which suggests that adherent cells in the co-culture provide the EPO survival signal. Cells used in co-culture experiments reported here were derived from whole spleen cells and are likely a heterogeneous population. Macrophages reportedly form erythroblastic islands, regulate erythropoiesis, and produce EPO (Ji et al., 2008; Ohls et al., 1994; Sadahira et al., 2000), suggesting the possibility that macrophages in our co-culture system provided survival signals such as EPO. Thus although co-culture approaches enable interactions with target cells, their utility in identifying critical cell subpopulations is limited due to their heterogeneity.

Mesenchymal stem cells, which are multi-potent precursors present in the stromal fraction of many tissues, can differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes after *in vitro* expansion (Wang et al., 2006). Mesenchymal stem cells that reside in bone marrow could maintain stemness and proliferation of hematopoietic stem cells, as well as support hematopoietic

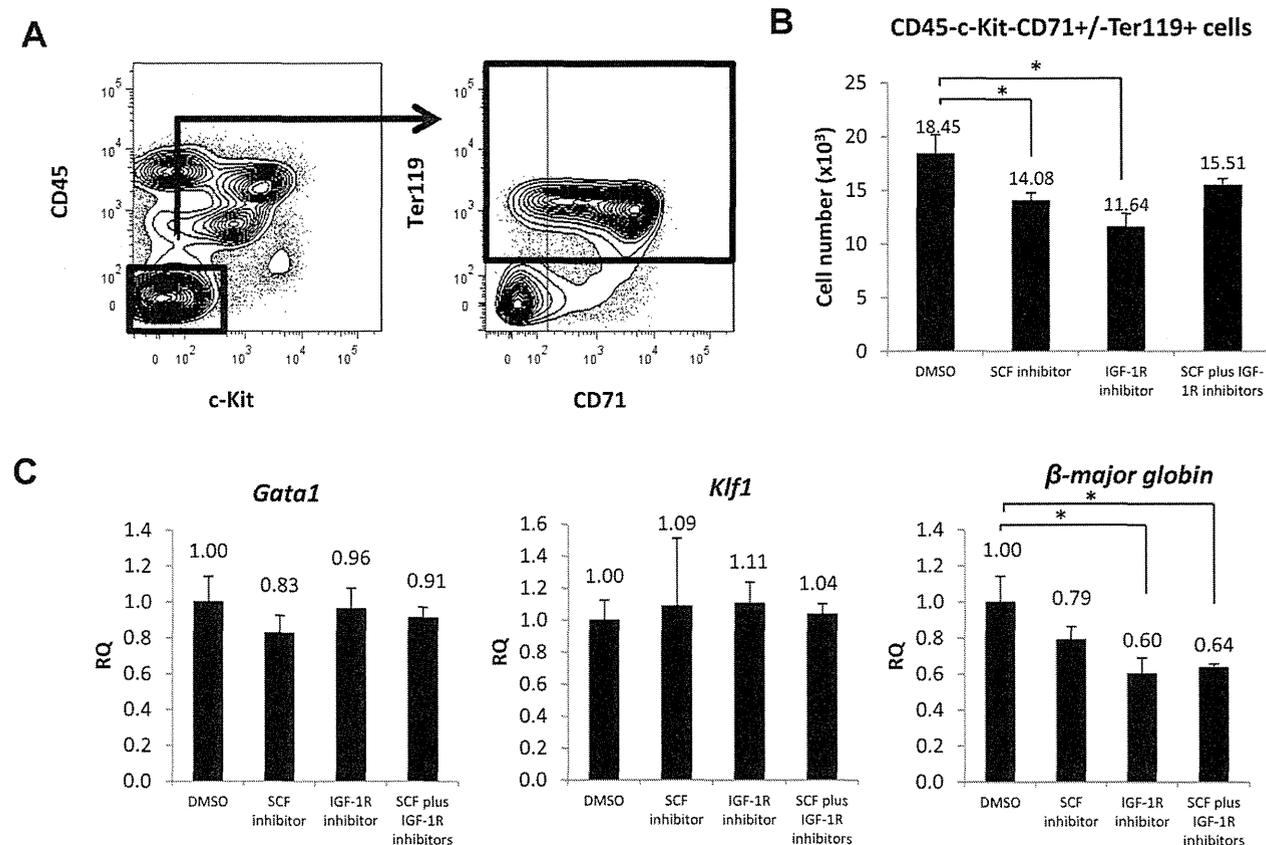


Fig. 7. SCF and IGF-1 accelerate fetal spleen erythropoiesis *in vivo*. (A) Gating strategy of flow cytometric analysis. CD45⁺-c-Kit⁻-CD71⁺-Ter119⁺ defines terminally-differentiating erythroid cells and mature red blood cells. (B) Graph showing the number of terminally-differentiating erythroid cells and mature red blood cells in mice treated with DMSO, the SCF inhibitor, the IGF-1R inhibitor or both, two hours after injection (n=3). (C) Relative expression (RQ) of erythroid genes such as *Gata1*, *Klf1* and *β-major globin* mRNAs in CD45⁺ cells was examined by real-time PCR. CD45⁺ cells from mice injected with DMSO served as controls (n=3). Data are means±standard deviation (SD). *P<0.05.

stem cell transplantation (Li and Wu, 2011). Lin⁻CD140ab⁺ mesenchymal cells isolated from adult bone marrow tissues express stem/progenitor cell markers such as CD29, CD51, CD73, CD105, CD146, and Sca-1 (Suire et al., 2012). Lin⁻CD140ab⁺ cells possess multi-lineage differentiation capacity, as they can form bone *in vivo* and also possess chondrogenic and adipogenic activities, suggesting that they are mesenchymal stem cells. CD51 and CD140a are expressed on Nestin⁺ mesenchymal stem cells of the bone marrow (Houlihan et al., 2012; Pinho et al., 2013). CD51⁺/CD140a⁺ cells express genes functioning in hematopoietic stem cell maintenance and are likely major constituents of the bone marrow hematopoietic stem cell niche (Pinho et al., 2013). By comparison, CD51⁺ cells among unclassified cells of fetal spleen express *Nestin*, suggesting that they exhibit mesenchymal stem cell characteristics in that milieu (supplementary material Fig. S4A,B). Spleen CD51⁺ cells express both SCF and IGF-1, suggesting that these factors function in hematopoietic stem cell maintenance and erythropoiesis.

Taken together, our work shows that robust erythropoiesis occurs in fetal spleen that its niche cells accelerate erythropoietic activity through SCF and IGF-1 secretion, and that erythropoietic regulation differs between fetal spleen and liver. Further investigation of erythropoietic regulation should facilitate our understanding of erythropoietic differentiation from pluripotent stem cells and be useful for future regenerative medicine approaches.

MATERIALS AND METHODS

Mice

ICR mice were purchased from Nihon SLC (Hamamatsu). Noon on the day of the plug was considered to be 0.5 day post-coitum (dpc). Animals were handled according to Guidelines for Laboratory Animals of Kyushu University. This study was approved by the Animal Care and Use Committee, Kyushu University (Approval ID: A21-068-0).

Hematoxylin and eosin staining

Fetal spleens at 16.5 dpc and 19.5 dpc were dissected in PBS under a Leica MZ7.5 stereomicroscope, fixed in 2% paraformaldehyde/PBS at 4°C overnight, washed 3 times with PBS, equilibrated with 30% sucrose/PBS, embedded in OCT compound (SAKURA, Tokyo, Japan) and frozen in liquid nitrogen. Tissues were then sliced at 10 μm thick using a Leica CM1900 UV cryostat, transferred to glass slides (Matsunami, Osaka, Japan) and dried thoroughly. Slides were put into a glass chamber, washed with running tap water for 3 minutes and then stained with Mayer's Hematoxylin solution (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan) for 5 minutes to visualize dark nuclei. Slides were then washed under warm running tap water in a glass chamber for 3 minutes and then stained with 1% Eosin Y solution (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) for 5 minutes to visualize red blood cells. Slides were again washed in tap water in a glass chamber to remove excess Eosin Y. The slides were successively dehydrated in 95% ethanol, 100% ethanol and then xylene. Tissues were mounted on slides using MGK-S (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan), covered with cover glass (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) and stored at room