OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Induction of Live Cell Phagocytosis by a Specific Combination of Inflammatory Stimuli
Author(s)	石止, 貴将
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69647
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Induction of Live Cell Phagocytosis by a Specific Combination of Inflammatory Stimuli

（過剰炎症による自己生細胞貪食メカニズムの解明）

石止　貴将

2018 年　3 月 22 日　修了予定

ABSTRACT

Conditions of severe hyper-inflammation can lead to uncontrolled activation of macrophages, and the ensuing phagocytosis of live cells. However, relationships between inflammatory stimuli and uncontrolled phagocytosis of live cells by macrophages are poorly understood. To identify mediators of this process, I established phagocytosis assays of live cells by stimulating macrophages with CpG DNA, interferon-γ, and anti-interleukin-10 receptor antibody. In this model, various cell surface receptors were upregulated on macrophages, and phagocytosis of live cells was induced in a Rac1-dependent manner. Subsequent inhibition of the ICAM-1, VCAM-1, and both of these receptors abolished *in vitro* and *in vivo* phagocytosis of live T cells, myeloid cells, and B cells, respectively. Specifically, the reduction in lymphocyte numbers due to *in vivo* activation of macrophages was ameliorated in *Icam-1*-deficient mice. In addition, overexpression of ICAM-1 or VCAM-1 in non-phagocytic NIH3T3 cells led to active phagocytosis of live cells. These data indicate molecular mechanisms underlying live cell phagocytosis induced by hyper-inflammation, and this experimental model will be useful to clarify the pathophysiological mechanisms of hemophagocytosis and to indicate therapeutic targets.

要旨

生体内で全身性の過剰な炎症が起こると、貪食細胞であるマクロファージが異常に活性化し、生きた細胞を貪食するようになる。しかしながら、炎症性刺激がどのようにして生きた細胞の貪食につながるかはほとんどわかっていない。生きた細胞の貪食を起こす分子を同定するために、私は CpG DNA、IFN-γ、αIL-10R を用いることで、生細胞貪食の細胞培養系モデルを樹立した。本モデルでは、炎症性刺激によってマクロファージ上に様々な受容体が誘導され、生きた細胞が Rac1 依存的に貪食されることがわかった。この誘導された貪食に対して、ICAM1 もしくは VCAM1 に対する抗体を作用させることで、T 細胞、B 細胞、ミエロイド細胞の貪食がそれぞれ阻害された。特に、過剰な炎症によるマウス生体内のリンパ球数減少が、*Icam1* KO マウスでは回復していた。さらに、通常は生きた細胞を貪食しない NIH3T3 に、ICAM1 もしくは VCAM1 を過剰発現させることで、生細胞の貪食を誘導できた。これらの結果より、過剰な炎症による自己生細胞貪食メカニズムの一端を明らかにすることができ、今後、血球貪食の生理的機能の解明や、治療法確立につながることが期待される。

目次

1. 研究の背景と概要
2. Introduction
3. Materials and Methods
4. 結果
5. Discussion
6. 謝辞
7. References
8. Figures and Legends
9. Supplemental Figures and Legends

１．研究の背景と概要

- CpG DNA、γ-インターフェロン、抗 IL-10 受容体抗体の 3 種類の炎症性刺激を組み合わせることによってマクロファージによる生きた細胞の貪食を誘導できる
- 炎症性刺激によってマクロファージ上に誘導された ICAM1 と VCAM1 が生きた細胞の貪食に関与している

これまで死んだ細胞の適切な貪食は、組織の恒常性維持や、自己免疫疾患を防ぐうえで非常に重要であることは様々な論文で報告され、その分子メカニズムも広く調べられてきた。一方で、生きた細胞の貪食も、一定の環境下で起こることが知られている。特に、血球やその前駆細胞の貪食は、“血球貪食”と呼ばれており、感染症や悪性腫瘍、自己免疫疾患といった過度の慢性炎症によって引き起こされ、そのような疾患群は、総称して血球貪食症候群と呼ばれている。血球貪食症候群患者では、汎血球減少や、抗サイトカイン血症が見られるが、何より、活性化した貪食細胞が自己血球を貪食している像が見られるのが特徴である。血球貪食症候群は致死的な経過をたどることが多いが、現在有効な療法はなく、治療法確立のために、そのメカニズム解明は重要である。しかし、詳しい分子メカニズムはわかっていない。これまで血球貪食に関する研究は、主にマウスモデルやヒトサンプルを用いて行われてきたため、その詳細な分子メカニズムを明らかにするのが困難であった。私は、血球貪食の新たな細胞培養系モデルを樹立することで、この問題を解決した。このモデルでは CpG DNA、γ-インターフェロン、抗 IL-10 受容体抗体の 3 種類の炎症性刺激によってマクロファージを活性化することで、培養細胞系でも生きた細胞の貪食

を誘導できる。また、このモデルを用いることで、T 細胞の貪食には ICAM1 が、B 細胞の貪食には ICAM1 と VCAM1 が、ミエロイド細胞の貪食には VCAM1 がそれぞれ関与していることを明らかにした。これらの結果によって、今後、新たな血球貪食分子の同定や、血球貪食症候群の治療法確立につながることが期待される。

2. Introduction

私たちの体の中では毎日何十億の細胞がアポトーシスを起こして死に、貪食細胞がそれらを除去することで、ホメオスターシスを維持している。このアポトーシス細胞の貪食はefferocytosisと呼ばれ、そのメカニズム解明が進んでいる。例えば、アポトーシス細胞はその表面にホスファチジルセリン（PS）を露出しており、そのPSを貪食細胞がTim4やMFG-E8などを介して貪食することが知られている(Segawa and Nagata, 2015 ;Nagata et al., 2010)。また、生細胞の表面にはCD31やCD47といった、生きた細胞の貪食を阻害するための分子が発現しており(Brown et al., 2002; Gardai et al., 2005)、これらによって、アポトーシス細胞が特異的に貪食されるようなメカニズムになっている。

一方で、生細胞の貪食は、全身性の感染症や、自己免疫疾患を由来とした、過剰炎症による、マクロファージの異常な活性化により引き起こされる。特に、生きた自己血球やその前駆体の貪食は、血球貪食と呼ばれ、一定以上の血球貪食像を示す疾患群は、血球貪食症候群と呼ばれている。血球貪食症候群患者では、汎血球減少や抗サイトカイン血症を示し、何より骨髄や脾臓において異常に活性化した貪食細胞によって赤血球や白血球、血小板が貪食されている様子が観察される(Janka, 2012; Grom et al., 2016)。HLHは非常に致死性の高い疾患であるが、現在有効な治療法がないため、そのメカニズム解明は非常に重要である。しかし、その詳しい分子メカニズムはほとんどわかっていない。この血球貪食に関しては、血球貪食症候群患者の血液幹細胞において、CD47の発現が低下しているという報告(Kuriyama et al., 2012)や、マウスモデルにおいて、PSが露出した赤血球が増加しているといった報告(Ohyagi et al., 2013)がある。しかしながら、γ-インターフェロン(IFN-γ)などの炎症性刺激によるマクロファージの異常な活性化が、血球貪食の本態である

(Zoller et al., 2011)ことを考えると、これらの知見だけでは、血球貪食のメカニズム全容を解明するに至っていない。特に、炎症性刺激がどのようにマクロファージに作用して、自己血球を貪食するようになるのかという分子メカニズムはほとんどわかっていない。

そこで、私は、血球貪食の細胞培養系モデルを樹立することでこの分子メカニズムを解明しようと考えた。しかし、マクロファージは死んだ細胞を認識し、貪食するため、マクロファージによる生細胞の貪食を *in vitro* で再現することは誰も成功していなかった。最近、Toll-like receptor (TLR) 9 のリガンドである CpG DNA をマウスに繰り返し投与することで血球貪食を誘導できる(Behrens et al., 2011)ということが報告されたため、それを参考にして、血球貪食の細胞培養系モデルの樹立試みることにした。

3. Materials and Methods

3.1. マウス、細胞、試薬

C57BL/6 マウスは SLC から購入した。 C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウス (Okabe et al., 1997) は岡部勝先生から頂いた。 *Icam*-1 KO マウスはマウス *Icam-1* exon-4 (CGCTGCGTTTTGGAGCTAGCGG) と exon-6 (TCCTAAGATGACCTGCAGACGG) (下線 PAM 配列を示す)をターゲットとした、CRISPR/Cas9 pX330 ベクターを前核インジェクションにより作製した。すべてのマウスは pathogen-free の施設で飼育し、すべての動物実験は金沢大学の動物実験委員会により承認された実験計画に基づいて行われた。骨髄由来マクロファージ(Bone marrow-derived macrophage;BMDM)はマウスの大腿骨から抽出した骨髄細胞を、10% FBS (Biowest)、 1% penicillin/streptomycin、M-CSF を過剰発現した L929 細胞の上清より調整した 10 units/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Takeshita et al., 2000)を含む high glucose DMEM (Nacalai, Japan)によって、4-6 日間培養することで作製した。すべての細胞株は RIKEN Bio Resource Center (Japan)より購入し、マイコプラズマ感染がないことを確認して使用した。それぞれの細胞は recombinant IFN-γ、 the Rac1 inhibitor NSC23766 (Wako, Japan)、 cycloheximide (Nacalai, Japan)、 CpG ODN-1826 (5'- TCCATG ACGTTCCTGACGTT-3', Hokkaido System Science, Japan)、 BAPTA-AM (Dojindo, Japan)によって処理した。B220 (RA3-6B2, RRID:AB_312996)、CD3 (17A2, RRID:AB_312661)、 CD4 (GK1.5, RRID:AB_312696)、CD8a (53-6.7, RRID:AB_312751)、 CD11b (M1/70, RRID:AB_312794)、 CD68 (FA11, RRID:AB_10575475)、 Gr-1 (RB6-8C5, RRID:AB_313368)、 ICAM-1 (YN1/1.7.4, RRID:AB_313700)、 IL-10R (1B1.3a, RRID:AB_313521)、 Integrin α_V (RMV-7, RRID:AB_2265155)、 Integrin β_3 (2C9.G2, RRID:AB_313086)、 LAMP-1 (1D4B,

RRID:AB_572003)、 LFA-1α (M17/4, RRID:AB_10694867)、 PECAM-1 (MEC13.3, RRID:AB_312918)、 VCAM-1 (429, RRID:AB_313209)、 VLA-4α (9C10, RRID:AB_2129608)、VLA-5α (5H10-27, RRID:AB_313065)、以上の抗マウス抗体と rat IgG1κ (RTK2071, RRID:AB_326519)、IgG2a κ (RTK2758)、 IgG2b κ (RTK4530, RRID:AB_2086803)、Armenian hamster IgG (HTK888) isotype control antibodies、mouse IL-10 ELISA Kit は Biolegend より購入。MFG-E8 の D89E 変異たんぱく質は以前の報告にあるとおりに調整した(Hanayama et al., 2002)。

3.2. プラスミドとトランスフェクション

mouse *Icam-1* と *Vcam-1* のコーディング領域全長を含む DNA 断片は、CpG DNA、IFN-γ、αIL-10R で刺激した BMDM から RNA を抽出し、以下のプライマーを使用して RT-PCR を行うことで得た。ICAM-1-Fw, 5'-CCCGGATCCCTACCATGGCTTCAACCCGT-3' and ICAM-1-Rv, 5'-AAAGCGGCCGCTCAGGGAGGTGGGGC-3' (下線は BamHI、NotI 制限酵素サイト)、VCAM-1-Fw, 5'-ATTAATTAAGCCACCATGCCTGTGAAGAGGTC-3' and VCAM-1-Rv, 5'-AAAGCGGCCGCCTACACTTTGGATTTCTGTGC -3' (下線は PacI、NotI 制限酵素サイト)。PCR 断片を BamHI/PacI と NotI により切断し、pMXs retrovirus vectors (Kitamura et al., 2003) に挿入した。pMXs-Rac1 は長田重一先生より頂いた。 レトロウイルスベクターを FuGENE6 (Promega)を用いて、PLAT-E 細胞(Morita et al., 2000)にリポフェクションし、48 時間後に NIH3T3 細胞、もしくは BMDM に、PLAT-E 上清を 10 μg/ml polybrene とともに加えることで感染させ、過剰発現細胞株を作製した。インテグリン$\alpha_v\beta_3$を発現させた NIH3T3 細胞は以前作製したものを使用した(Hanayama et al., 2002)。

3.3. In Vitro 貪食アッセイ

1×10^5 の貪食細胞を 24-well plates (Corning)もしくは NUNC Lab-Tek II 8-well chamber glass slides (Thermofisher)にそれぞれ培養し、IFN-γ (100 U/ml)、CpG DNA (0.5 μg/ml)、αIL-10R (1.25 μg/ml)によって 20 時間刺激した。このとき、cycloheximide (1 μg/ml)もしくは 50、100、200 μM の Rac1 inhibitor NSC23766 を加えたものと加えないものを用意した。胸腺細胞や脾臓細胞、ミエロイド細胞は、4–6 週齢マウスから摘出し、調整した。ミエロイド細胞は、骨髄細胞を抗 CD3 抗体と抗 B220 抗体で染色し、T 細胞と B 細胞を FACSAria cell sorter (BD Biosciences)によって除去することによって調製した。胸腺細胞のアポトーシスは 10 μM dexamethasone で 4 時間処理することで誘導し、ミエロイド細胞のアポトーシスは 200 J/cm^2 の UV 照射後、2 時間培養することで誘導した。フローサイトメトリーによる解析のために、被貪食細胞は PBS により 2 回ウォッシュし、1 μM CellTracker green dye (CMFDA) (Thermofisher)を加えて、30 分インキュベートし、染色した。染色反応は 1 ml FBS によって止め、10% FBS を含む DMEM によってウォッシュした。1×10^6 のラベルした細胞をあらかじめ 4 μg/mL の抗体、10、20 μM BAPTA-AM、7 μg/ml MFG-E8 D89E で 30 分前処理した、もしくは前処理していない貪食細胞に加えた。その後 37℃で 2.5 時間貪食を起こさせ、貪食されていない細胞は PBS で 2 回ウォッシュすることで除去した。貪食細胞をトリプシン処理によって回収し、ウォッシュし、2% FBS を含む PBS に再懸濁した。Percentage phagocytosis は、CMFDA 陽性 BMDM を FACSVerse (BD Biosciences)を用いて定量することで算出した。顕微鏡観察のために、1×10^6 の被貪食細胞を 4 μg/mL (BMDM)もしくは 10 μg/mL (NIH3T3 細胞、pMAC、BMDC)で 30 分前処理した、もしくはしていない、GFP でラベルされた貪食細胞に加えた。いくつかの実験では、被貪食細胞を 0.1 μg/ml の pHrodo Red (Thermofisher)であらかじめ染色した。2.5 時間貪食細胞

と被貪食細胞を共培養した後に、細胞を PBS によりウォッシュし、4% paraformaldehyde (PFA)/PBS により固定した。脾臓細胞を用いた場合には、ice-cold acetone により貪食細胞を易透化し、APC ラベル抗 B220、抗 CD4、抗 CD8 抗体によって染色することで、貪食された細胞種を同定した。この細胞を DAPI (Dojindo, Japan)を含む ProLong Gold Antifade (Thermofisher)を用いてマウントし、FV10i confocal microscope (Olympus, Japan)により観察した。 貪食された細胞は黒いスポットとして検出され、200 の貪食細胞(50 細胞/1 視野 × 4 視野)あたり貪食された細胞数を、無作為に数え、100 貪食細胞当たり貪食された細胞数の平均を phagocytosis index として算出した。

3.4. 生細胞、アポトーシス細胞の検出

TUNEL 染色、JC-1 アッセイ、Annexin V 染色はそれぞれ ApopTag Fluorescein Direct *In Situ* Apoptosis Detection Kits (Merck Millipore)、 MitoPT JC-1 Assay Kit (ImmunoChemistry Technologies)、FITC-Annexin V (BioLegend)を用いて行った。電子顕微鏡観察は BMDM を Cell Desk (Sumitomo Bakelite, Japan) polystyrene cover slips 上で培養し、貪食反応をさせた後、2% formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium-phosphate buffer (pH 7.4) によって固定し、同様のバッファーにより 3 回ウォッシュした。以下の操作は委託して行ってもらった。細胞を 0.1 M sodium-phosphate buffer (pH 7.4) containing 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide によって 1 時間後固定し、一連の濃度のエタノールにより脱水し、Epon812 (TAAB, UK) に固定。その後、80 nm で超薄切切片を作製し、saturated solution of uranyl acetate と lead citrate により染色、JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL, Japan) を用いて観察した。

3.5. マイクロアレイと qPCR 解析

BMDM を CpG (0.063 μg/ml)、IFN-γ (100 U/ml) + αIL-10R (1.25 μg/ml)、もしくはこれら 3 すべてによって、37°C で 20 時間刺激し、RNA 全量を RNeasy Plus Mini Kits (QIAGEN)を用いて抽出した。SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8 × 60 K Microarrays (Agilent) を用いたマイクロアレイ解析は、MBL, Japan に委託して行った。qPCR 解析では、RNA を ReverTra Ace qPCR master mix (TOYOBO, Japan)によって、逆転写し、cDNA 産物を Universal SYBR Select master mix (Thermofisher)と LightCycler 96 (Roche)によって増幅、定量した。データは delta Ct method により解析し、*β-actin* RNA の発現をもとに補正した。マイクロアレイのオリジナルデータは GEO database に公開済み(accession number GSE90881)。real-time PCR で用いたプライマーは以下の通り:β-actin-Fw, 5'-CTTTGCAGCTCCTTCGTTG-3'、β-actin-Rv, 5'-CGATGGAGGGGAATACAGC-3'; ICAM-1-Fw,5'-GTCCGCTGTGCTTTGAGAAC-3'、ICAM-1-Rv,5'-TGAGGTCCTTGCCTACTTGC-3'; VCAM-1-Fw, 5'-GAAATGCCACCCTCACCTTA-3'、VCAM-1-Rv, 5'-CGGGGGAGATGTCAACAATA-3'; LFA-1α-Fw, 5'-CAGAACAAGAACCCCGATGT-3'、LFA-1α-Rv, 5'-CCTGGCACCAGACTCTTCTT-3'; VLA-4α-Fw, 5'-AATGCCTCAGTGGTCAATCC-3'、VLA-4α-Rv, 5'- TCTCCTCCAGGCATGTCTTC-3'。

3.6. In Vivo 貪食アッセイ

DH5α (Toyobo, Japan)大腸菌を 37℃、100 ml の LB 培地で対数増殖期(OD_{600} = 0.8–1.0)まで増殖させた。4000 × *g* 10 分間遠心することで大腸菌を回収し、50 ml の 70% ethanol に 30 分間作用させることで不活化 させた。その混合物を遠心し、PBS でウォッシュし、再懸濁した後、30 分間 UV 照射を行った。その後、200 μg の大腸菌を 8–10 週齢マウスの腹腔

に投与し、その 2 日後、4×10^7 の CMFDA でラベルした生細胞をマウスの腹腔内に、10 μg の阻害抗体もしくはそれに対応する isotype control 抗体を投与した。投与 2.5 時間後、腹腔内の細胞を回収し、ガラスボトムスライドで 1 時間培養することで、マクロファージをディッシュに接着させた。接着したマクロファージを固定し、抗 CD11b 抗体および抗 Gr-1 抗体によって染色し、共焦点顕微鏡により観察した。50 (10 細胞/1 視野 × 5 視野)の $CD11b^+/Gr\text{-}1^-$ 腹腔マクロファージあたり貪食された細胞数 を数え、100 貪食細胞当たり貪食された細胞数の平均を phagocytosis index として算出した。マウス生体内で血球貪食と汎血球減少を誘導するため、0、2、4、6、8 日目にマウス腹腔内に PBS もしくは 20 mg の大腸菌死菌を投与した。7 日目に末梢血をマウスの頬から回収し、FACSCanto II (BD Biosciences)を用いて血球計数を行った。T 細胞と B 細胞の血球数は、赤血球を溶血させたのちに、抗 CD3 抗体、もしくは抗 B220 抗体で染色することで算出した。10 日目に、マウスを安楽死させ、脾臓を摘出し、抗 CD68 抗体を用いた免疫組織染色を行い、共焦点顕微鏡により観察した。

4. 結果

4.1. 炎症性刺激の組み合わせによって生細胞貪食が誘導される

血球貪食の細胞培養系モデルを樹立するために、骨髄由来マクロファージ(Bone Marrow Derived Macrophage;BMDM)を CMFDA でラベルした生きた胸腺細胞と、2.5 時間共培養し、胸腺細胞を貪食したマクロファージをフローサイトメトリーにより定量した。無刺激の状態でマクロファージは、胸腺細胞を全く貪食しなかったが、CpG DNA によりマクロファージを 20 時間刺激することで、4.8%のマクロファージが胸腺細胞を貪食するようになった(Fig. 1a)。そこで、IFN-γ や抗 IL-10 受容体抗体(αIL-10R)といった、他の炎症性刺激によってマクロファージを刺激したが、貪食は誘導されなかった。しかし、これら 3 つの刺激(CpG, IFN-γ,αIL-10R;Triple 刺激)を加えると、マクロファージが強く胸腺細胞を貪食するようになった。また、この貪食は、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキサミドによって完全に阻害されたことから、Triple 刺激によって誘導されたタンパクが関与していることが示唆された(Fig. 1b)。

胸腺細胞と BMDM を 2.5 時間共培養している間に、約 10%の胸腺細胞がアポトーシスを起こしていることがわかった(Fig. S1a)。そこで、マクロファージが生きた細胞を貪食していることを示すために、アポトーシス細胞の貪食を阻害する MFG-E8 D89E 変異タンパク(Hanayama et al., 2002)の存在下で共培養実験を行うと、胸腺細胞の貪食は阻害されなかった(Fig. 1b)。実際に、死んだ細胞の核を染める TUNEL 染色により、胸腺細胞が生きたまま貪食されていることを確認した(Fig. 1c)。また、生細胞ではミトコンドリア膜電位が維持されていることも確認した(Fig. S1b)。さらに電子顕微鏡によって貪食された細

胞を観察すると、生きた細胞は細胞膜を完全な状態で保持しているのに対して、アポトーシス細胞では消化され核だけが残っているのが観察された(Fig. 1d)。

4.2. 生きた細胞とアポトーシス細胞では貪食後の応答が異なる

生きた細胞がどのようにして、マクロファージ内に留まっているのかを検討するために、ファゴソームとリソソーム(Phagosome-Lysosome;P-L)融合によって起こる酸性化に反応して赤いシグナルを示す pH-rodo によって胸腺細胞を染色し、酸性化を可視化した(Miksa et al., 2009)。また、GFP でラベルされた BMDM を用いることで貪食された胸腺細胞が、黒いスポットとして観察されるようにした。こうすることで、実際に胸腺細胞が、活性化したマクロファージに取り込まれている様子を観察することができた(Fig. 2a)。このとき、pH-rodo のシグナルを生きた細胞と、アポトーシス細胞とで比較すると、生きた細胞では pH-rodo のシグナルが非常に弱いことがわかった(Fig. 2b)。それと相関するように、リソソームマーカーである LAMP1 は、取り込まれた生きた細胞の周りには局在せず、アポトーシス細胞の周りにのみ局在することがわかった(Fig. 2c)。これらの結果より、生きた細胞の貪食では、P-L 融合が起こらないことが示唆された。

これまで、P-L 融合には細胞質のカルシウムイオンが重要であることが報告されている(Jaconi et al., 1990)。そこで、P-L 融合の阻害メカニズムを解明するために、細胞膜透過型のカルシウムキレート剤である、BAPTA-AM で BMDM を処理した後の貪食を観察した。すると、BAPTA-AM で処理することで、アポトーシス細胞の貪食において、pH-rodo のシグナルが弱くなったが、一方で、生細胞の貪食には影響がなかった(Fig. 2d,e)。このことより、efferocytosis とは異なり、生細胞の貪食では、カルシウムシグナルが誘導されず、貪食後の応答も異なるのではないかと考えた。マクロファージはアポトーシス細胞を貪食

することで抗炎症性サイトカインである IL-10 を放出して、抗炎症応答を示すことが知られている(Voll et al., 1997)。実際に、私たちのモデルにおいても、マクロファージにアポトーシス細胞を貪食させることで IL-10 が放出されることを確認した。しかし、生きた細胞の貪食ではそのような応答は見られず、私のモデルでは、マクロファージは抗炎症応答を示さないことが示唆された(Fig. 2f)。

4.3. CpG, IFN-γ、αIL-10R *の 3 つの刺激によって誘導ささた ICAM1 が、生きた T 細胞の貪食に関与している*

生細胞の貪食分子を同定するために、Triple 刺激によって誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイによって調べた。DNA マイクロアレイのデータより、IFN-γ+αIL-10R 刺激に比べて、Triple 刺激によって 2391 遺伝子が 2 倍以上発現亢進していることがわかった。また、血球貪食を誘導しない CpG 刺激によっては 2032 遺伝子が発現亢進していることがわかり、これら 3 種類の刺激(IFN-γ+αIL-10R 刺激、CpG 刺激、Triple 刺激)によって誘導される遺伝子を比較することで、553 遺伝子が Triple 刺激特異的に誘導されることがわかった(Fig. 3a)。この中で細胞表面分子である、PECAM1、ICAM1、VCAM1、VLA5 を候補分子とし、それぞれの阻害抗体を用いて阻害実験を行った(Fig. S2a)。すると、ICAM1 抗体のみが、胸腺細胞の貪食を阻害し、ICAM1 抗体によって、胸腺細胞を貪食したマクロファージの割合が、25.6%から 8.9%に減少した(Fig. 3b)。ICAM1 は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子であり、T 細胞の活性化や、白血球の遊走に関与していることが報告されている(Vestweber, 2015)。ICAM1 の発現は、CpG もしくは IFN-γ+αIL-10R 刺激によっても弱く発現誘導されるが、Triple 刺激ではさらに 2.5 倍程度発現が強く誘導される

ことがわかり、Triple 刺激による強い ICAM1 の発現が胸腺細胞の貪食に重要であることが示唆された(Fig. 3c)。

ICAM1 抗体による阻害効果を、顕微鏡観察によっても確認した。ここでは、GFP でラベルされた BMDM を用いることで、取り込まれた細胞が黒いスポットとして観察されるようにし、100 マクロファージあたりどれだけの細胞が取り込まれたのかを Phagocytosis Index として算出した。すると、フローサイトメトリーのデータと相関するように、ICAM1 抗体存在下では、Phagocytosis Index が 18.6 から 3.2 に減少し、ICAM1 抗体によって、胸腺細胞の貪食が阻害されていることがわかった(Fig. 3d,e)。

どの細胞種が ICAM1 を介して、貪食されているのかを同定するために、よりヘテロな細胞集団である脾臓細胞を被貪食細胞として用い、どの細胞が貪食されたかを、細胞特異的なマーカーで免疫染色することで同定し、それぞれの Phagocytosis Index を算出した。すると、ICAM1 抗体は CD4+もしくは CD8+T 細胞の貪食を阻害し、B220+B 細胞の貪食は阻害しなかった(Fig. 3f)。また、ICAM1 抗体は、T リンパ球系細胞株である EL-4 の貪食は阻害したが、骨髄系細胞株である NSO の貪食は阻害しなかった(Fig. S2b)。以上のことから、Triple 刺激によってマクロファージ上に誘導された ICAM1 が、生きた T 細胞の貪食に関与していることが示唆された。

4.4. NIH3T3 線維芽細胞株を用いた生細胞貪食の再構築

efferocytosis において small GTPase である Rac1 が、取り込みに重要であるという報告がある(Nakaya et al., 2008)ため、私は、この Rac1 が生細胞の貪食にも関与しているのではないかと考えた。実際に、Triple 刺激によって誘導された、胸腺細胞の貪食は、Rac1 阻害剤によって濃度依存的に阻害された(Fig. 4a)。そこで、ICAM1 と Rac1 の生細胞貪食にお

ける役割を詳細に検討するために、通常では生きた細胞を貪食しない NIH3T3 線維芽細胞株を用いて、生細胞貪食の再構築を行った。ICAM1 と Rac1 を過剰発現することによって、NIH3T3 細胞が胸腺細胞を貪食するようになり、黒いスポットとして観察された(Fig. 4b)。Phagocytosis Index を算出すると、ICAM1 と Rac1 の過剰発現によって、1.1 から 20.1 に上昇していた(Fig. 4c)。このことから、ICAM1 と Rac1 が生きた T 細胞の貪食において重要な役割を果たしていることがわかった。

ICAM1 は LFA1 と結合することが知られているため(Marlin and Springer, 1987)、LFA1 が貪食リガンドとして働いていることが考えられる。実際に、NIH3T3 過剰発現細胞株による貪食は、ICAM1 抗体のみならず、LFA1 抗体によっても阻害された(Fig. 4d)。ICAM1 はその細胞質領域を介して、シグナル伝達をすることが報告されている(Holland and Owens, 1997)。そこで、私はこのシグナル伝達が貪食のために必要であるのかどうかについて検討するために、細胞質領域を欠損させた ICAM1 変異タンパクを NIH3T3 細胞に発現させた。すると、この欠損変異を加えた ICAM1 を発現させた NIH3T3 細胞は通常の ICAM1 を発現させた NIH3T3 細胞と同程度、胸腺細胞を貪食した(Fig. S2c)。このことから、ICAM1 自体は、貪食のためのシグナル伝達を行っていないことが示唆された。

4.5. ICAM1 と VCAM1 が生きた B 細胞の貪食に関与している

B 細胞の貪食促進分子を同定するために、脾臓細胞を被貪食細胞として用い、貪食された B220 陽性細胞を数えることで、Phagocytosis Index を算出した(Fig. 5a)。この実験では、候補分子に対する阻害抗体を検討した。どの阻害抗体も単独で加えても阻害効果が見られなかったが、ICAM1 抗体と VCAM1 抗体の両抗体を加えることで B 細胞の貪食が阻害さ

れた(Fig. 5b)。そこで、VCAM1 の発現を確認すると、VCAM1 は、CpG 刺激によっては亢進せず、Triple 刺激によってのみ発現が強く亢進することを確認した(Fig. 5c)。

T 細胞と同様に NIH3T3 細胞を用いた再構築を行った。ICAM1 と VCAM1 を NIH3T3 細胞に過剰発現させると、B 細胞 Phagocytosis Index が 3.8 から 12.0 に増加する一方で、ICAM1 と VCAM1 を単独で過剰発現させても、強い貪食促進効果は見られなかった(Fig. 5d)。ICAM1 と VCAM1 はそれぞれ LFA1 と VLA4 に結合することが知られているので(Marlin and Springer, 1987; Elices et al., 1990)、NIH3T3 過剰発現細胞株による貪食は、ICAM1 抗体と VCAM1 抗体、もしくは LFA1 抗体と VLA4 抗体によって強く阻害された(Fig. 5e)。しかし、このどの阻害抗体も単体では強い阻害効果を示さなかったことから、ICAM1 と VCAM1 は、B 細胞貪食において協調的に、かつ相補的に機能していると考えられる。

4.6. ミエロイド細胞の貪食には VCAM1 とインテグリン$\alpha_v\beta_3$が関与している

次に、私は、リンパ球以外の細胞の貪食にも ICAM1 と VCAM1 が関与しているのかを検討した。このために、骨髄から細胞を抽出し、その骨髄細胞から、T 細胞と B 細胞をソーティングによって除去し、残った細胞をミエロイド細胞として実験に用いた。ソーティングによって得られたミエロイド細胞は、AnnexinV 陰性で生きたまま抽出できたことを確認した(Fig. S3a and b)。T 細胞と B 細胞同様に、Triple 刺激によって活性化された BMDM はミエロイド細胞を効率よく貪食するようになり、貪食された細胞は、TUNEL 陰性で、細胞膜を完全な状態で維持していることを確認した(Fig. 6a, Fig. S3c,d)。ミエロイド細胞の貪食促進分子を同定するために様々な阻害抗体を用いたスクリーニングを行った。

すると、VCAM1 抗体とインテグリン$\alpha_v\beta_3$抗体がミエロイド細胞の貪食を阻害した。一方で、ICAM1 抗体や PECAM1 抗体は阻害効果が見られなかった(Fig. 6b)。

そこで、NIH3T3 細胞に VCAM1 とインテグリン$\alpha_v\beta_3$を過剰発現させることでミエロイド細胞貪食の再構築を行った。インテグリン$\alpha_v\beta_3$の過剰発現によって、NIH3T3 細胞がミエロイド細胞を効率よく貪食するようになったが、VCAM1 の過剰発現によっては貪食が亢進しなかった(Fig. S3e)。これは、NIH3T3 細胞が、すでに VCAM1 を十分量発現しているためだと考えられる。しかし、NIH3T3 細胞のインテグリン$\alpha_v\beta_3$過剰発現細胞によるミエロイド細胞の貪食は、インテグリン$\alpha_v\beta_3$抗体のみならず、VCAM1 抗体、VLA4 抗体によっても阻害され、他の阻害抗体では阻害されなかったため(Fig. 6c and S3f)、実際に VCAM1 がミエロイド細胞の貪食に関与していることが示唆された。

VCAM1 の貪食促進効果を確認するために、NIH3T3 細胞に比べて VCAM1 の発現が低い、BMDM に VCAM1 を過剰発現することとした。BMDM に VCAM1 を発現させることで、無刺激の状態でミエロイド細胞の貪食が弱く誘導された(Fig. 6d)。一方で、Triple 刺激を加えると、VCAM1 発現による貪食亢進がより顕著となった。また、その亢進した貪食は VCAM1 抗体によって阻害された。

さらに、VCAM1 抗体、VLA4 抗体によって、ミエロイド細胞だけでなく、ミエローマ細胞株である NSO 細胞の貪食も阻害された(Fig. S3g,h)。

以上の結果より、生きたミエロイド細胞の貪食には VCAM1 とインテグリン$\alpha_v\beta_3$が関与していることが示唆された。

4.7.他の貪食細胞による生細胞貪食と生細胞貪食 In Vivo モデル

次に、BMDM 以外の貪食細胞においても、ICAM1 や VCAM1 が生細胞貪食に関与しているのかを検討した。腹腔マクロファージ(Peritoneal Macrophage;p-mac)と骨髄由来樹状細胞(Bone Marrow Derived Dendritic Cell;BMDC)を、Triple 刺激によって活性化させたのち、胸腺細胞、脾臓細胞、ミエロイド細胞と共培養すると、BMDM と同様に生細胞の貪食が誘導された(Fig. 7a)。さらに、T 細胞の貪食は ICAM1 抗体によって、B 細胞の貪食は ICAM1 抗体と VCAM1 抗体によって、ミエロイド細胞の貪食は VCAM1 抗体によってそれぞれ細胞特異的に阻害された。このことから、生細胞貪食は細胞特異的な受容体によって引き起こされていることが確認できた。

そこで、貪食受容体はどのようにして決定されているのかを検討するため、被貪食細胞における、*Lfa1α*と *Vla4α*の発現を定量した(Fig. 7b)。すると、*Lfa1α*はミエロイド細胞で発現が最も低く、T 細胞で約 5 倍、B 細胞で約 2 倍発現が高いことがわかった。同様に、*Vla4α*は、T 細胞と B 細胞でミエロイド細胞に比べて約 2 倍発現が高いことがわかった。このことから、生細胞貪食のための受容体は、被貪食細胞の LFA1 発現に相関していることがわかり、LFA1 の発現が高い細胞に対しては ICAM1 を受容体として使用し、その発現が減少するにつれて、VCAM1 を受容体として使用するようになるということが示唆された。

最後に ICAM1 と VCAM1 の生細胞貪食への関与を、マウス生体内で検討した。ここでは、マウスの腹腔内に大腸菌の死菌を投与後 2 日後に、腹腔マクロファージが活性化し、CD11b 陽性、Gr1 陰性のマクロファージ細胞群において、ICAM1 と VCAM1 の発現が亢進していることを確認した(Fig. S4a,b)。続いて、生細胞を腹腔に投与すると、活性化したマクロファージによって生細胞が効率よく貪食された(Fig. 7c)。しかし、生細胞と同時に、ICAM1 抗体、ICAM1 抗体と VCAM1 抗体、VCAM1 抗体をそれぞれ投与すると、T 細胞、

B 細胞、ミエロイド細胞の貪食が細胞特異的に阻害された。この結果は、細胞培養系モデルから得られた結果と相関しており、ICAM1 と VCAM1 が生細胞貪食に関与していることを示している。

さらに、ICAM1 の *In vivo* における生細胞貪食への関与を詳細に検討するために、*Icam1* KO マウスを作製した。WT マウスに大腸菌の死菌を繰り返し投与することで、汎血球減少が誘発されたが(Fig. S4c)、*Icam1*KO マウスではその血球減少がリンパ球特異的に緩和されていた(Fig. 7d)。それと相関するように、WT マウスの脾臓で多く観察された血球貪食像が *Icam1*KO マウスでは、顕著に減少していた(Fig. 7e)。ICAM1 のみの阻害で T 細胞、B 細胞の両細胞の貪食が阻害されたことは、細胞培養系モデルで得られた結果とは異なるが、生体内では、ICAM1 が、生細胞貪食においてより主要な役割を果たしているのだろうと推測した。以上の結果より、ICAM1 が生体内において、リンパ球の血球貪食に重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. Discussion

本研究を通して、私は複数の炎症性刺激の組み合わせによって ICAM1 と VCAM1 がマクロファージ上に誘導され、これらの分子が生細胞の貪食に重要であることを示した(Fig. 8)。ICAM1 や VCAM1 は LFA1 や VLA4 のリガンドとして同定され、特に免疫反応において細胞遊走や接着、リンパ球の活性化などにおける機能はこれまで多く報告されてきた。私のデータは、ICAM1 と VCAM1 の生細胞貪食受容体として役割を明らかにした。特に、NIH3T3 細胞を用いた再構築の実験において、ICAM1 の細胞質領域は貪食の上で不要であることが示唆されたことから、ICAM1 や VCAM1 は貪食の前に、ターゲットとなる細胞を繋ぎ止めるという機能を有していることが考えられる。私の研究室では、以前 efferocytosis において、アポトーシス細胞は繋ぎ止められた後に取り込まれるという 2 ステップモデルを提唱している(Hanayama et al., 2004; Toda et al., 2012)。このモデルでは、Tim4 や MFG-E8 が PS を認識し結合する。しかし、Tim4 は ICAM1 と同様に、PS と結合するのみで、貪食のためのシグナル伝達は行っていない。一方で、MFG-E8 は PS と結合すると同時にインテグリン$\alpha_v\beta_3$にも結合し、Rac1 を活性化するためのシグナル伝達を行う。このモデルを ICAM1 と VCAM1 にも適応するのであれば、ICAM1 と VCAM1 は細胞を繋ぎ止める役割をしており、ほかの分子が最終的な取り込みのためのシグナル伝達を行っているということが考えられる。インテグリン$\alpha_v\beta_3$がミエロイド細胞貪食に関与しているということが、このモデルを裏付ける一つの例だと考える。しかし、インテグリン$\alpha_v\beta_3$を阻害しても T 細胞と B 細胞の貪食には影響がなかったことから、これらの細胞についてはほかの分子が関与していることが考えられる。もう一つの可能性として、慢性炎症下では Rac1 が常に活性化しているという報告(Windheim and Hansen, 2014; Frausto-Del-

Rio et al., 2012)があるため、このような条件下では ICAM1 や VCAM1 による細胞の繋ぎ止めが貪食の十分条件を満たしているということも考えられる。

血球貪食症候群において、赤血球や血小板の貪食は病気の重症度や進行度という意味で非常に重要である。私の樹立したモデルでも、赤血球や血小板の貪食は観察されたが、貪食分子を同定するに至らなかった。赤血球や血小板はその活性化もしくは老化によって PS が露出するということが報告されているが(Nagata et al., 2016)、私のモデルにおいては、PS 非依存的に貪食されていることを確認している。今後、このモデルを用いて、さらに解析することで、赤血球や血小板の貪食分子を同定することも可能だろうと考える。

これまで efferocytosis の生理的機能については、組織の恒常性維持、自己免疫疾患や慢性炎症の予防というように、明らかになっているが、生細胞貪食の生理的機能というのはほとんど明らかになっていない。生細胞貪食の生理的機能として考えられるのが、免疫細胞を除去することで、過剰な炎症を終息させることである。免疫細胞の貪食ではないが、PS を露出した赤血球を樹状細胞が貪食することで、IL-10 を放出し、炎症を終息させるという報告もあり、血球貪食が炎症の終息に関与しているということは十分に考えられる。

これまで、血球貪食の研究は主にマウスモデルやヒトサンプルを用いて行われてきたが、これらは分子メカニズムの全容を明らかにする場合などには不向きである。本論文で示した、血球貪食の細胞培養系モデルは、今後血球貪食のより詳細な分子メカニズムの解明や、血球貪食をターゲットとした、治療法の確立につながることが期待される。

6. 謝辞

電子顕微鏡観察を行っていただいた、大森さんに御礼申し上げます。

7. References

Albert, M. L., Kim, J. I., Birge, R. B., 2000. alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. Nat Cell Biol. 2(12):899-905.

Arandjelovic, S., Ravichandran, K. S., 2015. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. Nat Immunol. 16(9):907-917.

Behrens, E. M., Canna, S. W., Slade, K., Rao, S., Kreiger, P. A., Paessler, M., Kambayashi, T., Koretzky, G. A., 2011. Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice. J Clin Invest. 121(6):2264-2277.

Brown, G. C., Neher, J. J., 2012. Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. Trends Biochem Sci. 37(8):325-332.

Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C. D., Savill, J., 2002. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. Nature. 418(6894):200-203.

Dalpke, A. H., Eckerle, S., Frey, M., Heeg, K., 2003. Triggering of Toll-like receptors modulates IFN-gamma signaling: involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and suppressors of cytokine signaling. Eur J Immunol. 33(7):1776-1787.

Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E., Lobb, R., R. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. Cell. 60(4):577-584.

Frausto-Del-Rio, D., Soto-Cruz, I., Garay-Canales, C., Ambriz, X., Soldevila, G., Carretero-Ortega, J., Vazquez-Prado, J., Ortega, E., 2012. Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells. Cytokine. 57(1):158-168.

Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M., Henson, P. M., 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. Cell. 123(2):321-334.

Grom, A. A., Horne, A., De Benedetti, F., 2016. Macrophage activation syndrome in the era of biologic therapy. Nat Rev Rheumatol. 12(5):259-268.

Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Nagata, S., 2002. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. Nature. 417(6885):182-187.

Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Nagata, S., 2004. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. Science. 304(5674):1147-1150.

Holland, J., Owens, T., 1997. Signaling through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in a B cell lymphoma line. The activation of Lyn tyrosine kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. J Biol Chem. 272(14):9108-9112.

Jaconi, M. E., Lew, D. P., Carpentier, J. L., Magnusson, K. E., Sjogren, M., Stendahl, O., 1990. Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. J Cell Biol. 110(5):1555-1564.

Janka, G. E. 2012. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. Annu Rev Med. 63:233-246.

Janka, G. E., Lehmberg, K., 2014. Hemophagocytic syndromes--an update. Blood Rev. 28(4):135-142.

Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Oki, T., Nakajima, H., Nosaka, T., Kumagai, H., 2003. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. Exp Hematol. 31(11):1007-1014.

Kuriyama, T., Takenaka, K., Kohno, K., Yamauchi, T., Daitoku, S., Yoshimoto, G., Kikushige, Y., Kishimoto, J., Abe, Y., Harada, N., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Teshima, T., Akashi, K., 2012. Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. Blood. 120(19):4058-4067.

Marlin, S. D., Springer, T. A., 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). Cell. 51(5):813-819.

Miksa, M., Komura, H., Wu, R., Shah, K. G., Wang, P., 2009. A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. J Immunol Methods. 342(1-2):71-77.

Miyasaka, K., Hanayama, R., Tanaka, M., Nagata, S., 2004. Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. Eur J Immunol. 34(5):1414-1422.

Morita, S., Kojima, T., Kitamura, T., 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. Gene Ther. 7(12):1063-1066.

Muller, W. A. 2011. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. Annu Rev Pathol. 6:323-344.

Nagata, S., Hanayama, R., Kawane, K., 2010. Autoimmunity and the clearance of dead cells. Cell. 140(5):619-630.

Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., Fujii, T., 2016. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. Cell Death Differ. 23(6):952-961.

Nakagawa, Y., Ohigashi, I., Nitta, T., Sakata, M., Tanaka, K., Murata, S., Kanagawa, O., Takahama, Y., 2012. Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary T cell receptor alpha rearrangement in cortical thymocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(50):20572-20577.

Nakaya, M., Kitano, M., Matsuda, M., Nagata, S., 2008. Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(27):9198-9203.

Ohyagi, H., Onai, N., Sato, T., Yotsumoto, S., Liu, J., Akiba, H., Yagita, H., Atarashi, K., Honda, K., Roers, A., Muller, W., Kurabayashi, K., Hosoi-Amaike, M., Takahashi, N., Hirokawa, M., Matsushima, K., Sawada, K., Ohteki, T., 2013. Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses. Immunity. 39(3):584-598.

Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., Nishimune, Y., 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett. 407(3):313-319.

Overholtzer, M., Brugge, J. S., 2008. The cell biology of cell-in-cell structures. Nat Rev Mol Cell Biol. 9(10):796-809.

Overholtzer, M., Mailleux, A. A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S. J., King, R. W., Cibas, E. S., Brugge, J. S., 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. Cell. 131(5):966-979.

Segawa, K., Nagata, S., 2015. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. Trends Cell Biol. 25(11):639-650.

Takeshita, S., Kaji, K., Kudo, A., 2000. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. J Bone Miner Res. 15(8):1477-1488.

Toda, S., Hanayama, R., Nagata, S., 2012. Two-step engulfment of apoptotic cells. Mol Cell Biol. 32(1):118-125.

Vestweber, D. 2015. How leukocytes cross the vascular endothelium. Nat Rev Immunol, 15(11):692-704.

Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., Girkontaite, I., 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. Nature, 390(6658):350-351.

Windheim, M., Hansen, B., 2014. Interleukin-1-induced activation of the small GTPase Rac1 depends on receptor internalization and regulates gene expression. Cell Signal, 26(1):49-55.

Yi, A. K., Yoon, J. G., Yeo, S. J., Hong, S. C., English, B. K., Krieg, A. M., 2002. Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. J Immunol, 168(9):4711-4720.

Zoller, E. E., Lykens, J. E., Terrell, C. E., Aliberti, J., Filipovich, A. H., Henson, P. M., Jordan, M. B., 2011. Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation. J Exp Med, 208(6):1203-1214.