

脳虚血において脾臓に発現する HMGB-1 陽性細胞は ミノサイクリン投与により減少する

深 澤 麻 衣

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野

(指導: 飯沼利光 教授, 浅野正岳 教授)

要旨: ラット片側総頸動脈結紮により誘導された脳虚血において, damage associated molecular patterns (DAMPs) の一種として知られる high mobility group box protein 1 (HMGB-1) が末梢血中で増加し, 脾臓において HMGB-1 陽性細胞数が増加することが報告されている。本研究ではマウスにおいても同様の変化が認められるか, また, この変化が脳ミクログリア細胞の活性化と関連しているか検討した。

麻酔下にて, 右側総頸動脈を 60 分間結紮, 解除した後, 創部を縫合し脳虚血モデルマウスとした。灌流固定後, 脾臓を摘出, パラフィン切片を作製し, ウサギ抗マウス HMGB-1 抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。ミクログリア活性の抑制はミノサイクリンを腹腔内注射することにより行った。また, 細胞溶解液を作製し western blotting に供した。

摘出した脾臓は肉眼的に縮小していた。また, HMGB-1 陽性細胞数は経日的に増加し, HMGB-1 量増加は, western blot によっても確認できた。また, ミノサイクリン投与により HMGB-1 陽性細胞数の増加は抑制された。

マウスにおいても HMGB-1 陽性細胞数, および量の増加が確認できた。ミノサイクリン投与により HMGB-1 陽性細胞は減少したことから, 脳虚血による HMGB-1 陽性細胞の脾臓での発現はミクログリアの活性化と相関している可能性を示唆するものであった。

キーワード: DAMPs, HMGB-1, 脳虚血, 脳ミクログリア

The increase of HMGB-1+ cells in the spleen after cerebral ischemia was inhibited by intraperitoneal injection of minocycline

Mai Fukasawa

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Applied Oral Sciences

(Directors: Prof. Toshimitsu Inuma, Prof. Masatake Asano)

Abstract: High mobility group box-1 (HMGB-1) is a kind of damage-associated molecular patterns (DAMPs) released in response to cellular damage and increased in peripheral blood in cerebral ischemia. The increase of HMGB-1-positive (HMGB-1⁺) cells in the spleen was reported in rat model of unilateral common carotid artery occlusion (UCCAO). The purpose of the present study was to examine whether HMGB-1⁺ cell increase is observed in mice.

Under general anesthesia, the right carotid artery was exposed and ligated with 4-0 silk thread. The ligation was released after 1 h and the incision was closed. After 1, 3, 5 and 7 days of surgery, mice were perfused with 4% paraformaldehyde. The spleen was excised and subjected to immunohistochemical analysis. Minocycline (50 mg/kg) was intraperitoneally injected to mice to examine the contribution of microglia for the increase of HMGB-1⁺ cell in the spleen. The HMGB-1 protein expression level was examined by western blot.

HMGB-1⁺ cell increased time-dependently in the spleen. The most prominent increase was observed after 7 days of surgery. HMGB-1 increase was confirmed by western blot in a protein level. Minocyclin injection significantly reduced the HMGB-1⁺ cell number.

The increase of HMGB-1⁺ cell in the spleen was also confirmed in mice UCCAO model. HMGB-1⁺ cell increase was inhibited by minocyclin injection indicating the functional correlation between the brain and the spleen.

Keywords: DAMPs, HMGB-1, Brain ischemia, Microglia

(受付: 令和 3 年 1 月 20 日)

責任著者連絡先: 深澤麻衣

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野

〒 101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL : 03-3219-8143

FAX : 03-3219-8124

E-mail : dema17025@g.nihon-u.ac.jp

緒 言

Damage-associated molecular patterns (DAMPs) とは、生体内の細胞が障害された際に、周囲の細胞や組織に危機的な状況を知らしめるために細胞外に放出される物質の総称である¹⁾。一般に細菌などの微生物の感染を伴わずに惹起される炎症を sterile inflammation といい、この反応において主役を演じるのが alarmin である¹⁾。一方、細菌感染などに伴って発症する炎症では、微生物の構成成分としての pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) が主役で、これに対応するレセプターである toll-like receptor (TLR) などがその情報の受け手となる²⁾。細胞の死に際しては、本来細胞内に存在する ATP や DNA などが細胞外に放出されるが、興味深いことにこれらの情報の受け手が PAMPs のレセプターと共通しているものが存在し、これらのことから生体の防御反応は、様々な仕組みの重層的な組み合わせによって構成されていることが推察される。

Alarmin の代表的なものに、high mobility group box protein-1 (HMGB-1) がある³⁾。HMGB-1 は、マクロファージを lipopolysaccharide で刺激することにより、細胞外に放出された物質の検索により発見された分子量 30 kDa のタンパク質である⁴⁾。多くの動物種間で高い相同性を示し、A box および B box と呼ばれる 2 つの DNA 結合領域を有しており、両ドメインが揃った状態で機能する。B box はサイトカインを分泌誘導するドメインであるのに対し、A box はレセプターには結合するものの、シグナルを伝達しないことから、B box のアンタゴニストと考えられている⁵⁾。また、HMGB-1 は非ヒストン DNA 結合タンパク質として核内に存在し、ヌクレオソームの構造を維持することによって遺伝子転写の調節に関与している⁵⁾。そのため、本来は核内に存在する HMGB-1 が、細胞の壊死に際して受動的に細胞外に放出されることが明らかになって以来、HMGB-1 の DAMPs としての機能に注目が集まっている⁶⁾。

植木⁷⁾は、ラットでの片側総頸動脈結紮により誘導される脳虚血に際して、脳内のミクログリアが活性化され、これに伴って脾臓における HMGB-1 陽性細胞数が増加すること、末梢血中の HMGB-1 濃度が上昇することを報告した。脳ミクログリアの活性は Ionized-calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1) の発現程度に相関しており、抗 Iba-1 抗体を用いた免疫組織化学染色強度の変化と、ミクログリアの形態変化などと合わせて評価するが、同モデルにおいては Iba-1 染色性の増強およびミクログリアの細胞体の膨化が顕著に認められた。これに関し、HMGB-1 を産生する細胞は脳内に存在するのか、さらに、脾臓における HMGB-1 陽性細胞が増加するメカニズムについてはいまだ明らかではない。近年、マウス由来のミ

クログリアに myc 遺伝子を導入することにより、ミクログリア培養細胞株が樹立された^{8,9)}。この細胞はこれまでのミクログリア培養細胞と比較し安定的な性質を保持しやすく、この細胞を片側総頸動脈結紮モデルに応用することは、上記現象のメカニズム解明の一助になると考えられる。

そこで本研究は、ラットと比較し多種類の遺伝子変異モデルが存在し、ミクログリア細胞株の応用が可能となるマウスに実験モデルを移行し、マウスにおいても同様の現象が認められるか否かについて検討を行うとともに、ミクログリアの活性を抑制するミノサイクリン¹⁰⁻¹²⁾を投与することでその動態をより詳細に探索することを目的とした。

材料および方法

本研究では、脳虚血モデルマウスを作製し、脾臓の大きさの変化を比較検討した。脾臓における HMGB-1 陽性細胞の動態については、抗 HMGB-1 抗体を用いた免疫組織化学的解析による分析を行った。また、タンパク質レベルでの変化を観察するべく脾臓溶解液を western blotting に供した。

さらに、脳虚血モデルマウスへのミノサイクリン投与による脾臓の HMGB-1 陽性細胞の動態変化について検討を行った。

1. 脳虚血モデルマウス

5 週齢雄性マウス (C57/BL6 JJcl, 日本クレア, 東京, n=57) を、12 時間の明暗サイクルの環境下、恒温室 (23°C) で飼育し、搬入後 1 週間順化させた。4% イソフルラン (ファイザー, 東京) 吸入による麻酔導入後、0.15 mg/kg 塩酸メドミジン (明治製薬ファルマ, 東京), 2 mg/kg ミダゾラム (サンド, 東京), 2.5 mg/kg 酒石酸ブトルファンール (明治製薬ファルマ) を 3 種混合麻酔薬として腹腔内注射し全身麻酔を施した。頸部剃毛後、メスにより正中部を約 1.5 cm 切開して右側総頸動脈を剖出し、4-0 ナイロン糸を用いて結紮した。60 分後結紮を解除し、創部を縫合しポピドンヨードを用いて消毒を行い、麻酔からの覚醒を確認したのち飼養施設に戻した。同様に麻酔下にて切開を行い、60 分間開創状態を維持した後、創部を縫合および消毒を行ったものをコントロールとした。

さらに、ミクログリアの活性抑制薬である¹⁰⁾ミノサイクリン (MilliporeSigma, St. Louis, MO, USA) による作用の検討は、50 mg/kg の容量¹³⁾にて麻酔導入前にミノサイクリンを腹腔内注射して行った。

本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認 (AP17 D013, AP17 D026) を受け、国際疼痛学会のガイドライン¹⁴⁾に従って行った。

2. 免疫組織化学的解析

モデルマウスは、術後 1, 3, 5 および 7 日後に、全身

麻酔下で開胸し、経心的に生理食塩水の灌流により脱血し、安楽死させた。その後、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。灌流固定後、脾臓を摘出し、同様の固定液で室温にて2日間の後固定を行い、大きさを比較検討した。その後、通法に従って厚さ2 μ mの切片を作製した。作製された切片は、0.3% H₂O₂含有メタノールにより内因性ペルオキシダーゼ活性の不活化を行い、次にProteinase K(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)にて抗原賦活化を行った。さらに1%ウシ血清アルブミン加リン酸緩衝液(BSA-PBS)に1時間浸漬することで、非特異的反応のブロッキングを行った。その後、一次抗体としてウサギ抗マウス HMGB-1 抗体(1:100 1% BSA-PBS 希釈, Abcam, Cambridge, UK)により4 $^{\circ}$ Cにて24時間反応させた後、切片をphosphate buffered saline(PBS)により洗浄し、二次抗体としてhorse radish peroxidase(HRP)標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(1:1 希釈, Agilent Technologies)を4 $^{\circ}$ Cにて1時間反応させ、さらにPBSにて洗浄した後、3,3'-diaminobenzidine(DAB, MilliporeSigma)溶液で15分間反応させ発色を行った。なお、核染色はマイヤーヘマトキシリン(富士フィルム和光純薬, 大阪)を用いて行った。組織像の観察は、切片を封入後、オールインワン顕微鏡(BZ X-810, キーエンス, 大阪)により行った。赤脾髄上で無作為に7視野(1視野=170 μ m \times 230 μ m)を選択し、1視野中でDABにて標識された細胞数の平均をHMGB-1陽性細胞数とした。

3. Western blotting

未固定のまま摘出した脾臓を細胞溶解液(1% Triton X, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7.6)に浸漬し、手術用はさみにより細切した後、ホモゲナイザーによりさらに細胞破碎処理を行った。つぎに、サンプルを14,000 \times g, 2分間遠心分離し、得られた上清のタンパク質濃度をprotein assay kit(Bio-Rad, Barkley, CA, USA)を用いてマイクロプレート吸光分光光度計(Bio-Rad)により定量した。さらに、定量されたサンプル1 μ gをSDS sample bufferと混和し、95 $^{\circ}$ Cにて3分間反応させた後、10%ポリアクリルアミドゲルを使用して電気泳動した。泳動後ナイロン膜に転写し、1% BSA-PBSにより非特異的反応のブロッキングを行った。一次抗体としてウサギ抗マウス HMGB-1 抗体(1:500 1% BSA-PBS 希釈, Abcam)を4 $^{\circ}$ Cにて24時間反応させた後、二次抗体としてHRP標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(1:5,000 1% BSA-PBS 希釈, Jackson ImmunoResearch, Philadelphia, PA, USA)を用いて4 $^{\circ}$ Cにて2時間反応させ、ECL kit(Bio-Rad)を使用して発光させて、HMGB-1のタンパク質レベルの変化を検出した。画像の取り込みにはイメージングシステム(Bio-Rad)を用い、取り込んだイメージはImage Jにて解析した。

4. 統計学的解析

免疫組織化学的解析およびwestern blottingにより得られた結果について、統計学的解析を行った。統計学的解析では、IBM SPSS Statistics 20 software(International Business Machines, Armonk, NY, USA)を使用し、初めにShapiro-Wilk testにて各群のデータの正規性を検討した。正規性を示すものについては、それぞれ一元配置分散分析を行った後、Dunnett's test, あるいはStudent's *t*-testを実施した。結果は平均値 \pm 標準偏差で示し、いずれにおいても $\alpha=0.05$ を有意水準とした。

成 績

脾臓の大きさの観察と脾臓における HMGB-1 陽性細胞の発現

マウス右側総頸動脈の結紮による脾臓の肉眼的変化について観察した。その結果、脳虚血群では脾臓の縮小が確認された(図1)。脳虚血後の脾臓における HMGB-1 陽性細胞の発現について免疫組織化学的解析を行った結果、褐色に染色した HMGB-1 陽性細胞が認められた(図2)。また、術後7日目まで HMGB-1 陽性細胞数の経日的な増加が確認された。HMGB-1 陽性細胞の発現は、主に赤脾髄において強く認められ、濾胞内または傍濾胞領域における HMGB-1 陽性細胞はわずかであった。赤脾髄に発現する HMGB-1 陽性細胞数は、コントロール群に対し、術後1, 3, 5, および7日目で有意に増加した(コントロール群: 10.1 \pm 1.5; 術後1日目: 28.0 \pm 2.6; 術後3日目: 31.6 \pm 2.6; 術後5日目: 35.1 \pm 4.1; 術後7日目: 40.9 \pm 3.3)(図3)。

脾臓における HMGB-1 量の定量

コントロールおよび術後7日目の脾臓における



図1 右側総頸動脈結紮後7日目の脾臓
(図中スケールバー: 2mm)

HMGB-1 タンパク質の発現レベルの変化を western blotting により確認した。その結果、コントロールおよび脳虚血群の双方で、30 kDa の位置に single band として HMGB-1 のバンドが検出された(図 4 a)。GAPDH のバンドの intensity に対する HMGB-1 バンドの intensity を比較したところ、HMGB-1 量は脳虚血群で顕著に増加した(コントロール群：29.5 ± 4.7, 脳虚血群：86.4 ± 6.4) (図 4 b)。

HMGB-1 発現に対するミノサイクリンの効果

ミクログリアの活性抑制薬であるミノサイクリンの腹腔内投与による脳虚血に伴って脾臓に発現する HMGB-1 陽性細胞数の変化について検討した。HMGB-1 陽性細胞数は、術後 5 日目において有意に減少した(非投与群：35.1 ± 1.5, ミノサイクリン投与群：9.8 ± 3.4) (図 5)。

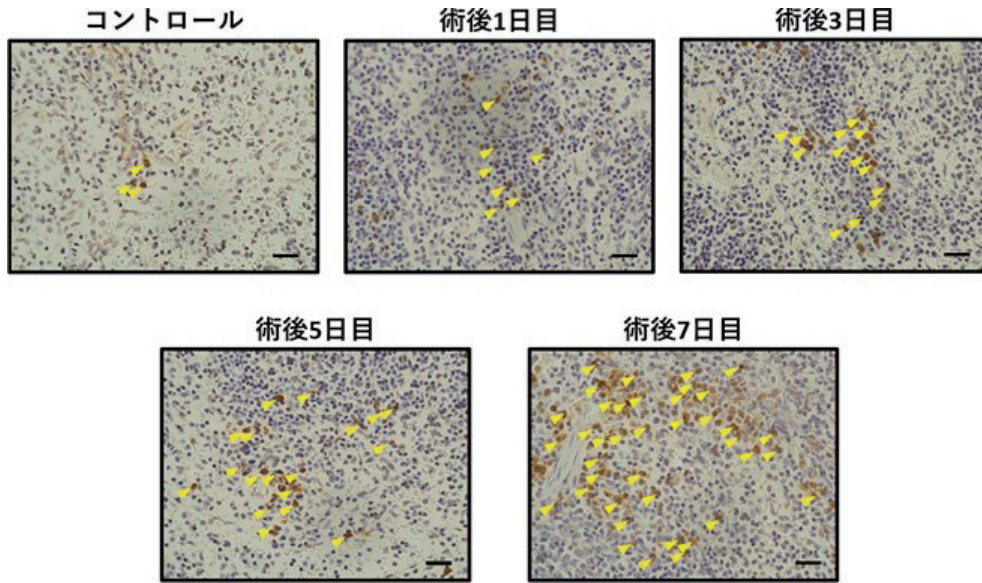


図 2 右側総頸動脈結紮後の脾臓における HMGB-1 陽性細胞 矢印に HMGB-1 陽性細胞を示す。(図中スケールバー：20 μm)

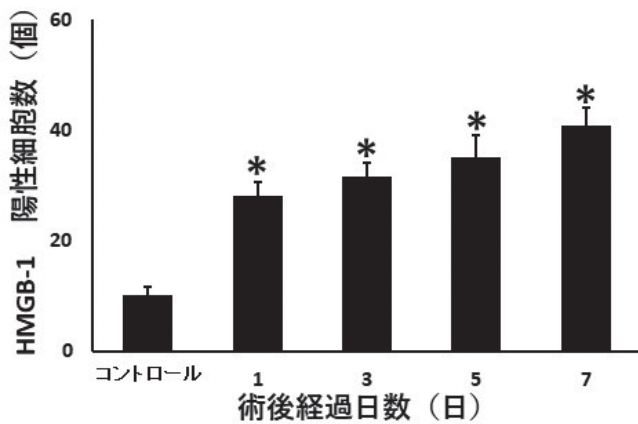


図 3 右側総頸動脈結紮後の脾臓における HMGB-1 陽性細胞数の変化 (各 n=7, * : p < 0.05 vs コントロール群)

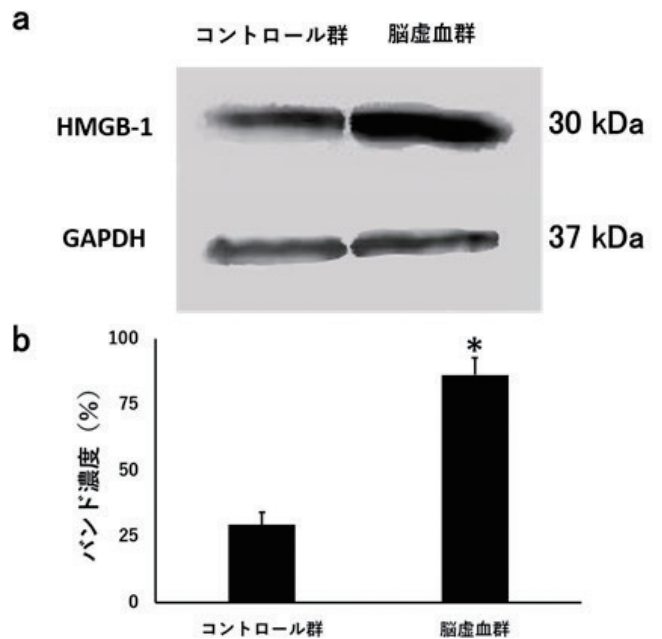


図 4 western blotting による脾臓における HMGB-1 量 (各 n=4, * : p < 0.05 vs コントロール群)

考 察

脳虚血に際して脾臓の容積が減少することは、これまで多くの研究で報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。しかし、減少する細胞の種類やポピュレーションについてはいまだ結論が得られていない。脳梗塞巣においては、血液脳関門の破壊と^{18,19)}、これに伴った炎症性細胞の脳実質内への浸潤が知られている²⁰⁾。この脳実質内に集簇する細胞は、脾臓などの末梢リンパ組織に由来し²¹⁾、脾臓からの免疫細胞の遊走阻止が脳梗塞の病態改善に貢献すると考えられている²¹⁾。Liuらは、脳梗塞に先立ってあらかじめ脾臓を摘出し、脳における炎症を軽減させることにより、梗塞巣の予後が改善することを報告した²²⁾。一方で、摘脾が予後の改善に貢献しなかったとの報告もあり²³⁾、いまだ議論がなされている。本研究で観察された脳虚血における脾臓の縮小は、赤血球の減少と、脾臓における濾胞構造の拡大による結果とも考えられるため、今後詳細な検討が望まれる。

脳虚血において DAMPs の一種である HMGB-1 が末梢血中で増加することはすでに報告されており^{5,7)}、これは脳の壊死細胞から放出された HMGB-1 が、末梢に移行することによるものとされている²⁴⁾。また、これにより梗塞巣の範囲やミクログリアの活性が調節されていると考えられている^{24,25)}。一方、アポトーシスによる細胞死では HMGB-1 の細胞外放出は起こらないとされることから⁶⁾、本研究で行ったマウスの片側総頸動脈結紮によっても、脳細胞の一部が壊死を起こした可能性が考えられる。植木はラットによる同様の実験で、脾臓において増加した HMGB-1 陽性細胞は、脾臓に存在するマクロファージが末梢血中で増加した HMGB-1 を細胞内に取り込んだ結果と考察している⁷⁾。本研究の結果では、この可能性を確認するには至らなかったが、ミクログリアの活性阻害薬として働くミノサイクリンの腹腔内投与が、

発現する細胞の数を減少させることを明らかとした。これは、脳ミクログリア活性と脾臓に発現する HMGB-1 陽性細胞数との間に相関があることを示すものであり、極めて興味深い。さらに、脾臓で増加した HMGB-1 陽性細胞の起源はどこなのかという根源的な疑問も残る。これに関し、脳梗塞においてマクロファージが脳実質に血液脳関門を通過して集簇するのであれば、逆に脳内のミクログリアが末梢に遊走する可能性を否定できない。近年、ミクログリア細胞にケモカイン CX₃CR₁ が特異的に発現する²⁶⁾ことを根拠として、この分子中のプロモーター下に蛍光色素の遺伝子を連結し、ミクログリアを特異的に標識する方法が考案された²⁷⁾。本研究においても、このような手法を応用することにより、蛍光標識したミクログリアを脳実質内に注入し、その動向を観察することが可能であり、その研究価値は高いと考える。

一方、末梢血中の HMGB-1 濃度上昇がおよぼす効果に関しては、いまだ不明な点が多い。HMGB-1 に対するレセプターには toll like receptor (TLR)4 や receptor for advanced glycation end products などがあり²⁸⁾、脳外傷では TLR4 を介して脳水腫を誘発すると報告されている²⁹⁾。DAMPs の本来の機能は、細胞の壊死など危機的な状況に際して、周囲の組織・細胞にこの状況を周知させることであり、すなわち炎症を惹起させることにある。炎症は組織の修復にとり必須の生体反応であり⁷⁾、その欠如は生命体にとってさらに危機的な状況を招来することとなる。その意味では、血中に放出された HMGB-1 が全身各臓器に炎症を惹起する可能性は否定できない。

近年、視床下部-下垂体-副腎経路を介したカテコールアミンの活性化が脾臓の萎縮を誘発すること¹⁶⁾、また、視床下部において産生される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンが脾臓における形質細胞の産生に影響することなど²⁸⁾、脳と脾臓の機能的連関を示唆する報告が相次いでおり、本研究で確認された脳虚血に際して脾臓で HMGB-1 陽性細胞数が増加するという現象はこのことを支持する結果であった。

さらに、脳虚血に際して脾臓で増加し、ミノサイクリン投与によって増加が抑制される HMGB-1 陽性細胞のキャラクタライゼーションは、脳虚血の病態把握のためにも極めて意義深いと考える。しかし、本研究では、マウスの脾臓における HMGB-1 陽性細胞の動態を、*in vivo* にてミノサイクリン投与により検討するに留まった。ミノサイクリン以外にもミクログリアに作用する薬物は複数存在しており、今後は、様々な遺伝子変異モデルマウスを使用し、加齢や疾病、各種効果が見込まれる薬物との関係性や、前述したミクログリア培養細胞株を応用した詳細な検討が必要と考える。

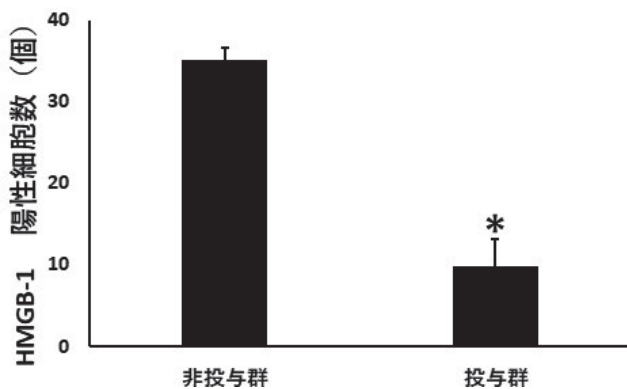


図5 術後5日目のミノサイクリン投与による HMGB-1 陽性細胞数の変化

(各 n=6, * : p<0.05 vs 非投与群)

結 論

本研究では、マウスを用いて、右側総頸動脈を結紮することにより生じた脳虚血と脾臓との関連を、HMGB-1に着目し検討した。その結果、以下の結論を得た。

- 1 片側総頸動脈を結紮することにより、脾臓の容積は縮小した。
- 2 片側総頸動脈を結紮することにより生じた脳虚血に伴い、脾臓で赤脾髄に集中してHMGB-1陽性細胞数は有意な増加を認めた。また、western blottingにより、脾臓においてHMGB-1タンパク量が増加することが確認された。
- 3 脳虚血状態に伴う脾臓におけるHMGB-1陽性細胞数の増加は、ミクログリアの活性阻害薬であるミノサイクリンの投与によりその増加が抑制された。

稿を終えるにあたり、ご指導およびご校閲賜りました日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座飯沼利光教授、日本大学歯学部病理学講座浅野正岳教授に謹んで深く感謝申し上げます。また、本研究を通じ、多大なるご協力を賜りました日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座西尾健介助教を始め、日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座および病理学講座の皆様へ感謝申し上げます。

なお、本論文に関して開示すべき COI 関係はありません。

文 献

- 1) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
- 2) Zindel J, Kubes P (2020) DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation. *Annu Rev Pathol* 15, 493-518.
- 3) Venereau E, De Leo F, Mezzapelle R, Careccia G, Musco G, Bianchi ME (2016) HMGB1 as biomarker and drug target. *Pharmacol Res* 111, 534-544.
- 4) Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285, 248-251.
- 5) Matthew GF, Michael DW, Linda RW, Steven FM (2015) Stress sounds the alarmin: the role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun* 48, 1-7.
- 6) Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
- 7) 植木皓介 (2019) 脳虚血モデルラットにおける全身諸臓器の高 mobility group box protein 1 発現の変化. *日大歯学* 93, 19-23.
- 8) Takenouchi T, Ogiwara K, Sato M, Kitani H (2005) Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca²⁺ influx and pore formation induced by the activation of P2 X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line. *Biochim Biophys Acta* 1726, 177-186.
- 9) Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I (2006) Suppressive effect of simvastatin on interferon-beta-induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neurosci Lett* 407, 205-210.
- 10) Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Gálvez J (2013) Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol* 169, 337-352.
- 11) Sato K, Tobo A, Mogi C, Tobo M, Yamane N, Tosaka M, Tomura H, Im DS, Okajima F (2020) The protective role of proton-sensing TDAG8 in the brain injury in mouse ischemia reperfusion model. *Sci Rep* 10, 17193.
- 12) Bassett B, Subramaniam S, Fan Y, Varney S, Pan H, Carneiro AMD, Chung CY (2021) Minocycline alleviates depression-like symptoms by rescuing decrease in neurogenesis in dorsal hippocampus via blocking microglia activation/phagocytosis. *Brain Behav Immun* 91, 519-530.
- 13) Mostafaezur RM, Zakir HM, Yamada Y, Yamamura K, Iwata K, Sessle BJ, Kitagawa J (2012) The effect of minocycline on the masticatory movements following the inferior alveolar nerve transection in freely moving rats. *Mol Pain*, doi: 10.1186/1744-8069-8-27.
- 14) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 15) Gendron A, Teitelbaum J, Cossette C, Nuara S, Dumont M, Geadah D, du Souich P, Kouassi E (2002) Temporal effects of left versus right middle cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats. *Brain Res* 955, 85-97.
- 16) Seifert HA, Hall AA, Chapman CB, Collier LA, Willing AE, Pennypacker KR (2012) A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into systemic circulation. *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 1017-1024.
- 17) Ostrowski RP, Schulte RW, Nie Y, Ling T, Lee T, Manaenko A, Gridley DS, Zhang JH (2012) Acute splenic irradiation reduces brain injury in the rat focal ischemic stroke model. *Transl Stroke Res* 3, 473-481.
- 18) Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA (2007) Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 697-709.
- 19) Liu Q, Jin WN, Liu Y, Shi K, Sun H, Zhang F, Zhang C, Gonzales RJ, Sheth KN, La Cava A, Shi FD (2017) Brain ischemia suppresses immunity in the periphery and brain via different neurogenic innervations. *Immunity* 46, 474-487.
- 20) Piao MS, Lee JK, Park CS, Ryu HS, Kim SH, Kim HS (2009) Early activation of matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier disruption after photothrombotic cerebral ischemia in rats. *Acta Neurochir (Wien)* 151, 1649-1653.
- 21) Planas AM (2018) Role of immune cells migrating to the ischemic brain. *Stroke* 49, 2261-2267.
- 22) Liu ZJ, Chen C, Li FW, Shen JM, Yang YY, Leak RK, Ji

- XM, Du HS, Hu XM (2015) Splenic responses in ischemic stroke: new insights into stroke pathology. *CNS Neurosci Ther* 21, 320-326.
- 23) Ran Y, Liu Z, Huang S, Shen J, Li F, Zhang W, Chen C, Geng X, Ji Z, Du H, Hu X (2018) Splenectomy fails to provide long-term protection against ischemic stroke. *Aging Dis* 9, 467-479.
- 24) Kim JB, Choi JS, Yu YM, Nam K, Piao CS, Kim SW, Lee MH, Han PL, Park JS, Lee JK (2006) HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J Neurosci* 26, 6413-6421.
- 25) Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M (2007) Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* 21, 3904-3916.
- 26) Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreuzberg GW, Sher A, Littman DR (2000) Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20, 4106-4114.
- 27) Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 308, 1314-1318.
- 28) Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ (2010) HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 28, 367-388.
- 29) Laird MD, Shields JS, Sukumari-Ramesh S, Kimbler DE, Fessler RD, Shakir B, Youssef P, Yanasak N, Vender JR, Dhandapani KM (2014) High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. *Glia* 62, 26-38.
- 30) Zhang X, Lei B, Yuan Y, Zhang L, Hu L, Jin S, Kang B, Liao X, Sun W, Xu F, Zhong Y, Hu J, Qi H (2020) Brain control of humoral immune responses amenable to behavioural modulation. *Nature* 581, 204-208.