

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07211

研究課題名(和文)代謝制御とがん組織微小環境を結ぶネットワーク機構の解明

研究課題名(英文)Metabolic regulation and the remodeling tissue microenvironment

研究代表者

岡田 斉 (Okada, Hitoshi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20280620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質恒常性維持機構の破綻は、神経変性疾患、代謝性疾患、リソソーム病、がん、老化など、様々な疾患を引き起こす。本研究計画では、代謝制御に焦点を当て、独自に作成した肝特異的 Bat3欠損マウスモデルを用いて、個体レベルでのBAT3機能の解析を行った。BAT3の機能異常がPI3K/Aktシグナルの活性化、小胞体ストレス、代謝ストレス、炎症反応を促進することで肝機能障害を誘導することを見出した。肝細胞においてはタンパク質恒常性維持ネットワークの破綻が代謝異常の誘因・増悪因子となることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生活習慣病に強く関連する非アルコール性脂肪肝炎が原因とされる慢性肝炎、肝硬変、肝がん症例が世界的に増加傾向にある。しかしながら、代謝ストレスにより惹起される肝障害、肝硬変、肝がんの個体レベルでの発症の詳細は不明な点も多い。我々の研究結果は、我々が独自に作成したマウスモデルが代謝ストレスにより引き起こされる肝炎、肝硬変、自然発症肝がんの病態を理解するための有用なモデルとなり得ること示唆している。従って、これらのモデルを用いて代謝性肝障害に関与するシグナル経路の詳細を検討することはその治療法、予防法を開発する上で社会的にも大変に意義深い。

研究成果の概要(英文)：Disruption of the proteostasis network leads to a variety of human diseases including neurodegenerative disorders, metabolic diseases, lysosome diseases, cancer and aging. In this project, we investigated Bat3 functions in vivo using original liver-specific Bat3 deficient mice with special emphasis on metabolic regulation. Histological, biochemical and molecular biological analyses showed that Bat3 deficiency in the liver resulted in liver damages and enhanced ER stress, metabolic stress and inflammation signature. These data suggest that Bat3 deficiency induced dysregulated proteostasis and metabolic stress, which exacerbate liver damage in vivo.

研究分野：腫瘍生物学、病態医科学、医科学

キーワード：組織微小環境 がん 代謝制御 エピジェネティクス マウスモデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が機能的タンパク質を維持することは細胞、組織、個体を維持するために必須である。タンパク質の恒常性は細胞内における複数のシャペロンやタンパク質分解機構の複雑なネットワークによって維持されている (Trends Endocrinol. Metab. 2012)。タンパク質恒常性維持機構の破綻は、神経変性疾患、代謝性疾患、リソソーム病、がん、老化など、様々な疾患を引き起こす。

組織微小環境は、がん、生活習慣病をはじめとするヒト疾患の発症・進展・治療反応性に重要である。近年、タンパク質恒常性維持ネットワークが代謝制御、炎症・免疫応答、小胞体ストレス応答シグナル経路と相互作用し、組織微小環境の構築と維持に寄与することが報告されている (Annu Rev Biochem. 2017)。分子シャペロンはタンパク質恒常性維持ネットワークの主要な構成要素であり、新生ポリペプチド鎖のフォールディングだけでなく、タンパク質のメンテナンス・活性制御・分解など、広範な細胞機能の制御に関与している。

BAT3 は、human major histocompatibility complex (MHC) 領域の網羅的シーケンスの過程で、ヒト染色体 6 番の MHC class 領域に存在する BAT1-BAT5 と命名された遺伝子クラスター内に存在する機能不明な遺伝子として同定された (Science 1989; PNAS 1990)。BAT3 の生物学的機能は長い間不明であったが、Kornbluth 博士らにより、BAT3 の分子シャペロンとアポトーシス制御機能を有することが示された (EMBO J. 1999, 2001)。この報告に続き、BAT3 がプロテオソーム機能、分子シャペロン、免疫応答に関与するという一連の報告が我々と他のグループからなされた。これらの知見は、BAT3 が生体内でのタンパク質恒常性維持ネットワークの制御に重要な役割を果たしている可能性を強く示唆している。実際、BAT3 変異は複数のがんあるいは炎症性疾患でリスクファクターとなる可能性が報告されている。しかしながら、タンパク質恒常性維持ネットワークの制御に関わる遺伝子の個体レベルでの機能は不明な点も多い。本研究ではシャペロン機能を有する BAT3/BAG6 の個体レベルでの機能解析に焦点を当て、BAT3 の機能異常が個体レベルでの病態制御にどのような影響を与えるかを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究計画では、代謝制御に焦点を当て、個体レベルでの BAT3 機能の解析を行う。研究には独自に作成した肝特異的 Bat3K0 マウスを用いる。肝細胞においてはタンパク質恒常性維持ネットワークの破綻が代謝異常の誘因・増悪因子となることを念頭に置き、代謝制御と組織微小環境制御に関わる分子群の全体像と機能を明らかにする。

(1) BAT3 の糖、脂質代謝における役割の解明

肝特異的 Bat3K0 マウスに高脂肪食を摂餌し、継続的に血清脂質、耐糖能、肝機能をモニターすることにより、代謝ストレス下の Bat3 の機能を明らかにする。

(2) BAT3 のインスリンシグナル、小胞体ストレス応答における役割の解明

小胞体ストレス応答が糖・脂質代謝を含む代謝制御に関わることが報告されている。BAT3 の代謝ストレス制御、インスリンシグナル経路、小胞体ストレス応答における機能を明らかにする。

(3) BAT3 の肝がん発症における役割の解明

BAT3 変異はヒト大腸がん、肺がんのリスクファクターとなることが報告されている。また、代謝異常により引き起こされる慢性炎症は肝がんの誘因となることが知られている。そこで、肝特異的 BAT3 欠損が肝がん発症・進展に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

独自に作成した組織特異的 Bat3K0 マウスを肝特異的に Cre を発現する Albumin promoter-Cre トランスジェニックマウスを交配し、肝特異的 Bat3K0 マウス (Bat3LK0: Bat3^{fllox/fllox}; Albumin-Cre) を樹立する。作成したモデルマウスを用いて肝特異的 BAT3 欠損が代謝異常、小胞体ストレス、炎症に及ぼす影響を検討する。マウスでは遺伝的背景が肥満・代謝異常の発症に影響を与える事が報告されているため、本実験には C57BL/6J に 10 世代以上戻し交配済みのマウスを用いる。

(1) BAT3 の糖、脂質代謝における役割の解明

6 週令の Bat3LK0、対照マウスを正常食、高グルコース食、高脂肪食で摂餌し、継続的な体重、随時血糖測定を行い、肥満と耐糖能異常の有無を比較する。また、インスリン負荷試験とブドウ糖負荷試験を行い、BAT3 欠損が糖代謝異常の発症に与える影響を調べる。同時に、各マウスの

肝機能、脂質代謝検査を含めた血清の生化学的解析を行い、肝細胞障害の有無、代謝異常の有無を調べる。さらに、肝臓組織の病理組織学的及び生化学的解析を行い、各群における脂肪肝、炎症反応、構造上の異常の有無や程度を比較する。BAT3 の欠損が代謝全般に及ぼす影響を探索するとともに、特にグリコーゲン代謝異常に着目した解析を行う。

(2) BAT3 のインスリンシグナル、タンパク質恒常性機能における役割の解明

普通食、高グルコース食、あるいは高脂肪食で摂餌した Bat3LKO、野生型マウスの肝臓からサンプルを調製し、小胞体ストレスのマーカーである PERK、IRE-1 のリン酸化および、一般的なストレスマーカーである JNK 活性を調べる。前述(1)の実験においてインスリンに対する反応性に異常を認める場合には、Bat3LKO、対照マウス由来の初代培養肝細胞をインスリン刺激し、IRS-1、IRS-2、Akt の活性化を生化学的に比較検討する。

上記実験から得られる BAT3LKO、野生型マウスの肝臓における遺伝子発現解析を進展させる目的で RNA シーケンスを用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。BAT3LKO で特異的に影響を受ける遺伝子群を同定し、GSEA 解析などのパスウェイ解析を行う。これらの解析結果に基づき、遺伝子発現に差が見られた遺伝子の強制発現あるいはノックダウンを行い、機能的意義を調べる。阻害剤が入手可能なものについては阻害剤を使用する。この際、まず、マウス肝初代培養細胞を用いるが、その実験系が十分に機能しない場合にはヒトあるいはマウス肝がん細胞株を使用する。

これらの解析から得られる代謝ストレス、肝細胞障害、遺伝子発現の変化に関するデータは、(1) および (3) の表現型解析の分子基盤となる。

(3) BAT3 の肝がん発症における役割の解明

BAT3 変異はヒト大腸がん、肺がんのリスクファクターとなることが報告されているが、その発癌機構の詳細は不明である。本研究では、BAT3 欠損と高脂肪食により引き起こされる慢性炎症が肝がん発症および肝細胞障害の増悪に与える影響を調べる。Bat3LKO マウスの自然発症による肝がん発症を経時的な小動物 CT、生化学検査等によりモニターする。肝がん発症時、病理学的、生化学的、分子生物学的手法により腫瘍の解析を行う。

肝がん発症前の Bat3LKO および野生型マウスの遺伝子発現解析により得られるデータを用いて Bat3 が制御する遺伝子・分子群を絞り込み Bat3 シグナル経路の詳細を明らかにする。さらに、肝がんモデルを用いて Bat3 欠損が肝がん発症・進展におよぼす影響を調べる。

Bat3LKO マウスの肝がん発症をモニターすが、BAT3 欠損と代謝ストレスだけでは肝がん発症に至らない場合も想定される。その場合は、ヒト肝がん認められる Kras 変異により誘導される肝がんモデルを用いて、Bat3 欠損が発がん、がんの進展に及ぼす影響を明らかにする。Kras 変異単独では肝がんを発症する頻度は低い、他のがん遺伝子の活性化、がん抑制遺伝子の不活化、あるいはタンパク質恒常性維持ネットワークの異常に起因する微小環境の変化により肝がん発症が促進されることが報告されている(Karnoub AE et al., 2008)。また、バックアップとして四塩化炭素投与により誘導される肝がんモデルも使用する。

4. 研究成果

(1) BAT3 の糖、脂質代謝における役割の解明

6週令の Bat3LKO、対照マウスを正常食、高グルコース食摂餌し、肝臓組織の病理組織学的及び生化学的解析を行い、比較した。肝特異的 Bat3KO マウスに高グルコース食を摂餌すると、野生型では絶食により肝内グリコーゲンがエネルギー産生に消費され、グリコーゲンをほとんど認めなかった。しかしながら、大変興味深いことに肝特異的 Bat3KO マウスでは絶食後も肝臓内にグリコーゲンが貯留していた。このことは Bat3 欠損が肝細胞におけるグリコーゲン合成あるいは分解制御に関わる可能性を強く示唆している。

(2) BAT3 のインスリンシグナル、小胞体ストレス応答における役割の解明

Bat3 のインスリンシグナル経路における役割を調べる目的でコンベンショナル Bat3KO マウス胎児から線維芽細胞 MEF を作成した。MEF をインスリン処理し、Akt のリン酸化を指標として解析を行ったところ、Bat3 欠損 MEF では、Akt のリン酸化が亢進していた。従って、Bat3 はインスリンシグナルに抑制的に働くことが示唆された。

(3) 肝臓における遺伝子発現解析

正常食を摂餌した野生型および Bat3LKO マウスの肝臓から RNA を抽出し RNA シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行った。シーケンスにより得られたデータを用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析を行い、Bat3 欠損により活性化あるいは抑制されるパスウェイを解析したところ、Bat3LKO マウスの肝臓では小胞体ストレス応答シグナルの活性化、インスリンシグナル経路の活性化、糖質・脂質代謝の変化を認めた。これらの結果は、(2) の生化学的

解析結果と併せ、BAT3 が細胞および個体レベルにおいて、PI3K/Akt シグナルの抑制因子として機能し、BAT3 欠損が小胞体・代謝ストレス制御に関わることを示唆している。

(4) BAT3 の肝がん発症における役割の解明

BAT3 変異はヒト大腸がん、肺がんのリスクファクターとなることが報告されている。また、ヒト肝がんの遺伝子変異データベースを独自に解析し、約 5 % の症例が BAT3 遺伝子の変異を有することを見出した。独自に樹立した組織特異的 Bat3 欠損マウスモデルを長期飼育したところ、野生型と比較して早期に死亡することが確認された。また、肝がんの自然発症を認める個体を確認した。この結果は組織特異的 Bat3 欠損マウスが、Bat3 の個体レベルでのがん抑制効果を明らかにするモデルとなることを示唆している。

近年、生活習慣病に強く関連する非アルコール性脂肪肝炎が原因とされる肝がん症例が世界的に増加傾向にある。したがって、新たなマウスモデルを用いて代謝性肝障害に関与するシグナル経路の詳細を検討することは社会的にも大変に意義深いと結論された。

(5) 免疫応答における BAT3 の役割の検討

以前の国際共同研究により BAT3 が Tim-3 のアダプタータンパクとして機能することを報告してきたが、その研究内容を発展させ、BAT3 が T 細胞疲弊を制御する新たな機序を見出し報告した。我々が樹立した T 細胞特異的 Bat3 欠損マウスを用いた解析から、Bat3 欠損により T 細胞疲弊が増強されることを示した。機序としては Bat3 が TORC2 を抑制することで Akt 活性を抑制することを発見した。Bat3 欠損マウスでは Akt の活性化と FoxO1 のリン酸化が増強し、Prdm1 の発現を上昇させた。網羅的遺伝子発現解析により Bat3 欠損 T 細胞は T 細胞のエフェクターとして機能するために必要な遺伝子群の発現低下を認めた。これらの結果は、T 細胞における Bat3 欠損が、炎症反応下あるいは自己免疫疾患の状態においても、T 細胞の機能異常を引き起こす可能性を強く示唆している。従って、Bat3 の T 細胞制御における重要性を示す新たな知見と言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ota Kazushige, Komuro Akiyoshi, Amano Hisayuki, Kanai Akinori, Ge Kai, Ueda Takeshi, Okada Hitoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 High Fat Diet Triggers a Reduction in Body Fat Mass in Female Mice Deficient for Utx demethylase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46445-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hitachi Keisuke, Inagaki Hidehito, Kurahashi Hiroki, Okada Hitoshi, Tsuchida Kunihiro, Honda Masahiko	4. 巻 1
2. 論文標題 Deficiency of Vgl12 Gene Alters the Gene Expression Profiling of Skeletal Muscle Subjected to Mechanical Overload	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Sports and Active Living	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fspor.2019.00041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Amano Hisayuki, Sahin Ergun	4. 巻 6
2. 論文標題 Telomeres and sirtuins: at the end we meet again	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 e1632613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/23723556.2019.1632613	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kang Changkeun, Saso Kayoko, Ota Kazushige, Kawazu Masahito, Ueda Takeshi, Okada Hitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 JMJD2B/KDM4B inactivation in adipose tissues accelerates obesity and systemic metabolic abnormalities	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 767 ~ 777
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 岡尚宏, 天野恭志, 古室暁義, 太田一成, 上田健, 西村俊司, 岡田斉, 赤木将男	4. 巻 92
2. 論文標題 骨肉腫におけるシスプラチンと抗酸化物質によるROS産生を介した抗腫瘍効果の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 2039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhu Chen, Dixon Karen O., Newcomer Kathleen, Gu Guangxiang, Xiao Sheng, Zaghouni Sarah, Schramm Markus A., Wang Chao, Zhang Huiyuan, Goto Kouichiro, Christian Elena, Rangachari Manu, Rosenblatt-Rosen Orit, Okada Hitoshi, Mak Tak, Singer Meromit, Regev Aviv, Kuchroo Vijay	4. 巻 7
2. 論文標題 Tim-3 adaptor protein Bat3 is a molecular checkpoint of T cell terminal differentiation and exhaustion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd2710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Oka Naohiro, Komuro Akiyoshi, Amano Hisayuki, Dash Suman, Honda Masahiko, Ota Kazushige, Nishimura Shunji, Ueda Takeshi, Akagi Masao, Okada Hitoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Glaser Simone F., Heum?ller Andreas W., Tombor Lukas, Hofmann Patrick, Muhly-Reinholz Marion, Fischer Ariane, G?nther Stefan, Kokot Karoline E., Okada Hitoshi, Hassel David, Kumar Sandeep, Jo Hanjoong, Boon Reinier A., Abplanalp Wesley, John David, Boeckel Jes-Niels, Dimmeler Stefanie	4. 巻 117
2. 論文標題 The histone demethylase JMJD2B regulates endothelial-to-mesenchymal transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 4180~4187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1913481117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田健
2. 発表標題 急性骨髄性白血病におけるエピゲノム調節因子の役割
3. 学会等名 第23回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古室暁義
2. 発表標題 乳がん悪性化におけるヒストン脱メチル化酵素の役割
3. 学会等名 第23回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野恭志
2. 発表標題 Sirt1-NAD+経路による炎症性腸疾患関連大腸がんの抑制機構の解明
3. 学会等名 第23回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野恭志
2. 発表標題 テロメア損傷は、Sirtuin遺伝子群の発現を抑制し、肝繊維化を促進する
3. 学会等名 新学術領域研究「化学コミュニケーションフロンティア」第3回若手シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田健
2. 発表標題 8;21転座急性骨髄性白血病におけるエピゲノム調節因子の役割
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田斉
2. 発表標題 がん化におけるHLA-B-associated transcript3 (Bat3)/Scytheの役割
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野恭志
2. 発表標題 Sirt1-NAD+経路による炎症性腸疾患の抑制機構の解明
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古室暁義
2. 発表標題 Inhibition of histone demethylase KDM6A promotes breast cancer progression
3. 学会等名 第78回 日本癌学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 斉
2. 発表標題 Utx欠損は高脂肪食により誘導される肥満を雌マウス特異的に抑制する
3. 学会等名 第48回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 斉
2. 発表標題 エビジェネティクスから考える環境と肥満
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会総会 シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 健
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素KDM4Bの急性骨髄性白血病における役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古室暁義
2. 発表標題 Effect of inhibition of histone demethylase KDM6A on breast cancer development
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 健
2. 発表標題 急性骨髄性白血病におけるヒストン脱メチル化酵素KDM4Bの役割
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 天野恭志
2. 発表標題 テロメア損傷は、Sirtuin遺伝子群の発現を抑制し、肝線維化を促進する
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古室暁義
2. 発表標題 乳がん悪性化におけるヒストン脱メチル化酵素KDM6Aの役割
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 斉
2. 発表標題 KDM4B/JMJD2B inactivation in adipose tissues accelerates obesity and systemic metabolic abnormalities
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	天野 恭志 (Amano Hisayuki) (20549331)	近畿大学・医学部・助教 (34419)	
研究分担者	古室 暁義 (Komuro Akiyoshi) (50512274)	近畿大学・医学部・助教 (34419)	
研究分担者	上田 健 (Ueda Takeshi) (60585149)	近畿大学・医学部・准教授 (34419)	
研究分担者	太田 一成 (Ota Kazushige) (70589928)	近畿大学・医学部・助教 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------