

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15453

研究課題名(和文) 多発性硬化症におけるPD-1陽性T細胞を用いた進行性病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of progressive pathology using PD-1 positive T cells in multiple sclerosis

研究代表者

千原 典夫 (Chihara, Norio)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70781821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は中枢神経系の自己免疫疾患である。本研究ではMS患者髄液CD8陽性T細胞の共抑制性受容体PD-1陽性の割合が治療効果と相関することを発見した。疾患修飾薬治療によって寛解を得られた患者由来のPD-1陽性CD8陽性T細胞は共培養した他のT細胞分裂を抑制し、その遺伝子発現解析では申請者が腫瘍微小環境や免疫寛容など複数のT細胞機能不全に共通して同定した共抑制性遺伝子プログラム(co-iGP)に含まれる他の共抑制性受容体を発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で解明を進める遺伝子プログラムはそのT細胞制御機能によって慢性持続炎症制御機序の鍵の一つとして汎用性があり、MS領域のみならず、免疫性神経疾患全般ひいては慢性炎症が二次的増悪因子となる生活習慣病や神経変性疾患など、より広い分野への波及効果が期待できる。今後、他のT細胞機能不全状態との共通性や相違性について解析を加え、免疫性神経疾患全般に応用可能な抑制性遺伝子プログラム同定を目指す。

研究成果の概要(英文)：Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system. In advance to this study, the applicant identified and reported a co-inhibitory gene program (co-iGP) commonly found in multiple T cell dysfunctions such as tumor microenvironment and immune tolerance (Chihara N, et al. Nature 2018). Thus, I hypothesized that this co-iGP in T-cells might control inflammatory pathology and prevent neurological impairments of MS patients who had a good clinical course. Indeed, I found that the proportion of a co-inhibitory receptor PD-1 positivity of cerebrospinal fluid CD8 expressing T cells in MS patients correlated with the therapeutic effects. PD-1+CD8+ T-cells from patients who achieved remission by disease modifying treatments suppressed co-cultured other T-cell proliferations, and their gene expression analysis revealed that other co-inhibitory receptors found in co-iGP were expressed.

研究分野：神経免疫学

キーワード：多発性硬化症 PD-1 共抑制性受容体 共抑制性遺伝子プログラム

## 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は中枢神経内に多発性の炎症性病変を生じる疾患で、臨床的には永年にわたって再発と寛解を繰り返すが、徐々に神経変性が進行して車椅子生活を余儀なくされる例も稀ではない。MSは慢性炎症性神経疾患の一つで、T細胞やB細胞の介在する自己免疫性炎症病態が詳細に解析されてきた。一方で長期間疾患修飾薬が奏功する良性MS例があり、例えば interferon  $\beta$  (IFN  $\beta$ ) 治療で効果が得られた例はレスポナーとして10年を超えて安定した経過をとる。進行性MSと良性MSの違いを解明することが肝心だが、経時的な組織変化を観察することは難しく、変化する免疫病態の核心に迫るためには何らかの鑄型モデルが必要である。

腫瘍微小環境などの慢性炎症組織において活性化T細胞は長期にわたって抗原刺激や周囲からの抑制性シグナルを受けることでその恒常性を変化させ‘疲弊; exhaustion’という状態になる。T細胞の疲弊は細胞傷害性や炎症性サイトカインの産生能を低下させ腫瘍の増大を招く。疲弊T細胞はProgrammed Death 1(PD-1)をはじめとした多様な共抑制性受容体を発現し疲弊の程度に寄与している。申請者が疲弊T細胞の表面受容体発現をSingle cell RNA sequenceやMass cytometry (CyTOF)を用いて網羅的に解析したところ、これら抑制性受容体はそれぞれ別の細胞に発現しているわけではなく、同じT細胞に共発現しており、PD-1、T-cell immunoglobulin and mucin domain 3(Tim-3)、Lymphocyte-activation gene 3(Lag3)、T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains(TIGIT)を核としてその相関する発現の程度によってより分化の進んだ疲弊T細胞となっていることが判明した(Chihara N et al., Nature, 2018)。興味深いことに疲弊T細胞の発現遺伝子から抽出した抑制性遺伝子プログラムは慢性ウイルス感染症における機能低下T細胞や免疫寛容状態のT細胞と共通しており、種々の環境におけるT細胞の普遍的な免疫応答に対する抑制性遺伝子群を含んでいる可能性があった。

MS患者ではPD-1やLag3はその遺伝子上のSNPsが進行性の病態と関連するとされる報告や、Tim-3の発現はMS患者で低下しているという報告があり、これら共抑制性受容体を介したT細胞抑制機能の破綻を示唆する。このことから本来、組織からの抑制性シグナルを受けたT細胞は疲弊T細胞様の細胞となるはずだが、MSにおいてはその分化過程が何らかの形で不完全なものとなるため慢性的な炎症が持続し神経障害を引き起こす可能性があるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では代表的な抑制性受容体であるPD-1に注目しMS患者末梢血T細胞上での発現と病勢や治療反応性との関連解明を目的とした。さらに、分離したPD-1陽性T細胞についてトランスクリプトーム解析を行い、腫瘍における疲弊T細胞の抑制性受容体共発現機序との対比によって、MSの進行性病態を調整する新規治療標的となりうる表面受容体やサイトカインの発見を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では以下の方法でMS患者末梢血および髄液のPD-1陽性T細胞機能解析を行った。

- 1) フローサイトメトリーを用いた疾患活動期の血液・髄液中のT細胞解析  
MS患者末梢血および髄液を用いて、PD-1陽性T細胞の病勢や治療反応性との関連を分析し病態制御に関連するT細胞亜分画を抽出する。
- 2) In vitro培養系を用いたPD-1陽性T細胞の機能解析  
T細胞抗原刺激による活性化を行い、PD-1陽性T細胞の細胞生存、分裂に対する抑制性機能及びその機序を明らかにする。
- 3) マイクロアレイを用いたPD-1陽性T細胞の発現変動遺伝子の抽出  
PD-1陽性T細胞に特徴的に発現する遺伝子についてマイクロアレイを用いて抽出し、他のT細胞機能低下状態で発現する遺伝子との共通の遺伝子群を抽出する。

## 4. 研究成果

- 1) PD-1+CD8+T細胞が治療反応性の良好なMSで増加するT細胞亜分画であった。

人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に基づいて神戸大学附属病院内の倫理委員会の許可を得た上で、PD-1発現T細胞の割合を健康人やMS患者の末梢血単核球細胞(PBMC)を用いたフローサイトメトリーで解析したところ健康人と比して無治療MS患者ではCD8+T細胞中のPD-1+T細胞の割合が低下しており、IFN  $\beta$ 治療によって回復していた。CD4+T細胞においても同様の傾向が認められたが有意差は認めなかった。これはMS患者におけるT細胞の制御不全を示唆し、IFN  $\beta$ 治療によるPD-1発現回復は治療効果機序の一端を担っている可能性があると考えた。次に疾患活動期のMS患者髄液でPD-1+T細胞の割合を解析したところ、CD8+T細胞中のPD-1+T細胞が多い患者ではその後の急性期治療の反応性が良く、PD-1+CD8+T細胞が急性期病態においても軽症の経過と関連している可能性を考えた。

- 2) IFN  $\beta$ 治療レスポナー患者由来のPD-1+CD8+T細胞は細胞分裂抑制能を有していた。

次に良性MS患者由来のPD-1+T細胞が病原性CD4+T細胞を抑制する役割を担っているかを解析するために、IFN  $\beta$ 治療レスポナーMS患者の末梢血からセルソーターでソートしたCD4+T細胞

胞と CD8+T 細胞亜分画との共培養を T 細胞受容体刺激下で行ったところ、PD-1+CD8+T 細胞と共培養した CD4+T 細胞の生存や分裂能は PD-1-CD8+T 細胞と共培養したものとは低下していた。また、無治療 MS 由来の T 細胞での解析結果は一貫性を認めなかった。一方で培養上清における T 細胞由来の炎症性サイトカインや抑制性サイトカインについては差がなく細胞間相互作用による PD-1+CD8+T 細胞の細胞分裂抑制能が示唆された。

3) IFN $\beta$  治療レスポナー患者由来の PD-1+CD8+T 細胞では他の T 細胞機能低下状態と共通する抑制性遺伝子群の発現が認められた。

IFN $\beta$  治療によって PD-1+CD8+T 細胞の抑制機能が回復していたことから、IFN $\beta$  治療レスポナー患者由来の PD-1+CD8+T 細胞および PD-1-CD8+T 細胞について Affymetrix 社のマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析をして PD-1+CD8+T 細胞に特徴的に発現する発現変動遺伝子を抽出した。腫瘍組織での疲弊 T 細胞や免疫寛容 T 細胞において共発現する遺伝子を対象に、MS の病態制御に関与する PD-1+CD8+T 細胞の発現遺伝子を抽出した(図 1)。

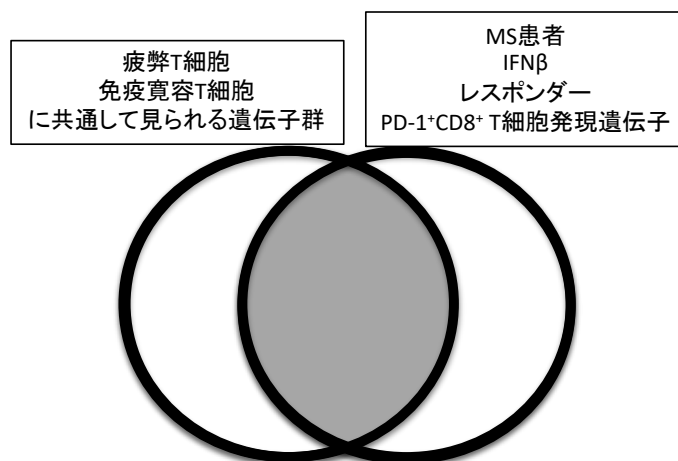


図1. PD-1+CD8+ T細胞に共発現する抑制性遺伝子の検出  
良性経過を示すMS患者(IFN $\beta$  レスポナー)から得られた  
PD-1+CD8+ T細胞での発現遺伝子から複数の免疫抑制環  
境において機能不全に陥っているT細胞に共通して発現する  
遺伝子群に共通するものを抽出した(図の網掛け部分)。

この候補因子は慢性的な T 細胞活性化制御の鍵となっている可能性があり、今後 *in vitro* で  
の初代 T 細胞の細胞培養系に候補受容体リガンドや候補サイトカインまた中和抗体を加えてそ  
の抑制能を実証し、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを用いてそのシグナル伝達の分子生  
物学的解析を行ってゆく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Chihara Norio, Matsumoto Riki, Yamamura Takashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Plasmablasts and neuroimmunological disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 103 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2019.1659476	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 Akatani Ritsu, Chihara Norio, Tachibana Hisatsugu, Koto Shusuke, Kowa Hisatomo, Kanda Fumio, Matsumoto Riki, Toda Tatsushi	4. 巻 35
2. 論文標題 Validation of the Guy's Neurological Disability Scale as a screening tool for cognitive impairment in multiple sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Multiple Sclerosis and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 272 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msard.2019.08.012	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 Akatani Ritsu, Chihara Norio, Katanazaka Kimitaka, Ueda Takehiro, Sekiguchi Kenji, Matsumoto Riki	4. 巻 59
2. 論文標題 Increased disease activity in a case of multiple sclerosis after switching treatment from fingolimod to natalizumab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rinsho Shinkeigaku	6. 最初と最後の頁 536 ~ 540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5692/clinicalneurology-001307	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 Komaki Ryouhei, Chihara Norio, Hara Atsushi, Fujisawa Satoshi, Muramae Naokazu, Nakasone Kazutaka, Ueda Takehiro, Sekiguchi Kenji, Matsumoto Riki	4. 巻 -
2. 論文標題 A case of area postrema syndrome associated with sick sinus syndrome in an elderly patient with neuromyelitis optica spectrum disorder: case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ncn3.12380	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 千原 典夫	4. 巻 71
2. 論文標題 【T細胞・B細胞研究の進展】インターロイキン27を用いたT細胞における共抑制性 遺伝子群の誘導と転写制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 555～560
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 千原 典夫	4. 巻 269
2. 論文標題 免疫学 ヘルパーT細胞における共抑制分子の発現制御機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 549～550
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 千原 典夫,松本 理器,山村 隆	4. 巻 37
2. 論文標題 ニューロサイエンスの最新情報 Plasmablastsと免疫性神経疾患	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 744～746
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 赤谷律,千原典夫	4. 巻 83
2. 論文標題 【知らずにすまない神経眼科疾患!】抗GQ1b抗体症候群	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OCULISTA	6. 最初と最後の頁 20～27
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 Chihara N, Madi A, Kondo T, Zhang H, Acharya N, Singer M, Nyman J, Marjanovic ND, Kowalczyk MS, Wang C, Kurtulus S, Law T, Etmnan Y, Nevin J, Buckley CD, Burkett PR, Buenrostro JD, Rozenblatt-Rosen O, Anderson AC, Regev A, Kuchroo VK.	4. 巻 558
2. 論文標題 Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 454 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0206-z	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 Sudo Atsushi, Chihara Norio, Takenaka Yu, Nakamura Tetsu, Ueda Takehiro, Sekiguchi Kenji, Toda Tatsushi	4. 巻 5
2. 論文標題 Paraneoplastic NMOSD associated with EG junction adenocarcinoma expressing unprotected AQP4	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e482 ~ e482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000000482	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 Chihara Norio	4. 巻 9
2. 論文標題 Dysregulated T cells in multiple sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 20 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12438	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 Chihara Norio, Madi Asaf, Anderson Ana C., Kuchroo Vijay K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Going beyond a whack a mole game: A systems biology approach to immune tolerance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 5 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12487	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

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 赤谷 律, 千原 典夫, 古東 秀介, 盛 崇太郎, 栗本 拓治, 立花 久嗣, 大塚 喜久, 上田 健博, 関口 兼司
2. 発表標題 多発性硬化症の病態評価における光干渉断層計(OCT)の意義についての検討
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千原 典夫, 古東 秀介, 赤谷 律, 立花 久嗣, 大塚 喜久, 上田 健博, 関口 兼司
2. 発表標題 NMOに対するMMFによる再発抑制と安全性確認のためのオープン試験
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 的場 健人, 千原 典夫, 大塚 喜久, 立花 久嗣, 上田 健博, 関口 兼司
2. 発表標題 当院で診療した重症筋無力症の臨床像および治療成績
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古東 秀介, 千原 典夫, 赤谷 律, 関口 兼司, 戸田 達史
2. 発表標題 多発性硬化症の急性期治療反応性と相関する脳脊髄液中のPD-1陽性CD8+ T細胞の役割
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古東 秀介, 千原 典夫, 赤谷 律, 関口 兼司, 松本 理器, 戸田 達史
2. 発表標題 多発性硬化症における制御性CD8+T細胞に関する検討
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 盛 崇太郎, 栗本 拓治, 村井 佑輔, 上田 香織, 坂本 麻里, 千原 典夫, 中西 裕子[山田], 中村 誠
2. 発表標題 再発性視神経炎に対する免疫抑制剤の治療効果
3. 学会等名 第57回日本神経眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野 孝宏, 的場 健人, 立花 久嗣, 大塚 喜久, 千原 典夫, 上田 健博, 関口 兼司, 濱口 浩敏, 古和 久朋, 松本 理器
2. 発表標題 抗GAD抗体、抗LGI1抗体、抗GABAAR抗体陽性脳炎に対し、免疫治療が奏効した1例
3. 学会等名 第37回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 的場 健人, 中野 孝宏, 立花 久嗣, 大塚 喜久, 千原 典夫, 上田 健博, 関口 兼司, 古和 久朋, 松本 理器
2. 発表標題 異常行動とけいれん発作で発症し、3種の抗神経抗体が陽性であった自己免疫性脳炎の1例
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 山口 星一郎, 末廣 大知, 森本 耕平, 千原 典夫, 辻 佑木生, 立花 久嗣, 上田 健博, 関口 兼司, 松本 理器
2. 発表標題 両側性の faciobrachial dystonic seizure を呈した抗 LGI1 抗体陽性辺縁系脳炎の 1 例
3. 学会等名 第15回日本てんかん学会近畿地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihara N
2. 発表標題 Plasmablasts and neuroimmunological disorders
3. 学会等名 Asia-Pacific School of Neuroimmunology (APSNI) of the International Society of Neuroimmunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihara N
2. 発表標題 Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells
3. 学会等名 Kobe Univeristy-University of Washington Joint Symposium on Molecular Pharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norio Chihara, Atsushi Sudo, Shusuke Koto, Ritsu Akatani, Kenji Sekiguchi, Tatsushi Toda
2. 発表標題 Paraneoplastic NMOSD preceding immune-escape of EG junction adenocarcinoma
3. 学会等名 14th International Congress of Neuroimmunology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千原 典夫, 古東 秀介, 赤谷 律, 関口 兼司, 戸田 達史
2. 発表標題 The role of PD-1 expressing T cells in the cerebrospinal fluid of MS and NMO
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤谷 律, 千原 典夫, 渡部 俊介, 立花 久嗣, 古東 秀介, 大塚 喜久, 上田 健博, 関口 兼司, 古和 久朋, 戸田 達史
2. 発表標題 日本語版Guy's Neurological Disability Scaleを用いた多発性硬化症の臨床的評価
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古東 秀介, 千原 典夫, 赤谷 律, 関口 兼司, 戸田 達史
2. 発表標題 PD-1陽性CD8+ T細胞は多発性硬化症の治療効果を反映する
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千原 典夫, 首藤 篤史, 古東 秀介, 赤谷 律, 関口 兼司, 戸田 達史
2. 発表標題 腫瘍随伴性NMOSDにおけるPD-1/PD-L1経路の役割
3. 学会等名 第30回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古東 秀介, 千原 典夫, 赤谷 律, 関口 兼司, 戸田 達史
2. 発表標題 多発性硬化症におけるPD-1陽性CD8+ T細胞の脳脊髄液および末梢血での比較
3. 学会等名 第30回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤谷 律, 千原 典夫, 刀坂 公崇, 立花 久嗣, 大塚 喜久, 上田 健博, 関口 兼司, 古和 久朋, 戸田 達史
2. 発表標題 抗ナタリズマブ抗体が陽性となった多発性硬化症の1例
3. 学会等名 第30回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千原 典夫, 古東 秀介, 赤谷 律, 関口 兼司
2. 発表標題 多発性硬化症/視神経脊髄炎における調節不全T細胞の役割について
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤谷 律, 千原 典夫, 刀坂 公崇, 立花 久嗣, 大塚 喜久, 上田 健博, 関口 兼司
2. 発表標題 疾患修飾薬変更後に再発を繰り返し, 抗ナタリズマブ抗体が陽性となった多発性硬化症の1例
3. 学会等名 第36回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

T細胞における共抑制性遺伝子プログラムの発現の制御  
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/18371>  
神戸大学大学院医学研究科・内科学講座 脳神経内科学分野  
<https://www.med.kobe-u.ac.jp/sinkei/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----