

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15473

研究課題名（和文）多発性硬化症における、新規治療法開発と個別化医療実現のためのバイオマーカー確立

研究課題名（英文）Development of novel therapeutic approach and realization of personalized medicine in multiple sclerosis

研究代表者

木村 公俊 (Kimura, Kimitoshi)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：10807093

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：多発性硬化症（MS）は中枢神経系の自己免疫疾患であり、若年で発症し、再発と寛解を繰り返しながら徐々に神経障害が進行する。MSに対して、血液浄化療法が施行され、その効果には個人差が大きい。事前の効果予測が困難であり、MSの多様な病態の細分化に基づいた個別化医療が求められている。本研究では、血中の免疫細胞を網羅的に解析し、Th1細胞 - CD11c+ B細胞の免疫機構の働きが目立つ患者において、血液浄化療法の効果が認められることを見出した。血中のTh1細胞頻度を測定することで、個別化医療を実現できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Th1細胞 - CD11c+ B細胞の免疫機構の働きが目立つ多発性硬化症（MS）患者において、血液浄化療法の効果が認められることを見出した。血中のTh1細胞頻度を測定することで、個別化医療を実現できる可能性がある。また、CD11c+ B細胞の機能を詳細に解析し、病態への関与を示したことは、今後の新規治療開発に寄与するものと考えている。また、MSは罹患者の受ける影響が大きく、医療費等の社会的負担も大きい疾患である。上記により個別化医療を実現できれば、患者の身体的負担の軽減のみならず、医療費削減にもつながると考える。

研究成果の概要（英文）：Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system. The neurological burden accumulates gradually throughout the life after the onset of the disease typically at 30s. Plasmapheresis is used to treat the patients with MS, though the therapeutic response varies among the patients. It is still difficult to predict the response. We thoroughly analyzed the immune cells before and after plasmapheresis, and found that Th1 cell-CD11c+ B cell axis is closely associated with treatment response to plasmapheresis. The inflammatory phenotype of Th1 cells was ameliorated, and CD11c+ B cell frequency decreased after plasmapheresis. Th1 cell frequency showed a high predictive value, which may lead to the precision medicine in the future.

研究分野：神経免疫学

キーワード：多発性硬化症 個別化医療 T細胞 B細胞 血液浄化療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS: multiple sclerosis) は、30 歳前後の若年で発症し、再発と寛解を繰り返しながら生涯にわたって神経障害が蓄積する難病である。患者への身体的負担のみならず、医療費を含めた社会的な負担も大きい。MS では、疾患の多様性が認められ、既存の治療薬への反応性にも個人差があることが知られる。このため、MS 病態の詳細な理解による、個別化医療の実現が必要とされる。本研究代表者は、本研究開始までに、MS 患者の末梢血や髄液の検体を用いた研究に従事し、エクソソーム・リンパ球の相互作用を通じた病態を解明していた。こうした経験をもとに、下記項目 2 に記載の目的をもって、本研究を開始した。

2. 研究の目的

上記項目 1 の通り、MS の病態には多様性があり、詳細な病態理解に基づいた個別化医療の実現が求められている。本研究では、エクソソームやリンパ球の解析に基づいて、MS 病態の多様性を解明し、個別化医療を実現することを目的とした。また、エクソソームや内在 miRNA を標的とした新規治療法の探索を目的とした。

3. 研究の方法

(1) MS 病態の多様性解明と個別化医療の実現

MS では血液浄化療法が施行されるが、その効果には個人差が大きく、病態の多様性を反映していると考えられる。血液浄化療法前後において、血中のリンパ球やエクソソームを網羅的に解析し、治療効果と関連のあるパラメータを探索する。さらに、治療によって変動する免疫パラメータを解析することによって、血液浄化療法の抗体除去以外の作用機序を解明する。

(2) エクソソームや内在 miRNA を標的とした新規治療法の探索

MS モデルマウスとして、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスを用いる。EAE マウスは、髄鞘タンパク質である MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) を用いて免疫することで疾患誘導する。まず、MOG で免疫するマウスと MOG を除いたアジュバントのみで免疫するマウスを作成し、病勢極期における両者の血液中のエクソソームを回収する。これらのエクソソーム中の内在 miRNA について、MS 患者血中で高発現していた *let-7i* 等の含有量を解析する。治療実験として、*let-7i* アンタゴニストを静注し、EAE 重症度スコアの改善の有無を確認する。

4. 研究成果

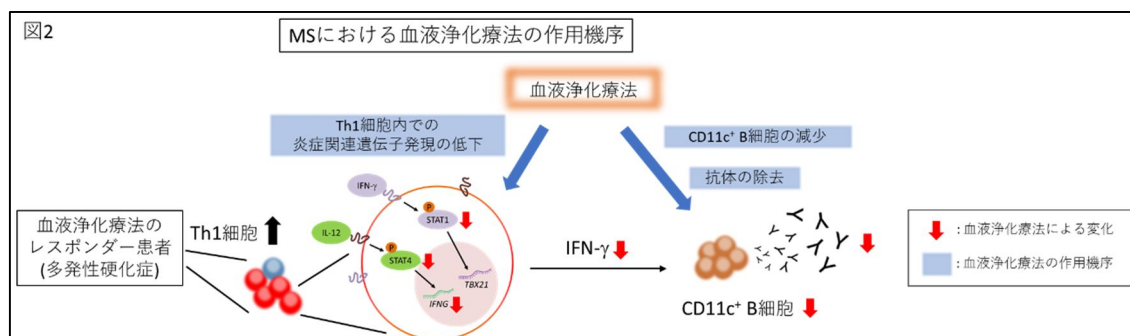
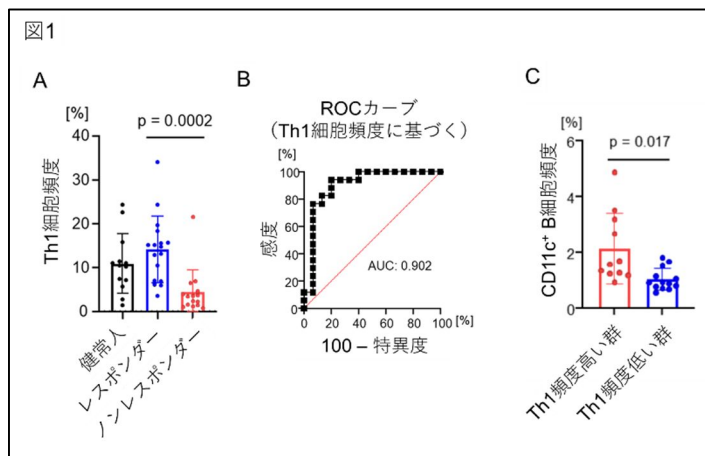
(1) MS 病態の多様性解明と個別化医療の実現

血液浄化療法の一つである免疫吸着療法 (IAPP: immunoadsorption plasmapheresis) を受ける MS 患者において、治療開始前後で、血中の免疫細胞の頻度を網羅的に解析した。結果、治療によって改善を認める群 (レスポンドー群) では、治療前の時点で、IFN を産生する Th1 細胞の頻度が有意に高値であった (図 1A)。一方、他の炎症性・制御性 CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、一般的な B 細胞系集団、NK 細胞、NKT 細胞、単球等には、レスポンドー群とノンレスポンドー群の間で有意差を認めなかった。また、エクソソーム内在 miRNA についても明確な差異を認めなかった。Th1 細胞頻度をもとにした ROC (Receiver Operatorating Characteristic) 曲線での解析の結果、レスポンドー群予測において良好な感度・特異度を示した (AUC=0.902, 図 1B)。なお、各種臨床パラメータ (年齢・性別・臨床病型・罹病期間・治療前の EDSS 等) には、レスポンドー群を特徴づけるものは認めなかった。

この Th1 細胞頻度は治療前後で変化を認めなかったが、治療前後での Th1 細胞内遺伝子発現プロファイルを解析したところ、炎症性機能に重要な *IFNG*、*STAT1*、*STAT4* 遺伝子の発現が低下していた。さらに Th1 細胞と相互作用する細胞集団として CD11c⁺ B 細胞に着目した。CD11c⁺ B 細胞は、全身性エリテマトーデスや関節リウマチ等の自己免疫疾患において、自己抗体を産生する細胞集団として報告されている。また、IFN がこの細胞集団の誘導・維持に深く関与していることが示唆されている。さらに、MS における GWAS 解析によって、この細胞集団の重要性が示唆されている。本研究で、末梢血中の CD11c⁺ B 細胞頻度を解析したところ、Th1 細胞割合高値の集団では CD11c⁺ B 細胞割合が高いことを見出した (図 1C)。さらに CD11c⁺ B 細胞の遺伝子発現プロファイルを解析したところ、他の B 細胞集団と比較して、特徴的なフェノタイプを有していることを見出した。また、免疫グロブリン産生能が、他の B 細胞集団に比して高いことも確認した。さらに、この CD11c⁺ B 細胞の頻度は、Th1 細胞の *IFNG* 発現量と正の相関を示した。CD11c⁺ B 細胞は血液浄化療法後に減少しており、上記の通り、Th1 細胞内の *IFNG* 低下を反映しているものと考えた (Kimura K. et al. *Annals of Neurology*. 2021;90(4):595-611.)

他の詳細な検討をあわせて、MS に対する血液浄化療法においては、Th1 細胞における IFN- γ 産生低下、IFN- γ と密接に関連する CD11c $^{+}$ B 細胞の減少、さらに CD11c $^{+}$ B 細胞から産生される病原性免疫グロブリンの除去、という機序が組み合わさって効果が生じることが示唆された(図 2)。また、MS の一部の患者では、Th1 細胞-CD11c $^{+}$ B 細胞の軸が病態に密接に関わっており、こうした群においては血液浄化療法の効果が見込めることが示唆された。今後の個別化医療の実現につながる

成果と考えている。また、本研究で見出した病態機序は、MS においてこれまで知られていないものである。今後、さらなる MS 病態解明と、新規治療法開発への応用が期待される。



また、MS における神経障害進行に関しては、中枢神経内に浸潤している T 細胞や B 細胞の働きが重要とされる。上記の Th1 細胞 - CD11c $^{+}$ B 細胞軸を含めて、こうした中枢神経組織内での免疫機構動態を解明するため、MS や他の慢性炎症性疾患、さらに神経変性疾患を加えて、髄液の解析を行った。結果、髄液中では末梢血中には存在しない組織常在性 T 細胞 (resident memory T 細胞: Trm 細胞) が豊富に存在することを見出した。さらに、CD8 $^{+}$ Trm 細胞は、コントロール群に比較して、MS や一部の变性疾患で共通して上昇していた。つまり、慢性進行性の中枢神経障害という側面においては、これらの疾患で共通して Trm 細胞が関与している可能性がある。自己免疫疾患と神経変性疾患の重複領域の解明につながる、重要な知見と考えている (Kimura K. et al. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2024;11(1):e200172.)。引き続き、Th1 細胞 - CD11c $^{+}$ B 細胞軸を含めて詳細な解析を行うとともに、Trm 細胞の治療標的としての妥当性評価を進めている。

(2) エクソソームや内在 miRNA を標的とした新規治療法の探索

本研究代表者は、これまでの研究により、*let-7i*, *miR-19b*, *miR-25*, *miR-92a* が MS 患者の末梢血中エクソソーム内に有意に多く含まれていることを見出していた。なかでも *let-7i* が Treg 細胞の誘導を制御することで病態に関与していた。本研究では、EAE マウスにおいて、免疫 16 日目の末梢血中エクソソームを回収し、内在 miRNA 量を解析した。結果、コントロールと比較して、EAE においては、エクソソーム内の *let-7i* 量が有意に多く、一方で他の 3 つの miRNA の量はあまり変わらないことを見出した。次に、こうしたエクソソーム *let-7i* を標的とした治療法を探索するため、*let-7i* のアンタゴニストをマウス尾静脈から注入して、重症度スコアを比較したが、コントロールに比して改善を認めなかった。また、エクソソームの生成阻害薬である GW4869 を静注したが、こちらもコントロールに比して、EAE の重症度スコアの改善を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kimura Kimitoshi, Okada Yoichiro, Fujii Chihiro, Komatsu Kenichi, Takahashi Ryosuke, Matsumoto Sadayuki, Kondo Takayuki	4. 巻 266
2. 論文標題 Clinical characteristics of autoimmune disorders in the central nervous system associated with myasthenia gravis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 2743 ~ 2751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-019-09461-3	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 山村隆、木村公俊	4. 巻 268
2. 論文標題 多発性硬化症と制御性T細胞	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1229-1233
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 Kimura Kimitoshi, Hohjoh Hirohiko, Yamamura Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 The Role for Exosomal microRNAs in Disruption of Regulatory T Cell Homeostasis in Multiple Sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1179069518764892	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 Kimura Kimitoshi, Yamamura Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Circulating exosomes cause loss of immunological balance 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 209 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12474	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 木村公俊、北條浩彦、山村隆	4. 巻 36
2. 論文標題 多発性硬化症において、血中のエクソソームが制御性T細胞の分化を抑制する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1497-1500
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 木村公俊、北條浩彦、山村隆	4. 巻 70
2. 論文標題 多発性硬化症において循環血中のエクソソームはlet-7i を介して制御性T細胞の分化を抑制する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 129-135
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 木村公俊、山村隆	4. 巻 38
2. 論文標題 多発性硬化症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Progress in Medicine	6. 最初と最後の頁 1311-1317
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 山村隆、木村公俊	4. 巻 268
2. 論文標題 多発性硬化症と制御性T細胞	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1229-1233
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 木村公俊	4. 巻 39
2. 論文標題 神経免疫病態におけるmicro RNAの意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 2368-2372
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 Kimura Kimitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Regulatory T cells in multiple sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 148 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12591	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 木村公俊	4. 巻 73
2. 論文標題 細胞外miRNAを捉える	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学別冊	6. 最初と最後の頁 158-163
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 Takewaki Daiki, Suda Wataru, Sato Wakiro, Takayasu Lena, Kumar Naveen, Kimura Kimitoshi, Kaga Naoko, Mizuno Toshiki, Miyake Sachiko, Hattori Masahira, Yamamura Takashi	4. 巻 117
2. 論文標題 Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis	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 22402 ~ 22412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2011703117	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 Ashida Shinji, Ochi Hirofumi, Hamatani Mio, Fujii Chihiro, Kimura Kimitoshi, Okada Yoichiro, Hashi Yuichiro, Kawamura Kazuyuki, Ueno Hideki, Takahashi Ryosuke, Mizuno Toshiki, Kondo Takayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Immune Skew of Circulating Follicular Helper T Cells Associates With Myasthenia Gravis Severity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000000945	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 Kimura Kimitoshi, Lin Youwei, Yamaguchi Hiromi, Sato Wakiro, Takewaki Daiki, Minote Misako, Doi Yoshimitsu, Okamoto Tomoko, Takahashi Ryosuke, Kondo Takayuki, Yamamura Takashi	4. 巻 90
2. 論文標題 Th1 CD11c+ B Cell Axis Associated with Response to Plasmapheresis in Multiple Sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 595 ~ 611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.26202	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 Hamatani Mio, Ochi Hirofumi, Kimura Kimitoshi, Ashida Shinji, Hashi Yuichiro, Okada Yoichiro, Fujii Chihiro, Kawamura Kazuyuki, Mizuno Toshiki, Ueno Hideki, Takahashi Ryosuke, Kondo Takayuki	4. 巻 59
2. 論文標題 T cells from MS Patients with High Disease Severity Are Insensitive to an Immune-Suppressive Effect of Sulfatide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 5276 ~ 5283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-022-02881-9	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 Kimura Kimitoshi, Nishigori Ryusei, Hamatani Mio, Sawamura Masanori, Ashida Shinji, Fujii Chihiro, Takata Masaki, Lin Youwei, Sato Wakiro, Okamoto Tomoko, Kuzuya Akira, Takahashi Ryosuke, Yamamura Takashi, Kondo Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Resident Memory-like CD8+ T Cells Are Involved in Chronic Inflammatory and Neurodegenerative Diseases in the CNS	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e200172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.000000000000200172	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 Minote Misako, Sato Wakiro, Kimura Kimitoshi, Kimura Atsuko, Lin Youwei, Okamoto Tomoko, Takahashi Ryosuke, Yamamura Takashi	4. 巻 47
2. 論文標題 High frequency of circulating non-classical monocytes is associated with stable remission in relapsing-remitting multiple sclerosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2024.2331271	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 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kimitoshi Kimura, Youwei Lin, Wakiro Sato, Ryosuke Takahashi, Takashi Yamamura
2. 発表標題 Response to Plasmapheresis is Predicted by the Th1 Cell Frequency in the Blood in Multiple Sclerosis
3. 学会等名 Federation of Clinical Immunology Societies Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村公俊
2. 発表標題 マイクロRNAを介したエクソソームによる多発性硬化症の病態
3. 学会等名 第3回Liquid Biopsy研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kimitoshi Kimura, Youwei Lin, Wakiro Sato, Ryosuke Takahashi, Takashi Yamamura
2. 発表標題 Th1 cell frequency is an accurate predictor of responders to plasmapheresis in multiple sclerosis
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 Youwei Lin, Kimitoshi Kimura, Yoko Yamada, Wakiro Sato, Manabu Araki, Tomoko Okamoto, Seiichi Yasuda, Takashi Yamamura, Yuji Takahashi
2. 発表標題 Clinical and immunological efficacy of plasmapheresis in MS and NMO refractory to steroid pulse therapy
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 林 幼偉、木村 公俊、坪田 佳代子、佐藤 和貴朗、荒木 学、岡本 智子、登坂 一真、安田 聖一、山村 隆、高橋 祐二
2. 発表標題 ステロイドパルス療法で寛解不十分なMS・NMOにおける血液浄化療法の有効性と免疫学的指標
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 Youwei Lin, Kimitoshi Kimura, Kayoko Tsubota, Wakiro Sato, Manabu Araki, Tomoko Okamoto, Kazuma Tosaka, Seiichi Yasuda, Takashi Yamamura, Yuji Takahashi
2. 発表標題 The efficacy of plasmapheresis for multiple sclerosis and neuromyelitis optica unresponsive to steroid-pulse therapy and its immunological prognostic markers
3. 学会等名 The Joint meeting of the 12th World Congress of International Society for Apheresis and the 40th Annual Meeting of Japanese Society for Apheresis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kimitoshi Kimura, Youwei Lin, Wakiro Sato, Ryosuke Takahashi, Takashi Yamamura
2. 発表標題 Successful response to plasmapheresis is mediated by phenotypic change of Th1 cells in multiple sclerosis
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 木村公俊
2. 発表標題 多発性硬化症におけるmiRNAを介したエクソソームの関与
3. 学会等名 東京農工大学 - 国立精神・神経医療研究センター 第4回合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村公俊、林幼偉、佐藤和貴郎、高橋良輔、山村隆
2. 発表標題 多発性硬化症への免疫吸着療法における、T細胞解析に基づいた個別化医療実現と作用機序解明
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 木村公俊
2. 発表標題 マイクロRNAを介したエクソソームによる多発性硬化症の病態
3. 学会等名 第3回Liquid Biopsy研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 血液浄化療法の臨床的有効性を予測するためのデータを収集する方法	発明者 木村公俊、林幼偉、 山村隆	権利者 国立精神・神経 医療研究セン ター
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-155801	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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