

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07427

研究課題名(和文) 自然免疫系を標的とした新規HAM発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism of HAM pathogenesis by targeting the innate immune system

研究代表者

八木下 尚子 (Yagishita, Naoko)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：40367389

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)：HAMは無発症のHTLV-1キャリアに比べ高いHTLV-1プロウイルス量を示すが、HTLV-1抗原であるTaxに特異的な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が多く、抗HTLV-1抗体価も高いことから、CTLの働きにもかかわらずHTLV-1の感染拡大が制御しきれない状況にある。一方でHAM患者では、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞の頻度が減少している報告があることから、HAMを発症する患者は脆弱な自然免疫によりHTLV-1が感染拡大し、HAMの発症や病態形成に寄与する可能性が示唆される。本研究で、HAM患者由来検体を用いて遺伝子発現の網羅的な解析を進めた結果、自然免疫に関わる分子の発現低下が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HAMにおいて自然免疫が低下していることが明らかになった。引き続き解析を進めることで、HAM発症リスクを予測することが可能な末梢血中サロゲートマーカーの同定も可能になると期待され、HTLV-1関連疾患の研究領域に対しても貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human T-cell leukemia virus (HTLV-1)-associated myelopathy (HAM) has higher levels of HTLV-1 provirus compared to asymptomatic HTLV-1 carriers. HAM patients have high numbers of cytotoxic T lymphocytes (CTL) specific for the HTLV-1 antigen, Tax, and high anti-HTLV-1 antibody titers, suggesting that the spread of HTLV-1 infection is uncontrolled despite CTL function. On the other hand, it has been reported that the frequency of dendritic cells and natural killer cells is decreased in patients with HAM, suggesting that patients with HAM may have developed HAM due to HTLV-1 infection spread by vulnerable innate immunity. In this study, we proceeded with a comprehensive analysis of gene expression using specimens derived from HAM patients, and found decreased expression of molecules involved in innate immunity.

研究分野：神経免疫学

キーワード：HAM HTLV-1 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、脊髄の慢性炎症による進行性の脊髄障害を特徴とする難治性疾患である。欧米では患者が少なく、先進国で患者が多いのは日本のみであることから、エビデンスの蓄積と長期予後改善に結びつく治療法の開発が急務であり、そこにおける日本の役割は重要である。これまで我々は、HAM の病態解明を目指し、HTLV-1 感染細胞に着目して研究を進め、HAM では、HTLV-1 に感染した CD4+ヘルパー T (Th) 細胞が IFN を過剰産生する Th1 様の異常細胞に変化・増殖し、Th1 免疫応答を主体とした慢性炎症を引き起こしていること (PLoS One 2009, Brain 2013, J Clin Invest 2014) 実際に HAM の脊髄病巣部では、この Th1 様の HTLV-1 感染細胞が占拠していることを明らかにし (Brain 2013) この知見をもとにした医師主導治験を開始した (N Engl J Med 2018)。

近年の解析により、同じ HTLV-1 感染により起こる疾患の成人 T 細胞白血病 (ATL) では、HTLV-1 感染細胞がクローナルに増殖することで感染拡大しているのに対し、HAM では、HTLV-1 は感染細胞から非感染細胞への細胞間感染により感染拡大していることが示唆されている。細胞間感染を成立させるためには、ウイルス抗原である Tax を発現させる必要があるが、HAM では Tax 特異的な CTL が多いことが報告されており、このことは、HAM では HTLV-1 が細胞間感染により加速的な感染拡大をしていることを裏付けている。さらに HAM では、無発症の HTLV-1 キャリアに比べ高い HTLV-1 プロウイルス量、抗 HTLV-1 抗体価を示すことも知られている。これらのことから、HAM では、細胞間感染が加速することでウイルス量が高く、またその感染拡大に応じて Tax の抗原刺激が持続的に存在するために、Tax 特異的 CTL や抗 HTLV-1 抗体価が高くなっているといえる。すなわち、CTL の働きが存在するにもかかわらず、HTLV-1 の感染拡大が制御しきれないという状況が、結果的に HTLV-1 感染細胞の増加をもたらし、その感染細胞の異常化により脊髄での慢性炎症という HAM の病態を引き起こしているといえる。

一方で、これまでに HTLV-1 感染者のプロウイルス量は感染初期に決定し、生涯ほとんど変動がないことが幼児コホート研究により報告されていることから (Maloney EM, Yamano Y *et al.* J Infect Dis 2006) HAM における高い HTLV-1 プロウイルス量は、感染初期にすでに規定されていることが考えられる。生体において、ウイルスに対する最初の防御は自然免疫であり、この防御システムが突破されると獲得免疫が作動することになるが、HAM では感染初期に HTLV-1 が感染拡大していると仮定すると、HTLV-1 キャリアに比べ HAM 患者の自然免疫系が脆弱で、HTLV-1 の感染拡大を許しているのではないかと予想される。HAM における自然免疫に関しては、HTLV-1 キャリアに比べナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) の活性が顕著に低いことが報告されており (Fujihara K *et al.* J Neurol Sci 1991, Yu F *et al.* J Neuroimmunol 1991) また我々も樹状細胞や NK 細胞の頻度が減少していることを報告しているが (Blood 2009) なぜこのような現象が起こっているのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまで着目されていなかった HTLV-1 感染初期のイベント、すなわち HAM 患者の自然免疫の状態の解明を試み、自然免疫の状態に基づく HAM の新たな病態形成機序を解明することを目的とする。

最終的には、自然免疫の状態により HTLV-1 感染細胞が増えてしまう原因が明らかになれば、HAM 発症リスクを予測することが可能な末梢血中サロゲートマーカーの同定も可能になると期待され、HTLV-1 関連疾患の研究領域に対しても貢献できるものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、HAM 患者由来検体を用いて、nCounter Analysis System のヒト免疫応答をプロファイルするパネルにより、自然免疫にかかわる遺伝子発現を網羅的に解析した。ここで HTLV-1 キャリアとの遺伝子発現を比較することで、自然免疫制御と HAM 発症の関連が明らかになる。また我々は、患者レジストリ「HAM ねっと」を活用した疫学調査により、HAM の主な症状の一つである歩行障害は、急速進行例、緩徐進行例、進行停滞例と 3 つの異なる疾患活動性に分類できること (Orphanet J Rare Dis 2016) この疾患活動性は髄液中の炎症マーカーの値と関連していることを証明した (PLoS Negl Trop Dis 2013, Front Microbiol 2018) 。そこで疾患活動性の異なる患者由来検体ごとに同様の検討を行い、髄液での炎症状態と自然免疫の状態がどのような関係にあるのかを検討した。

HAM 患者および、HTLV-1 キャリア (AC) 検体より RNA を抽出し、nCounter により、免疫応答のステップを段階的に評価できるパネルを用いて約 700 遺伝子の発現パターンを解析し、自然免疫の状態の違いを明らかにした。また、疾患活動性の異なる HAM 患者検体を用いて (nCounter による解析を行う。各疾患活動性での結果を比較することで、髄液の炎症レベルの違いによる自然免疫の状態の違いを明らかにした。

4. 研究成果

本研究により、HAM において、これまでに報告されている IFN や慢性炎症を引き起こすケモカインの発現が上昇していることが確認された。また NK 細胞の分化増殖関連因子の発現低下、オートファジー関連因子の活性化、酸化ストレス因子の低下など、これまで HAM との関連が明らかにされていないシグナル伝達系の変動が確認された。特に NK 細胞の分化増殖関連因子は疾患活動性が高いほど発現低下が著しいという結果となり、自然免疫の低下が HAM の病態形成に係わる可能性が示唆された。

今後更なる解析を進めることで、HAM の病態を引き起こす HTLV-1 感染細胞がなぜ増え、HAM を発症するのかを明らかにすることで、HAM 発症リスクを予測することが可能な末梢血中サロゲートマーカーの同定も可能になると期待され、HTLV-1 関連疾患の研究領域に対しても貢献できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takao N, Yagishita N, Araya N, Aratani S, Yamauchi J, Takahashi K, Kunitomo Y, Sato T, Nakamori M, Kawai Y, Omae Y, Tokunaga K, Matsuda F, Mitsuhashi S, Yamano Y.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Large-Scale Whole-Genome Analysis of HTLV-1-Associated Myelopathy Identified Hereditary Spastic Paraplegias.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neurol Genet	6. 最初と最後の頁 e200108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXG.000000000200108	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 Koseki A, Araya N, Yamagishi M, Yamauchi J, Yagishita N, Takao N, Takahashi K, Kunitomo Y, Honma D, Araki K, Uchimar K, Sato T, Yamano Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 EZH1/2 dual inhibitors suppress HTLV-1-infected cell proliferation and hyperimmune response in HTLV-1-associated myelopathy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 1175762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1175762	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 Sato T, Yamauchi J, Yagishita N, Araya N, Takao N, Ohta Y, Inoue E, Takahashi M, Yamagishi M, Suzuki Y, Uchimar K, Matsumoto N, Hasegawa Y, Yamano Y.	4. 巻 146(8)
2. 論文標題 Long-term safety and efficacy of mogamulizumab (anti-CCR4) for treating virus-associated myelopathy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 3181-3191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awad139	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 鷹尾直誠, 佐藤知雄, 山内淳司, 八木下尚子, 堀部恵梨佳, 山野嘉久.	4. 巻 63(7)
2. 論文標題 HTLV-1関連脊髄症（HAM）診療ガイドライン2019」の活用実態および内容の評価に関する全国アンケート調査.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床神経学	6. 最初と最後の頁 433-440
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 八木下尚子, 山野嘉久.	4. 巻 40(1)
2. 論文標題 Human T-cell leukemia virus type 関連脊髄症患者レジストリ「HAMねっと」.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 神経治療学	6. 最初と最後の頁 28-31
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 M, Yamauchi J, Sato T, Yagishita N, Araya N, Aratani S, Tanabe K, Horibe E, Watanabe T, Coler-Reilly ALG, Nagasaka M, Akasu Y, Kaburagi K, Kikuchi T, Shibata S, Matsumoto H, Koseki A, Inoue S, Takata A, Yamano Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Health-related quality of life evaluation using the Short Form-36 in patients with human T Lymphotropic virus type 1-associated myelopathy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Med(Lausanne)	6. 最初と最後の頁 879379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.879379.	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 Wada Y, Sato T, Hasegawa H, Matsudaira T, Nao N, Coler-Reilly ALG, Tasaka T, Yamauchi S, Okagawa T, Momose H, Tanio M, Kuramitsu M, Sasaki D, Matsumoto N, Yagishita N, Yamauchi J, Araya N, et al.	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 RAISING is a high-performance method for identifying random transgene integration sites.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03467-w.	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 Tanaka Y, Sato T, Yagishita N, Yamauchi J, Araya N, Aratani S, Takahashi K, Kunitomo Y, Nagasaka M, Kanda Y, Uchimarui K, Morio T, Yamano Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Potential Role of HTLV-1 Tax-Specific Cytotoxic T Lymphocytes expressing a Unique T-cell Receptor to Promote Inflammation of the Central Nervous System in Myelopathy Associated with HTLV-1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 993025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.993025.	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 Yamauchi J, Tanabe K, Sato T, Nakagawa M, Matsuura E, Tsuboi Y, Tamaki K, Sakima H, Ishihara S, Ohta Y, Matsumoto N, Kono K, Yagishita N, Araya N, Takahashi K, Kunitomo Y, Nagasaka M, Coler-Reilly ALG, Hasegawa Y, Araujo A, Jacobson S, Grassi MFR, Galvao-Castro B, Bland M, Taylor GP, Martin F, Yamano Y.	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Efficacy of corticosteroid therapy for HTLV-1-associated myelopathy: A randomized controlled trial (HAMLET-P).	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14010136.	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 Iijima N, Yamauchi J, Yagishita N, Araya N, Aratani S, Tanabe K, Sato T, Takata A, Yamano Y.	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Clinical course of neurogenic bladder dysfunction in human T-cell leukemia virus type-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: A nationwide registry study in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Orphanet J Rare Dis	6. 最初と最後の頁 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13023-021-01990-3.	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 Yamauchi J, Araya N, Yagishita N, Sato T, Yamano Y.	4. 巻 218
2. 論文標題 An update on human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) focusing on clinical and laboratory biomarkers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacol Ther	6. 最初と最後の頁 107669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2020.107669	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 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 新谷奈津美, 山岸誠, 清原和裕, 浅原尚美, 中島誠, 荒谷聡子, 八木下尚子, 内丸薫, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1感染細胞に起因したHAMの神経障害機構.
3. 学会等名 第9回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小関昭仁, 新谷奈津美, 山岸誠, 山内淳司, 八木下尚子, 鷹尾直誠, 高橋克典, 國友康夫, 本間大輔, 荒木一司, 内丸薫, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HAM における HTLV-1 感染細胞に対する EZH1/2 二重阻害剤の増殖抑制効果.
3. 学会等名 第9回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀部恵梨佳, 相良康子, 佐藤知雄, 八木下尚子, 渡邊俊樹, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1 キャリア電話相談の利用状況報告.
3. 学会等名 第9回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀部恵梨佳, 相良康子, 佐藤知雄, 八木下尚子, 渡邊俊樹, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1 感染者のオンライン相談に関する意向調査.
3. 学会等名 第9回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新谷奈津美, 山岸誠, 清原和裕, 浅原尚美, 中島誠, 荒谷聡子, 八木下尚子, 内丸薫, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1関連脊髄症におけるウイルス感染細胞に起因した神経障害機構の解析.
3. 学会等名 第27回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小関昭仁, 新谷奈津美, 山岸誠, 山内淳司, 八木下尚子, 本間大輔, 荒木一司, 内丸薫, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 EZH1/2二重阻害剤はHTLV-1関連脊髄症におけるHTLV-1感染細胞の増殖と過剰免疫応答を抑制する.
3. 学会等名 第27回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口泉, 八木下尚子, 古澤嘉彦, 丹澤和雅, 長崎正朗, 山野嘉久, 松田文彦.
2. 発表標題 難病レジストリ研究の運用構築支援とデータシェアリング推進(難病プラットフォーム活動報告).
3. 学会等名 第27回日本医療情報学会春季学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamauchi J, Sato T, Yagishita N, Araya N, Nakagawa M, Matsuura E, Tsuboi Y, Tamaki K, Sakima H, Ishihara S, Araujo A, Jacobson S, Grassi MFR, Galvao-Castro B, Bland M, Taylor GP, Martin F, Yamano Y.
2. 発表標題 A randomized controlled trial on corticosteroid therapy for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Japan (HAMLET-P trial).
3. 学会等名 20th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses(HTLV22) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato T, Yagishita N, Araya N, Yamauchi J, Takahashi K, Kunitomo Y, Hasegawa Y, Higashikuse Y, Miyachi K, Yamano Y.
2. 発表標題 Evaluation of quantification method of HTLV-1 proviral load in white blood cells using whole blood.
3. 学会等名 20th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses(HTLV22) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新谷奈津美, 荒谷聡子, 八木下尚子, 山内淳司, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1関連脊髄症 (HAM) の病態形成機構.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鷹尾直誠, 佐藤知雄, 山内淳司, 八木下尚子, 新谷奈津美, 荒谷聡子, 山野嘉久.
2. 発表標題 HAMの排尿障害における臨床症状評価と治療効果判定の標準化スケールの確立.
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新谷奈津美, 荒谷聡子, 八木下尚子, 山内淳司, 鷹尾直誠, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の神経障害機構の解析.
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内淳司, 新谷奈津美, 八木下尚子, 佐藤知雄, 湯沢賢治, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1陽性臓器移植の診療に関する全国調査.
3. 学会等名 第55回日本臨床腎移植学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤知雄、八木下尚子、新谷奈津美、荒谷聡子、山内淳司、高橋克典、國友康夫、長谷川由美子、東久世裕太、宮地恵子、佐藤賢文、直亨則、齋藤益満、山野嘉久.
2. 発表標題 全血を用いた改変HTLV-1プロウイルス量定量法に関する検討.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷奈津美、荒谷聡子、八木下尚子、山内淳司、佐藤知雄、山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1関連脊髄症 (HAM) における神経障害機構の解析.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内淳司、新谷奈津美、八木下尚子、佐藤知雄、湯沢賢治、山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1陽性の臓器移植に関する全国アンケート調査.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯島直樹、山内淳司、高梨世子、太刀川慶史、八木下尚子、新谷奈津美、荒谷聡子、田辺健一郎、佐藤知雄、高田礼子、山野嘉久.
2. 発表標題 リアルワールドデータにより示されたHAMの排尿障害に対するミラベグロンの有用性.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷奈津美, 荒谷聡子, 八木下尚子, 山内淳司, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1による神経障害機構.
3. 学会等名 第25回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷奈津美, 荒谷聡子, 八木下尚子, 山内淳司, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1関連脊髄症 (HAM)の神経障害機構.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯島直樹, 山内淳司, 八木下尚子, 新谷奈津美, 荒谷聡子, 田辺健一郎, 佐藤知雄, 高田礼子, 山野嘉久.
2. 発表標題 リアルワールドデータにより示されたHAMの排尿障害に対するミラベグロンの有用性.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター https://nanchiken.jp/</p>

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