

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390280

研究課題名(和文)細胞生物学および分子生物学的手法を用いた肉芽腫形成の分子メカニズム解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism on granuloma formation based on the analysis with cellular and molecular biology

研究代表者

神戸 直智(Kambe, Naotomo)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50335254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス(EOS)は、NOD2遺伝子の変異を基盤とし、明らかな外因性因子の存在なしに肉芽腫を来す疾患である。本症における肉芽腫形成の機序を明らかにするため、患者より末梢血CD14陽性細胞を採取し、発現する遺伝子の網羅解析を行った。しかしながら、NOD2の発現が患者検体で同定できない事もあり、肉芽腫に結びつく差違は同定できなかった。しかしながら、細胞株にNOD2を過剰発現させた系などを利用して、今後も解析を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Blau syndrome and early-onset sarcoidosis (EOS) is the granulomatosis, based on the NOD2 mutation, which is spontaneously activated without external ligand. To unveil the molecular mechanism how NOD2 activation induce granuloma formation, we collected CD14 positive peripheral monocytes from the patients and analyzed the gene expression profiles. However, probably due to the quite low expression levels of NOD2 gene in the peripheral monocytes from the patients, we could not identify the difference between the patients with NOD2 mutation and normal controls to explain the granuloma formation in Blau syndrome/EOS. We will still continue the analysis for evaluating the granuloma formation, using the transient expression model with disease-associated NOD2 mutants, that was established through this project.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学 肉芽腫 NOD2

1. 研究開始当初の背景

貪食能をもつ単球由来の組織球が増殖して形成される肉芽腫は、結核に代表される感染防御反応、環状肉芽腫や脂肪類壊死症のよう変化した自己組織に対する反応、シリカなどへの異物反応、サルコイドーシスなどで認められるが、いずれの病態でも肉芽腫形成の分子メカニズムは不明である。

我々はこれまで、病原微生物、変化した蛋白質や結晶構造、生体自らが発する危険信号を細胞内で認識して炎症を惹起し、自然免疫において重要な役割を担うと注目される NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-leucine rich repeats containings) 分子の機能と、NLR 遺伝子の自己活性型変異によって特徴的な臨床症状を呈する自己炎症症候群の研究に従事してきた (Kambe, et al. *J Dermatol Sci* 2005 review, Kambe, et al. *Allergol Int.* 2010 review)。NLR 分子の 1 つである NOD2 は、当初、その機能消失性変異が消化管に肉芽腫を来すクローン病の発症に関連すると注目された分子である。

一方、家族性に皮膚、関節、眼にサルコイドーシス類似の肉芽腫を来す疾患がブラウ症候群として報告され (Blau. *J Pediat* 1985)、その後、ブラウ症候群において NOD2 の機能獲得性変異が認められることが報告された (Miceli-Richard, et al. *Nat Genet* 2001)。これを契機として我々は、小児期発症のサルコイドーシスの中で、肺病変を欠き関節症状を来す一群はこのブラウ症候群に病態が近いと考えて国内症例を収集し、若年発症サルコイドーシス (EOS) と診断されてきた孤発例の病態にも NOD2 の機能獲得性変異が関わることを同定した (Kanazawa, et al. *Blood* 2005)。その後、ブラウ症候群/EOS と診断される症例は、国内で 30 例ほど集積されたが (Okafuji, et al. *Arthritis Rheum* 2009)、なぜ NOD2 の活性化が肉芽腫の形成に関わるかは、依然として明らかでない。

2. 研究の目的

細胞内のパターン認識受容体の 1 つであり、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異の結果としてリガンド (細菌細胞膜の構成成分の 1 つである muramyl dipeptide [MDP]) によって活性化された時と同じ機序で肉芽腫を形成すると考えられる、NOD2 遺伝子の変異を基盤としたブラウ症候群/EOS をモデルに、細胞生物学的あるいは分子生物学的な手法から肉芽腫形成のメカニズムの解明を目指した。

すなわち、NOD2 の遺伝子変異によって肉芽腫を来す患者、およびコントロールとしての健常者から、インフォームドコンセントを得て末梢血を採取し、NOD2 を発現する単球を分離した後、mRNA を単離し、発現する遺

伝子の網羅解析を行って差異のある遺伝子を同定することで、肉芽腫形成の分子メカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ブラウ症候群/EOS 末梢血単球に発現する遺伝子の網羅解析

NLRP3 の変異を背景とした CAPS においては IL-1 β が関わる手がかりとなったが、NOD2 の変異を背景としたブラウ症候群/EOS では、NF- κ B の転写亢進以外に手がかりがない。そこで、まず、NOD2 の下流で働いており、NOD2 の活性化によって差異のある遺伝子を網羅解析し、病態解析の手がかりを得る。

NOD2 を発現する細胞は末梢血では単球であることから、患者および健常者から、インフォームドコンセントを得た後に末梢血を採取し、Ficol 比重遠沈にて単核球を分離後、FITC 標識 CD14 陽性細胞で染色、抗 FITC 磁気ビーズを用いて染色された細胞を単離する。

末梢血 CD14 細胞より発現する mRNA を単離し、Agilent 社の 40K x 4 の Gene Chip を用いて発現する遺伝子の網羅解析を行う。患者検体の個性によるばらつきを排除するため、同意を得られた国内での症例においてさらに検討を加える。

一部の症例では、BCG 接種が皮膚症状発症の契機になったと考えられ、遺伝子変異に加えて何らかの外来因子が病状を修飾していると推測される。このため、健常者および NOD2 変異をもった患者から単離した CD14 陽性細胞を、LPS および NOD2 のリガンドである MDP によって刺激した後の遺伝子発現の差異を、同様に検討する。なお、健常者由来の CD14 陽性細胞を用いた予備実験においては、刺激の種類および有無によらず、1 時間の細胞培養によって、培養を行わなかった細胞との間に遺伝子発現のパターンが著しく変動した。このため、比較対象とする無刺激の細胞でも 1 時間の培養を行う。

(2) NOD2 遺伝子変異を導入したヒト単球細胞株の樹立

患者検体に依存せずに解析を進められるように、患者から同定した代表的な NOD2 変異 (R334W および N670K) を用いて、ヒト単球細胞株 THP-1 細胞へと移入した細胞を樹立する。

(3) NOD2 変異を有する疾患特異的 iPS 細胞の樹立と単球への分化

連携研究者の所属する京都大学のレギュレ

ーションに従った上で、同意を得た EOS 患者から iPS 細胞を樹立する。その後、樹立した NOD2 変異をもった iPS 細胞は、血液系細胞へと分化させる条件で培養後、血液幹細胞のマーカーを発現する細胞を、さらに単球系細胞へと分化させる条件で培養する。

4. 研究成果

初年度は、千葉大学にて経過観察をしている父子例、および厚労省の難治性疾患克服研究事業を通じて症例を蓄積した鹿児島大学保健学科の武井修治先生の協力を得て、鹿児島大学の小児科にて経過観察をされている 5 例の計 7 例の患者から、末梢血を得て、これを CD14 陽性細胞へと分離した。分離した CD14 陽性細胞の純度は、抽出前の単球 8.6%、抽出後の CD14 陽性細胞の純度 91.5%と解析に十分な純度を得ることができた。

これら分離した CD14 陽性細胞から mRNA を抽出し、mRNA のクオリティーチェックを行って解析に耐える純度をもった mRNA が抽出されていることを確認した上で、遺伝子の網羅解析を Agilent 社の 40K x 4 の Gene Chip を用いて解析を行った。

本症の患者で同定された NOD2 変異を HEK293 細胞へと遺伝子導入した場合には、ルシフェラーゼ活性を指標とした NF- κ B レポーターアッセイの結果として、疾患関連変異体によって NF- κ B 転写の亢進が確認されるのに対して、患者末梢血 CD14 陽性細胞から抽出した検体では、予想に反して、NF- κ B 転写が亢進していることを示唆する遺伝子発現パターンは確認されなかった。この理由の 1 つとしては、NOD2 遺伝子発現そのものについて解析を行うと、むしろ NOD2 遺伝子発現自体が、健常者に比して、患者群で 1.56 倍と発現が減少していることが確認された。

このとき、EOS 患者末の梢血で NOD2 を発現する CD14 陽性細胞では、転写抑制因子として機能するセリン/スレオニンキナーゼの発現亢進が認められることが同定された。このため、NOD2 の恒常活性変異体を病態として肉芽腫を形成するブラウ症候群/EOS において、定常状態で肉芽腫の進行を対症的に制御している機構として、この分子の役割を検討するプロジェクトを、指導する助教の中野倫代らとともに開始した。

一方、末梢血単球において NOD2 の発現を増強させる試みとして、ビタミン D3 の添加により抗菌ペプチドの発現とともに、NOD2 の発現が誘導されることが報告されており、これに基づいて、抽出した CD14 陽性細胞をビタミン D3 を添加して 24 時間培養し、この細胞から mRNA を抽出する系での遺伝子の網羅解析を計画した。

しかしながら非常に残念なことに、本研究

期間の 2 年目に鹿児島大学において行った検討においては、患者検体から網羅解析に耐えるだけのクオリティーをもって mRNA を抽出することができなかった。このため、解析対象を千葉大学で経過観察している父子例に加えて、千葉近隣に在住するさらに 3 例の症例に協力を依頼し、細胞を抽出し遺伝子解析を行ったが、確かに抗菌ペプチドである LL37 の発現亢進がビタミン D3 添加によって著明に亢進することが確認できたものの、炎症性サイトカインを始めとした NF- κ B 転写が亢進していることを示唆する遺伝子発現パターンは確認されなかった。

以上の結果から本研究 3 年目に関しては、研究手法を転換し、関連法規を遵守しつつ共同研究期間を含めた倫理委員会への手続きを行った後、患者から末梢血を採取し、iPS 細胞の樹立のための細胞培養を開始した。

それとともに、単球系細胞株である THP-1 細胞へと、本症の患者から同定された変異 NOD2 を、標識のための FLAG 配列を C 末に付した形で遺伝子導入するとともに、その導入効率の評価のために GFP を発現するプラスミドとして細胞導入を行い、一定の純度で GFP 陽性細胞を得る系を確立した。その上で、これら遺伝子導入した細胞から mRNA を抽出し、遺伝子の網羅解析を行うという研究に着手し、現在この解析を継続中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 23 件)

1. Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2013) NLRP3 activation induces ASC-dependent programmed necrotic cell death, which leads to neutrophilic inflammation. *Cell Death Dis.* 4: e644. doi. 10.1038/cddis.2013.169. 査読：有
2. Ikeda K, Kambe N, Satoh T, Matsue H, Nakajima H. (2013) Preferentially inflamed tendon sheaths in the swollen but not tender joints in a 5-year-old boy with Blau syndrome. *J Pediatr.* 163: 1525.e1. doi. 10.1016/j.jpeds.2013.05.059. 査読：有
3. Kanazawa N, Tchernev G, Kambe N. (2013) Monogenic early-onset sarcoidosis is no longer a variant of "idiopathic" sarcoidosis. *J Am Acad Dermatol.* 69: 164-5. doi. 10.1016/j.jaad.2012.12.976. 査読：有
4. Nakamura Y, Kambe N. (2013) Linkage of bacterial colonization of skin and the urticaria-like rash of NLRP3-mediated autoinflammatory syndromes through mast

- cell-derived TNF- α .
J Dermatol Sci.71: 83-8. doi. 10.1016/j.jdermsci.2013.04.009. 査読：有
5. 中野倫代, 神戸直智 (2013) Blau 症候群 / 若年発症サルコイドーシス研究の現状と展望.
 日本臨床. 71: 737-41. 査読：なし
 6. 中川誠太郎, 神戸直智, 中村悠美 (2013) 自然免疫と蕁麻疹.
 皮膚アレルギーフロンティア. 11(1): 13-6. 査読：なし
 7. 江原瑞枝, 神戸直智 (2013) 序 ~ 自己炎症症候群の概説と現在提唱されている定義・分類 ~.
 アレルギー・免疫. 20: 1395-8. 査読：なし
 8. 神戸直智 (2013) 皮膚から診断する全身疾患 皮膚所見から考える自己炎症症候群.
 日皮会誌. 123: 2826-8. 査読：なし
 9. Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. (2012) The CD40-CD40L axis and IFN- γ play critical roles in Langhans giant cell formation.
Int Immunol. 24:5-15. doi: 10.1093/intimm/dxr088. 査読：有
 10. Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK. (2012) Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery.
Blood. 120: 1299-308. doi: 10.1182/blood-2012-03-417881. 査読：有
 11. Nakamura Y, Franchi L, Kambe N, Meng G, Strober W, Núñez G. (2012) Critical role for mast cells in interleukin-1 β -driven skin inflammation associated with an activating mutation in the Nlrp3 protein.
Immunity. 37: 85-95. doi: 10.1016/j.immuni.2012.04.013. 査読：有
 12. 神戸直智, 中村悠美 (2012) 連載「自己炎症症候群の多様性」CAPS でみられるヒスタミン非依存性蕁麻疹.
 炎症と免疫. 20: 183-8. 査読：なし
 13. 神戸直智 (2012) 特集「蕁麻疹患者のQOL 向上術」蕁麻疹様皮疹を呈するクリオピリン関連周期性症候群の診断と管理.
Monthly Book Derma デルマ. 194: 63-9. 査読：なし
 14. 中野倫代, 神戸直智 (2012) 特集「皮膚免疫学 - 免疫臓器としての意義と病態」皮膚と自己炎症性機序による肉芽腫性疾患.
 医学のあゆみ. 242: 791-4. 査読：なし
 15. 神戸直智, 中村悠美 (2012) 特集「アナフィラキシーショック」NLRP3 インフラマソームを介したマスト細胞の活性化.
 臨床免疫・アレルギー科. 58: 560-4. 査読：なし
 16. 神戸直智 (2012) 自己炎症症候群と皮膚疾患の関連 - 治りにくい蕁麻疹 (それと乾癬) について - .
 日皮会誌. 122: 3286-8. 査読：なし
 17. Kambe N, Satoh T, Nakamura Y, Iwasawa M, Matsue H. (2011) Autoinflammatory diseases and the inflammasome: mechanisms of IL-1 beta activation leading to neutrophil- rich skin disorders.
Inflammation Regeneration. 31: 72-80. 査読：有
 18. 神戸直智, 佐藤貴史, 西小森隆太 (2011) インフラマソームの自発的活性化を病態とする自己炎症症候群.
 生体の科学. 62: 221-7. 査読：なし
 19. 神戸直智 (2011) 自己炎症性疾患からとらえたバイオインフォマティクス.
 皮膚アレルギーフロンティア. 9: 130-6. 査読：なし
 20. 神戸直智, 佐藤貴史, 中野倫代, 中村悠美, 松江弘之 (2011) 【自己炎症疾患の新しい知見】若年発症サルコイドーシス / Blau 症候群.
 日本臨床免疫学会雑誌. 34: 378-81. 査読：有
 21. 佐藤貴史, 神戸直智 (2011) Th17 細胞と自己炎症性疾患.
 アレルギーの臨床. 31: 218-22. 査読：なし
 22. 佐藤貴史, 神戸直智 (2011) 【抗体医療 Update - 開発コンセプトから最新治療実績まで】自己炎症性疾患に対する抗体療法.
 医学のあゆみ. 238: 724-9. 査読：なし
 23. 佐藤貴史, 神戸直智 (2011) 【蕁麻疹診療の実践-蕁麻疹診療ガイドライン改訂のポイント、薬物治療の評価を中心に-】クリオピリン関連周期性症候群の診断と治療.
Progress in Medicine. 31: 2811-5. 査読：なし

し

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 神戸直智, 佐藤貴史 (2013) ワークショップ「多彩な細胞死の実行制御と生体応答」Pyro necrosis: 細胞内パターン認識受容体 NLRP3 の活性化によって誘導されるプログラム細胞死
(第 36 回日本分子生物学会年会, 12 月 10-13 日, 神戸市)
2. 神戸直智, 佐藤貴史, 中野倫代, 松江弘之, 池田 啓, 西小森隆太, 金澤伸雄, 武井修治 (2013) 若年発症サルコイドーシスへの治療介入時の評価項目としての関節エコーの有用性
(第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 11 月 9-10 日, 鹿児島市)
3. 神戸直智 (2013) 教育講演 32 「皮膚から診断する全身疾患」皮膚所見から考える自己炎症症候群
(第 112 回日本皮膚科学会総会, 6 月 14-16 日, 横浜市)
4. Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2013) Programmed necrosis by CAPS-associated NLRP3.
(7th International Congress of FMF and AIDs, May 22-26, Lausanne, Switzerland)
5. Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2013) Programmed cell death induced by CAPS-associated mutant NLRP3 features necrosis that leads to in vivo neutrophilic inflammation.
(International Investigative Dermatology 2013, May 8-11, Edinburgh, UK)
6. 神戸直智 (2013) 分野別シンポジウム 8 「自己炎症性疾患の基礎と臨床」若年発症サルコイドーシス / Blau 症候群
(第 116 回日本小児科学会学術集会, 4 月 19-21 日, 広島市)
7. Kambe N. (2012) JSID Award Lecture. The genetic fidelity of the dead or dysing.
(37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 7-9, Okinawa)
8. Kambe N. (2012) Seminar 1. Urticaria and innate immunity. Innate Immunity and autoinflammation.
(37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 7-9, Okinawa)
9. Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2012) Programmed necrotic cell death caused by NLRP3 activation is dispensable for TLR stimulation
(第 41 回日本免疫学会学術集会, 12 月 5-7 日, 神戸市)
10. 神戸直智 (2012) シンポジウム 1 「臨床から見た自己炎症症候群」皮膚症状から見た自己炎症症候群
(第 22 回日本小児リウマチ学会総会・学術大会, 10 月 5-7 日, 名古屋市)
11. 赤池治美, 久保田知洋, 山崎雄一, 山遠剛, 野中由希子, 根路銘安仁, 嶽崎智子, 今中啓之, 池田 啓, 神戸直智, 武井修治 (2012) 手根管長および関節エコーによる若年発症サルコイドーシスにおける関節炎病態の検討
(第 22 回日本小児リウマチ学会総会・学術大会, 10 月 5-7 日, 名古屋市)
12. Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2012) Programmed necrotic cell death caused by NLRP3 activation is dispensable for TLR stimulation
(42nd Annual ESDR Meeting, 2012. Sep 19-22, Venice, Italy)
13. Nakamura Y, Franchi L, Kambe N, G Meng G, Strober W, Núñez G. (2012) Critical role for mast cells in IL-1 β -driven skin inflammation accompanying a disease-associated Nlrp3 mutation.
(42nd Annual ESDR Meeting, 2012. Sep 19-22, Venice, Italy)
14. 神戸直智 (2012) 教育講演 17 「炎症と免疫」自己炎症症候群と皮膚疾患の関連 - 治りにくい蕁麻疹について -
(第 111 回日本皮膚科学会総会, 6 月 1-3 日, 京都市)
15. 神戸直智 (2012) 教育講演 3 アレルギーと自己炎症症候群
(第 24 回日本アレルギー学会春期臨床大会, 5 月 12-13 日, 大阪市)
16. Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2011) Oligomerization of NLRP3 is induced downstream of cathepsin B in NLRP3-induced rapid programmed cell death
(第 40 回日本免疫学会学術集会, 11 月 27-29, 千葉市幕張)
17. 神戸直智 (2011) シンポジウム 11: アナフィラキシー NLRP3 インフラマソームを介したマスト細胞の活性化
(第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 11 月 10-12 日, 品川)
18. 神戸直智 (2011) 日本皮膚科学会認定皮膚科専門医研修講習会 (西部支部企画) 自己炎症性疾患 その疾患概念と臨床

症状

(第 63 回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 10 月 8-9 日, 宜野湾市)

19. Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2011) Homopolymerization of ASC using FKBP12 chimeric protein induced rapid cell death accompanied with IL-1 beta processing (41st Annual ESDR Meeting, 2011. Sep 7-10, Barcelona, Spain)
20. Kambe N, Satoh T, Matsue H. (2011) Peripheral CD14+ monocytes from early-onset sarcoidosis associated with NOD2 mutation do not show the molecular signature of NF-kappa B signaling (41st Annual ESDR Meeting, 2011. Sep 7-10, Barcelona, Spain)
21. 田中尚子, 井澤和司, 西小森隆太, 神戸直智, 河合朋樹, 酒井秀政, 八角高裕, 平家俊男 (2011) NLRP3 体細胞モザイクは CINCA 症候群の 25%以上に認められる (第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 7 月 17-20 日, 神戸市)
22. 金澤伸雄, 岡藤郁夫, 神戸直智, 古川福実 (2011) 自己炎症性肉芽腫形成における ICAM-1 と PDGF-B の関与 (第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 7 月 17-20 日, 神戸市)
23. Kambe N, Nakamura Y. (2011) Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome (22nd World Conference of Dermatology 2011, May 24-29, Seoul, Korea)
24. 西山瑞穂, 李 洪錦, 古川福実, 金澤伸雄, 岡藤郁夫, 神戸直智 (2011) 若年発症サルコイドーシス/ブラウ症候群に関連する NOD2 遺伝子変異を組み込んだ THP-1 細胞は, phorbol myristate acetate 添加により細胞表面に ICAM-1 を長期発現し, 一時的に PDGF-B を産生する (第 424 回日本皮膚科学会大阪地方会, 3 月 19 日, 大阪市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 神戸直智 (2012) II 各論 A 自己炎症性疾患 7. Blau 症候群/若年発症サルコイドーシス p86-9. III 症例 Blau 症候群/若年発症サルコイドーシス p207-9.
「自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患」診断と治療社

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

神戸 直智 (KAMBE, Naotomo)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50335254

(2)研究分担者

松江 弘之 (MATSUE, Hiroyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 10250424

(3)連携研究者

西小森 隆太 (NISHIKOMORI, Ryuta)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 70359800

小原 収 (OHARA, Osamu)
かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究部・部長
研究者番号: 20370926

斎藤 潤 (SAITO, Megumu)
京都大学・iPS 研究所・准教授
研究者番号: 20370926

中畑 龍俊 (NAKAHATA, Tatsutoshi)
京都大学・iPS 研究所・教授
研究者番号: 20110744