

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03731

研究課題名(和文) 栄養素感知に関わる腸管内分泌ホルモン分泌機構の統合的解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of enteroendocrine hormone secretion mechanisms involved in nutrient sensing

研究代表者

稲垣 暢也 (Inagaki, Nobuya)

公益財団法人田附興風会・医学研究所・理事長

研究者番号：30241954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：CCK産生細胞の腸管部位別遺伝子プロファイルの解析およびCA8による新規GLP-1分泌制御機構を解明した。また腸管内分泌細胞に発現するGPR120の生理的意義に関して検討した。腸管特異的GPR120ノックアウトマウスの解析から、腸管GPR120シグナルの抑制は、高脂肪食摂取下でのCCK作用を介したGIP分泌を減弱させることで、インスリン抵抗性・脂肪肝の改善に寄与することが示唆された。さらに中鎖脂肪酸が、長鎖脂肪酸-GPR120-CCK分泌経路を阻害し、CCK作用を介した長鎖脂肪酸摂取時GIP分泌を抑制することで、高脂肪食摂取時の肥満・インスリン抵抗性増大を軽減することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満・2型糖尿病患者の数は増加の一途をたどっており、全世界的に重要な健康問題であるが、有効かつ安全性の高い治療法は未だ確立されていないのが現状である。本研究で注目しているインクレチンを含めた腸管内分泌ホルモンはその治療標的として大変有望であり、その分泌・作用の詳細な制御機構を解明することで、糖尿病・肥満症の新たな治療法の開発、創薬につながることを期待され研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the intestinal site-specific gene profiles of CCK-producing cells and elucidated a novel regulatory mechanism of GLP-1 secretion by CA8. We also investigated the physiological significance of GPR120 expressed in enteroendocrine cells. Analysis of intestinal-specific GPR120 knockout mice suggested that suppression of intestinal GPR120 signaling contributes to the improvement of insulin resistance and fatty liver by reducing GIP secretion via CCK action under a high-fat diet. Furthermore, medium-chain fatty acids reduce obesity and increased insulin resistance during high-fat diet intake by inhibiting the long-chain fatty acid-GPR120-CCK secretory pathway and suppressing GIP secretion during long-chain fatty acid intake via CCK action.

研究分野：糖尿病・代謝

キーワード：腸管内分泌ホルモン インクレチン GLP-1 GIP CCK GPR120

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

gastric inhibitory polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide-1 (GLP-1) はともに、炭水化物や脂質、タンパク質などの栄養素の摂取によって分泌され、膵細胞からのインスリン分泌を促進する腸管内分泌ホルモンであるインクレチンとして知られているが、GIP および GLP-1 が全身の代謝調節に及ぼす作用には類似点や相違点が存在する。申請者らのグループは、GIP が高脂肪食摂取時の肥満形成・インスリン抵抗性を助長することを明らかにした(Naitoh R, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008)(Nasteska D, et al. *Diabetes.* 2014)。さらにその機序として、膵細胞における GIP シグナルが高脂肪食摂取肥満における高インスリン血症に關与すること(Harada N, et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008)、GIP 受容体(GIPR) が脂肪組織にも存在し、申請者の作製した脂肪組織特異的 GIPR 欠損マウスや GIP 遺伝子欠損マウスの解析から、脂肪組織における GIP シグナルが、interleukin-6 (IL-6) 発現を介した高脂肪食摂取下のインスリン抵抗性形成を助長することを報告している(Joo E, et al. *Diabetes.* 2017)。すなわち GIP は「脂肪摂取」と「肥満」をつなぐ重要な消化管ホルモンであり、GIP 過分泌抑制は高脂肪食摂取による肥満やインスリン抵抗性改善に有効と考えられる(Nasteska D, et al. *Diabetes.* 2014)。一方、GLP-1 は血糖降下に有利に働く多面的な生理活性を有しており、インスリン分泌促進作用だけでなく、膵細胞保護作用(Yamane S, et al. *J Diabetes Invest.* 2011)、視床下部を介した食欲抑制作用、胃排泄遅延作用、グルカゴン分泌抑制作用などが報告されている。したがって GIP、GLP-1 の分泌制御は肥満・糖尿病の創薬標的となりうるが、分泌制御機構に関しては不明な点が多く残されている。また長鎖脂肪酸受容体である GPR120 の欠損マウスでは、脂質による GIP 分泌が有意に低下するが、胆嚢収縮作用により腸管内への胆汁流出を促すコレシストキニン(cholecystokinin; CCK) の分泌も同時に低下しており、CCK アゴニストの事前投与により GPR120 欠損マウスの GIP 分泌が野生型マウスのレベルまで回復することを報告している(Sankoda A, et al. *Endocrinology.* 2017)。このことから脂肪酸-GPR120-CCK 分泌-胆汁-GIP 分泌の経路が想定されるが、この経路が全身の代謝状態の制御に及ぼす影響については明らかでない。

2. 研究の目的

GIP および GLP-1 の分泌は、栄養素による直接的な刺激に加え、CCK や胆汁などを介した複雑なネットワークにより精緻にコントロールされていることが推測されるが、詳細に関しては未解明である。申請者は GIP 遺伝子部位に緑色蛍光タンパク green fluorescent protein (GFP) の complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を挿入した GIP-GFP ノックインマウスの作製に世界で初めて成功した(Suzuki K, et al. *J Biol Chem.* 2013)。このマウスから K 細胞を単離し、発現する G タンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor、GPCR) である GPR40 および GPR120 や転写因子 regulatory factor X6 (Rfx6)、脂肪酸輸送タンパクである fatty acid-binding protein 5 (FABP5) など複数の分子が GIP の産生・分泌に關与していることを明らかにしている(Suzuki K, et al. *J Biol Chem.* 2013) (Shibue K, et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015)(Iwasaki K, et al. *Endocrinology.* 2015)(Sankoda A, et al. *Endocrinology.* 2017)(Ikeguchi E, et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2018)。また名古屋大学の林良敬教授との共同研究により、グルカゴン(Gcg)遺伝子に GFP をノックインした L 細胞可視化マウス(Gcg-GFP ノックインマウス) (Hayashi Y, et al. *Mol Endocrinol.* 2009) を用いて L 細胞の単離回収にも成功しており(Suzuki K, et al. *J Diabetes Investig.* 2018)、さらに CCK 産生細胞(I 細胞) 特異的に赤色蛍光タンパク tdTomato を発現するマウス(CCKtdTomato マウス) を新たに創出した。本研究ではこれらのマウスを用いて CCK・GIP・GLP-1 個々の分泌機構の解析を進めるとともに、各ホルモン間の相互作用などの重層的分泌制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) K 細胞・L 細胞・I 細胞の腸管内局在および発現プロファイル比較

GIP、GLP-1、CCK の相互ネットワークを検討するうえで、それぞれの分泌細胞の位置的關係や発現プロファイルを正確に把握し、比較することは極めて重要となる。K 細胞可視化マウス(GIP-GFP ノックインマウス) と L 細胞可視化マウス(Gcg-GFP ノックインマウス) および今回新たに作製した I 細胞可視化マウス(CCK-tdTomato マウス) を用いてこの解析が可能となる。GFP は緑色、tdTomato は赤色の蛍光タンパクであることから、K 細胞が GFP で、I 細胞が tdTomato で標識された GIP-GFP/CCK-tdTomato マウスを作製することにより、GIP 単独陽性、CCK 単独陽性、GIP/CCK 共陽性細胞(K/I 細胞) の局在や重複を評価できる。また同様に Gcg-GFP/CCK-tdTomato マウスを用いて L 細胞と I 細胞の位置的關係が評価可能である。さらに GIP-GFP マウス、Gcg-GFP マウスおよび CCK-tdTomato マウス腸管から単離した K 細胞・L 細胞・I 細胞それぞれのマイクロアレイ解析を行い、各細胞の発現プロファイルを比較する。

2) GPR120-CCK-GIP 経路が全身の代謝状態に及ぼす影響についての検討

GPR120 の全身欠損マウスでは、脂質による CCK 分泌および GIP 分泌が有意に低下するもの

の、CCK アゴニストの事前投与により野生型マウスのレベルまで回復することから(Sankoda A, et al. Endocrinology. 2017)、脂質摂取-I 細胞 GPR120-CCK 分泌-GIP 分泌といった経路が想定される。GPR120 は L 細胞にも発現を確認しているが、GPR120 全身欠損マウスの脂肪摂取時 GLP-1 分泌は野生型マウスと比べ有意な低下を認めなかった(Iwasaki K, et al. Endocrinology. 2015)。一方でマクロファージや脂肪細胞における GPR120 の発現も報告されており、全身欠損マウスでは肥満やインスリン抵抗性の増大が認められる(Ichimura A, et al. Nature 2012, Oh Y, et al. Nature Med 2014)。腸管内の GPR120 シグナルの減弱は CCK 分泌の低下を介して GIP の過分泌を抑制し、高脂肪食摂取による肥満・インスリン抵抗性の形成を緩和できる可能性があるが、全身欠損マウスでは評価困難である。腸管における GPR120 シグナルの生理的意義を検討するため、腸管上皮特異的 GPR120 欠損マウスを作製し、表現型を評価した。

3) 中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT) による高脂肪食摂取時肥満抑制機序の解明

中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT) は肥満を形成しにくい脂肪として知られている。しかしながら、脂肪蓄積や全身の代謝状態の制御に重要な腸管内分泌ホルモン分泌に中鎖脂肪酸がどのような影響を及ぼすかはこれまで検討されておらず、本研究では以下の検討を行った。

長鎖脂肪酸トリグリセリド (LCT) オイルおよび LCT+MCT 混合オイルを野生型マウスに単回投与し、GLP-1, GIP 血中濃度、CCK 作用 (腸管内リパーゼ活性, 胆嚢収縮量) を評価するマウス小腸細胞株 STC-1 を用いて、長鎖脂肪酸 (LCFA)、中鎖脂肪酸 (MCFA) 刺激時腸管内分泌ホルモン分泌を評価する

GPR120 発現 HEK293 細胞を用いて、LCFA/MCFA 存在下細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を評価する (GPR120 シグナル介在の可能性を検討)

GIP 欠損マウスにおける MCT オイルの高脂肪食摂取時肥満抑制効果を評価する

4. 研究成果

1) マウスの Cck プロモーターを活性化して赤色蛍光タンパク質 tdTomato (Tomato) を産生する CCK レポーターマウスを作製した。フローサイトメーターによる解析では小腸上部、小腸下部、大腸の上皮細胞における Tomato 陽性細胞の比率は、それぞれ 0.95、0.54、0.06% であった。脂肪酸受容体 Gpr120、Gpr40、Gpr43、オレオイルエタノールアミド受容体 Gpr119 は、小腸から単離した Tomato 陽性細胞で高い発現を示したが、大腸の Tomato 陽性細胞では発現が見られなかった。グルコースおよびフルクトースの輸送体である Sgl1、Glut2、Glut5 は、Tomato 陽性細胞と陰性細胞の両方で発現していたが、これらの輸送体の Tomato 陽性細胞における発現量は、小腸上部から大腸にかけて減少する傾向が見られた。ペプチド輸送体 Pept1 とペプチド受容体 Gpr93 は Tomato 陽性細胞と陰性細胞の両方に発現していたが、カルシウム感受受容体 (Casr) は小腸の Tomato 陽性細胞にのみ発現していた。このような結果から I 細胞の数や I 細胞での遺伝子発現が、消化管の部位によって異なることが明らかになった(Kato T, et al. J Mol Endocrinol. 2021)。

また GLP-1 産生 L 細胞で高い発現を認める炭酸脱水酵素 8 (carbonic anhydrase 8: CA8) に関して、腸管内分泌細胞株 STC-1 を用いて、CA8 の発現抑制により長鎖脂肪酸刺激による GLP-1 分泌が増強、過剰発現により減弱すること、さらに CA8 欠損マウスのコーン油負荷後 GLP-1 分泌は野生型マウスに比べて有意に高値であることも見出し報告した(Fujiwara et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2021)。

K 細胞可視化マウス(GIP-GFP ノックインマウス) と L 細胞可視化マウスおよび今回新たに作製した I 細胞可視化マウスを用いて、それぞれの分泌細胞の位置的關係や重複についての解析を進めている。

2) 腸管における GPR120 シグナルが代謝調節におよぼす影響を明らかにするため、腸管特異的 GPR120 ノックアウトマウスを作成した。腸管特異的 GPR120 ノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して、LCT 単回投与後のインスリン、GLP-1、ペプチド YY (PYY) 分泌は変化せず、GIP 分泌および CCK 作用が低下した。高 LCT 食下では、腸管特異的 GPR120 ノックアウトマウスの体重は軽度減少し、インスリン抵抗性と脂肪肝は大幅に改善した。さらに腸管特異的 GPR120 ノックアウトマウスの肝臓と白色脂肪組織(WAT)では、Akt リン酸化が増加し、インスリンシグナルを抑制するサイトカインシグナル抑制因子 (SOCS) 3 の遺伝子発現が低下していた。また腸管特異的 GPR120 ノックアウトマウスでは、WAT における炎症性サイトカインや肝臓の脂質生成分子の遺伝子発現が低下していた。これらの結果から、腸管における GPR120 シグナルの減弱は、CCK 分泌の低下を介して高脂肪食摂取による GIP の過分泌を抑制し、肥満・インスリン抵抗性の形成を緩和することが明らかとなった。

3) 中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT) による高脂肪食摂取時肥満抑制機序の解明について進展が見られた。12 週齢野生型マウスに対して LCT オイルおよび混合オイル (LCT+MCT) を単回投与したところ、混合オイル投与では LCT オイルと比較して血中 GIP 濃度と CCK 作用 (腸管内リパーゼ活性, 胆嚢収縮量) の低下を認め、この低下は CCK アゴニストの投与により完全に回復した。さらにマウス小腸細胞株 STC-1 を長鎖脂肪酸 (LCFA)、中鎖脂肪酸 (MCFA) で刺激したところ、LCFA は CCK 分泌を誘導するが MCFA では CCK 分泌が見られず、MCFA の添

加によって LCFA 誘導性 CCK 分泌は低下した。さらに MCFA は GPR120 発現 HEK293 細胞において LCFA 誘導性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制した。以上の結果から MCFA は LCFA-GPR120-CCK 分泌経路を阻害することにより、CCK 作用を介した LCT 摂取時 GIP 分泌を抑制することが示唆された。また 6 週齢マウスに生理食塩水 (コントロール群) または MCT オイル (MCT 群) の経口投与下で 45% 高脂肪食を 12 週間負荷したところ、野生型マウス (WT) では MCT 投与による血中 GIP 濃度の抑制、体重・体脂肪量の有意な低下、インスリン感受性・エネルギー消費量の増大を認めたが、GIP 欠損マウス (KO) では、コントロール群と MCT 群の間で差を認めなかった。WT において経口ブドウ糖負荷 15 分後のインスリン濃度は MCT オイル群でコントロール群と比較して有意に低下した (血糖値は有意差なし)。一方 KO では糖負荷後血糖値・インスリン濃度に 2 群間の差は認められなかった。これらの結果から、MCT オイルは GIP 分泌抑制を介して長期高脂肪食摂取下の肥満・インスリン抵抗性を軽減することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murata Y, Harada N, Kishino S, Iwasaki K, Ikeguchi-Ogura E, Yamane S, Kato T, Kanemaru Y, Sankoda A, Hatoko T, Kiyobayashi S, Ogawa J, Hirasawa A, Inagaki N.	4. 巻 24
2. 論文標題 Medium-chain triglycerides inhibit long-chain triglyceride-induced GIP secretion through GPR120-dependent inhibition of CCK	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102963.	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 Kato Tomoko, Harada Norio, Ikeguchi-Ogura Eri, Sankoda Akiko, Hatoko Tomonobu, Lu Xuejing, Yasuda Takuma, Yamane Shunsuke, Inagaki Nobuya	4. 巻 66
2. 論文標題 Gene expression of nutrient-sensing molecules in I cells of CCK reporter male mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 11～22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JME-20-0134	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 Fujiwara Yuta, Yamane Shunsuke, Harada Norio, Ikeguchi-Ogura Eri, Usui Ryota, Nakamura Toshihiro, Iwasaki Kanako, Suzuki Kazuyo, Yabe Daisuke, Hayashi Yoshitaka, Inagaki Nobuya	4. 巻 320
2. 論文標題 Carbonic anhydrase 8 (CAR8) negatively regulates GLP-1 secretion from enteroendocrine cells in response to long-chain fatty acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G617～G626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00312.2020	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 Yasuda Takuma, Harada Norio, Hatoko Tomonobu, Ichimura Atsuhiko, Ikeguchi-Ogura Eri, Murata Yuki, Wada Naoki, Kiyobayashi Sakura, Yamane Shunsuke, Hirasawa Akira, Inagaki Nobuya	4. 巻 324
2. 論文標題 Inhibition of GPR120 signaling in intestine ameliorates insulin resistance and fatty liver under high-fat diet feeding	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E449～E460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpendo.00329.2022	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12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田範雄
2. 発表標題 消化管ホルモン分泌を介した栄養素摂取後の代謝調節
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田範雄
2. 発表標題 栄養素に対するインクレチン分泌機序
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田範雄
2. 発表標題 栄養素に対するインクレチンの分泌機序
3. 学会等名 第54回糖尿病学の進歩
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田範雄・稲垣暢也
2. 発表標題 栄養素摂取後の消化管ホルモン分泌を介した代謝調節
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池口 絵里, 原田 範雄, 村田 由貴, 波床 朋信, 許林 櫻華, 盧 雪セイ, 安田 拓真, 山根 俊介, 稲垣 暢也
2. 発表標題 中鎖脂肪酸トリグリセリドは高脂肪食負荷下のGIP分泌抑制を介して肥満やインスリン抵抗性を軽減する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 朋子, 原田 範雄, 池口 絵理, 三小田 亜希子, 波床 朋信, 盧 雪セイ, 安田 拓真, 山根 俊介, 稲垣 暢也
2. 発表標題 CCKレポーターマウスを用いたI細胞における栄養素感知に関わる分子の遺伝子解析
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 許林 櫻華, 原田 範雄, 村田 由貴, 波床 朋信, 池口 絵里, 加藤 朋子, 盧 雪セイ, 安田 拓真, 山本 果奈, 山根 俊介, 稲垣 暢也
2. 発表標題 コレシストキニンの作用阻害は食欲増加を介して肥満とインスリン抵抗性を誘導する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波床 朋信, 原田 範雄, 徳本 信介, 山根 俊介, 池口 絵里, 安田 拓真, 加藤 朋子, 龍岡 久登, 桑原 智子, 矢部 大介, 林 良敬, 稲垣 暢也
2. 発表標題 組織透明化による3次元腸管を用いた腸管上皮細胞およびインクレチン分泌細胞の解析
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原雄太, 山根俊介, 原田範雄, 池口絵理, 岩崎可南子, 鈴木和代, 臼井亮太, 矢部大介, 林良敬, 稲垣暢也
2. 発表標題 炭酸脱水酵素 8 (Car8)によるGLP-1分泌制御機構の解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田 範雄, 村田 由貴, 岸野 重信, 山根 俊介, 加藤 朋子, 池口 絵里, 岩崎 可南子, 金丸 良徳, 三小田 亜希子, 小川 順, 平澤 明, 稲垣 暢也
2. 発表標題 中鎖脂肪酸トリグリセリドはGPR120を介して長鎖脂肪酸トリグリセリド摂取時のGIP分泌を抑制する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田 拓真, 原田 範雄, 波床 朋信, 市村 敦彦, 池口 絵里, 村田 由貴, 許林 櫻華, 山根 俊介, 平澤 明, 稲垣 暢也
2. 発表標題 腸管に発現する脂肪酸受容体GPR120の機能解析
3. 学会等名 第37回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田 拓真, 原田 範雄, 波床 朋信, 市村 敦彦, 池口 絵里, 村田 由貴, 許林 櫻華, 山根 俊介, 平澤 明, 稲垣 暢也.
2. 発表標題 腸管における脂肪酸受容体GPR120の欠損は高脂肪食摂取下のインスリン抵抗性と脂肪肝を軽減する
3. 学会等名 第26回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2022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	原田 範雄 (Harada Norio) (50530169)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	林 良敬 (Hayashi Yoshitaka) (80420363)	名古屋大学・環境医学研究所・教授 (13901)	
研究分担者	山根 俊介 (Yamane Shunsuke) (90582156)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

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