

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08770

研究課題名(和文) 神経膠腫におけるfibulin-7の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of fibulin-7 in glioma

研究代表者

デベガ スサーナ (de Vega, Susana)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：30623590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫は強い浸潤能と異常血管で特徴付けられている。本研究では、Fibulin-7 (Fbln7)が膠芽腫の異常血管で高発現し、Angiopoietin-1(Ang1)との結合でAng1-Tie2シグナルを阻害することを示した。また、高濃度VEGF刺激で異常血管網形成を来す共培養系を開発し、Fbln7はAng1との結合でAng2-Tie2シグナルを優位に導き異常血管網形成に関わることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は術後の再発や放射線療法や化学療法の治療効果は限定的であることから、きわめて予後不良である。本研究で得られたFbln7によるAng1との特異的な結合とそれによるAng2-Tie2シグナル優位に基づく異常血管新生のデータは、再発性膠芽腫患者に現在汎用されている抗VEGF抗体薬と化学療法の併用療法に、Ang1の正常化を誘導する治療法を加えることの重要性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Malignant transformation and abnormal angiogenesis of glioma may involve a tissue microenvironment created by the production of extracellular matrix (ECM). Here we show that fibulin-7 (Fbln7), an ECM molecule, is overexpressed in endothelial cells and pericytes of abnormal blood vessels in glioblastoma. Vascular endothelial cells stimulated with VEGF upregulate Fbln7, which specifically binds to angiopoietin-1 (Ang1), resulting in suppression of Ang1-Tie2 signaling. In a coculture assay using HUVEC and HBVP, multilayered and irregular-shaped tube-like structures of HUVEC were induced with 500 ng/ml VEGF. VEGF-induced aberrant tube-like structures were attenuated with antibody or synthetic peptides specific to Fbln7 or knockdown of Fbln7. These data demonstrate that Fbln7 is overexpressed by endothelial cells and pericytes of the abnormal microvessels in glioblastoma and suggest that Fbln7 may contribute to the aberrant vessel formation by modulation of the Ang1/Ang2-Tie2 axis.

研究分野：分子病理学

キーワード：神経膠腫 細胞外マトリックス フィビュリン-7 組織内微小環境 異常血管形成 血管内皮細胞 周皮細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオーマ)は、頻度の高い原発性脳悪性腫瘍であり、著しい浸潤能と異常血管新生により特徴付けられている。周囲脳組織への瀰漫性浸潤のために外科手術による腫瘍全摘は困難であり、術後の放射線療法や化学療法の治療効果は限定的なことから、きわめて予後不良な悪性腫瘍である。神経膠腫組織では、細胞外マトリックス(ECM)やそれに沈着した生理活性分子からなる組織内微小環境が劇的に変化することが知られている。正常脳組織のECMはヒアルロン酸やプレビカンなどのプロテオグリカンが主体であるが、神経膠腫組織ではこれら既存分子の分解が生じるとともに、新規ECM分子の異常産生が誘導される。また、血管内皮増殖因子(VEGF)などの増殖因子の過剰産生とともに、それら生理活性分子の貯蔵庫(reservoir)となるECMのダイナミックな変化が、神経膠腫細胞の浸潤や血管新生の制御に関与している。研究代表者は、一連のECMに関する研究を通して、フィビュリン-7(Fbln7)という新規のECM分子を見出し、本分子のフラグメントが血管新生抑制作用を有することを明らかにしてきた。一方、最近のOncomine databaseでは、Fbln7が幾つかの腫瘍、特に脳腫瘍で高発現していることが示されたため、研究代表者はTumor tissue array(Biomax社)を用いて予備実験を行い、神経膠腫組織での発現亢進のデータを確認した。神経膠腫ではチロシンキナーゼ型受容体Tie2も高発現しており、リガンドである2種類のAngiopoietin(Ang1とAng2)と結合し、Ang1-Tie2シグナルは血管の安定化と成熟に働き、Ang2-Tie2シグナルは内皮細胞の発芽を誘導することが知られている。また、Ang1やAng2などは未知のECMと結合することが示唆されており、相互作用を介して血管新生が正負の方向に制御されることも推定される。これらのデータを考え合わせると、神経膠腫で高発現したFbln7はAng1/Ang2との結合によりAng1-Tie2やAng2-Tie2のシグナルを変化させて本腫瘍の異常血管新生に関わる可能性が示唆される。しかし、神経膠腫組織におけるFbln7の発現細胞、Fbln7のAng1/Ang2/Tie2分子との結合能、Fbln7の血管新生に対する正負の作用、Fbln7の神経膠腫細胞に対する作用の有無など、神経膠腫におけるFbln7の機能に関してはほとんど不明である。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では、神経膠腫組織におけるFbln7の発現細胞を同定するとともに、全長Fbln7のAng1/Ang2/Tie2分子との結合能を検討する。また、神経膠腫における異常な血管新生に類似した新規血管新生アッセイ法を開発し、それを用いてFbln7の異常血管新生に対する作用を解析することを目的とした。さらに、Fbln7のC末端フラグメントによる血管新生抑制作用についても詳細に検討することを計画した。より具体的な研究項目は以下の通りである。

- (1) ヒト神経膠腫組織でのFbln7の発現解析
- (2) Fbln7のAng1/Ang2/Tie2分子との結合実験
- (3) 共培養系を用いた血管新生アッセイ開発によるFbln7の機能解析
- (4) Fbln7のC末端フラグメントによる血管新生抑制効果検討

3. 研究の方法

本研究で行った研究方法は以下の通りである。

- (1) ヒト神経膠腫組織内でのFbln7発現解析:

瀰漫性星細胞種(n=8)、退形成性星細胞種(n=6)、膠芽腫(n=15)および正常脳組織(n=9)のホモジネートについて、抗Fbln7抗体(Abcam)を用いてイムノプロット法でFbln7タンパク質のバンドを検出し、それぞれの症例におけるバンドをデンストメーターで測定することでFbln7の発現レベルと決定した。また、上記の組織のパラフィン切片について抗Fbln7抗体(Abcam)を用いて免疫染色により局在を検討した。Fbln7は膠芽腫の異常血管構成細胞を中心に局在したので、血管内皮細胞と周皮細胞のマーカー分子であるCD31と α -smooth muscle actinに対する抗体(AbcamとSigma-Aldrich)と抗Fbln7抗体(Abcam)を用いた二重蛍光抗体法でFbln7発現細胞の同定を試みた。

- (2) Fbln7の結合実験:

Microtiter plate をリコンビナントFbln7(R&D System)あるいはウシ血清アルブミンでコーティング後、His-tag を付けたリコンビナントAng1、Ang2あるいはTie2タンパク質とインキュベートし、結合能をHRP標識された抗His-tag抗体を用いて検討した。結合阻害実験では、Fbln7でコーティングしたmicrotiter plate をFbln7のN末端特異的抗体(Abcam)、C末端特異的抗体(Abcam)、Ang1のN末端特異的抗体(Abcam)、全長に対する抗体(Sigma-Aldrich)あるいは非免疫正常IgG(DAKOあるいはSanta Cruz Biotechnology)で処理した後に、リコンビナントAng1との結合アッセイを行った。また、同様な方法で、Fbln7のN末端とC末端に対する合計4種類の合成ペプチド(Biopolymers 106:184-195, 2015)でFbln7コーティングmicrotiter plate を処理後にAng1の結合アッセイを実施した。さらに、HA-tagを持つFbln7とHis-tagを有するAng1を1:1のモル比でインキュベート後、抗His-tag抗体で標識したProtein-G dynabeadsにより複合体をpull-downした。

(3) 培養血管内皮細胞での Ang1-Tie2 シグナリング解析：

ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、Ang1 (0 あるいは 400 ng/ml)、Ang1-Fbln7 複合体 (400 ng/ml Ang1 と 800 ng/ml Fbln7) と 37°C で 10 分間インキュベートし、細胞融解物を電気泳動した。泳動されたタンパク質を抗 Tie2 抗体 (R&D System) あるいは抗リン酸化 Tie2 抗体 (R&D System) を用いてイムノブロット法で Tie2 タンパク質のリン酸化の程度を検討した。

(4) 共培養系を用いた血管新生アッセイ開発と同アッセイ系における Fbln7 の機能解析：

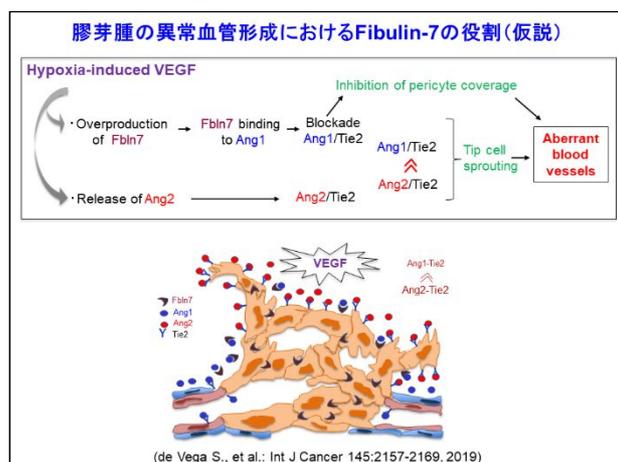
LabTek chamber slide 上に周皮細胞 (HBPV) (3×10^4 cells/well) をコンフルエントになるまで 5 日間培養し、HUVEC (3×10^4 cells/well) を播種し、VEGF (0、10、10 あるいは 500 ng/ml) を添加した培養液 (2% FBS 含有 EBM-2) で 4 日間培養した。培養後にパラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100 で透過処理後に抗 CD31 抗体を用いて蛍光抗体法で血管内皮細胞の形態を共焦点顕微鏡で観察した。Fbln7 と CD31 および Fbln7 と Ang1 に対する二重免疫染色は、それぞれの特異抗体で処理後に蛍光抗体法により検討した。また、HUVEC 細胞の増生による血管網形成の解析には、染色写真について、チューブ構造の面積、血管ループの数、チューブの厚さ、分岐の数、フィロポディアの数を測定することで定量化した。

4. 研究成果

ヒトグリオーマ組織ホモジネートを用いてイムノブロット法で Fbln7 の発現を解析したところ、Fbln7 は膠芽腫で著しく発現亢進していた。膠芽腫の免疫染色では、一部の膠芽腫細胞に軽度の陽性所見を認めるも、Fbln7 は膠芽腫で増生した異常血管構成細胞 (血管内皮細胞と周皮細胞) で強く発現していた。一方、正常脳組織、瀰漫性星細胞種、退形成性星細胞種では免疫染色はほとんど陰性であった。抗 Fbln7 抗体と抗 CD31 抗体 (血管内皮細胞マーカー) あるいは抗 Fbln7 抗体と抗 α -smooth muscle actin 抗体 (周皮細胞マーカー) を用いた二重蛍光抗体法では、Fbln7 は血管内皮細胞と周皮細胞の両方で発現することが明らかとなった。これら細胞における Fbln7 の発現は、培養下の HUVEC (血管内皮細胞) や HBVP (周皮細胞) においても確かめられた。これらの培養細胞を 10 ng/ml VEGF で刺激すると、HUVEC において約 1.4 倍程度の Fbln7 産生亢進を認めたと、HBVP では発現に変化はみられなかった。

次いで、全長 Fbln7 タンパク質と Ang1、Ang2、Tie2 の各タンパク質との結合実験を行ったところ、Fbln7 は Ang1 と特異的に結合し、Fbln7-Ang1 の結合は Fbln7 の N 末端に特異的な抗体やペプチドとのインキュベーションで阻害され、Ang1 の N 末端特異的抗体でも阻害されることから、本結合は Fbln7 と Ang1 の N 末端ドメイン同士の結合であることが示された。また、Fbln7-Ang1 の結合により、HUVEC における Ang1 の受容体である Tie2 のリン酸化が有意に抑制されることが証明された。これらのデータから、Fbln7 は膠芽腫における異常血管構成細胞で過剰発現しており、Fbln7 の Ang1 への特異的結合により、血管内皮細胞での Ang1-Tie2 シグナル抑制に働くことが示唆された。この現象が膠芽腫の異常血管形成にどのように関わるかを検討するために、血管内皮細胞と周皮細胞の共培養系を用いた新規血管新生アッセイ系を開発した。

周皮細胞 HBVP を単層培養し、コンフルエントになった後に血管内皮細胞 HUVEC を培養し、本共培養系に 10、100、500 ng/ml の VEGF を添加して HUVEC を抗 CD31 抗体で免疫染色したところ、高濃度 VEGF (500 ng/ml) の添加により、血管内皮細胞の多層性で不規則に分岐するチューブ状血管網が出現し、あたかも膠芽腫で観察される異常血管に類似した構造を示した。本アッセイ系では、500 ng/ml の VEGF 刺激で Fbln7 産生は 4 倍亢進しており、蛍光抗体法では Ang1 は Fbln7 陽性の HUVEC 周囲に位置しており、両分子の相互作用が示唆された。本アッセイ法を用いて、500 ng/ml の VEGF 刺激した状態で、Fbln7 の N 末端に対する特異的抗体や特異ペプチドを添加すると、上記の異常血管網構造は正常化した。また、HUVEC における Fbln7 発現を siRNA でノックダウンしても同様な異常血管網の形成が抑制された。以上の結果から、膠芽腫の血管内皮細胞や周皮細胞で過剰発現した Fbln7 は、Ang1-Tie2 系シグナルを阻害することで Ang2-Tie2 系が優位となった組織内微小



環境を創出することで、VEGF 誘導性異常血管形成に関わる可能性が示され (左図) 論文発表した (Int J Cancer 145:2157-2169, 2019)。

一方、高濃度 VEGF 存在下における全長 Fbln7 の異常血管形成への関与とは別に、Fbln7 の C 末端ドメインには血管新生を阻害することを明らかにしており、その詳細な機序について検討した。その結果、本作用は Fbln7 の C 末端フラグメントが VEGF 受容体と相互作用することで生じることを網膜血管新生アッセイで示した (Sci Rep 5:17654, 2018; Microvasc Res 129:103986, 2020)。このような Fbln7 のフラグメントによる血管新生阻害作用は、組織内で Fbln7 がプロテアーゼにより分解された場合に出現すると考えられ、Fbln7 の分解に関わるプロテアーゼの検討や病態の解析が今後の課題と考えられる。

Fbln7 は分泌されて細胞外に存在することから ECM 分子として分類されているが、通常の ECM 分子とは異なり、細胞機能調節作用が強い matricellular protein である。発現組織の微小環境によって種々の機能を発揮するが、本研究データから、膠芽腫のような高濃度の VEGF が存在する組織内微小環境下では、Fbln7 は異常血管網の形成に関わり、より生理的な環境においては、分解によりフラグメント化して血管新生抑制効果を発揮する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Susana de Vega, Akihiko Kondo, Mario Suzuki, Hajime Arai, Shabierjiang Jiapaer, Hemragul Sabit, Mitsutoshi Nakada, Tomoko Ikeuchi, Muneaki Ishijima, Eri Arikawa-Hirasawa, Yoshihiko Yamada and Yasunori Okada	4. 巻 145(8)
2. 論文標題 Fibulin-7 is overexpressed in glioblastomas and modulates glioblastoma neovascularization through interaction with angiopoietin-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2157-2169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32306	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 該当する
1. 著者名 Ikeuchi Tomoko, de Vega Susana, Forcinito Patricia, Doyle Andrew D., Amaral Juan, Rodriguez Ignacio R., Arikawa-Hirasawa Eri, Yamada Yoshihiko	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Extracellular protein fibulin-7 and its C-terminal fragment have in vivo antiangiogenic activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17654-17664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36182-w	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 該当する
1. 著者名 Chiba Y, He B, Yoshizaki K, Rhodes C, Ishijima M, Bleck CKE, Stempinski E, Chu EY, Nakamura T, Iwamoto T, de Vega S, Saito K, Fukumoto S, Yamada Y	4. 巻 294(10)
2. 論文標題 The transcription factor AmeloD stimulates epithelial cell motility essential for tooth morphology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 3406-3418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005298	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 該当する
1. 著者名 He B., Chiba Y., Li H., de Vega S., Tanaka K., Yoshizaki K., Ishijima M., Yuasa K., Ishikawa M., Rhodes C., Sakai K., Zhang P., Fukumoto S., Zhou X., Yamada Y.	4. 巻 98
2. 論文標題 Identification of the novel tooth-specific transcription factor AmeloD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 234 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034518808254	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 該当する

1. 著者名 Sarangi PP, Chakraborty P, Dash SP, Ikeuchi T, de Vega S, Ambatipudi K, Wahl L, Yamada Y.	4. 巻 32(9)
2. 論文標題 Cell adhesion protein fibulin-7 and its C-terminal fragment negatively regulate monocyte and macrophage migration and functions in vitro and in vivo.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 4889-4898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201700686RRR	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 該当する

1. 著者名 Nakamura T, Jimenez-Rojo L, Koyama E, Pacifici M, de Vega S, Iwamoto M, Fukumoto S, Unda F, Yamada Y.	4. 巻 32(3)
2. 論文標題 Epiprofin regulates enamel formation and tooth morphogenesis by controlling epithelial-mesenchymal interactions during tooth development.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Bone Miner Res	6. 最初と最後の頁 601-610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.3024	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 該当する

1. 著者名 Ikeuchi Tomoko, Kanan Yogita, Long Da, de Vega Susana, Hozumi Kentaro, Nomizu Motoyoshi, Campochiaro Peter A., Yamada Yoshihiko	4. 巻 129
2. 論文標題 Fibulin-7 C-terminal fragment and its active synthetic peptide suppress choroidal and retinal neovascularization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microvascular Research	6. 最初と最後の頁 103986 ~ 103986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mvr.2020.103986	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 Hayashi Chikako, Suzuki Nobuharu, Mabuchi Yo, Kikura Naomi, Hosoda Yukina, de Vega Susana, Akazawa Chihiro	4. 巻 523
2. 論文標題 The extracellular domain of teneurin-4 promotes cell adhesion for oligodendrocyte differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 171 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.002	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 de Vega Susana, Yoshida Hiroyuki, Okada Yasunori	4. 巻 2132
2. 論文標題 Expression and characterization of hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization: HYBID, Alias KIAA1199 and CEMIP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 129 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0430-4_13	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 Shiozawa Jun, de Vega Susana, Cilek Mehmet Z., Yoshinaga Chiho, Nakamura Tomomi, Kasamatsu Shinya, Yoshida Hiroyuki, Kaneko Haruka, Ishijima Muneaki, Kaneko Kazuo, Okada Yasunori	4. 巻 190
2. 論文標題 Implication of HYBID (hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization) in hyaluronan degradation by synovial fibroblasts in patients with knee osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1046 ~ 1058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.01.003	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Susana de Vega, Akihito Kondo, Mario Suzuki, Eri Arikawa-Hirasawa and Yasunori Okada
2. 発表標題 Fibulin-7 overproduction contributes to glioma vascularization via interaction with angiopoietin-1
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Susana de Vega, Akihito Kondo, Mario Suzuki, Eri Arikawa-Hirasawa, Yasunori Okada
2. 発表標題 Overexpression of Fibulin-7 Modulates the Ang1-Tie2 System and Contributes to the Aberrant Vasculature in Glioblastoma
3. 学会等名 Matrix Biology Europe (国際学会)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Susana de Vega
2. 発表標題 Fibulin-7, a non-elastogenic short fibulin, modulates the abnormal vascularization in glioblastoma brain tumor
3. 学会等名 第2回エラスチン・関連分子研究会学術集会出張報告書（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Susana de Vega, Akihito Kondo, Mario Suzuki, Eri Arikawa-Hirasawa and Yasunori Okada
2. 発表標題 Analysis of the expression and prospective role of Fibulin-7 in aberrant blood vessel formation in glioblastoma
3. 学会等名 第49回日本結合組織学会学術大会抄録
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Susana de Vega, Akihito Kondo, Mario Suzuki, Hajime Arai, Shabierjiang Jiapaer, Hemragul Sabit, Mitsutoshi Nakada, Tomoko Ikeuchi, Muneaki Ishijima, Eri Arikawa-Hirasawa, Yoshihiko Yamada and Yasunori Okada
2. 発表標題 Role of the matricellular protein Fibulin-7 in glioblastoma vascularization
3. 学会等名 The Matricellular Proteins in Tissue Remodeling and Inflammation Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Susana de Vega, Mitsutoshi Nakada, and Yasunori Okada
2. 発表標題 Fibulin-7 modulates glioblastoma neovascularization via regulation of the Ang1/Ang2-Tie2 system
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Susana de Vega, Yasunori Okada
2. 発表標題 Understanding the challenges in glioblastoma treatment
3. 学会等名 II Meeting of Spanish Researchers in Japan
4. 発表年 2019年～2020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	岡田 保典 (Okada Yasunori) (00115221)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授 (32620)	