

IgEを介した新たなマスト細胞活性化機構の解明

羅智靖¹⁾, 布村 聡¹⁾, 高橋恭子²⁾, 下川敏文¹⁾, 徳橋泰明¹⁾, 岡山吉道¹⁾

Elucidation for novel mechanisms of IgE-dependent mast cell activation

Chisei RA¹⁾, Satoshi NUNOMURA¹⁾, Kyoko TAKAHASHI²⁾, Toshibumi SHIMOKAWA¹⁾,
Yasuaki TOKUHASHI¹⁾, Yoshimichi OKAYAMA¹⁾

要旨

マスト細胞はアレルギー炎症を始めとする局所の炎症のコンダクターとして機能する。本研究では、免疫応答の盛んな粘膜組織に定着し、広く感染・炎症・免疫・アレルギーに、さらに組織の修復においてコンダクターとして機能する。本研究では、マスト細胞に焦点を絞り、マスト細胞の過剰な活性化の制御を原理とした新たなアレルギー治療法の開発を目指した。本研究プロジェクトの成果から、①ヒトのマスト細胞では、ヒトの好塩基球と異なり、IgE+を介したHRFによるマスト細胞の活性化がほとんど認められず、もしくは極めて活性化能が低い可能性が示唆された。また②FcεRIβ鎖が、γ鎖とは非依存性のシグナル伝達経路を持ち、特にLTC4の産生に寄与していることや、③β鎖のITAMペプチドは、マーモセットのマスト細胞の活性化を抑制することを初めて明らかにした。

1. はじめに

マスト細胞は殆ど全身の臓器、組織に分布するが、特に外界に接する皮膚や、気道、消化管などの免疫応答の盛んな粘膜組織の血管周囲に多数定着している。この位置取りは、細菌やウイルスなどの病原体や外来の異物に直接曝されることを意味し、感染時にはこれらの病原体を排除する自然免疫に携わる一方で、IgEやIgGと抗原の免疫複合体は、FcRを介してマスト細胞を活性化し、種々の炎症性メディエーターを放出させ、マスト細胞はアレルギー炎症を始めとする局所の炎症のコンダクターとして機能する。これに加えてマスト細胞の活性化によって細胞外へ放出された顆粒がTNF-αを含んだ状態で二次リンパ組織へ速やかに到達することにより、免疫系全体が賦活化されることが近年明らかにされた¹⁾。即ち、マスト細胞は単に即時相の反応を起動するのみではなく、遅発相における免疫応答の修飾に関与し、炎症の慢性化、増悪において中心的な役割を果たすことが類推される。例えば、繰り返す局

所の慢性刺激により、そこに形成された慢性アレルギー性炎症の“増悪サイクル”の制御因子はIgEとマスト細胞であり、花粉症の鼻粘膜、あるいは喘息の気管支粘膜などアレルギー炎症局所で、マスト細胞とB細胞、T細胞、樹状細胞などとの細胞接触型細胞間相互作用(OX40L-OX40, CD40L-CD40など)により、鼻粘膜や気管支粘膜局所におけるIgE産生の増幅が惹起されることが報告されている²⁾、そして、その増加したIgEによりマスト細胞や樹状細胞のFcεRI発現が増強し、今度はこれらの細胞の抗原に対する感受性、即ち過敏性と過剰な反応性が増幅される経路である。他の白血球と異なり、マスト細胞は、抗原が存在する限り何度でも活性化されることが、抗原非存在下であってもIgEのクローンによってはIgE分子単独でマスト細胞の活性化を惹起できることや、IgEがIgE+と呼ばれるアロタイプである場合にはHistamine Releasing Factor (HRF)に対する細胞応答性にも関与することが報告されており^{3,5)}、IgEとマスト細胞がこの増悪サイクルの制

1) 日本大学医学部
2) 日本大学生物資源科学部
羅智靖: ra.chisei@nihon-u.ac.jp

御因子たる所以である。活性化されたマスト細胞から産生、放出されたケモカインやサイトカイン、ロイコトリエンなどのメディエーターが、好塩基球や好酸球などの顆粒球、T細胞などの炎症細胞をアレルギー炎症局所へ動員することが明らかになって来ており、炎症のコンダクターとしてのマスト細胞の活性化制御が炎症の遷延化を防ぐ一つの鍵になることを示唆している。これらのことから、IgEによりマスト細胞から始まる炎症反応を制御する技法開発は、重要性が極めて高いと思われる。そこで本研究では、免疫応答の盛んな粘膜組織に定着し、広く感染・炎症・免疫・アレルギーに、さらに組織の修復においてコンダクターとして機能するマスト細胞に焦点を絞り、マスト細胞の過剰な活性化の制御を原理とした新たなアレルギー治療法の開発を目指した。具体的には①炎症増悪因子としてのIgEの新たな役割についての解析、②IgE系によるマスト細胞活性化シグナルとその制御分子(Fc ϵ RI β 鎖)の新たな機能についての解析、③新規ヒトマスト細胞活性化阻害ペプチドである、チロシンリン酸化したFc ϵ RI β 鎖ITAMによるマスト細胞の活性化阻害が、マスト細胞活性化に及ぼす影響について検討を行なった。これらの成果は、臨床試験に結びつく新たなアレルギー疾患治療薬の開発のみならず、近年マスト細胞の関与が明らかになりつつある自己免疫疾患などの治療への応用も期待される。

2. 材料および方法

試薬

マウスIgEは、BD Biosciences (San Diego, CA, USA) から購入した。ヒトIgE (HE1) およびヤギ抗ヒトIgE抗体は、それぞれDiatec Monoclonals AS (Oslo, Norway), DAKO JAPANから購入した。抗Gab2抗体は、ミリポアから (Billerica, MA, USA) から購入した。リコンビナントProtein L (PpL) はSigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。抗ヒトFc ϵ RI α 鎖抗体 (CRA1)、ヒトIgE (SKO007)、Histamine releasing factor (HRF) およびTNP-BSAは自分たちの研究室で調製した。実験に使用したヒトおよびマウスの各種サイトカインはPeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) から購入した。全ての抗リン酸化抗体 (Syk, PLC γ 1, Gab2, ERK1/2, p38 MAPK) およびコントロール抗体はCell Signaling

Technology (Beverly, MA, USA) から購入した。

動物

FcR γ 鎖欠損マウス (C57BL6 background)⁶⁾, FcR β 鎖欠損マウス (C57BL6 background)⁷⁾, およびFcR β γ 鎖二重欠損マウスは、日本大学医学部 医学研究支援部門ラボラトリーアニマル系の動物飼育室において飼育された。一部の実験において、Lyn欠損マウスから採取された大腿骨が川上敏明博士 (La Jolla Institute of Allergy and Immunology) から供与された。C57BL6/J マウスは日本チャールズリバー社から購入した。全ての動物実験は、日本大学動物実験委員会からの承認を得た後に、運営内規に従って行なった。

細胞培養

ヒトマスト細胞は、インフォームドコンセントによる同意の下、採取した肺組織から分離した。ヒトマスト細胞の純度は、Flow cytometryによるFc ϵ RIとc-kitの細胞膜表面の発現量の解析により、純度の高いものであることを確認してから実験に使用した。マウスの培養マスト細胞は、既に報告されている通り、Nunomuraら⁸⁾の方法に従って、骨髓細胞をマウスIL-3 (5 ng/ml) および10% FBSを含有させたRPMI1640培地で6~8週間培養して、調製を行なった。コモンマーモセットのマスト細胞は、東海大学医学部免疫学教室 (亀谷美恵博士) において、骨髓細胞から分取されたCD34陽性細胞を、Nunomuraら⁹⁾の方法に従って、マウスのSCF (10 ng/ml) 存在下で10-12週間培養させて分化を誘導したマスト細胞を実験に使用した。

遺伝子導入法

遺伝子導入は、Nunomuraら¹⁰⁾により報告されている通り、レトロベクターを用いたウイルス感染により行なった。FcR γ YY, FcR γ FF, FcR β YYYおよびFcR β FFF cDNAを各々pMX-puroにクローニングし、パッケージング細胞PLAT-Eにトランスフェクションにした後に、産生されたレトロウイルスを回収した。レトロウイルスとポリプレンの存在下で24時間、骨髓細胞を培養し、ウイルスに感染した細胞をピューロマイシンで選択した。選択されたFcR γ トランスフェクタントはIL-3含有培地で、

FcR $\beta\gamma$ トランスフェクタントはIL-3およびSCF 含有培地でさらに数週間培養し、マスト細胞へと分化させた。

マスト細胞の活性化と脱顆粒能の検定

調製したヒト培養肺マスト細胞に、ヒトのIgE+のクローンであるHE-1 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とHRF (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、あるいはIgE-のクローンであるSKO007 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とHRF (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) との同時刺激を行ない、30分間刺激後、上清および細胞内のヒスタミン量を脱顆粒の指標として、EIA法で測定した。またPositive controlとして、抗Fc ϵ RI α 鎖抗体CRA1 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を使用した。マウスマスト細胞は、マウス抗TNP-IgE (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で16時間感作したのち、細胞をTNP-BSAあるいはバクテリア由来のIgE結合タンパク質であるPpLによって30分間刺激した。上清中に遊離された β -hexosaminase (β -hex) を脱顆粒の指標として、測定した。またPositive controlとして、calcium ionophore A23187 (1 μM) を使用した。また、マーモセットマスト細胞の場合は、ヒトIgE (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で16時間感作したのち、ヤギ抗ヒトIgE抗体 (1もしくは10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) あるいはA23187 (1 μM) を添加し、30分間刺激した。これらのマスト細胞上清中に遊離されたヒスタミン量を脱顆粒の指標とした。ITAMペプチドを用いた実験では、刺激の前に15分間ペプチド処理を行なった。

カルシウム動態の解析

IgE感作したマスト細胞を4 μM のカルシウム指示薬 (Fluo3-AM) で30分間処理し、PBSで洗浄した後に、刺激を行なった。刺激後のfluorescenceの経時的变化をflow cytometer を用いて200ミリ秒毎に計測し、細胞質内のカルシウムイオン ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) はmean fluorescence intensity (MFI) として表した。

ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットは、刺激した細胞を1% NP40を含有するLysis bufferで可溶化し、12% SDS-PAGEでタンパク質を分離した後、Immobilon-P膜 (Millipore, Bedford, MA) に転写させた。膜を適切な一次抗体と二次抗体で処理を行なった後、ECL試薬 (GE Healthcare Biosciences) を用いてシグナルを検出した。

3. 結果

HRFとIgE+によるヒトマスト細胞活性化

HRFはIgEのタイプがIgE+ (HE1), IgE- (SKO007) に関わらず、ヒト肺由来マスト細胞からのヒスタミン遊離を惹起しなかった。抗Fc ϵ RI α 鎖抗体によるヒスタミン遊離は、遊離の程度が低いものであったが、明らかな遊離量であったために、HRFに対する不応答性は、マスト細胞の脱顆粒能の低下に起因するものではないと考えられた。これらの結果から、IgE+とHRFによる刺激は、少なくとも肺組織から分離・調製したヒトマスト細胞においては、末梢血から調製した好塩基球などですでに報告されているような著明なヒスタミンの遊離を引き起こすものではなく、好塩基球とマスト細胞でのHRFに対する応答性には大きな違いがある可能性が示唆された。

IgE依存性マスト細胞活性化シグナルの制御分子の解析

これまでの研究の結果から、脱顆粒やサイトカインの産生と異なり、Fc ϵ RI β 鎖がFc ϵ RI γ 鎖を介さずに、脂質メディエーター (LTC₄) の産生を惹起する機能を持つ可能性が示唆されるデータが得られてきたため、この β 鎖によるマスト細胞活性化機構の詳細な解析を行なった。 γ 鎖ITAMがFF型のマスト細胞 (FcR γ FF) では、Fc ϵ RI架橋によって誘導されるSyk, PLC γ 1, Gab2などの近位のシグナル伝達分子のリン酸化が顕著に低下していた (図1)。

しかしながら、興味深いことにERK1/2のリン酸化については、明らかな減弱は認められるものの、YY型 (FcR γ YY) と比較して、およそ50%程度のリン酸化反応はFF型のマスト細胞においてもFc ϵ RI架橋により誘導されてきており、この50%のERK1/2のリン酸化はFc ϵ RI γ 鎖ITAMに非依存性の機構により惹起されていると考えられた。一方、FF型およびYY型の細胞表面上のFc ϵ RI発現量に有意な差は認められなかった。 γ 鎖ITAM FF型のマスト細胞において、近位のシグナル伝達分子のリン酸化も完全には消失しないこと、②ERK1/2のリン酸化は、十分に認められることから、これらのFF型のマスト細胞で認められるシグナル伝達分子の活性化レベルが、LTC₄の産生にとって重要なファクターである細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を

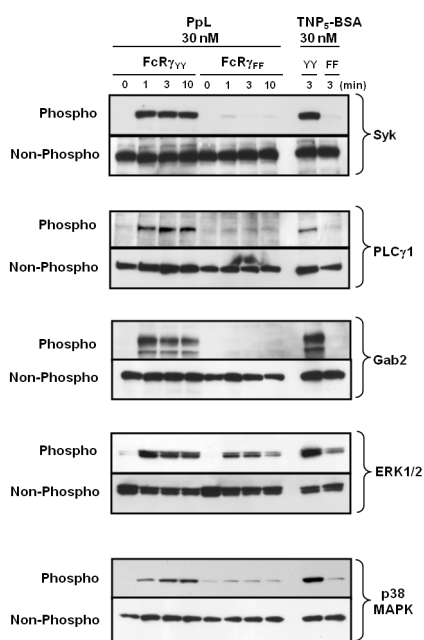


図1 Fc ϵ RI γ 鎖ITAM非依存性のFc ϵ RIシグナルの活性化

惹起しうるものであるのかを検討した。

その結果、FF型マスト細胞においても、YY型と比べて、変動のレベルは小さいものの、明らかな細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を認めることができた(図2)。

そこで次に、ERK1/2リン酸化と細胞内カルシウムイオン濃度上昇の、FF型マスト細胞のLTC₄産生

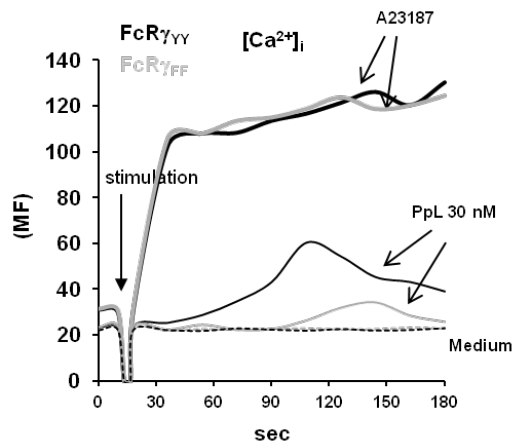


図2 Fc ϵ RI γ 鎖ITAM非依存性のカルシウムシグナルの活性化

における重要性について詳細な検討を行なった。U0126 (MEK1阻害剤) 非存在下および細胞外カルシウムが十分に存在する条件下で認められるFF型のLTC₄産生量は、U0126存在下および細胞外カルシウムをキレートした条件において、さらに減弱した(図3)。

これらの結果から、FF型マスト細胞において、認められたERK1/2リン酸化と細胞内カルシウムイオンの上昇は、FF型マスト細胞のFc ϵ RI γ 鎖ITAM非依存性のLTC₄産生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで、Fc ϵ RI γ 鎖ITAM非依存性のLTC₄産生と、ERK1/2のリン酸化、

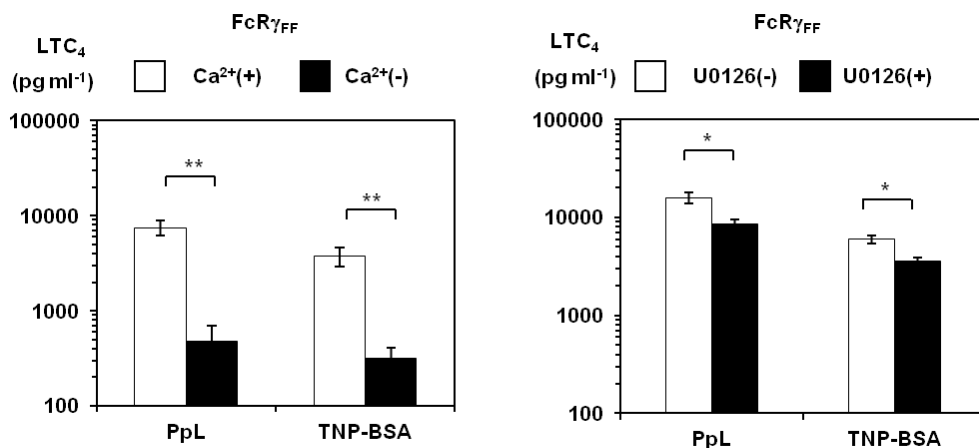


図3 Fc ϵ RI γ 鎖ITAM非依存性のLTC₄産生におけるカルシウムシグナルおよびERK1/2シグナルの重要性 (左) カルシウムをキレートした条件, (右) MEK1/2阻害剤 (U0126) の存在下でのLTC₄産生。

細胞内カルシウムイオンの動態変化における, FcεRI β鎖ITAMの機能解析を行なった。この目的のために, FcεRI β鎖欠損マウスとFcεRI γ鎖欠損マウスを掛け合わせて, FcεRI βγ鎖の二重欠損マウスを作成した。この二重欠損マウスの骨髓細胞に変異型の遺伝子(β鎖ITAM YYY型; γ鎖ITAM FF型), (β鎖ITAM FFF型; γ鎖ITAM FF型)を導入した後に, IL-3およびSCF存在下でマスト細胞へと分化させた。FcεRIは, 二つのFcεRIサブユニットが導入されないと発現しないため, 調製したマスト細胞から, さらにFcεRIを発現しているマスト細胞のみを分取し, 解析に使用した。YYY/FF型とFFF/FF型との比較により, YYY/FF型で産生されていたLTC₄は, β鎖ITAMがFFF型に置換されたことにより, ほとんど産生が認められなくなった(図4)。

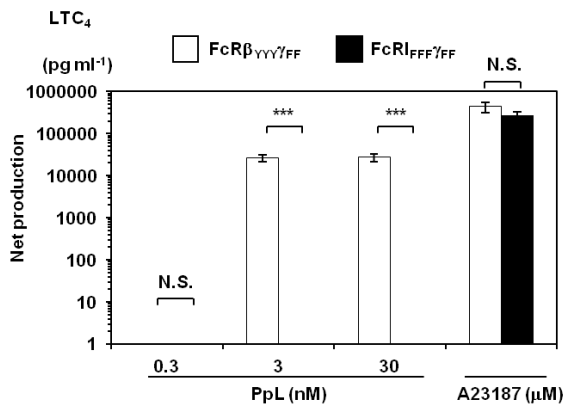


図4 β鎖ITAM依存性のLTC₄産生

この結果と一致して, ERK1/2のリン酸化, 細胞内カルシウムイオンの上昇も, FFF/FF型では完全に消失していた(図5)。

一方, FFF/FF型においても, FcεRIの発現レベルや抗原刺激によるFcεRIのエンドサイトーシスなどの機能については低下を認めなかった。以上の結果から, β鎖ITAMがγ鎖ITAM非依存性のマスト細胞活性化シグナルを伝達していることが, 初めて明らかとなった。今後は, β鎖ITAMによるγ鎖ITAM非依存性のマスト細胞活性化シグナルの制御機構の解析を中心に進めていく予定である。

FcεRI β鎖ITAMペプチドを用いたマウスおよびサルマスト細胞に対する効果の解析

マウスなどの実験動物に対する効果を検証する前に, マウスのマスト細胞に対するFcεRI β鎖ITAMペプチドの効果について検討を行なった。マウスFcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチド(YpYpYp; AAVLLPVLLAAP-KVPDDRLY(p) EELNVY(p) SPIY(p) SELEDKG)とITAMのコントロールペプチド(YYY; AAVLLPVLLAAP-KVPDDRLY(p) EELNVY(p) SPIY(p) SELEDKG)を作成し, B6マウスの骨髓から分化させた培養マスト細胞(BMMC)のFcεRIの架橋後の脱顆粒に対する2つのマウスペプチドの影響を調べたところ, β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチド(Y(p)Y(p)Y(p))でも脱顆粒に対し抑

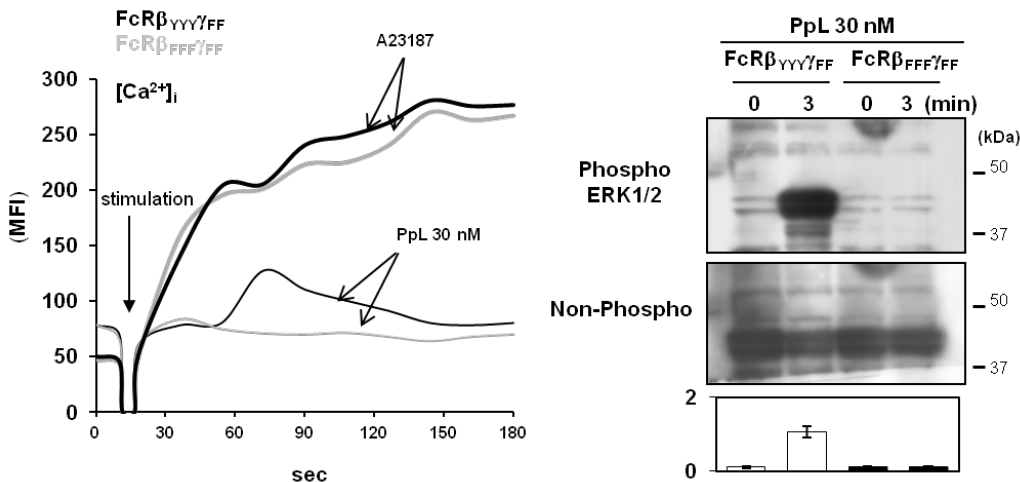


図5 β鎖ITAM依存性のカルシウムシグナルおよびERK1/2の活性化

制効果がみられなかった (図6左パネル)。またLynの欠損マウス由来BMMCでもFcεRIの架橋後の脱顆粒が抑制されないことから (図6右パネル), このペプチドは, B6マウスのマスト細胞の系では有効でないことが示唆され, 単純にマウスを用いたアレルギー性疾患モデルでの解析は, 容易ではないことが判明した。

これらの解析結果から, よりヒトに近い種の動物やマスト細胞を用いる必要性が示唆された。非ヒト霊長類であるコモンマーモセットのβ鎖のITAM motifのシーケンスはヒトと同じであることから, マーモセットのマスト細胞に対するヒトFcεRIβ鎖ITAMペプチドの効果を解析した。コモンマーモセットの骨髓細胞からCD34陽性細胞を分取し, マウスのSCF (10 ng/ml) 存在下で10-12週間培養させ

て分化を誘導したマスト細胞を実験に使用した。マスト細胞への分化は, トルイジンブルー/サフランin O染色 (図7左パネル), Flow cytometryによるIgE受容体およびc-Kitの発現により確認を行なった。マーモセットマスト細胞は, 1および10 μg/mlの抗ヒトIgE抗体によるFcεRI架橋により, 顕著なヒスタミン遊離能を示した。YpYpYpペプチドは1 μg/mlの抗ヒトIgE抗体によるヒスタミン遊離をほぼ完璧に抑制したが, 10 μg/mlの抗ヒトIgE抗体によるヒスタミン遊離に対しては, 抑制効果を認めなかった (図7右パネル)。

以上の結果から, FcεRIβ鎖ITAMペプチドのin vivoでの効果を検討し, 研究を進展させるための実験動物としてマーモセットが有用である可能性が示唆された。

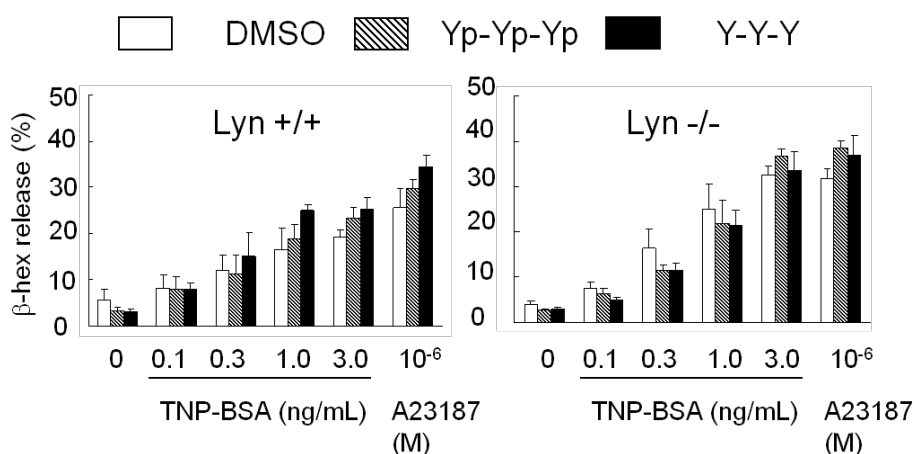


図6 マウスマスト細胞に対するマウスFcεRIβ鎖ITAMペプチドの効果

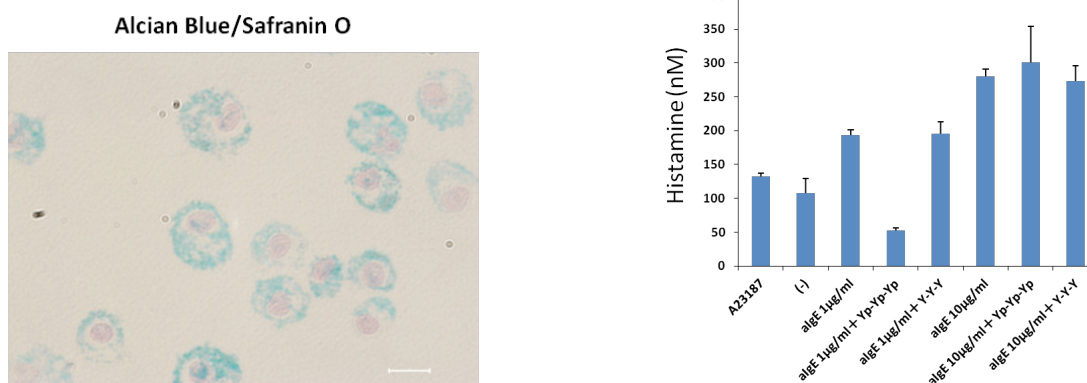


図7 マーモセットマスト細胞に対するヒトFcεRIβ鎖ITAMペプチドの効果 (左) 分化させたマーモセットマスト細胞のAlcian Blue/Safranin O染色。(右) ヒトFcεRIβ鎖ITAMリン酸化ペプチドによるヒスタミン遊離抑制。

4. 考察

今回の研究により、肺組織由来のヒトのマスト細胞では、ヒトの好塩基球と異なり、IgE+を介したHRFによるマスト細胞の活性化がほとんど認められず、もしくは極めて活性化能が低い可能性が示唆された。ヒトのマスト細胞は多様性を示し、組織から分離した場合、組織が肺などの粘膜組織や、皮膚や滑膜などの結合組織であるかによって、刺激に対する反応性や、遺伝子発現のプロファイルなどの性質が異なることや、末梢血中の前駆細胞と臍帯血に存在する幹細胞から分化・誘導させたマスト細胞間でも様々な性質が異なっていることが知られている¹⁰⁾。本研究プロジェクトの期間内では、肺組織由来のマスト細胞の応答しか解析することができなかつたため、今後は皮膚、滑膜や末梢血中の前駆細胞など起源の異なるマスト細胞を用いて、HRFに対するIgE+を介した反応性を解析する必要があると考えられる。IgE依存性マスト細胞活性化シグナルの制御分子の解析結果からは、FcεRI β鎖がγ鎖を介したシグナル伝達の調節分子として機能しているだけではなく、γ鎖とは非依存性のシグナル伝達経路を持ち、特にLTC4の産生に寄与していることが明らかとなった。この結果は、ヒトβ鎖ITAMペプチドのマスト細胞活性化抑制作用が、β鎖に会合する様々なシグナル伝達分子を競合的に阻害することで、①γ鎖シグナルの増強、②β鎖独自のシグナルの双方を減弱させている点にあることを示唆するものであり、β鎖ITAMペプチドの有用性をさらに高めるものであった。しかしながら、もっとも普遍的に用いられている実験動物であるマウスのβ鎖のITAMペプチドは、マウスのマスト細胞に対して、ヒトのマスト細胞で認められたような阻害効果を示さなかつた。本研究により、マウスに替わり、非ヒト霊長類であるコモンマーモセットが、in vivoでのITAMペプチドのアレルギー反応に対する阻害実験を検討するための実験動物として有用である可能性が示唆された。マーモセットは、繁殖能がマウスに比べて低いために、霊長類ではない実験動物としてイヌの使用も視野にいれており、イヌについてもイヌマストサイトーマセルラインの細胞などを駆使してin vitroでの効果を検証し、in vivo実験が適応可能な実験動物の種類を拡大していく予定である。

謝辞

本研究の成果は、平成24年度 日本大学学術研究助成金 総合研究の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文献

- 1) Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:440-452.
- 2) Pawankar R, Okuda M, Yssel H et al. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the FcεRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest.* 1997; 99:1492-1499.
- 3) Inoue T, Suzuki Y, Yoshimaru T et al. Nitric oxide protects mast cells from activation-induced cell death: the role of the phosphatidylinositol-3 kinase-Akt-endothelial nitric oxide synthase pathway. *J Leukoc Biol.* 2008; 3:1218-1229.
- 4) Nunomura S, Gon Y, Yoshimaru T et al. Role of the FcεRI beta-chain ITAM as a signal regulator for mast cell activation with monomeric IgE. *Int Immunol.* 2005; 17:685-94.
- 5) Kashiwakura JC, Ando T, Matsumoto K, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, Zajonc DM, Ozeki T, Ra C, MacDonald SM, Siraganian RP, Broide DH, Kawakami Y, Kawakami T. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. *J Clin Invest.* 2012; 122:218-228.
- 6) Park SY, Ueda S, Ohno H et al. Resistance of Fc receptor-deficient mice to fatal glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 1998; 102:1229-1238.
- 7) Kobayashi M, Nunomura S, Gon Y et al. Abrogation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation at the effector phase prevents contact hypersensitivity to oxazolone. *J Invest Dermatol.* 2010; 130:725-731.
- 8) Nunomura S, Yoshimaru T, Ra C. Na-Tosyl-Phe chloromethyl ketone prevents granule movement and mast cell synergistic degranulation elicited by costimulation of antigen and adenosine. *Life Sci.* 2008; 83:242-249.
- 9) Nunomura S, Shimada S, Kametani Y et al. Double expression of CD34 and CD117 on bone marrow progenitors is a hallmark of the development of functional mast cell of *Callithrix jacchus* (common marmoset). *Int Immunol.* 2012; 24:593-603.
- 10) Nunomura S, Gon Y, Yoshimaru T et al. FcεRI beta-chain ITAM amplifies PI3K-signaling to ensure synergistic degranulation response via FcεRI and adenosine receptors. *Eur J Immunol.* 2010; 40:1205-1217.
- 11) Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* 2010 ;3:111-128.