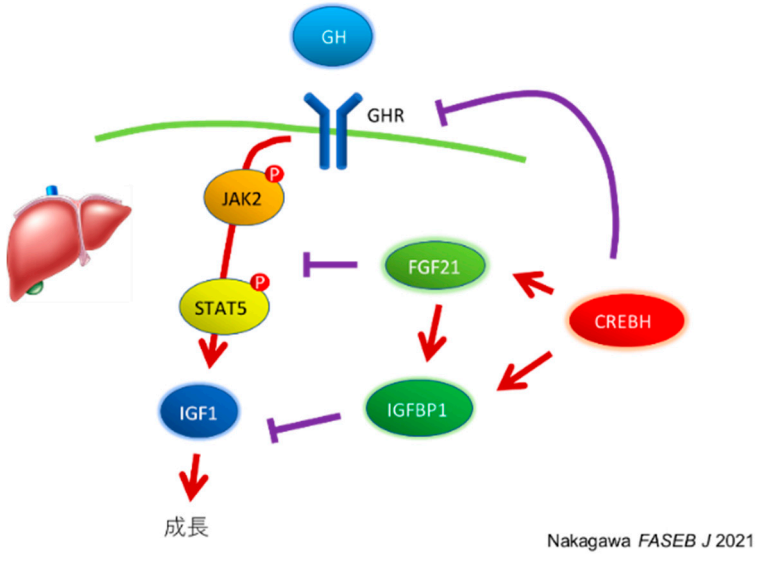
14　栄養代謝異常から肝がん発症を繋ぐ栄養応答性制御因子	中川　嘉

【目的】CREBH が肝臓、小腸で栄養代謝を制御し、生活習慣病に大きく関連することが明らかになっているが、そのメカニズムについては詳細な研究がなされてきていなかった。本課題ではそのメカニズムを解析することを目的とし、解析に必要な遺伝子改変マウスを作製するとともに、*CREBH*KO マウスに MCD 食を負荷した際に見られる異常な肝障害の発症メカニズムについて網羅的解析を行った。

【方法】1. 組織特異的 *CREBH* 過剰発現マウスの作製：Cre-LoxP システムで *CREBH* を過剰発現する *CREBH*flox Tg マウスを作製した。得られたマウスと肝臓特異的 Cre Tg（Albumin Cre Tg）マウスと交配し、肝臓特異的 *CREBH* 過剰発現（*CREBH*L-Tg）マウスを作製した。生後 1 か月のマウスを解析した。2. *CREBH*KO マウスへの MCD 食負荷実験：8 週齢 *CREBH*KO マウスに 8 週間、MCD 食を負荷し、経時的（1、4、8 週）に肝臓を摘出し、サンプリングした。肝臓から mRNA を抽出し、網羅的に遺伝子発現を解析した。

【結果】1. 肝臓特異的 *CREBH* 過剰発現マウスは成長ホルモン抵抗性により成長遅延を呈した：肝臓特異的 *CREBH* Tg（*CREBH*L-Tg）マウスは生後 1 か月の離乳期にすでに体長、体重がコントロール（flox）マウスと比べ、著しく低値を示した。血中成長ホルモン（GH）値は異常高値を、血中 IGF1 値は異常低値を示し、明らかな成長ホルモン抵抗性を示した。また、FGF21 は高値を示した。肝臓では成長ホルモン受容体（GHR）の低下に伴い、その下流分子である JAK2、STAT5 活性がともに低下し、GH シグナルが低下していた。その結果。IGF1 を含む STAT5 の標的遺伝子の発現も低下し、成長遅延を助長したと考えられた。FGF21 は成長遅延を引き起こすため、*CREBH* L-Tg マウスと *FGF21* KO マウスを交配し、*FGF21 CREBH* L-Tg マウスを作製したところ、このマウスでも成長遅延が生じた。したがって、CREBH は FGF21 に依存しない GH シグナル抑制が成長遅延を引き起こすことを明らかにした。CREBH は栄養代謝とともに、個体成長を制御することを新たに明らかにした。2. *CREBH* 欠損による肝障害：*CREBH* KO マウスにメチオニン・コリン欠損（MCD）食を負荷すると異常なまでの肝障害を生じる。MCD 食負荷 1 週間で GO 解析から *CREBH*KO マウスでは脂質代謝とサーカディアンリズムに関連する遺伝子群が特に変動した。MCD 食負荷 8 週間では脂質代謝とともに酸化還元のプロセスに関連する遺伝子群も変動した。*CREBH*KO マウスでは炎症性サイトカイン Lcn2、鉄代謝異常が引き起こす細胞死（フェロトーシス）を誘導する遺伝子群の発現が促進し、酸化還元に関与する Ak2 は低下した。*CREBH* 欠損による病態悪化に、鉄代謝異常が引き起こす酸化還元、フェロトーシスが原因であることを見出した。

栄養代謝と成長を繋ぐ分子として CREBH を同定



14. 栄養代謝異常から肝がん発症を繋ぐ栄養応答性制御因子

中川　嘉

富山大学 和漢医薬学総合研究所 複雑系解析分野

Key words：CREBH，FGF21，生活習慣病，脂質代謝

緒　言

生活習慣病の発症は栄養の吸収と消費のバランスの崩れが、体内の過剰栄養蓄積を推し進め、肥満を惹起する。次いで、動脈硬化、虚血性心疾患や脳血管障害、最終的には心不全や脳卒中、腎不全、肝がんなどの生死に係る重篤な病気を引き起こす。栄養代謝の中心臓器である肝臓に焦点を絞ると、食生活の破綻はアルコール性・非アルコール性脂肪肝から肝硬変へと進展する。さらに悪化すると肝がんにまで進展する。肝がんの主要な発症原因はB型、C型肝炎ウイルスであったが、近年、有効な治療薬が開発され、次第に脂肪肝や糖尿病などの代謝性疾患へと変化している。NAFLD（非アルコール性脂肪性肝疾患）、NASH（非アルコール性脂肪肝炎）は我が国において治療の重要性が増している。NASHは進行性の肝疾患であり、肝硬変への進展、肝細胞癌（肝癌）の合併等による肝臓死を引き起こすところに最大の問題がある。NAFLDのうち肝実質細胞の壊死や炎症所見を伴うNASHは進行性の慢性肝疾患であり、高い頻度で肝硬変から肝臓癌を発症するために治療介入が必要である。しかしながら、メタボリックシンドロームから脂肪肝、NASH を経て肝硬変、肝がんを発症する経時変化には不明な点が多い。どのようにして単純性脂肪肝から炎症所見や線維化を呈するNASHに進展するのかは不明である。そのため、代謝異常から肝がんを発症させる分子メカニズムの解明が治療薬開発に必要となっている。しかしながら、栄養代謝障害から肝臓がんまでを段階的に発症するヒトのマウスモデルがないため、解析が進んで来なかった。

CREBHは肝臓・小腸で発現する転写因子であり、肝臓でのCREBHの発現は栄養飢餓時に肝臓に供給される脂肪酸により誘導される。我々は肝臓のCREBHは血糖値、インスリン値とともに血中脂質を低下させ、生活習慣病を改善することも見出した。その原因の一つはCREBHが生活習慣病改善因子FGF21の発現を上昇させることにあった［1，2］。それに対し、小腸*CREBH*過剰発現マウスは小腸でのコレステロール吸収を抑制する［3］。

CREBH KOマウスにメチオニン・コリン欠損（MCD）食で早期に肝炎を引き起こすと極めて早期に炎症サイトカイン（Cxcl1、MCP-1など）による好中球の浸潤が始まり、炎症、線維化が生じる。また、高脂肪・高ショ糖食を長期間負荷すると*CREBH* KOマウスでは肝がんを発症する結果も得ている。CREBHが肝がん抑制遺伝子の候補であることをKOマウス解析から見出した。

以上から、CREBHが肝臓、小腸で栄養代謝を制御し、生活習慣病に大きく関連することが明らかになっているが、本課題ではその解析に必要な遺伝子改変マウスを作製するとともに、*CREBH*KOマウスにMCD食を負荷した際に見られる異常な肝障害の発症メカニズムについて網羅的解析から解析した。

方　法

1. 組織特異的*CREBH*過剰発現マウスの作製

Cre-LoxPシステムで*CREBH*を過剰発現するマウスを作製するため、CAGプロモーター-LoxP-EGFP-LoxP-マウス活性型CREBHで構成されたcDNAを作製した。CRISPR/Cas9システムを使い、ゲノム上のROSA26 Locusにこのコンストラクトを挿入するように設定した。コンストラクトを受精卵にインジェクションし、*CREBH* flox Tgマウスを作製した。得られたマウスと肝臓特異的Cre Tg（Albumin Cre Tg）マウスと交配し、肝臓特異的*CREBH*過剰発

現（*CREBH*L-Tg）マウスを作製した。

2. *CREBH*L-Tg マウスの表現型解析

生後 1 か月時に体重、肝臓重量を測定し、血液を採取し、その成分（血糖値、インスリン、トリグリセライド、コレステロール、遊離脂肪酸、FGF21、IGFBP1）を測定した。また、Lunar PIXImus Densitometer (GE Medical Systems) dual-energy x-ray absorptiometry（DEXA）を使い、骨密度を測定した。

採取した肝臓から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR を使い目的遺伝子の発現量を測定した。また、タンパクを抽出し、ウェスタンブロッティングで目的タンパクの量を測定した。

3. *CREBH*KO マウスへの MCD 食負荷実験

8 週齢 *CREBH*KO マウスに 8 週間、MCD 食を負荷し、経時的（1、4、8 週）に肝臓を摘出し、サンプリングした。肝臓から mRNA を抽出し、RNA seq またはマイクロアレイで網羅的に遺伝子発現を解析した。

結　果

1. 肝臓特異的 *CREBH* 過剰発現マウスは成長ホルモン抵抗性により成長遅延を呈した［4］

Cre-LoxP システムで組織特異的に *CREBH* を過剰発現するマウスを作製するため、CRISPR/Cas9 システムを用い作製した。まず、ROSA26 locus に CMV promoter-LoxP-EGFP cDNA-LoxP-mouse CREBH 活性化体 cDNA のコンストラクトを挿入し、*CREBH* flox Tg マウスを作製した（図 1A）。肝臓特異的 Cre Tg マウスと交配し、肝臓特異的 *CREBH* Tg（CREBH L-Tg）マウスを作製した。このマウスは生後 1 か月の離乳期にすでに体長、体重がコントロール（flox）マウスと比べ、著しく低値を示した（図 1B）。骨密度を測定したが、体重の減少による変化が見られるものが大きく、骨密度は若干低下し、体脂肪率は顕著に増加した（図 1D）。血中成長ホルモン（GH）値は異常高値を、血中 IGF1 値は異常低値を示し、明らかな成長ホルモン抵抗性を示した。血中のグルコース（Glu）、インスリン（Insulin）、トリグリセライド（TG）は低値を示し、FGF21 は高値を示した（図 1D）。肝臓の遺伝子発現では成長ホルモン受容体（GHR）、GH の標的転写因子 STAT5 の標的遺伝子群は低下した。GHR の低下はタンパクレベルでも確認し、その下流のシグナル分子のリン酸化状態は JAK2、STAT5 ともに低下しており、GH シグナルは低下した。STAT5 の不活性化が標的遺伝子の発現低下を引き起こした。また、IGF1 の抑制因子である IGFBP1 の発現、タンパクレベルは有意に上昇した。

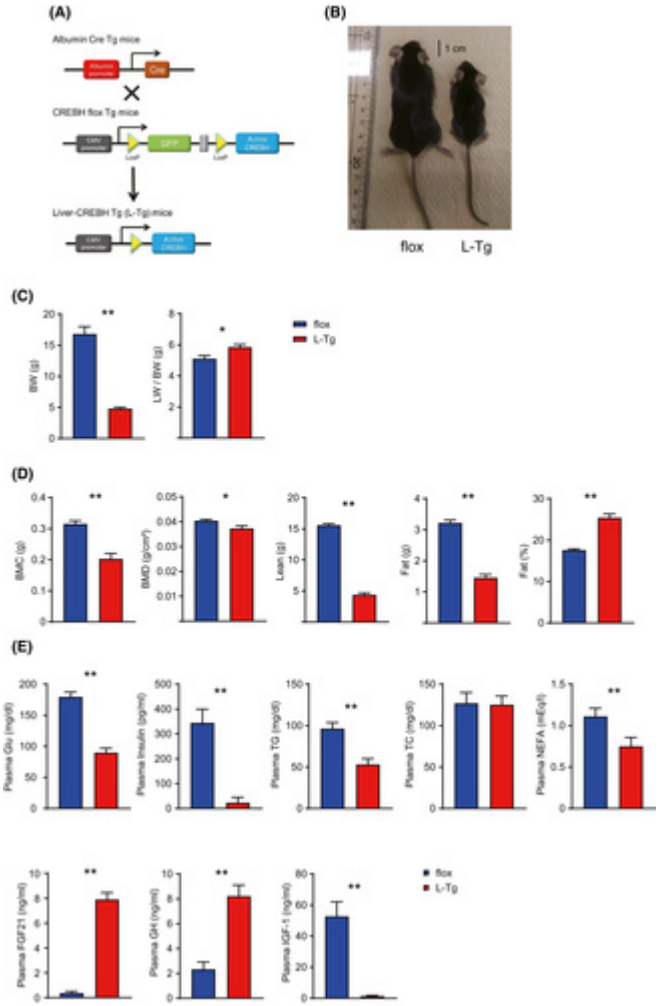


図 1. 肝臓での *CREBH* 過剰発現は成長支援を引き起こす

A) 肝臓特異的 *CREBH* 過剰発現（L-Tg）マウスの作製プロトコール。

B) 生後 1 か月のマウス写真（スケールバー：1 cm）。

C) 体重（BW）および肝臓重量（LW/BW）（n＝7～17）。

D) 骨量（BMC）、骨密度（BMD）、除脂肪重量（Lean）、脂肪重量（Fat (g)）、体脂肪率（Fat (%)）（n＝7～17）。

E) 血中成分のグルコース（Glu）、インスリン（Insulin）、トリグリセライド（TG）、コレステロール（TC）、遊離脂肪酸（NEFA）、FGF21、GH、IGF1（n＝7～18）。

データは平均±標準誤差（n＝7～18）で示し、Student's t-test で解析した。**P*＜0.05、***P*＜0.01。

CREBH の標的遺伝子である FGF21 がすでに成長遅延を引き起こすことが報告されていたため、*CREBH* L-Tg マウスと *FGF21* KO マウスを交配し、*FGF21 CREBH* L-Tg マウスを作製した。このマウスでも成長遅延が生じた（図 2A）。血中 GH および IGF1 についても *CREBH* L-Tg マウスと同様にそれぞれ、異常高値、異常低値を示した（図 2B）。肝臓での GHR の低下、IGFBP1 の上昇は遺伝子、タンパクレベルでも確認した（図 2C、D）。したがって、*CREBH* 過剰発現による成長遅延は FGF21 を介さない経路に起因していたことになる。

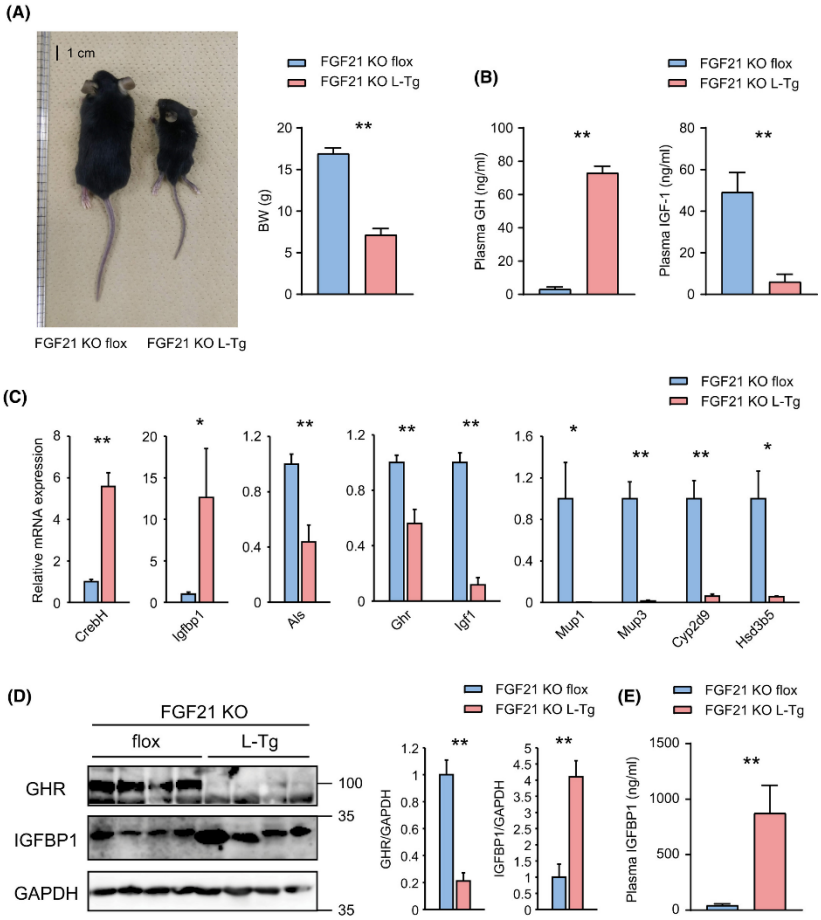


図 2. 肝臓での *CREBH* 過剰発現は FGF21 に依存せずに、成長遅延を引き起こす

生後 1 か月のマウスを解析した。

A) マウス写真（スケールバー：1 cm）と体重（BW）（n=14）。

B) 血中成分の GH、IGF1（n = 3～17）。

C) リアルタイム PCR による肝臓の遺伝子発現解析（n = 7～11)。

D) ウェスタンブロッティングによる肝臓のタンパク量解析（n = 4）。

E) 血中 IGFBP1（n = 9～10）。

データは平均±標準誤差（n=7～18）で示し、Student's t-test で解析した。$*P<0.05$、$**P<0.01$。

2. *CREBH* 欠損による肝障害

CREBH KO マウスにメチオニン・コリン欠損（MCD）食を負荷すると異常なまでの肝障害を生じる。病態を悪化させる原因遺伝子であり、CREBH により制御される因子を同定するため、食餌負荷後、経時的（1、4、8 週）に肝臓を採取し、網羅的解析を行った。*CREBH*KO マウスで上昇する遺伝子は食餌負荷後 1、4、8 週の全期間で上昇しているものに炎症性サイトカイン Lcn2、鉄代謝異常が引き起こす細胞死（フェロトーシス）を誘導する Slc7a11 が抽出された（図 3)。4、8 週齢で上昇した遺伝子にもフェロトーシスに関連する Spp1、Cd44 も含まれており、フェロトーシスが促進されていることが想定できる。GO 解析でも鉄代謝(iron transport)や炎症に関連する neutrophil chemotaxis、neutrophil aggregation が変化していることを示した（図 3)。

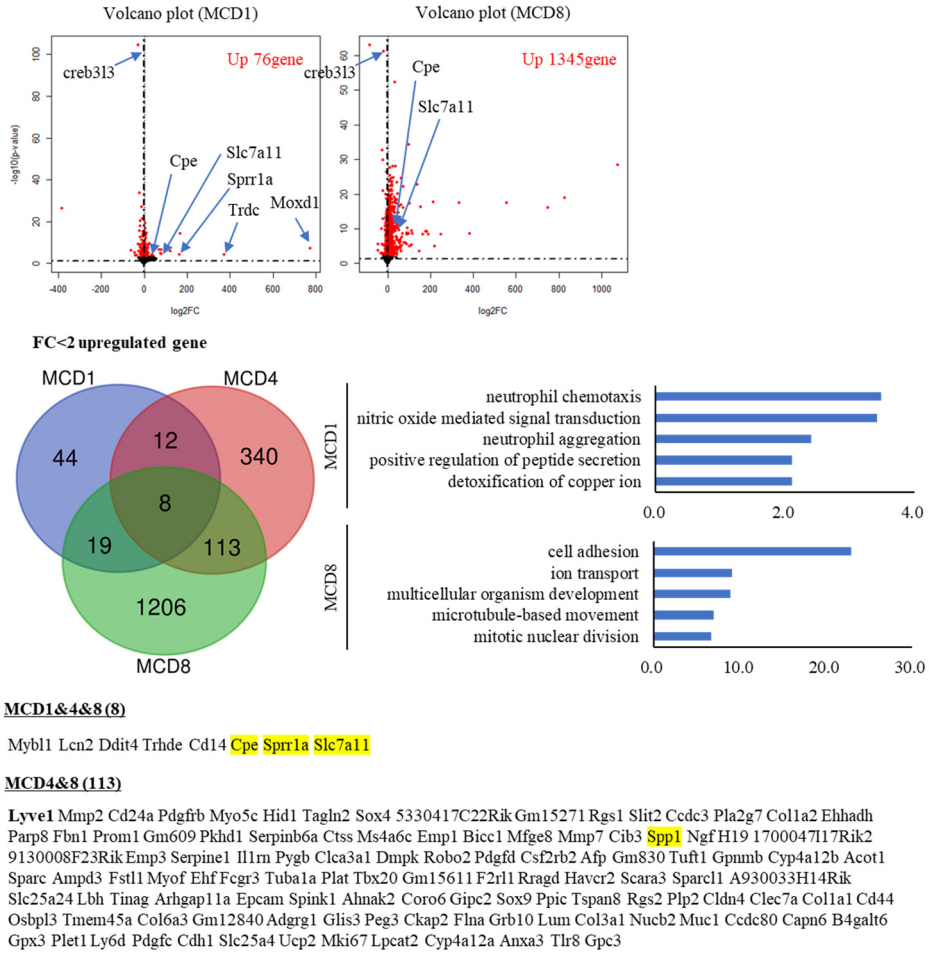


図 3. MCD 食負荷における *CREBH* KO マウス肝臓で網羅的遺伝子発現解析

8 週齢雄性マウスに MCD 食を 8 週間負荷し、経時的に肝臓を摘出した。mRNA を抽出後、RNA seq とマイクロアレイで網羅的に遺伝子発現解析を行った。発現が上昇した（＞×2）遺伝子を抽出した結果をボルケーノプロット、ベン図で示し、変化した遺伝子のグループを GO 解析で抽出した。

MCD 食負荷 1 週間で GO 解析から *CREBH* KO マウスでは脂質代謝に関連するプロセス（fatty acid metabolic process、unsaturated fatty acid biosynthetic process、lipid metabolic process）とサーカディアンリズムに関連する遺伝子（circadian regulation of gene regulation、rhythmic process）が特に変動した（図 4A）。MCD 食負荷 8 週間では脂質代謝とともに酸化還元のプロセス（oxidation-reduction process）も変動した。*CREBH* KO マウスで発現が半分以下になる遺伝子を MCD 食負荷後 1、4、8 週間でそれぞれ抽出し、さらに、すべての期間で発現が低下する遺伝子を 36 個抽出した（図 4B）。

CREBH を正常マウスの肝臓でアデノウイルスを使い過剰発現させた後、CREBH タンパクが結合するゲノム領域を特定するため、ChIP seq を行った。その結果と MCD 食で低下した遺伝子の中で CREBH がそのプロモーター上に結合する遺伝子として、*Ak2* *Elovl2*、*1810055G02Rik*、*Tor1b*、*Il11rap*、*Tnfaip8l1*、*Fads2*、*Apoa4* を同定した（図 4B）。*Elovl2*、*Fads2*、*Apoa4* はすでに CREBH の標的遺伝子として特定されており、*Ak2* は新規標的と考えられた。CREBH は PPARα と標的遺伝子を共有するため、*CREBH* KO、*PPARα* KO マウスの肝臓の網羅的解析データで *Ak2* の発現を確認した。絶食時での変化ではあるが、*Ak2* は両遺伝子の KO マウスでともに減少しており、2 つの転写因子により制御されていることが示唆された。*CREBH* L-Tg マウスの肝臓の網羅的遺伝子発現データでは *Ak2* の発現は CREBH で上昇しており（図 4C）、*Ak2* は CREBH の標的遺伝子であると考えられる。

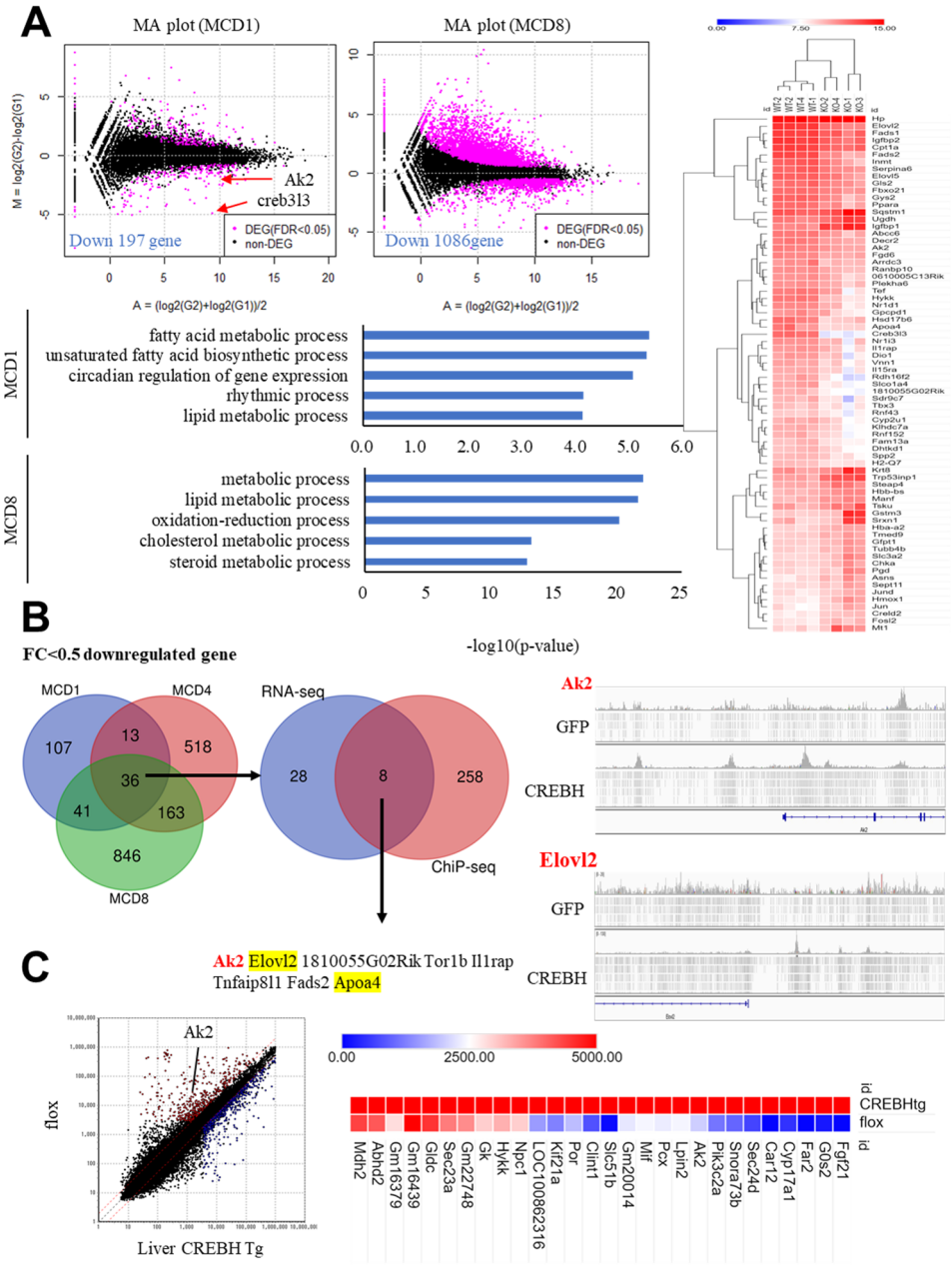


図 4. MCD 食負荷における CREBH が直接制御する遺伝子の特定

8 週齢雄性マウスに MCD 食を 8 週間負荷し、負荷後 1、4、8 週間に摘出した肝臓および 1 か月齢雄性肝臓特異的 *CREBH* 過剰発現（L-Tg）マウスの肝臓からそれぞれ mRNA を抽出後、RNA seq とマイクロアレイで網羅的に遺伝子発現解析を行った。

A) MCD 食負荷後 1、8 週間において *CREBH* KO マウスの肝臓で発現が低下した（＜×1/2）遺伝子を抽出したデータをボルケーノプロット、ベン図、ヒートマップ、GO 解析結果で示した。

B) MCD 食負荷後 1、2、8 週間で *CREBH* KO マウスの肝臓で発現が低下した（＜×1/2）遺伝子を抽出した。8 週齢雄性正常（WT）マウスに GFP、CREBH アデノウイルスを感染後 1 週間で肝臓を摘出し、ChIP seq で CREBH の結合ゲノム領域の遺伝子を同定した結果をベン図で示した。*CREBH* KO マウスで低下し、CREBH が結合する領域から、CREBH の標的遺伝子と特定した *Ak2*、*Elovl5* のプロモーター領域に CREBH が結合している領域を示した。

C) 1 か月齢雄性肝臓特異的 *CREBH* 過剰発現（L-Tg）マウスの肝臓における遺伝子発現変化をボルケーノプロットとヒートマップで示した。

考　察

CREBH は絶食時に肝臓で発現が上昇する転写因子であり、その際に機能する。これまでの KO マウスでの解析から、絶食時の適応に必須の分子であり、CREBH は絶食状態を促進させる機能を有することを報告してきた［5］。特に、脂肪酸酸化、ケトン体合成といった栄養飢餓状態に促進される生理的プロセスを促進させるとともに、生活習慣病改善ホルモン FGF21 の発現も上昇させる［6］。Cre-LoxP システムで組織特異的に *CREBH* を欠損できる CREBH flox マウスはすでに作製していたが、組織特異的に過剰発現できる *CREBH*flox Tg マウスを作製した。肝臓特異的に *CREBH* を過剰発現させると、マウスは明らかな成長遅延を引き起こし、明らかな低体重を示した。CREBH は脂肪酸酸化などの代謝を促進させ、栄養飢餓状態を促進させる機能がある。そのため、このマウスでは食餌を摂取しても、血中グルコース、トリグリセライドといった栄養素が低値を示しており、栄養を浪費してしまい、成長に結び付かなかったと考えられる。肝臓で *CREBH* を過剰発現しているマウスの肝臓では脂肪酸酸化に関わる遺伝子群の発現上昇も確認できている。成長に関わる遺伝子については、成長ホルモン受容体の遺伝子発現およびタンパク量が、検出できないほどの低値であり、その下流シグナルである JAK2-STAT5 の活性が遮断され、結果的に肝臓から分泌される成長に関する分泌因子 IGF1 が低下していた。CREBH の標的遺伝子である *FGF21* の過剰発現マウスでも成長遅延が報告されているが、JAK2-STAT5 の間で抑制的に機能する SOCS2 を活性化することで、このシグナルを抑制するとされている［7］。そのため、CREBH による成長遅延は FGF21 の経路とは異なる。確かに、*CREBH*L-Tg マウスと *FGF21* KO マウスを交配しても、そのマウスは *CREBH*L-Tg マウスと同程度に成長遅延を呈した。この際やはり、成長ホルモン受容体の発現低下は維持されており、このことが原因であると考えられた。加えて、*CREBH*L-Tg マウスでは IGF-1 の抑制因子である IGFBP1 の発現が上昇しており、IGF1 の機能を抑制し、成長遅延を促進させていると考えられる。以上より、CREBH の過剰発現では多面的に成長ホルモンシグナルを抑制することで成長遅延を引き起こすこと、CREBH が栄養飢餓と成長遅延をつなぐ重要な因子であることを見出した。しかしながら、肝臓特異的に CREBH を過剰させた際に肝がん病態を改善できるかを検討する目的に作製したが、長期生存がこのマウスではできない。そのため、生活習慣病から肝がんを発症させる研究には使用できない。今後は薬剤誘導型で肝臓特異的 Cre Tg マウスを導入し、交配する必要がある。

*CREBH*KO マウスではメチオニン・コリン欠損食負荷による非アルコール性脂肪肝発症を増悪化することをすでに筆者らは報告している［6］。その病態悪化のメカニズムを解明するために、経時的に肝臓をサンプリングし網羅的解析を行った。*CREBH*KO マウスでは負荷 1 週目ですでに血中肝炎マーカーが異常高値を示した。それゆえ、1 週目からすでに炎症性サイトカイン Lcn2 が上昇し、8 週目まで高値を維持しており、炎症の悪化を示唆している。また、フェロトーシスに関連する Spp1、CD44、Slc7a11 が高値を示しており、肝炎マーカーの序章はフェロトーシスによる細胞死によるものと考えられる。逆に、低下する因子として Ak2 を見出し、Ak2 のノックダウン細胞ではミトコンドリア機能異常を示しており、このことも細胞死を助長した原因と考えられる。Ak2 は CREBH が結合するプロモーター領域の解析からも CREBH が直接制御することが考えられる。以上のように、*CREBH* 欠損による非アルコール性脂肪肝の増悪化は細胞死の増加による細胞障害が原因と考えられる。この結果を基に *CREBH* 欠損による発症する肝がんの分子メカニズムへ切り込む予定である。

文　献

1） Nakagawa, Y.; Satoh, A.; Yabe, S.; Furusawa, M.; Tokushige, N.; Tezuka, H.; Mikami, M.; Iwata, W.; Shingyouchi, A.; Matsuzaka, T.; Kiwata, S.; Fujimoto, Y.; Shimizu, H.; Danno, H.; Yamamoto, T.; Ishii, K.; Karasawa, T.; Takeuchi, Y.; Iwasaki, H.; Shimada, M.; Kawakami, Y.; Urayama, O.; Sone, H.; Takekoshi, K.; Kobayashi, K.; Yatoh, S.; Takahashi, A.; Yahagi, N.; Suzuki, H.; Yamada, N.; Shimano, H., Hepatic CREB3L3 controls whole-body energy homeostasis and improves obesity and diabetes. Endocrinology. 2014 Dec;155(12):4706-19. doi: 10.1210/en.2014-1113. Epub 2014 Sep 18.PMID: 25233440

2) Satoh, A.; Han, S. I.; Araki, M.; Nakagawa, Y.; Ohno, H.; Mizunoe, Y.; Kumagai, K.; Murayama, Y.; Osaki, Y.; Iwasaki, H.; Sekiya, M.; Konishi, M.; Itoh, N.; Matsuzaka, T.; Sone, H.; Shimano, H., CREBH Improves Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance, and Metabolic Disturbances by FGF21-Dependent and FGF21-Independent Mechanisms. iScience. 2020 Mar 27;23(3):100930. doi: 10.1016/j.isci.2020.100930. Epub 2020 Feb 21.

3) Kikuchi, T.; Orihara, K.; Oikawa, F.; Han, S. I.; Kuba, M.; Okuda, K.; Satoh, A.; Osaki, Y.; Takeuchi, Y.; Aita, Y.; Matsuzaka, T.; Iwasaki, H.; Yatoh, S.; Sekiya, M.; Yahagi, N.; Suzuki, H.; Sone, H.; Nakagawa, Y.; Yamada, N.; Shimano, H., Intestinal CREBH overexpression prevents high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia by reducing Npc1l1 expression. Mol Metab. 2016 Sep 17;5(11):1092-1102. doi: 10.1016/j.molmet.2016.09.004. eCollection 2016 Nov.PMID: 27818935

4) Nakagawa, Y.; Kumagai, K.; Han, S. I.; Mizunoe, Y.; Araki, M.; Mizuno, S.; Ohno, H.; Matsuo, K.; Yamada, Y.; Kim, J. D.; Miyamoto, T.; Sekiya, M.; Konishi, M.; Itoh, N.; Matsuzaka, T.; Takahashi, S.; Sone, H.; Shimano, H., Starvation-induced transcription factor CREBH negatively governs body growth by controlling GH signaling. FASEB J. 2021 Jun;35(6):e21663. doi: 10.1096/fj.202002784RR. PMID: 34042217

5) Nakagawa, Y.; Shimano, H., CREBH Regulates Systemic Glucose and Lipid Metabolism. Int J Mol Sci. 2018 May 8;19(5):1396. doi: 10.3390/ijms19051396 PMID: 29738435

6) Nakagawa, Y.; Satoh, A.; Tezuka, H.; Han, S. I.; Takei, K.; Iwasaki, H.; Yatoh, S.; Yahagi, N.; Suzuki, H.; Iwasaki, Y.; Sone, H.; Matsuzaka, T.; Yamada, N.; Shimano, H., CREB3L3 controls fatty acid oxidation and ketogenesis in synergy with PPARalpha. Sci Rep. 2016 Dec 16;6:39182. doi: 10.1038/srep39182.PMID: 27982131

7) Inagaki, T.; Lin, V. Y.; Goetz, R.; Mohammadi, M.; Mangelsdorf, D. J.; Kliewer, S. A., Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. Cell Metab. 2008 Jul;8(1):77-83. doi: 10.1016/j.cmet.2008.05.006.PMID: 18585098