

令和元年5月28日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09517

研究課題名(和文) 自己由来遊離核酸断片の認識を介した動脈硬化発症機序の解明

研究課題名(英文) The role of TLR9, a DNA sensor, in the development of vascular inflammation and atherogenesis

研究代表者

福田 大受 (FUKUDA, Daiju)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任講師

研究者番号：40637568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アポリポ蛋白E欠損マウスにおいて、核酸受容体の1つであるToll様受容体(TLR9)を遺伝的、又は、薬理的に抑制することで、アンジオテンシンII誘導性の血管の炎症や動脈硬化の発症が有意に抑制された。また、TLR9の活性化は、マクロファージの炎症性活性化を促進した。さらに、急性冠症候群患者の冠動脈血中遊離核酸断片濃度は、OCTで観察される冠動脈プラークの不安定性や炎症所見と有意な正の相関を認め、ヒトにおいても、冠動脈硬化と遊離核酸-核酸受容体シグナルの関係が示唆された。以上から、遊離核酸-核酸受容体シグナルが動脈硬化の新規メカニズムであるだけでなく、新規治療方法となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中で動脈硬化性疾患が増加している。スタチンを用いた脂質低下療法は、動脈硬化に基づく心血管イベントを減少させるが、残余リスクが問題となっており、新規の動脈硬化の治療方法の開発が期待されている。動脈硬化の基盤病態は無菌性慢性炎症であるが、その発症機序は不明であり、慢性炎症を標的とした動脈硬化治療方法の開発もなされていない。本研究は、動脈硬化の基盤病態である慢性炎症の発症に、核酸受容体の1つであるTLR9を介した自然免疫機構が関与することだけでなく、TLR9が治療標的になる可能性を示唆しており、動脈硬化のさらなる病態の理解とともに、新規治療方法の開発につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Genetic deletion or pharmacologic blockade of TLR9 in angiotensin II infused ApoE KO mice attenuated atherogenesis in the aortic arch and decreased macrophage accumulation and inflammatory molecule expression in the aorta with no alteration of metabolic parameters. A TLR9 agonist markedly promoted proinflammatory activation of ApoE KO macrophages but not of TLR9/ApoE dKO macrophages. Furthermore, in humans, circulating ds DNA in the coronary artery positively correlated with inflammatory features of coronary plaques such as lipid arc and macrophage grade determined by OCT in patients with acute myocardial infarction. Our results suggested that TLR9 plays a pivotal role in the development of vascular inflammation and atherogenesis through proinflammatory activation of macrophages. TLR9 may serve as a potential therapeutic target for atherosclerosis.

研究分野：循環器内科

キーワード：炎症 動脈硬化 核酸断片 TLR9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は、血管壁における慢性炎症を病態基盤として発症する。しかし、その機序は十分に明らかになっていない。近年、Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) や Nucleotide-binding domain, leucine rich family, pyrin containing 3 (NLRP3) などのパターン認識受容体が、種々の内因性リガンドを認識して生じる自然炎症が慢性炎症の発症に関与することが明らかになってきた [1]。

高脂血症や糖尿病など動脈硬化の危険因子の存在下では、血管構成細胞 (血管内皮細胞や平滑筋細胞、浸潤した白血球など) のアポトーシスやネクローシスなどの細胞死が生じている [2]。そこで我々は、細胞死が生じた時に放出されるデブリスの一つ、遊離核酸断片 (cell free DNA, cfDNA) に注目した。これまでに、自己免疫疾患など種々の慢性炎症性疾患患者で、血中 cfDNA 濃度が高いことが報告されている [3]。さらに最近、重症の冠動脈疾患患者において、血中 cfDNA 濃度が高値であることも報告された [4]。しかし、どのような機序で cfDNA が血管の炎症を引き起こし、動脈硬化の病態に関与するかについては、不明のままである。

DNA は遺伝情報を担う生命の根源的な物質であるが、生体内には、その分解系と認識系が存在し、様々な病態に関与している。特に、マクロファージ内 DNase II 欠損により細胞質内に多量の DNA 断片が蓄積し、慢性炎症を惹起する事が報告されている [5]。また、マクロファージなどの炎症細胞に発現する TLR9 は、細菌由来の非メチル化 CpG-DNA 配列を本来のリガンドとするが、慢性的に過剰な細胞死が生じる場合には、自己由来 cfDNA をもリガンドとして認識し、慢性炎症を惹起する事が報告されている [6]。しかしながら、cfDNA と DNase II や TLR9 という DNA 分解関連分子が、血管の炎症や動脈硬化の発症に関与しているかについては、これまで、全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究は、以下の作業仮説を *in vivo* と *in vitro* の両方の実験で検証することで、「障害を受けた血管構成細胞から放出される cfDNA がマクロファージを活性化させ、血管の炎症を惹起することで動脈硬化病変の進展に関与する」という仮説を証明する。

仮説 1: マクロファージにおける TLR9 が cfDNA をリガンドとして認識し、血管壁の慢性炎症を惹起し、動脈硬化病変の形成を促進する。

仮説 2: マクロファージにおける DNase II は、細胞内に取り込まれた cfDNA の分解を促進し、cfDNA によるマクロファージの活性化を減弱し、血管壁の慢性炎症と動脈硬化病変の形成を抑制する。

これにより、新たな動脈硬化発症機序を明らかにするだけでなく、動脈硬化の新規治療方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 核酸受容体が血管の炎症と動脈硬化発症に与える影響の検討

動脈硬化モデルマウスであるアポリポ蛋白 E 欠損 (ApoE^{-/-}) マウスと TLR9^{-/-} マウスを交配し、TLR9^{-/-}/ApoE^{-/-} マウスを樹立し、ApoE^{-/-} マウスとの間で、血管の炎症や動脈硬化の進展を、組織学的解析や分子生物学的手法で比較検討する。さらに、TLR9 の動脈硬化の治療標的としての可能性を検討するため、TLR9 の阻害薬 (iODN) を ApoE^{-/-} マウスに投与し、動脈硬化の進展に与える影響を検討する。また、動脈硬化には、マクロファージを中心とした炎症性細胞の活性化が重要な役割を果たすことから、骨髄移植により、骨髄細胞に発現する TLR9 が、動脈硬化の進展に与える影響を検討する。

また、TLR9^{-/-}/ApoE^{-/-} マクロファージと ApoE^{-/-} マクロファージの間で、炎症性物質の発現などを各種分子生物学的に比較する。

(2) 核酸分解酵素が血管の炎症と動脈硬化発症に与える影響の検討

Cre/loxP システムを用いてマクロファージ特異的 DNase II 欠損マウス (DN2-flox/LysM-Cre) を樹立し、さらに ApoE^{-/-} マウスと交配することで、マクロファージ特異的 DNase II 欠損/ApoE KO (DN2^{-/-}/ApoE^{-/-}) マウスを作製する。コントロール群である DN2-flox/ApoE KO (DN2^{+/+}/ApoE^{-/-}) マウスとの間で、血管の炎症や動脈硬化の進展を、組織学的解析や分子生物学的手法で比較検討する。

また、DN2 の有無がマクロファージの炎症性活性化に影響を与えるかどうか、各種分子生物学的に比較する。

(3) cfDNA と冠動脈硬化の関係の検討

急性冠症候群患者における責任血管から得られた血液中の cfDNA 濃度を測定し、光干渉断層法 (OCT) で得られた冠動脈プラークの特徴と関係を検討することで、cfDNA と冠動脈硬化プラーク性状との関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) TLR9 の欠損は ApoE^{-/-} マウスにおける血管の炎症と動脈硬化発症を抑制する

ApoE^{-/-} マウスにアンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を 4 週間投与すると、dsDNA と ssDNA

で測定した cfDNA 濃度は有意に上昇し、また、それらの受容体と考えられる TLR9 の発現も増加していた。

TLR9^{-/-}/ApoE^{-/-}マウスと ApoE^{-/-}マウスにアンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を 4 週間投与すると、大動脈弓部に形成される動脈硬化病変は、有意に TLR9^{-/-}/ApoE^{-/-}マウスで抑制されていた。さらに、定量的 RT-PCR 法や免疫組織染色法を用いて、大動脈における VCAM-1 や MCP-1 などの炎症性物質の発現を検討すると、TLR9^{-/-}/ApoE^{-/-}マウスで有意に抑制されていた。

ApoE^{-/-}マウスにアンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を 4 週間投与して、動脈硬化を誘導する実験において、TLR9 の特異的阻害薬 (iODN) を投与すると、大動脈弓における動脈硬化の進展が有意に抑制され、大動脈における VCAM-1 や MCP-1 などの炎症性物質の発現も、有意に低下していた。

TLR9^{-/-}/ApoE^{-/-}マウスの骨髄を、骨髄移植によって、TLR9^{-/-}/ApoE^{-/-}マウスもしくは ApoE^{-/-}マウスの骨髄で置換し、アンジオテンシン II を用いて動脈硬化を誘導した。その結果、骨髄細胞に TLR9 が発現する骨髄移植マウスでは、全身に TLR9 が発現しない骨髄移植マウスに比べて有意に、大動脈弓部の動脈硬化の進展が見られた。

尚、～ の in vivo 実験において、TLR9 の発現の有無は、血圧や脂質レベルに影響を与えなかった。

TLR9^{-/-}/ApoE^{-/-}マクロファージと ApoE^{-/-}マクロファージを TLR9 のアゴニストである ODN1826 で刺激し、定量的 RT-PCR 法や ELISA 法で検討すると、ApoE^{-/-}マクロファージでは、有意に VCAM-1、MCP-1、TNF- α などの炎症性物質の発現が増加したが、TLR9^{-/-}/ApoE^{-/-}マクロファージでは、同様の反応は見られなかった。ウェスタンブロット法により、ODN1826 による刺激は、ApoE^{-/-}マクロファージの p38 MAPK 経路を活性化することが示された。そこで、ODN1826 と p38 MAPK 阻害薬を同時に ApoE^{-/-}マクロファージに作用させると、ODN1826 単独刺激で見られたような炎症性物質の発現増加が抑制された。

(2) DNase II の欠損は ApoE^{-/-}マウスにおける動脈硬化を進展させる

DN2^{+/+}/ApoE^{-/-}マウスと DN2^{-/-}/ApoE^{-/-}マウスに西洋食を 8 週間負荷した際の、大動脈弓部における動脈硬化の進展は、DN2^{-/-}/ApoE^{-/-}マウスで有意に進展していた。現在、長期間飼育時の動脈硬化の進展や、大動脈における炎症性物質の発現を検討中である。

DNase II の有無におけるマクロファージの炎症性活性化の差異を検討するため、DN2 欠損マクロファージと DN2 発現マクロファージに ODN1826 を作用させたところ、炎症性物質の発現は、DN2 欠損マクロファージで有意に高く、ウェスタンブロット法により、p38 MAPK と NF- κ B 経路が関与することが示された。現在、詳細な検討を継続している。

(3) cfDNA と冠動脈硬化の関係の検討

急性冠症候群患者の加療を行う際に、病変枝から採取した血液から cfDNA を抽出し、dsDNA 濃度と ssDNA 濃度を測定した。責任病変は、OCT で観察し、責任病変における、lipid arc、マクロファージ指数、cavity 面積と長を測定した。dsDNA 濃度と ssDNA 濃度と、プラーク形態の相関を統計学的に解析した。その結果、責任血管における dsDNA 濃度は、lipid arc、マクロファージ指数、cavity 長と有意な正の相関を示し、プラークの炎症や不安定化と、dsDNA 濃度が関係することが示された。

< 引用文献 >

1. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:826–837. (doi: 10.1038/nri2873.)
2. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:36–46. (doi: 10.1038/nri2675.)
3. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman RL. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005;202:1131–1139. (doi: 10.1084/jem.20050914.)
4. Borisssoff JI, Joosen IA, Versteylen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Gallant M, Martinod K, Ten Cate H, Hofstra L, Crijns HJ, Wagner DD, Kietse laer B. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:2032–2040. (doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301627.)
5. Yoshida H, Okabe Y, Kawane K, Fukuyama H, Nagata S. Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat. Immunol.* 2005;6:49–56. (doi: 10.1038/ni1146.)
6. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:823–835. (doi: 10.1038/nri1957.)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. **Fukuda D***, Nishimoto S*, Aini K, Tanaka A, Nishiguchi T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Masuda K, Naruto T, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Imoto I, Akasaka T, Shimabukuro M, **Sata M**. Toll-Like Receptor 9 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-Induced Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2019;8: e010860. (*; equal contribution) (doi.org/10.1161/JAHA.118.010860.) (査読あり)
2. Nishimoto S*, Kunduziayi A*, **Fukuda D**, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi Y, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Shimabukuro M, **Sata M**. Activation of Toll-like Receptor 9 Impairs Blood Flow Recovery After Hind-limb Ischemia. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5:144. (*; equal contribution) (doi: 10.3389/fcvm.2018.00144.) (査読あり)
3. Ganbaatar B, **Fukuda D**, Salim HM, Nishimoto S, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, **Sata M**. Ticagrelor, a P2Y12 antagonist, attenuates vascular dysfunction and inhibits atherogenesis in apolipoprotein-E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2018;275: 124-132. (doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.053.) (査読あり)
4. Hara T*, **Fukuda D***, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, **Sata M**. Inhibition of activated factor X by rivaroxaban attenuates neointima formation after wire-mediated vascular injury. *Eur J Pharmacol.* 2018; 820:222–228. (*; equal contribution) (doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.12.037.) (査読あり)
5. Hara T, Phuong PT, **Fukuda D**, Yamaguchi K, Murata C, Nishimoto S, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Imoto I, Shimabukuro M, **Sata M**. Protease-Activated Receptor-2 Plays a Critical Role in Vascular Inflammation and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient Mice. *Circulation.* 2018;138:1706-1719. (doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033544.) (査読あり)
6. Salim HM, **Fukuda D**, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, **Sata M**. Teneligliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, attenuated pro-inflammatory phenotype of perivascular adipose tissue and inhibited atherogenesis in normoglycemic apolipoprotein-E-deficient mice. *Vascul Pharmacol.* 2017; 96-98:19-25. (doi: 10.1016/j.vph.2017.03.003.) (査読あり)
7. Nishimoto S*, **Fukuda D***, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, Kim-Kaneyama JR, Sato F, Bando M, Yagi S, Soeki T, Hayashi T, Imoto I, Sakaue H, Shimabukuro M, **Sata M**. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv.* 2016;2:e1501332. (*; equally contribution) (doi:10.1126/sciadv.1501332.) (査読あり)
8. Nakano T, **Fukuda D**, Koga JI, Aikawa M. Delta-Like Ligand 4-Notch Signaling in Macrophage Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36:2038-2047. (doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.306926.) (査読あり)
9. Takashima A, **Fukuda D**, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Nishimoto S, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Taketani Y, Shimabukuro M, **Sata M**. Combination of n-3 polyunsaturated fatty acids reduces atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting macrophage activation. *Atherosclerosis.* 2016;254:142-150. (doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.002.) (査読あり)

1. **Fukuda D**, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, **Sata M**. Inhibition of Thrombin-PARs Signaling by Dabigatran, a Direct Thrombin Inhibitor, Attenuates Endothelial Dysfunction in Diabetic Mice. American Heart Association Scientific Sessions 2018, Chicago, America, November 10-12, 2018
2. **福田大受**、**佐田政隆**：血液凝固因子と動脈硬化 新規経口抗凝固薬の血管保護効果について 第 33 回日本糖尿病合併症学会（東京・2018 年 10 月 19-20 日）
3. **福田大受**、山口浩司、楠瀬賢也、八木秀介、山田博胤、若槻哲三、添木武、**佐田政隆**：活性型血液凝固第 X 因子が冠動脈硬化に与える影響 第 66 回日本心臓病学会学術集会（大阪・2018 年 9 月 7-9 日）
4. **Daiju Fukuda**, Shusuke Yagi, Takeshi Soeki, **Masataka Sata**. Inhibition of thrombin signaling by dabigatran, a direct thrombin inhibitor, attenuates endothelial dysfunction in diabetic mice. 第 82 回日本循環器学会学術集会（大阪・2018 年 3 月 23-25 日）
5. **Daiju Fukuda**, **Masataka Sata**. The mechanism by which lifestyle-related diseases cause atherosclerosis: The role of innate immune system. 第 82 回日本循環器学会学術集会（大阪・2018 年 3 月 23-25 日）
6. **福田大受**：自然免疫機構が関与する慢性炎症と心血管代謝性疾患 第 47 回心臓血管作動物質学会・シンポジウム（長崎・2018 年 2 月 10 日）
7. **福田大受**、**佐田政隆** 自己 DNA 断片を介した自然免疫機構が心血管代謝性疾患の発症を促進する 第 38 回脳心血管抗加齢研究会（大阪・2017 年 12 月 16-17 日）
8. **Daiju Fukuda**, Hotimah Masdan Salim, Shusuke Yagi, Takeshi Soeki, **Masataka Sata**. Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, attenuates endothelial dysfunction in diabetic mice(直接的トロンピン阻害薬であるダビガトランは糖尿病性血管内皮機能障害を改善する) 心血管代謝週間 (CVMW) 2017 (大阪・2017 年 12 月 8 - 10 日)
9. **福田大受**：遊離核酸断片を介した自然免疫機構が脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の発症に与える影響 第 38 回肥満学会・シンポジウム(大阪・2017 年 10 月 7-8 日)
10. **Daiju Fukuda**, **Masataka Sata**. The thrombin signaling in endothelial dysfunction in diabetes. 第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会・シンポジウム（広島・2017 年 7 月 6-7 日）
11. **福田大受**、**佐田政隆**：多価不飽和脂肪酸と動脈硬化性疾患 第 3 回 J - I S C P 学術集会・シンポジウム（東京・2017 年 6 月 17-18 日）
12. **福田大受** 新しい動脈硬化のメカニズムの解明～自己由来核酸断片による自然免疫機構の関与～ 第 38 回日本循環制御医学会総会・学術集会・シンポジウム（大阪・2017 年 6 月 16-17 日）
13. **Daiju Fukuda**, Hotimah Masdan Salim, Shusuke Yagi, Takeshi Soeki, **Masataka Sata**. Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, attenuates endothelial dysfunction in diabetic mice. 第 17 回日本 NO 学会学術集会（徳島・2017 年 5 月 19-20 日）
14. Nishimoto S, **Fukuda D**, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Shimabukuro M, **Sata M**. Genetic deletion of TLR9 promotes blood flow recovery in hind limb ischemia. 19th International Vascular Biology Meeting, Boston, America, October 30-November 3, 2016.
15. Salim HM, **Fukuda D**, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, **Sata M**. Glycemic control with canagliflozin, a SGLT2 inhibitor, inhibited inflammation in the vascular and adipose tissue, and ameliorated vascular complication in diabetic mice. 19th International Vascular Biology Meeting,

Boston, America, October 30-November 3, 2016.

16. Salim HM, **Fukuda D**, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, **Sata M**. Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, prevents the development of endothelial dysfunction in diabetic mice. 19th International Vascular Biology Meeting, Boston, America, October 30-November 3, 2016.
17. **福田大受**、**佐田政隆**. 遊離核酸断片による血管の炎症と動脈硬化症発症機序の解明. 第 39 回日本高血圧学会総会 (仙台・2016 年 9 月 30-10 月 2 日)
18. **福田大受**. 動脈硬化発症における FXa-PARs シグナルのマクロファージ活性化調節機構の解明. 第 64 回日本心臓病学会学術集会 (東京・2016 年 9 月 23-25 日)
19. **Daiju Fukuda**. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. 第 21 回アディポサイエンス・シンポジウム(大阪・2016 年 8 月 20 日)
20. **福田大受**、**佐田政隆**: ~ 心不全を予防する ~ 遊離核酸断片を介した血管の炎症と動脈硬化症発症機序の解明. 第 2 回 J-ISCP 学術集会 (徳島・2016 年 6 月 25-26 日)
21. **Fukuda D**. Protease-Activated Receptor-2 Plays a Critical Role in Vascular Inflammation and Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. 第 38 回血栓止血学会学術集会 (奈良・2016 年 6 月 16-18 日)

[図書] (計 1 件)

1. **Sata M**, Tanaka K, **Fukuda D**. Wire-Mediated Endovascular Injury That Induces Rapid Onset of Medial Cell Apoptosis Followed by Reproducible Neointimal Hyperplasia. Mouse Models of Vascular Diseases. 2016:3-20. Springer Nature

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐田 政隆

ローマ字氏名：**SATA**, Masataka

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部 (医学系)

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：**80345214**

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。