

STAP現象の検証結果について

実験総括責任者:

独立行政法人理化学研究所 研究不正再発防止改革推進本部
検証実験チーム チームリーダー 相澤 慎一

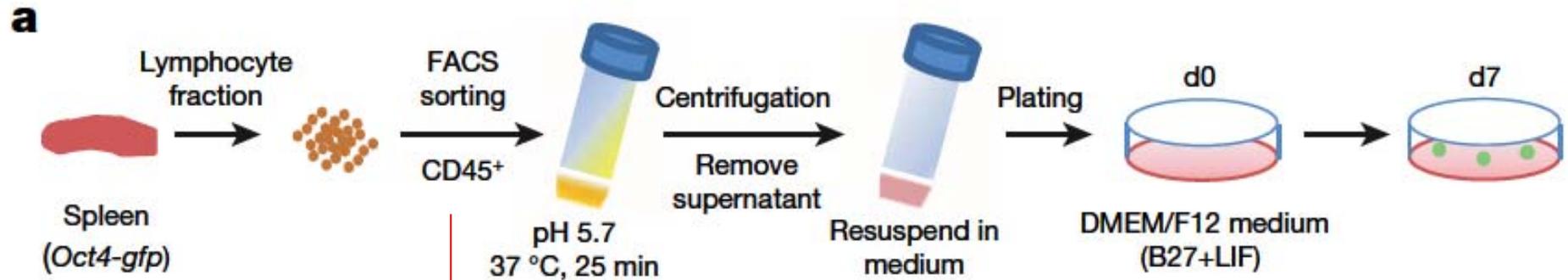
研究実施責任者:

独立行政法人理化学研究所 研究不正再発防止改革推進本部
検証実験チーム 副チームリーダー 丹羽 仁史

2014年12月19日

独立行政法人理化学研究所

STAP細胞誘導の概略



C57BL/6
F1(C57BL/6x129)
生後5~10日目

*塩酸を用い弱酸性化
*ATP

Lympholyte®(リンパ球分離溶液)を用いた遠心分離による赤血球の除去
=90%以上CD45陽性細胞

(1) 小保方研究員による検証結果

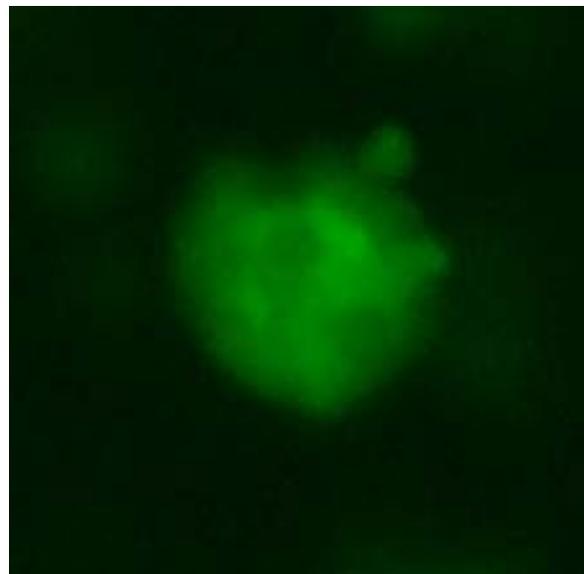
検証の目的

STAP現象(新生児の分化した細胞を弱酸性ストレス処理すると、多能性をもつ未分化細胞にリプログラミングされる)の存在を検証する。

- Oct-GFPを導入したマウス新生児の脾臓などの細胞の弱酸性処理によるGFP 陽性細胞出現の検証
出現頻度:細胞塊数、FACS
多能性細胞特異的分子マーカーの発現:定量PCR法、免疫染色法
自家蛍光との区別:緑色蛍光と赤色蛍光の分離
- キメラマウス(胚)形成能の検証
LIF, ACTH下でのSTAP幹細胞の樹立
FGF4下でのFI 幹細胞の樹立

蛍光顕微鏡による酸処理後形成されるSTAP様細胞塊の 緑色蛍光検出

50-100 μm



酸処理による緑色蛍光陽性細胞の出現数

GFP陽性細胞塊数/ 1×10^6 播種細胞/well

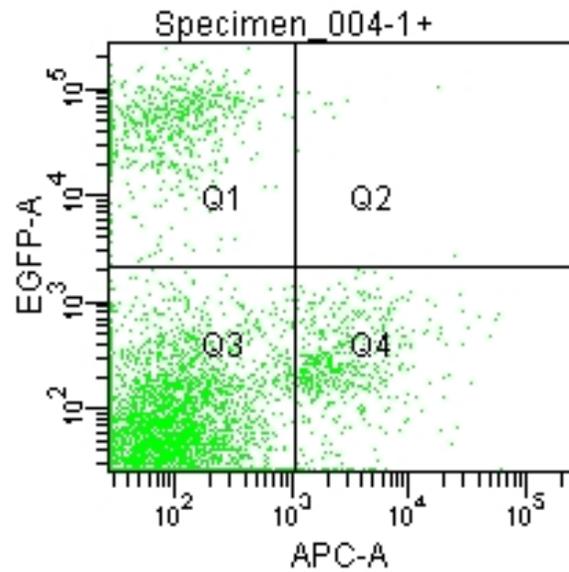
	C57BL/6	B6/129 F1
Cont	0 (9)	0 (9)
HCl	3~23 (11)	0~42 (10)
ATP	4~52 (14)	1~30 (13)

(実験回数)

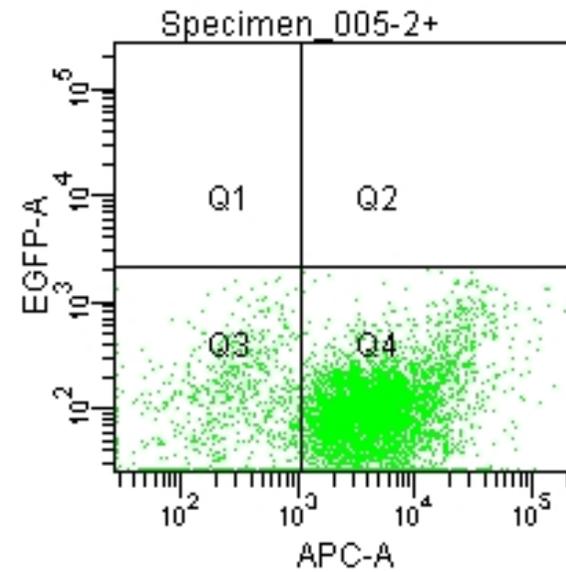
FACSによる酸処理後形成されるSTAP様細胞塊の緑色蛍光検出

EGFP: Oct3/4-GFP

APC: CD45



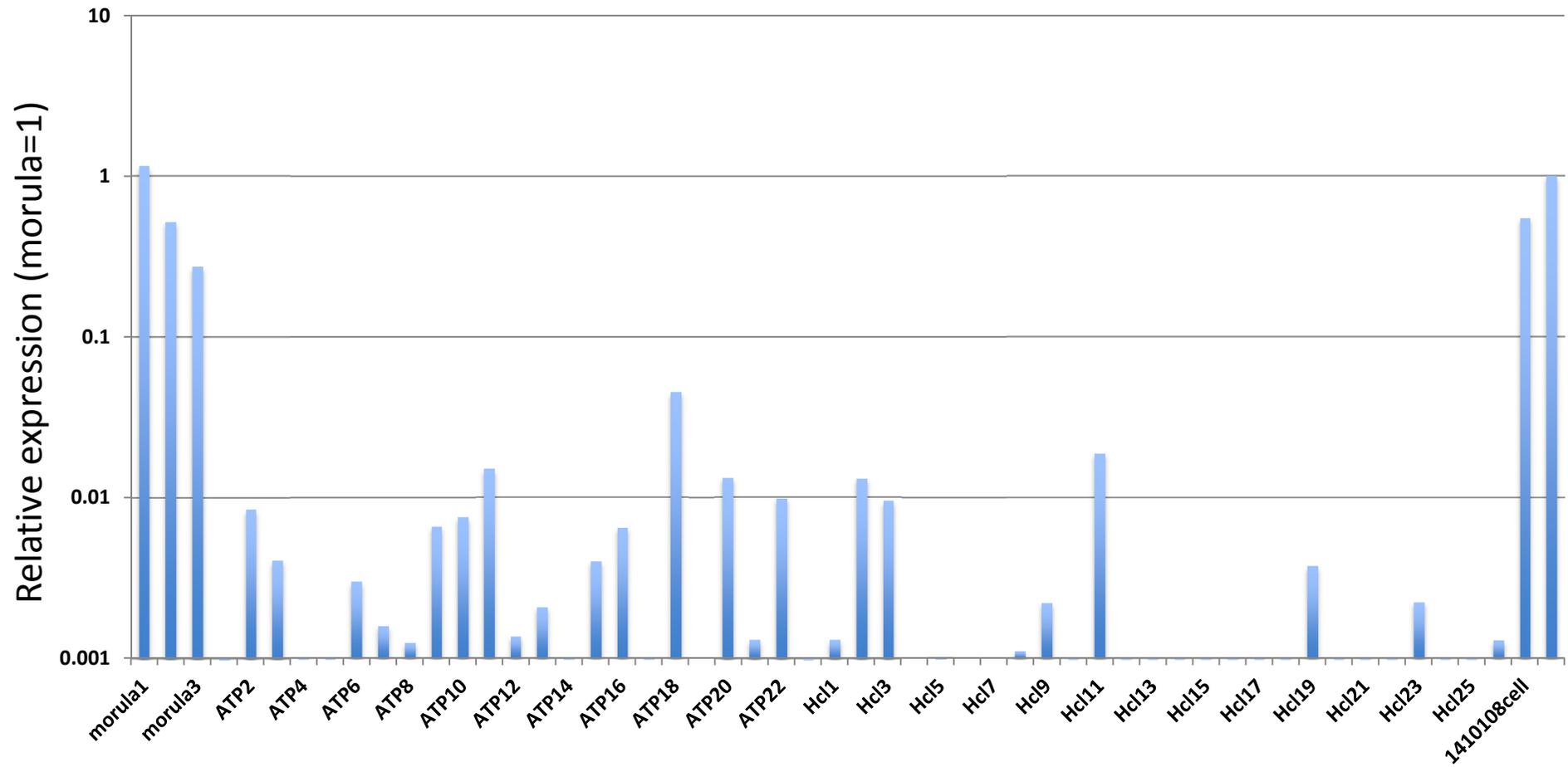
Q1: 9.1 Q2: 0.2
Q3: 83.4 Q4: 7.3



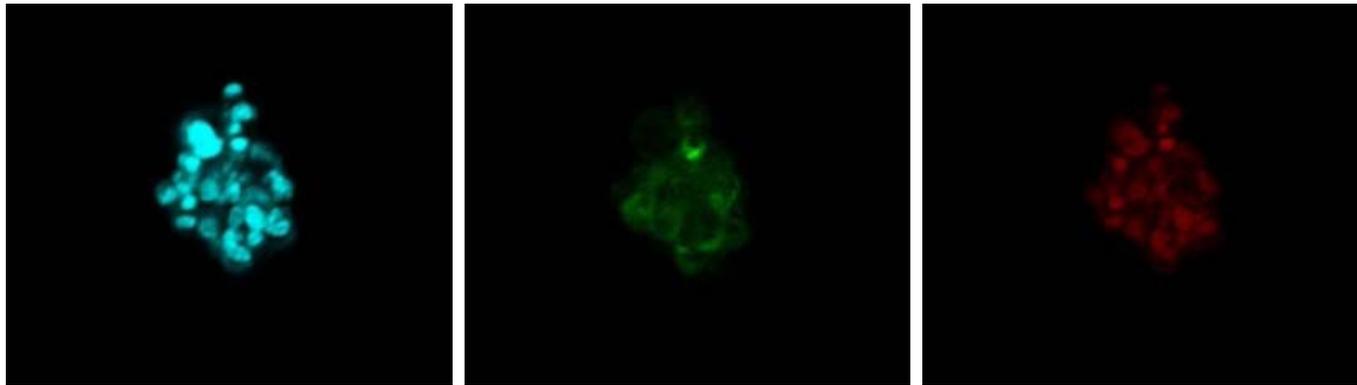
Q1: 0 Q2: 0
Q3: 12.1 Q4: 87.9

定量PCRによる脾臓由来STAP様細胞塊におけるOct発現

oct/gap



免疫染色法によるSTAP様細胞塊でのOct3/4発現確認

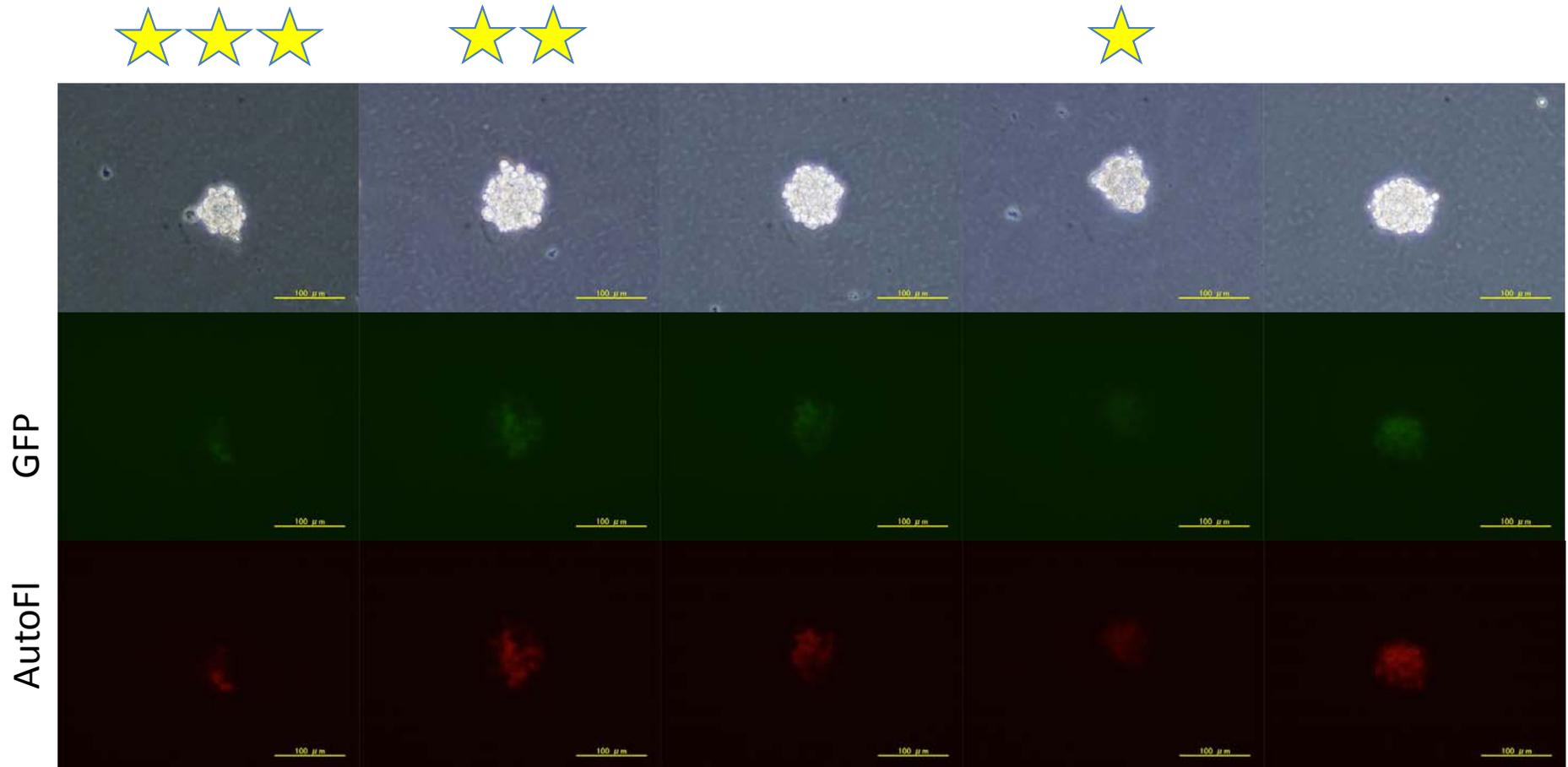


DAPI
(細胞核)

E-cadherin
(細胞膜)

Oct3/4

STAP様細胞塊における緑色蛍光および赤色蛍光の分離検出



緑色蛍光陽性細胞の出現が十分には得られなかった状況下において、再現性をもって自家蛍光と区別し、多能性細胞特異的分子マーカーの発現と対応づけることは出来なかった。

■ STAP様細胞塊からのキメラ作製

移植細胞塊数	1615
発生胚数	845
キメラ胚数	0

■ 細胞塊からの幹細胞株の樹立

STAP-SCs

FI-SCs

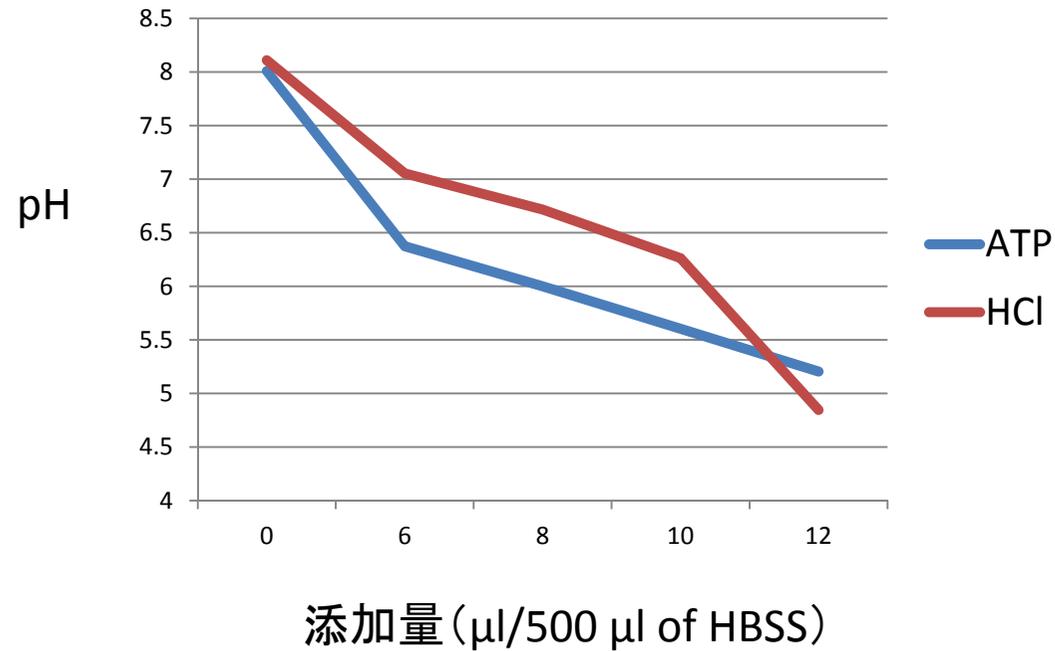
■ テラトーマ作製

(2) 丹羽副チームリーダーによる検証結果

検証を行った因子の組み合わせ

細胞を調製する臓器	酸処理方法	マウスの遺伝背景
脾臓	塩酸(HCl)	C57BL/6(B6)
肝臓	アデノシン3リン酸 (ATP)	C57BL/6x129(F1)
心臓		

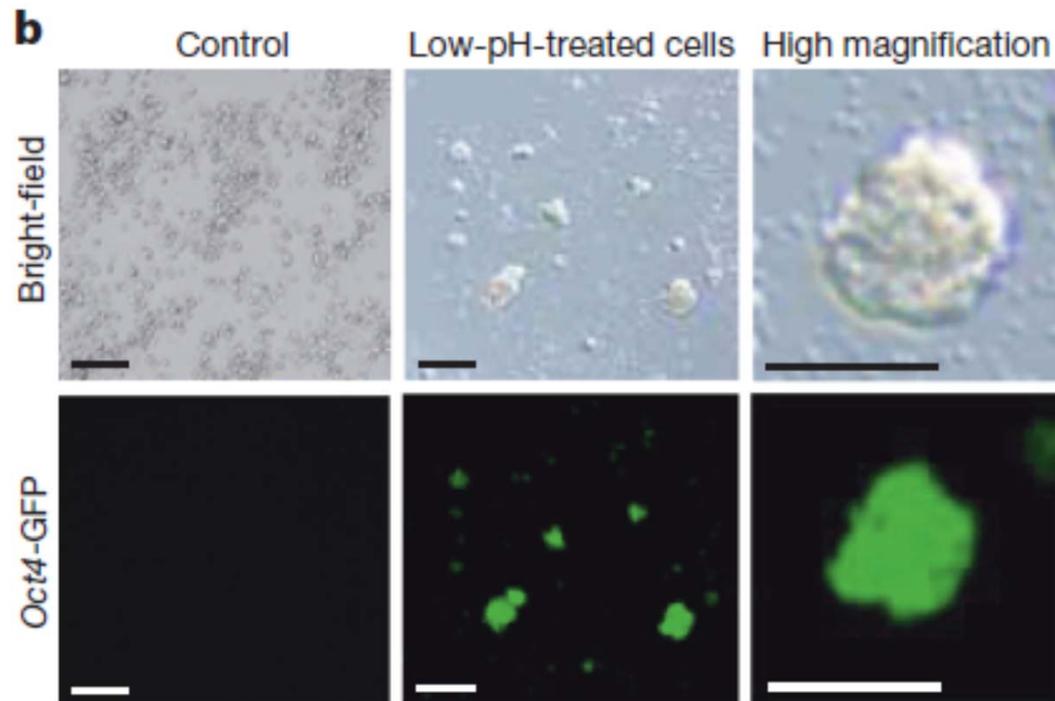
HClならびにATPの濃度の設定



HCl: 10 μl の35%HClを590 μl のHBSSで希釈したものを添加
ATP: 200mM溶液を添加

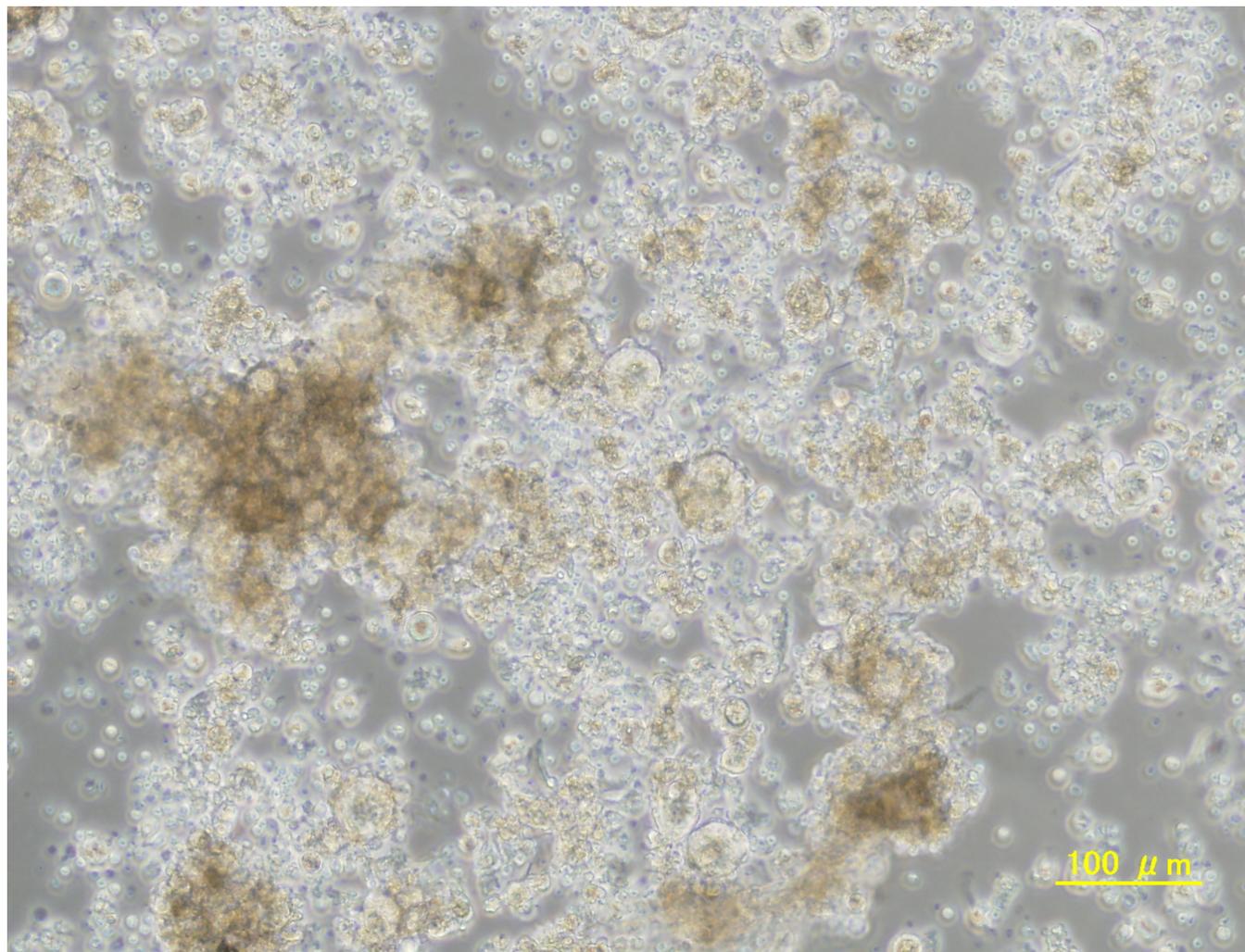
STAP様細胞塊が誘導されたことを確認する方法

- 1 浮遊細胞塊の出現
- X 2 Oct3/4-GFP (GOF)からのGFP蛍光遺伝子発現



(Obokata *et al.*, Nature, 2014, *retracted*)

酸処理した肝臓細胞を培養したときに出現する細胞塊



20140711d7 liver LLM ATP10 FGF2
20140704 No47 B6/129 p4

条件別実験試行回数

酸処理方法	HCl(塩酸)	ATP(アデノシン3リン酸)
臓器		
脾臓	32	69
肝臓	34	82
心臓	27	53

塩酸(HCl)処理を用いたSTAP細胞誘導実験の結果(まとめ)

		STAP様細胞塊 の出現	Oct4-GFP の発現	Oct3/4蛋白 の検出	Oct3/4遺伝子 の発現
spleen	脾臓	△	×	×	×
liver	肝臓	△	×	×	×
heart	心臓	×	×	×	×
		↓	↓	↓	↓
実験手法		顕微鏡 形態観察	蛍光顕微鏡観察 FACS解析	抗体による 免疫染色	定量PCR

アデノシン3リン酸(ATP)処理を用いた STAP細胞誘導実験の結果(まとめ)

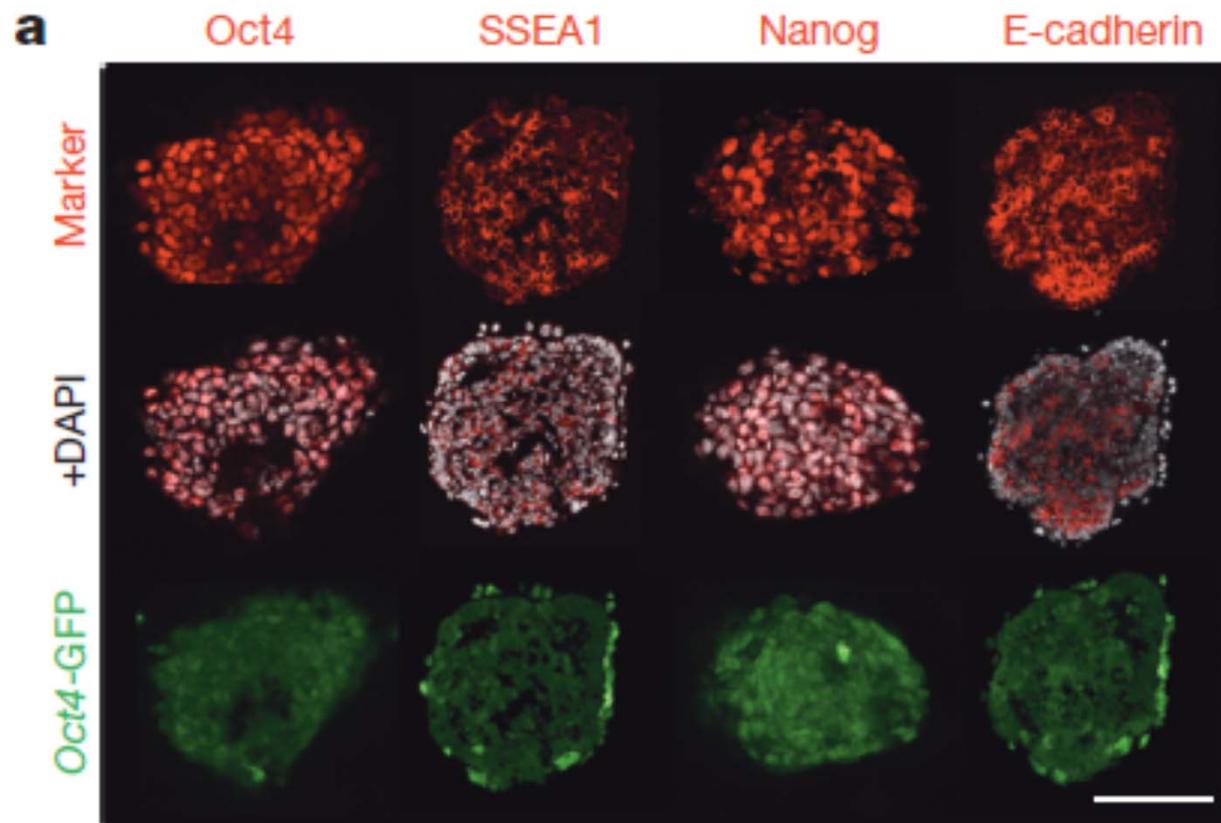
		STAP様細胞塊 の出現	Oct4-GFP の発現	Oct3/4蛋白 の検出	Oct3/4遺伝子 の発現
spleen	脾臓	△	×	×	×
liver	肝臓	△	×	○	○
heart	心臓	×	×	×	×
		↓	↓	↓	↓
実験手法		顕微鏡 形態観察	蛍光顕微鏡観察 FACS解析	抗体による 免疫染色	定量PCR

肝臓細胞をATP処理したときのSTAP様細胞塊の出現数

マウス 遺伝背景	トランスジーン	試行回数	STAP様細胞塊の出現	
			あり	なし
B6	なし	8	5	3
B6	GOF18	7	5	2
B6	CAG-GFP	11	8	3
B6	Alb-Cre/GFP	10	10	0
F1	なし	3	3	0
F1	GOF18	6	2	4
F1	CAG-GFP	4	4	0
	合計	49	37	12

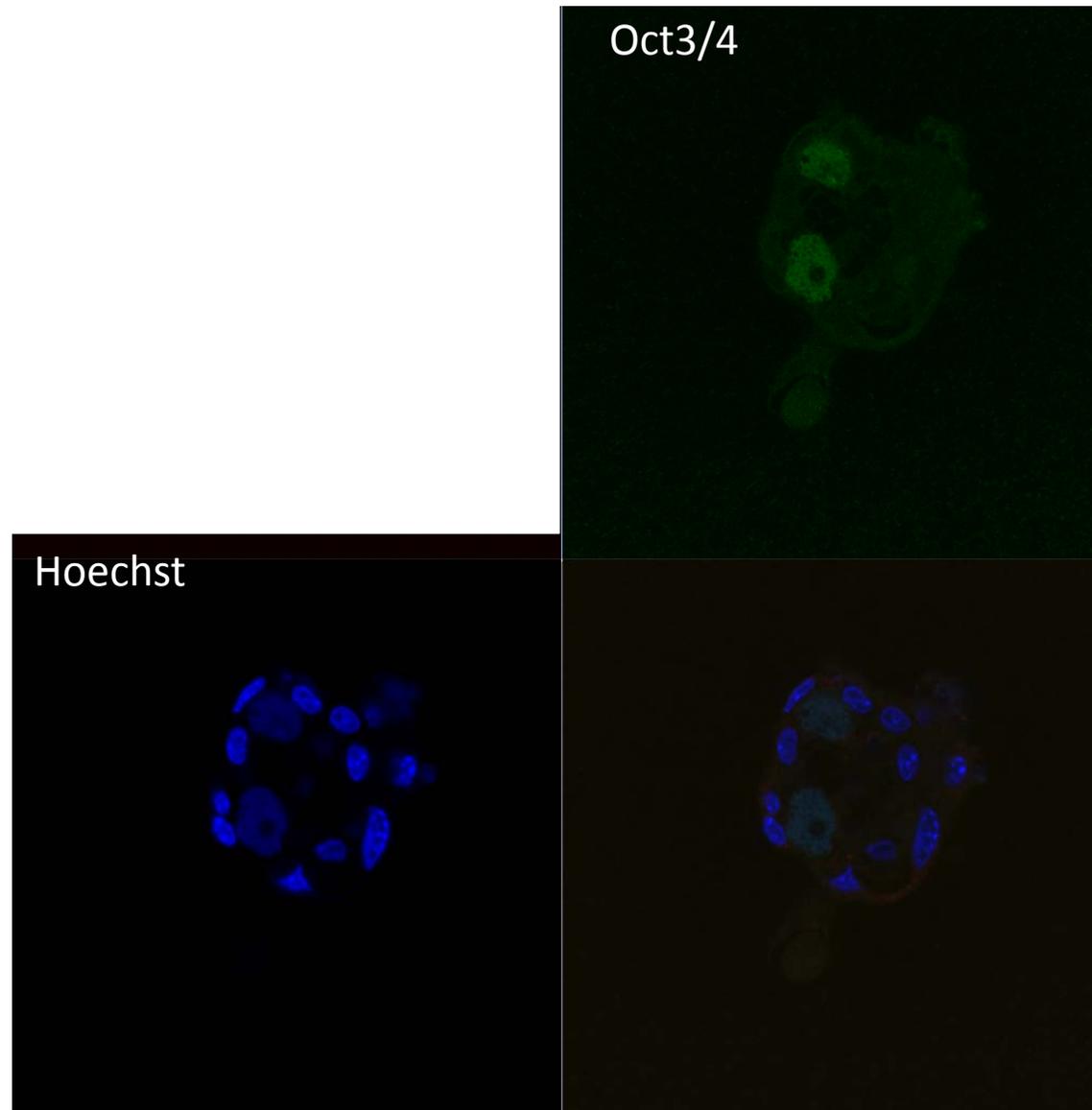
マウス 遺伝背景	試行回数	STAP様細胞塊の出現		
		あり	なし	頻度
B6	36	28	8	78%
F1	13	9	4	44%

免疫染色法によるOct3/4蛋白発現の検出



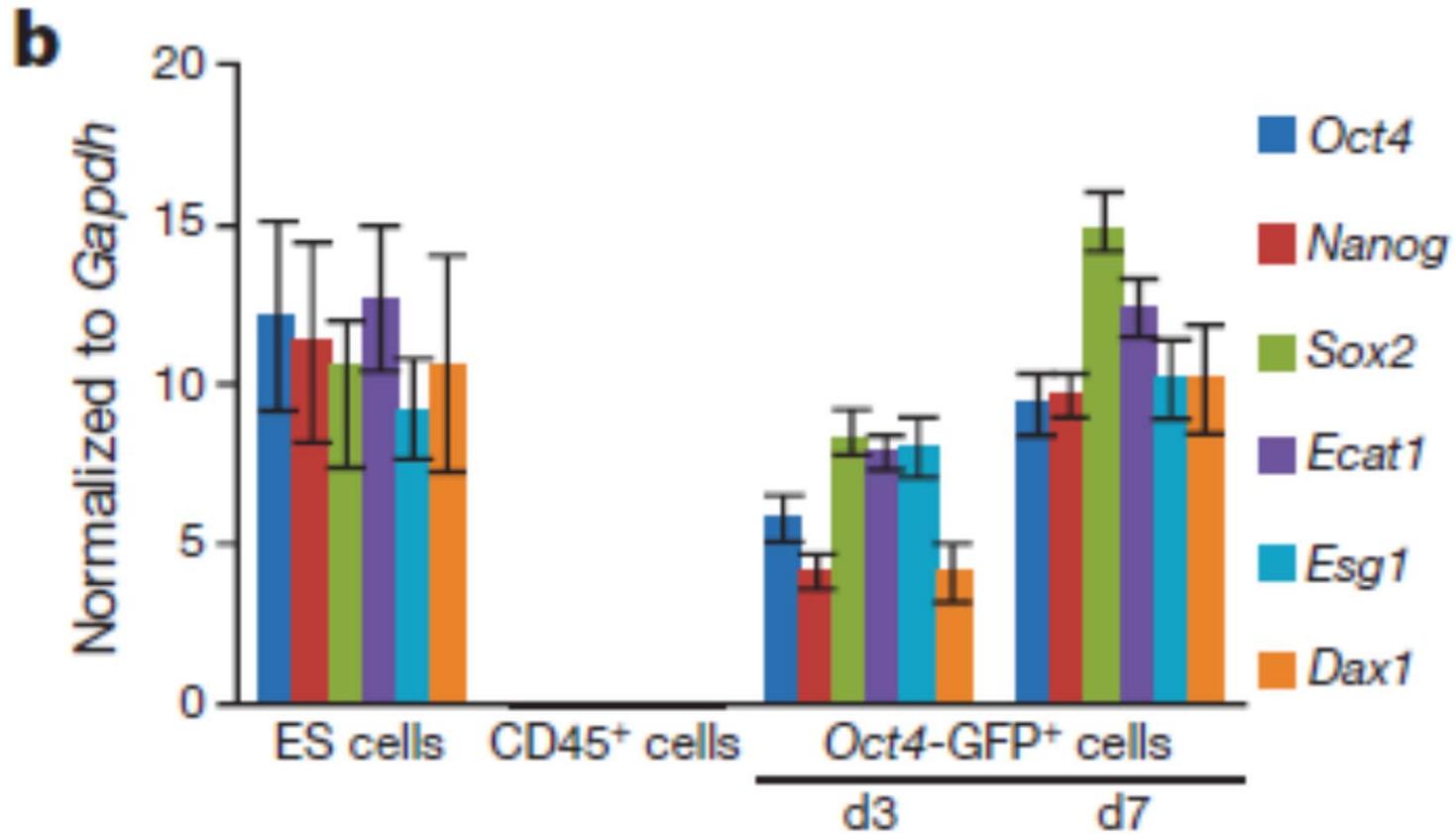
(Article, Figure 2)

免疫染色法による肝臓細胞由来STAP様細胞塊における 多能性マーカー(Oct3/4タンパク質)発現の検出



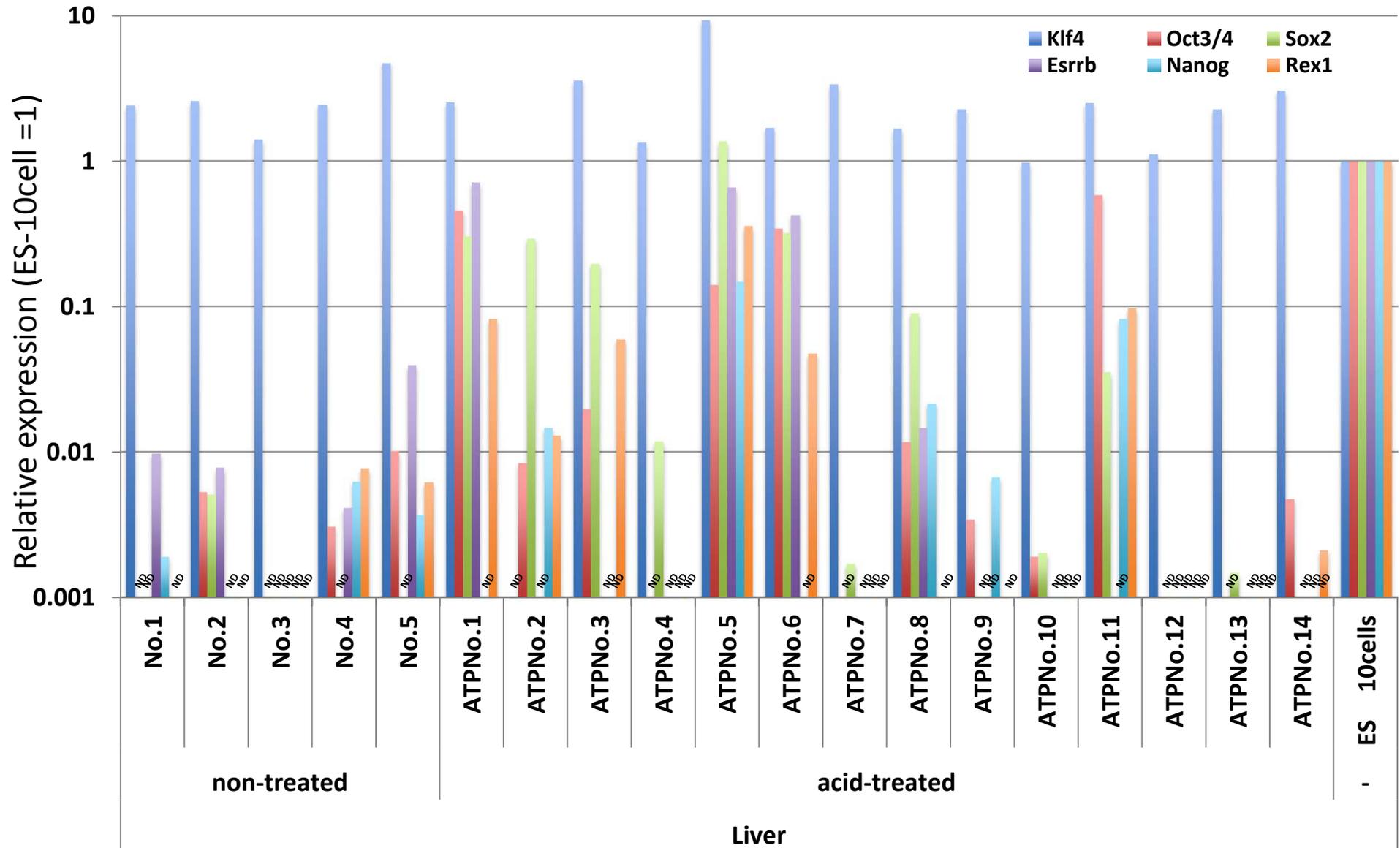
20140603 No35 B6/129 p6 liver ATP10 FGF2

定量PCR法によるOct3／4遺伝子発現の検出



(Article, Figure 2)

細胞塊毎の定量PCR法による多能性マーカー遺伝子発現解析の例



Single cell-aggregate QPCR (B6-liver No 47)

Oct3／4陽性細胞が多能性を有することを検証する方法

(1) STAP様細胞塊のOct3／4陽性細胞から

ないしは

(2) STAP様細胞塊のOct3／4陽性細胞から樹立した幹細胞株から

(A) 胚盤胞注入によりキメラ胚を作製し、三胚葉への寄与を証明する(キメラ法)

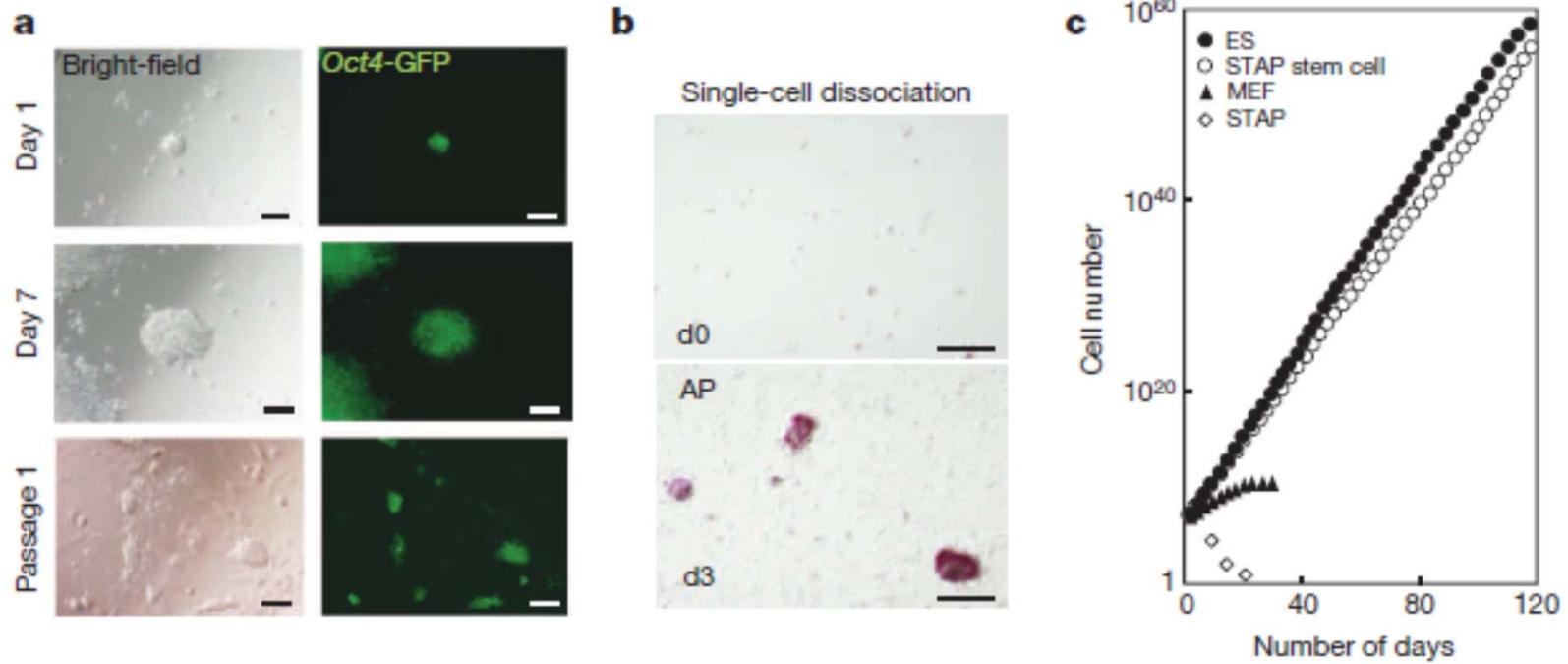
(B) 免疫不全マウスへの移植で奇形腫を作製し、三胚葉への分化を証明する(テラトーマ法)

(C) 培養条件下で分化を誘導し、三胚葉への分化を証明する(分化誘導法)

肝臓細胞由来STAP様細胞塊の初期胚への注入による キメラ胚作製の試み

実験回数	8回
細胞塊を注入した胚の数	244個
回収した着床後胚(9.5~10.5日胚)の数	117個
GFP陽性細胞を含む胚(キメラ胚)の数	0個

STAP様細胞塊からのSTAP幹細胞の樹立



STAP様細胞塊をES細胞培養条件で培養

(Article, Figure 5)

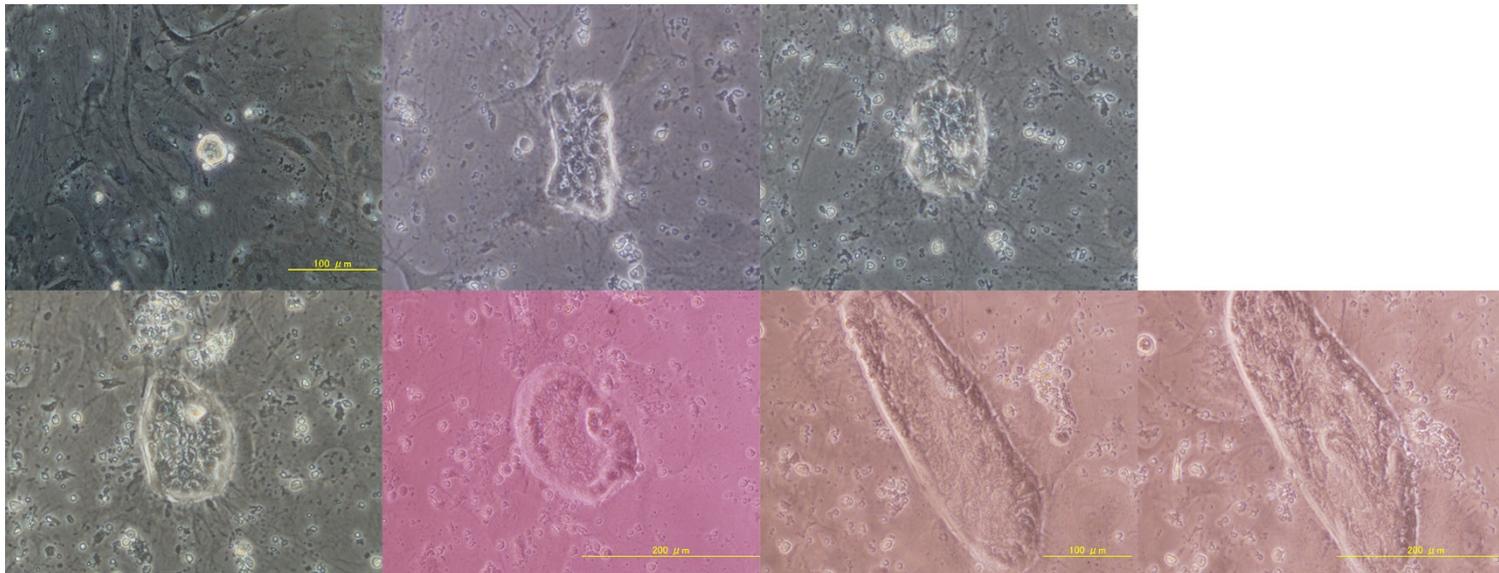
STAP様細胞塊の培養による多能性幹細胞株樹立の試み

No66 B6 CAG-GFP P7 liver ATP10 LLM C4

140901 D0

140908 D7

140910 D9



140911 D10

140912 D11

140915 D14

140916 D15

肝臓細胞をATP処理して得られたSTAP様細胞塊の培養 (LIF/ACTH含有培地におけるSTAP幹細胞作製の試み)

マウス		STAP細胞様細胞塊の数			
遺伝背景	トランスジーン	試行回数	培養	増殖	継代
B6	CAG-GFP	3	61	2	0
B6	Alb-Cre/GFP	5	189	1	0
F1	CAG-GFP	4	142	0	0
F1	GOF18	2	100	0	0
		計	492	3	0

帰結

- Oct-GFPを導入した新生児脾臓、肝臓からのGFP 陽性細胞の出現頻度は低く、再現性をもって、これらの細胞の多能性獲得、未分化性を分子マーカーの発現によって確認することは出来なかった。
- 細胞塊が有する緑色蛍光を自家蛍光と区別することも困難で、その由来を判定することは出来なかった。
- 研究論文で報告されたSTAP 幹細胞、FI 幹細胞の樹立条件下でも、形態的に類似細胞の出現は認めしたが、低頻度であり、継代樹立することは出来ず、これら類似細胞出現の意義を判定することは出来なかった。
- STAP様細胞塊より、さまざまな手法、条件でキメラ作製を検討したが、リプログラミングを有意に示すキメラ作成を認めることが出来なかった。

検証の実施期限を来年3月まで予定していたが、以上の検証結果を踏まえ、検証に関する実験を終了することとした。