

# STAP現象の検証の実施について

実験総括責任者:

独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター  
特別顧問(相澤研究ユニット 研究ユニットリーダー兼務) 相澤 慎一

研究実施責任者:

独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター  
多能性幹細胞研究プロジェクト プロジェクトリーダー 丹羽 仁史

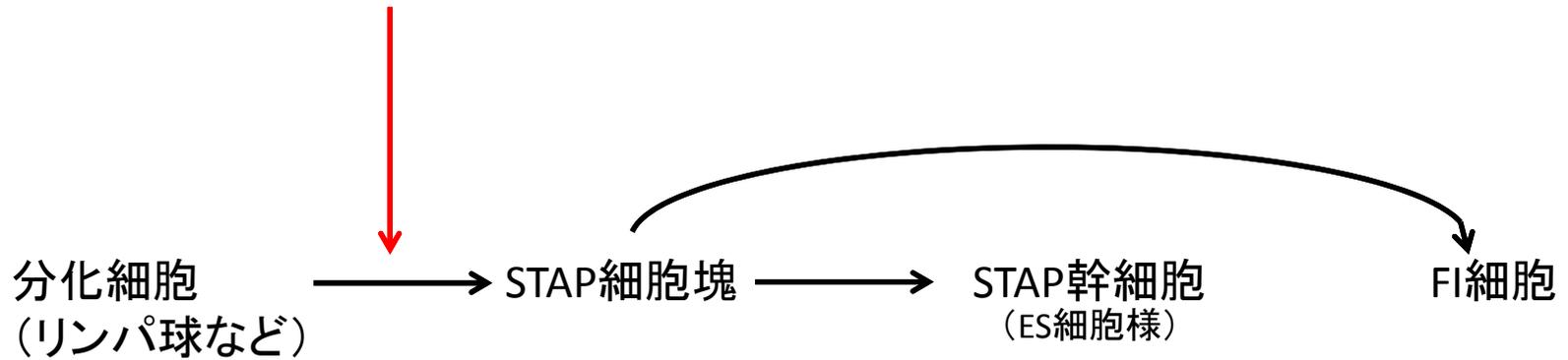
2014年4月7日

独立行政法人理化学研究所

## 検証実験の目的

- STAP現象が存在するか否かを一から検証する。
- 論文に記載された方法で再現性を検証する。  
(リンパ球からの多能性細胞誘導の検証)
- 論文に記載された方法とは異なる、より厳密な細胞追跡法を用い、STAP現象の有無を検証する。  
(Cre-loxPシステムを用いた検証)

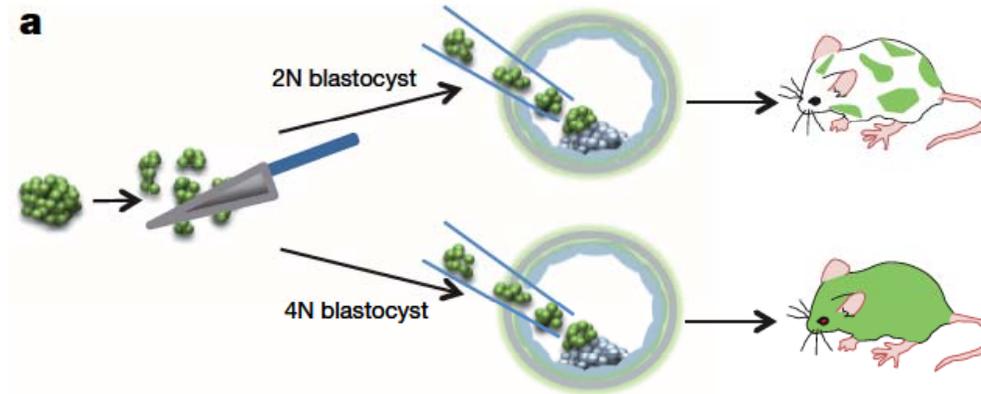
STAP現象＝分化細胞が刺激によってリプログラミングされ  
多能性を獲得する現象(論文の主張)



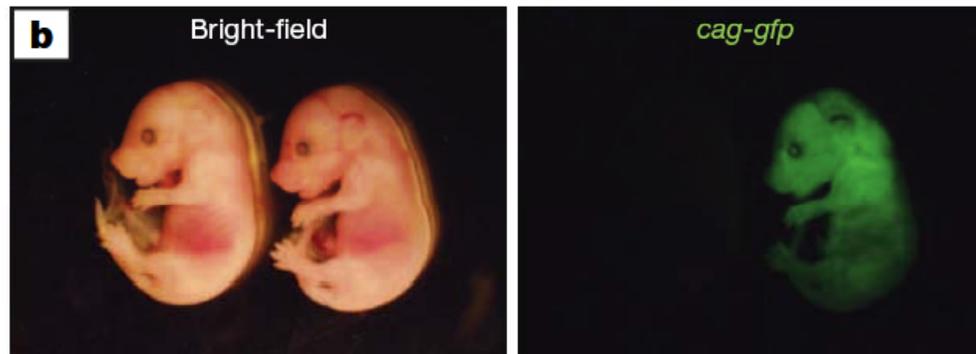
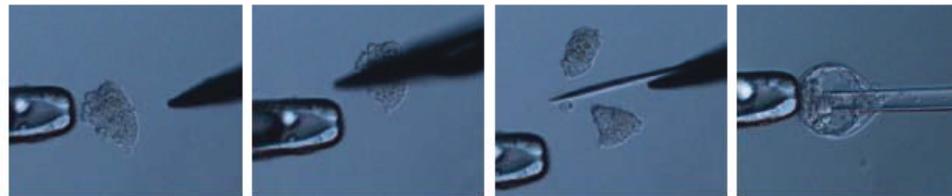
キメラ寄与能

胎児	×	○	○	△
胎盤	×	○	×	○
自己複製能	×	×	○	○

# 多能性の厳密な評価＝胚盤胞注入によるキメラ胚形成能



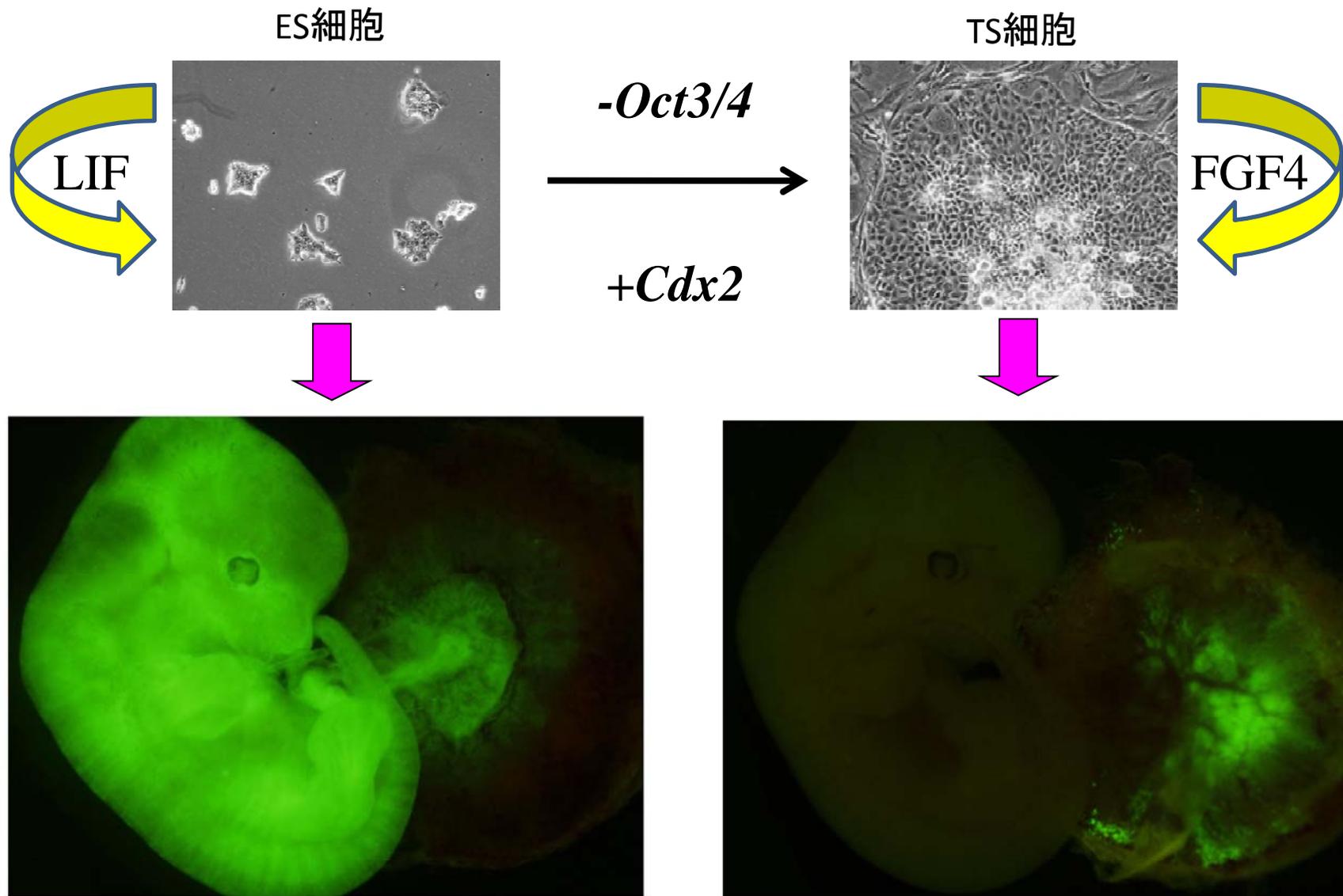
4倍体キメラ法では注入した細胞のみにより胚が形成される。



キメラ胚形成は、テラトーマ形成よりも、より厳密な多能性の評価法とされる。

(Obokata et al, Nature, 2014)

# ES細胞は分化転換されない限り胎盤には寄与できない



(Niwa, H. et al, Cell, 2005)

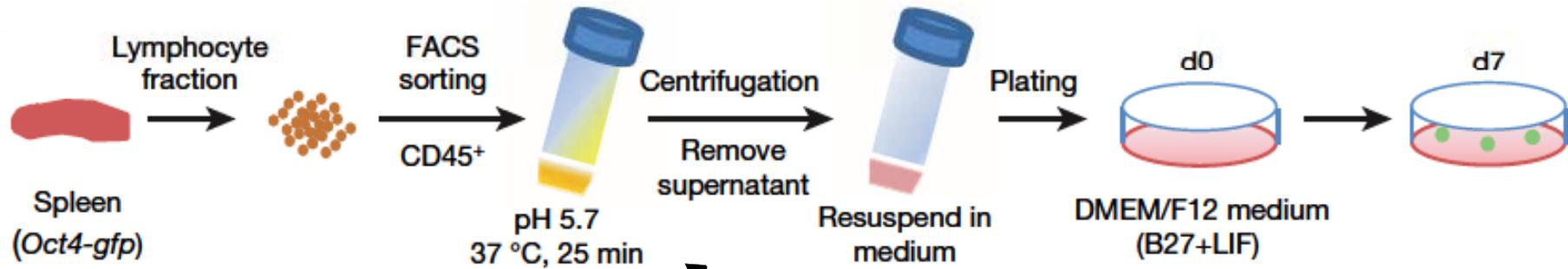
## (参考)胎児と胎盤に寄与する幹細胞の報告

ES細胞に含まれる亜集団(全体の約2%)を、蛍光遺伝子マーカーを導入して識別して回収し、これらを胚盤胞に注入すると胎児と胎盤に寄与する(Macfarlan et al, Nature, 2012)。

遺伝子マーカーの導入なしには回収できず、分離した亜集団は安定に培養できない。

特殊な環境で誘導したiPS細胞を胚盤胞に注入すると胎児と胎盤に寄与する(Abad et al, Nature, 2013)。

# STAP細胞誘導手順の検討



1週令マウスから再現性よく一定時間でリンパ球を調製すること、ないしは組織から分散した単一細胞を調製すること自体が、熟練を要する。

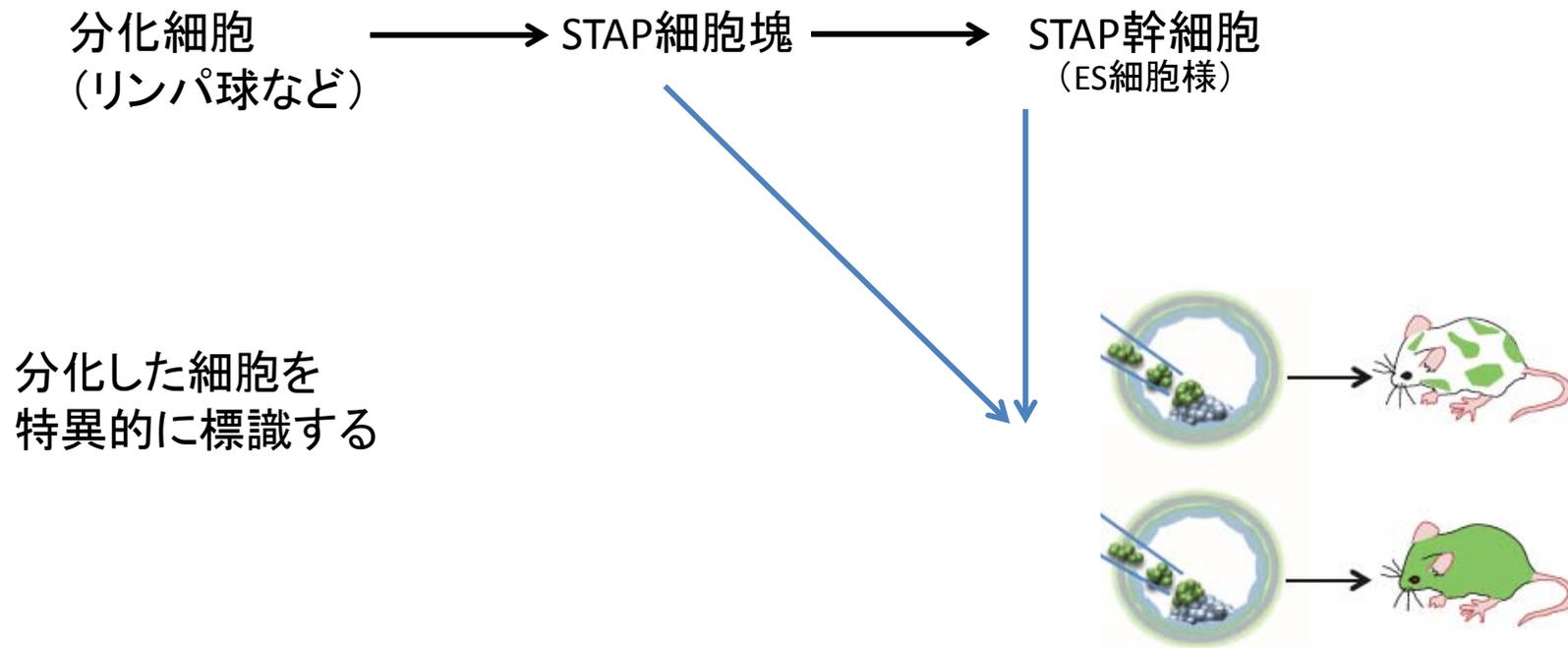
酸処理  
HCl

細ガラス管通過(trituration法)  
Vacanti protocolでは酸処理と併用

トランスジェニックマウスの安定供給

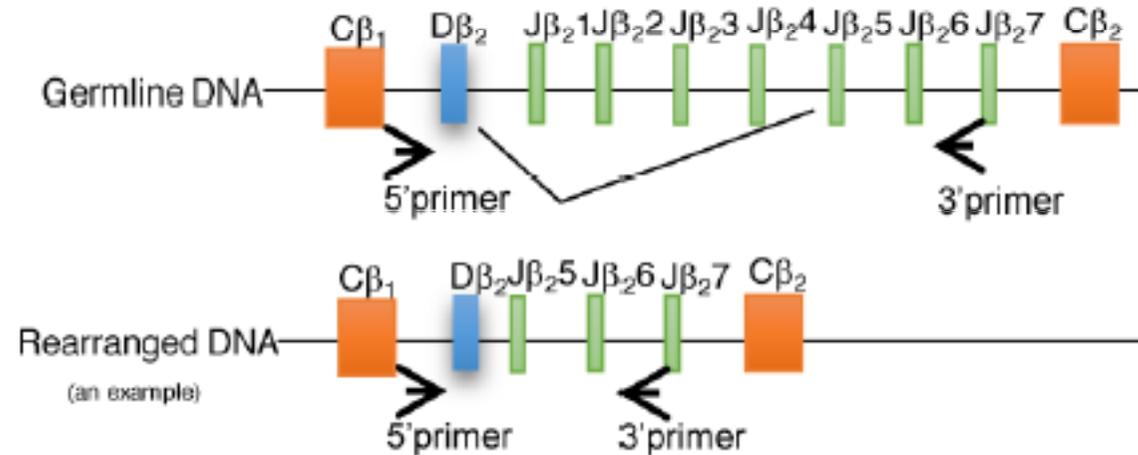
(Obokata et al, Nature, 2014)

# 分化した細胞からSTAP現象により多能性細胞が生じる事の証明方法



分化した細胞由来である事を示す標識の検出

## T細胞受容体遺伝子再構成＝ゲノムに残る分化細胞の証拠

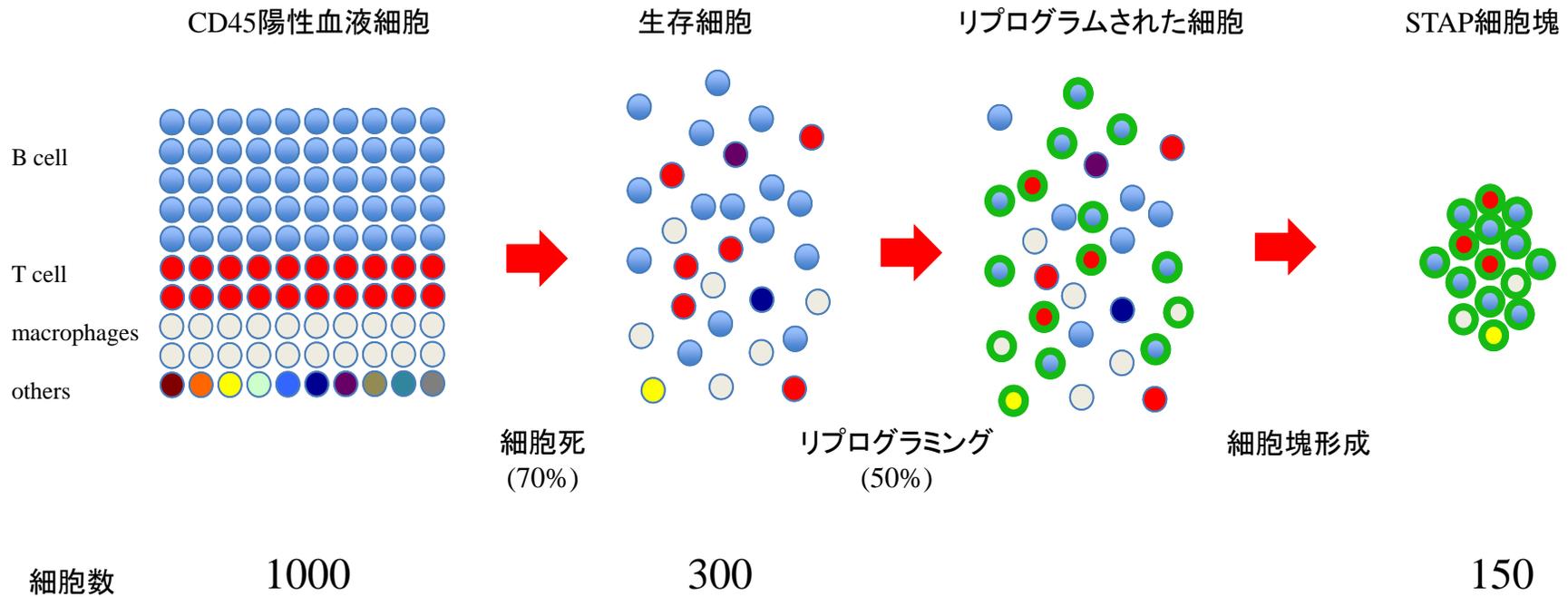


1週令マウス脾臓由来CD45陽性血液細胞の10-20%がT細胞で、  
そのうち10-20%がT細胞受容体遺伝子再構成を持つ。  
(全CD45陽性細胞の1-4%がT細胞受容体遺伝子再構成を持つ)

これは決して効率のよい指標ではなく、他の指標を用いた検証を併用する事が望ましい。

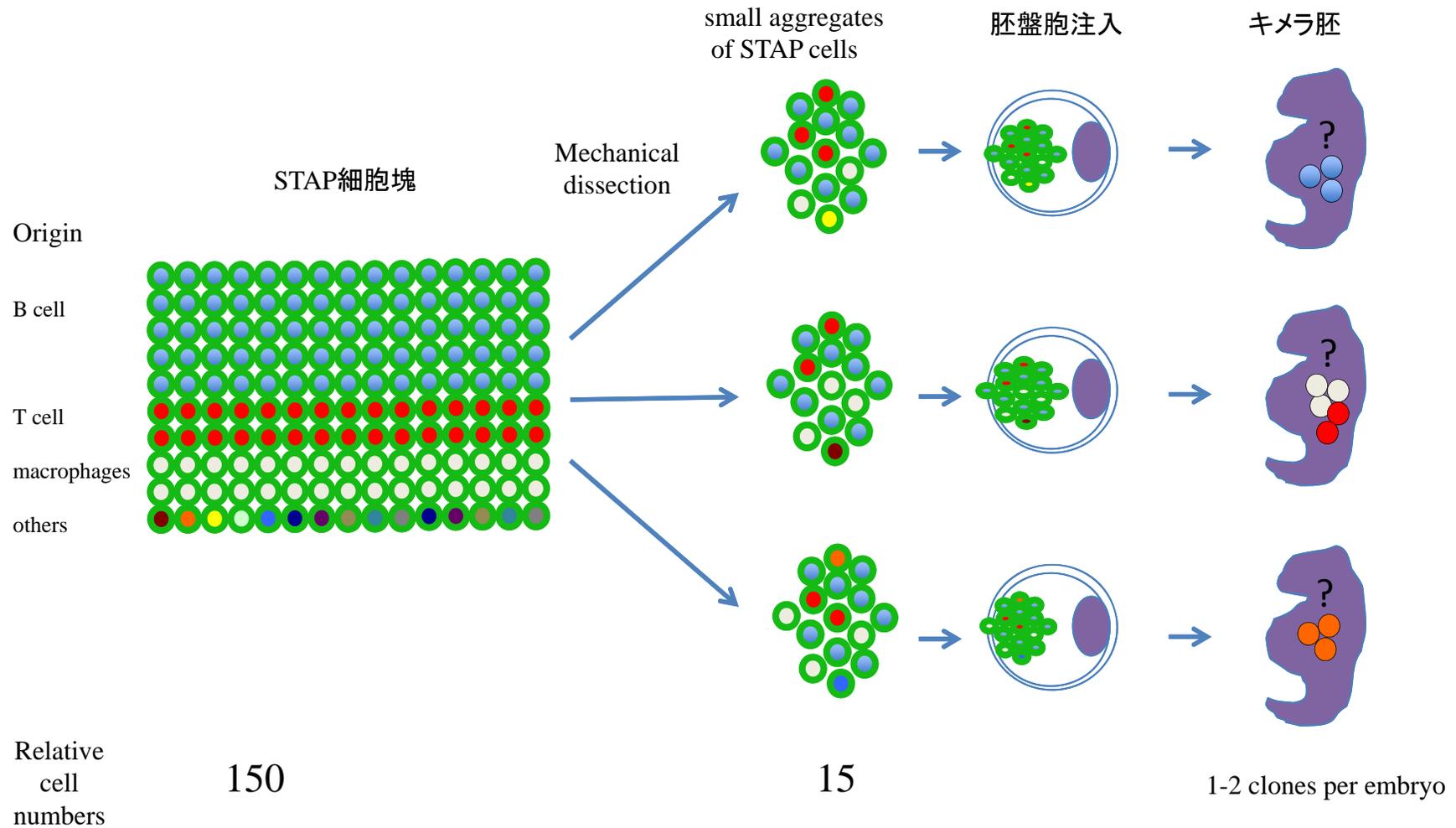
(Obokata et al, Nature, 2014)

# STAP細胞が出来る過程(論文に基づく仮説)

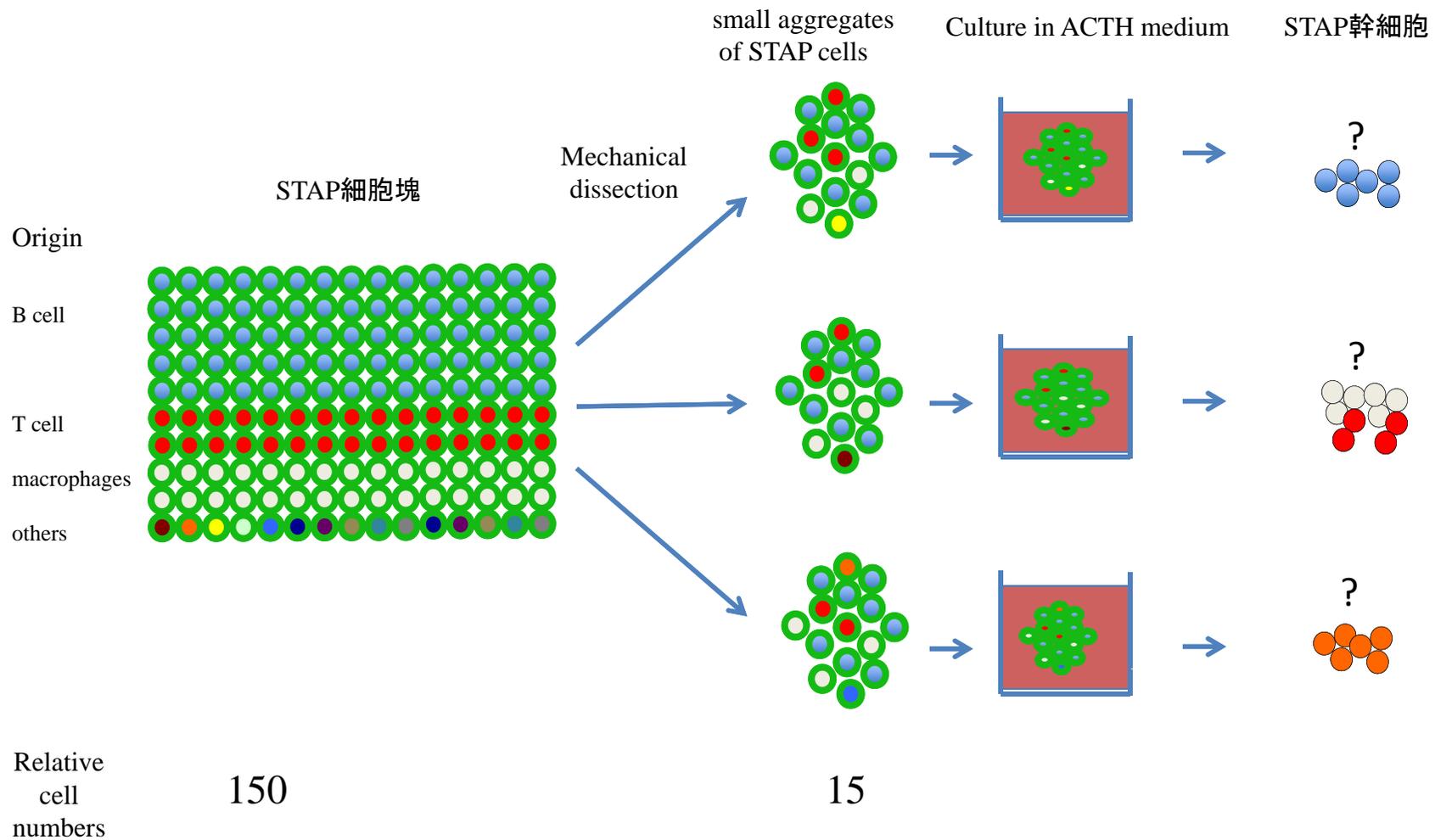


STAP細胞は細胞塊(クラスター)として得られる。  
細胞塊にはT細胞受容体遺伝子再構成を持たない細胞も多く含まれる。

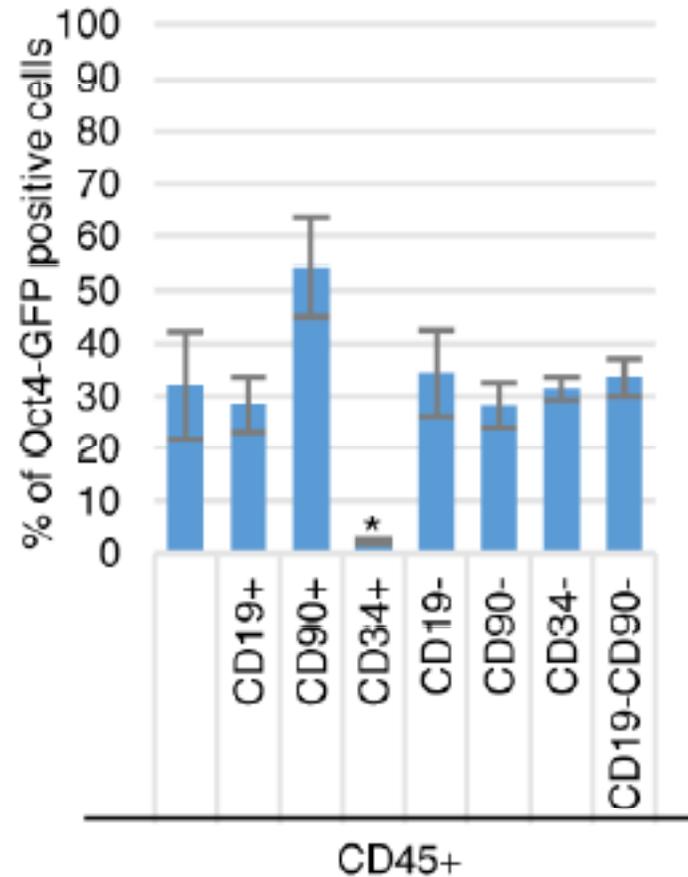
# キメラ胚でT細胞受容体遺伝子再構成を検出できる確率は低い



# 再構成されたT細胞受容体遺伝子を持つSTAP幹細胞が 得られる確率は低い



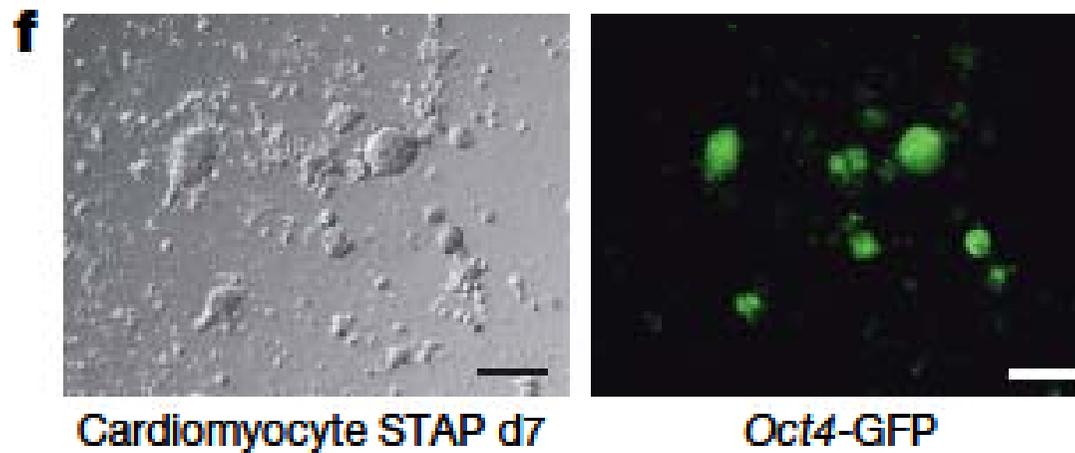
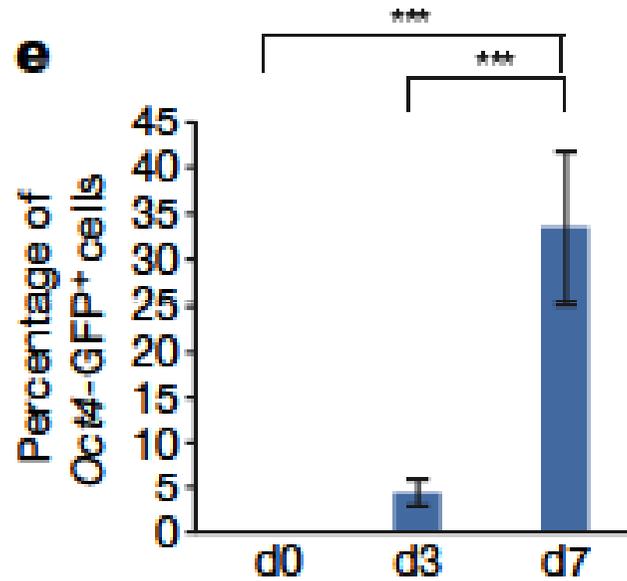
# 血液細胞の中でもSTAP細胞誘導効率に差があるかもしれない



T細胞に限定した評価は真偽を確定するためには不十分

(Obokata et al, Nature, 2014)

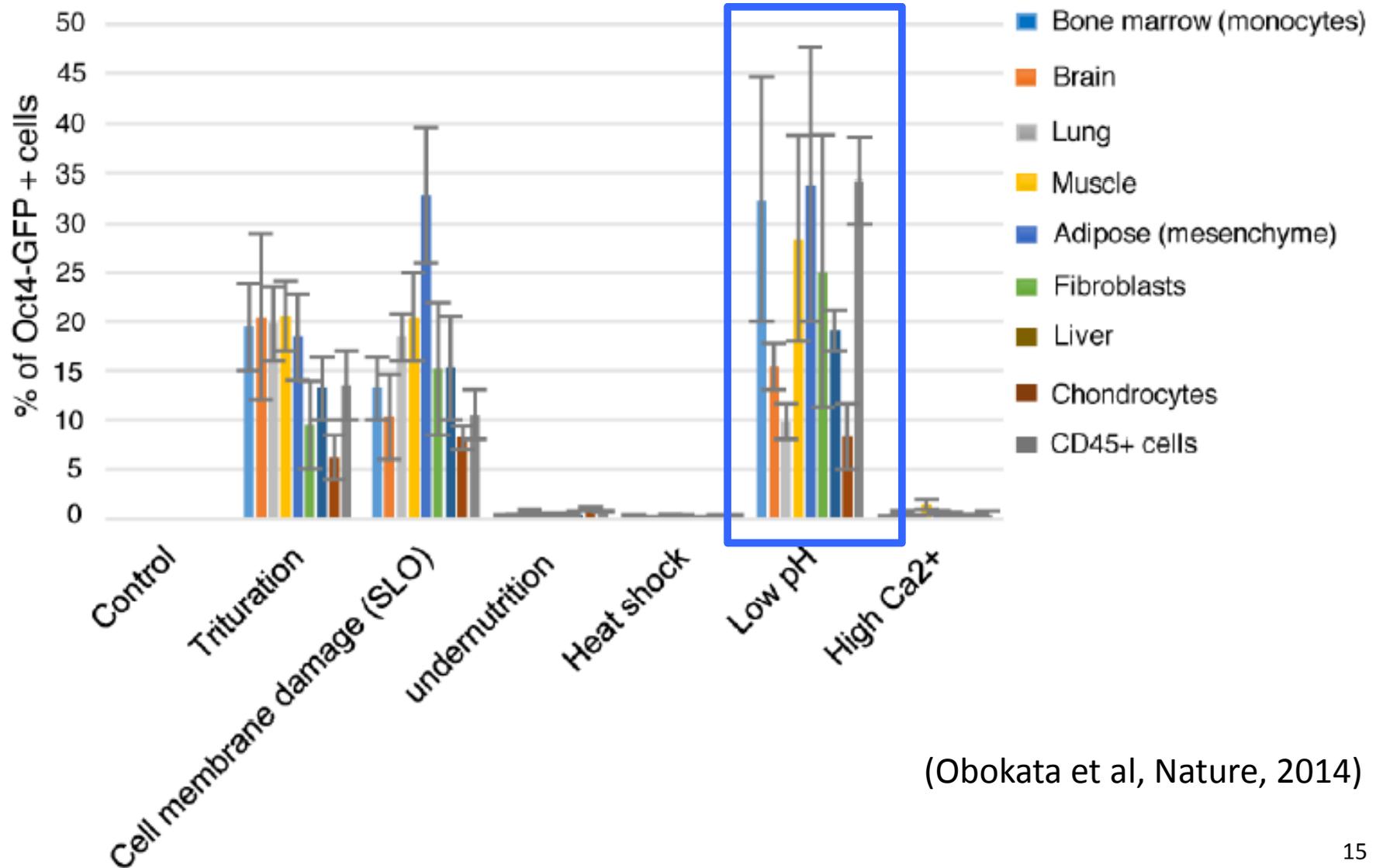
# 心筋からのSTAP細胞誘導



(Obokata et al, Nature, 2014)

# 血液細胞以外の酸処理によるSTAP細胞誘導

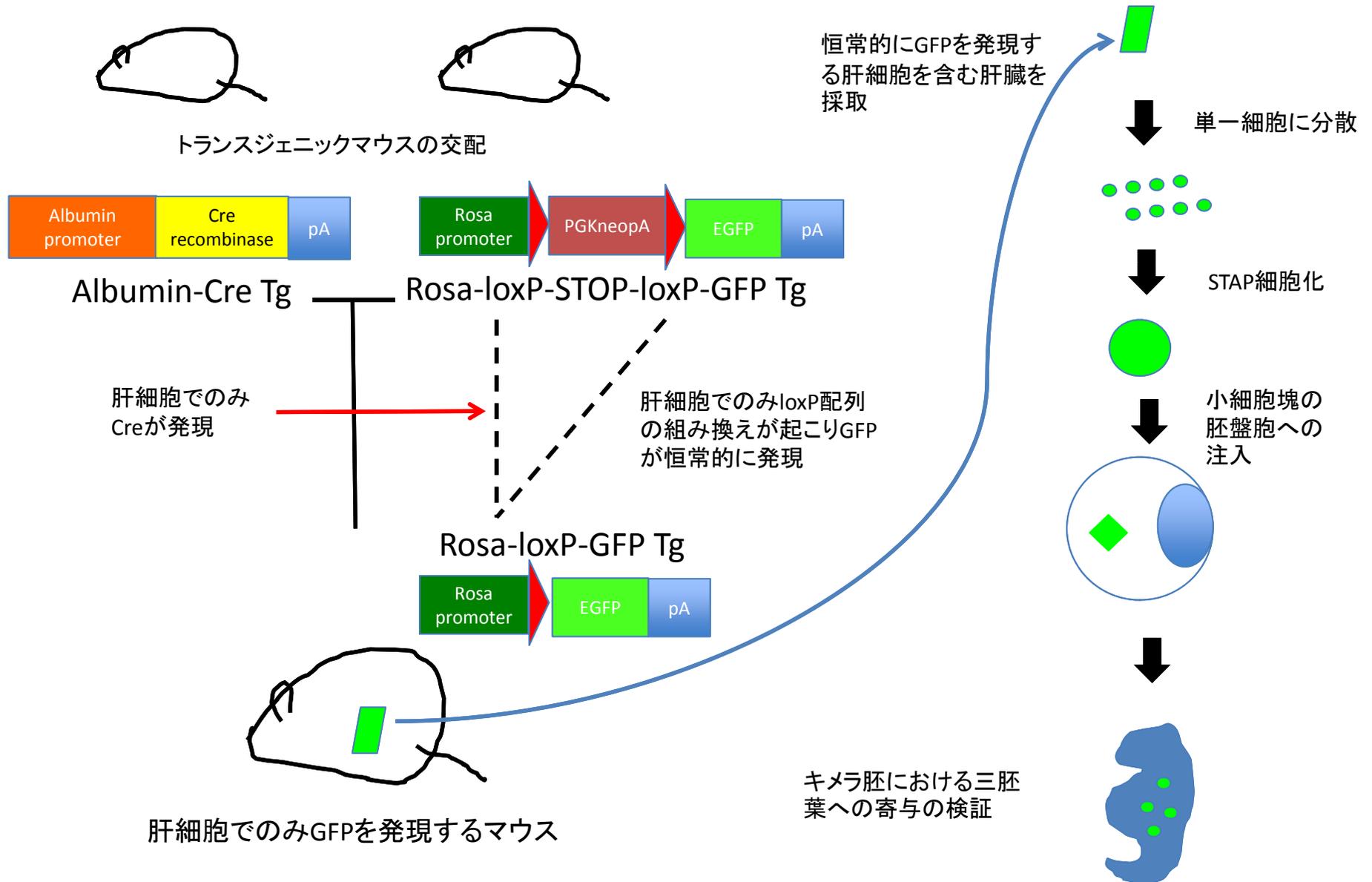
**a**



(Obokata et al, Nature, 2014)

# 分化細胞特異的Cre組み換え酵素発現による恒常的の子孫細胞追跡法

(アルブミン遺伝子発現を指標とした肝細胞の標識化を例とした)



## 使用を予定する遺伝子改変マウス系統

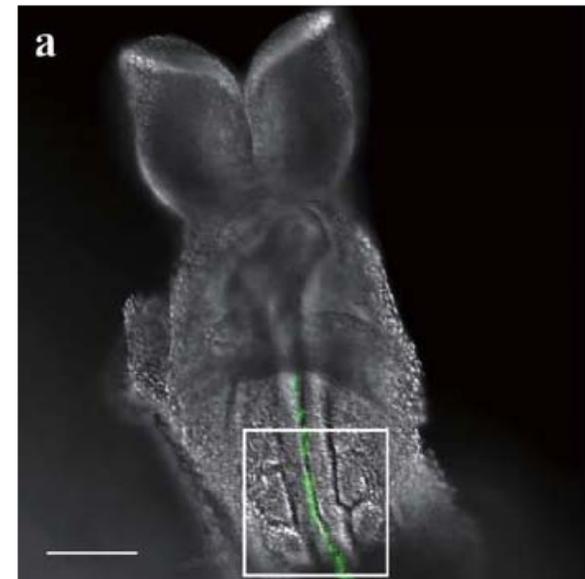
Nkx2.5-Cre  
(心筋細胞特異的に発現)

Albumin-Cre  
(肝細胞特異的に発現)

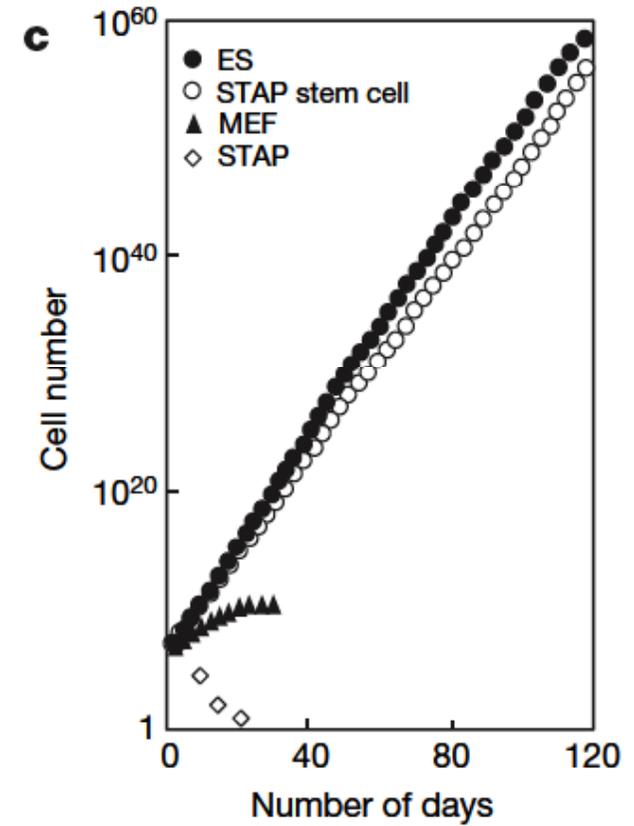
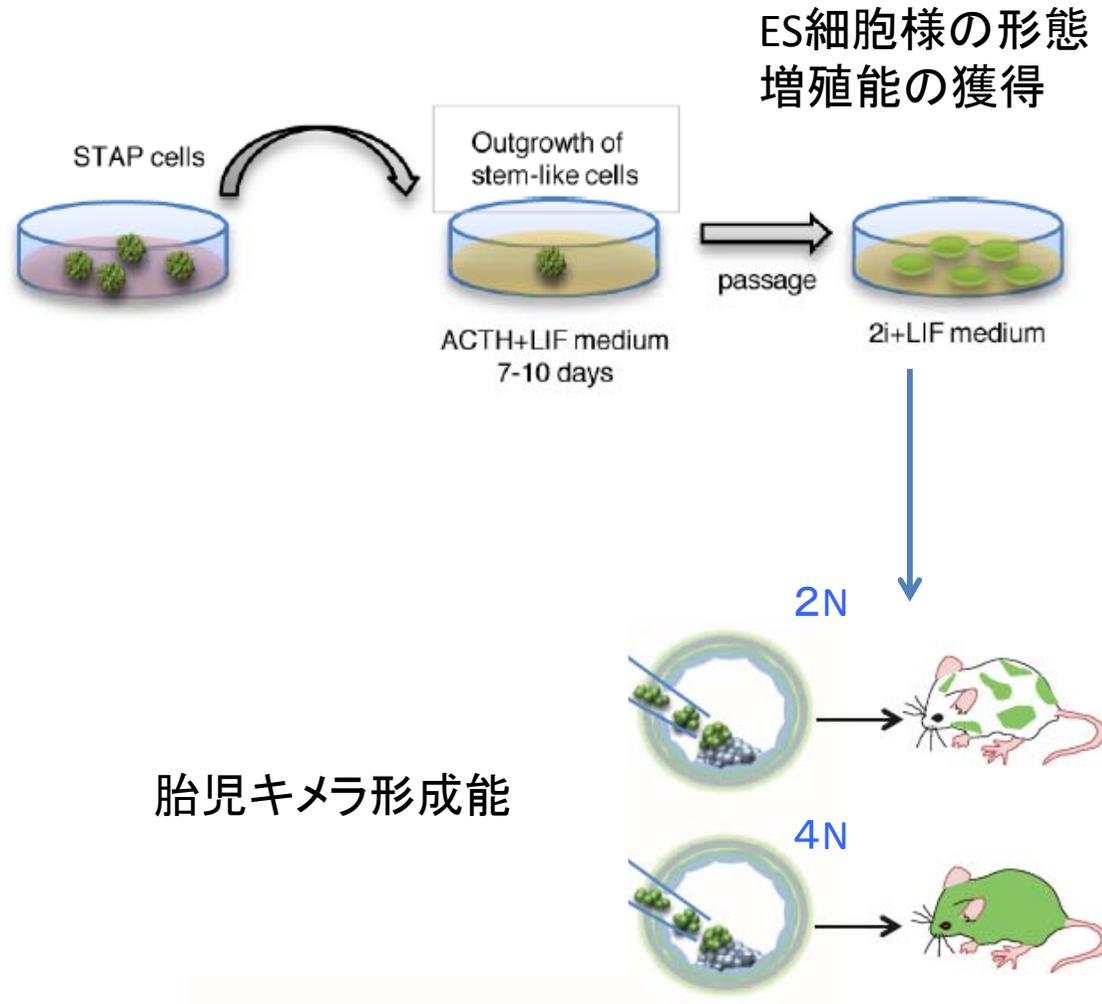
その他の組織特異的Cre発  
現マウスについても検討中

Rosa26-loxP-STOP-loxP-蛍光遺伝子  
(変異マウス開発ユニットで作成済み)

Abe et al, Genesis, 2011

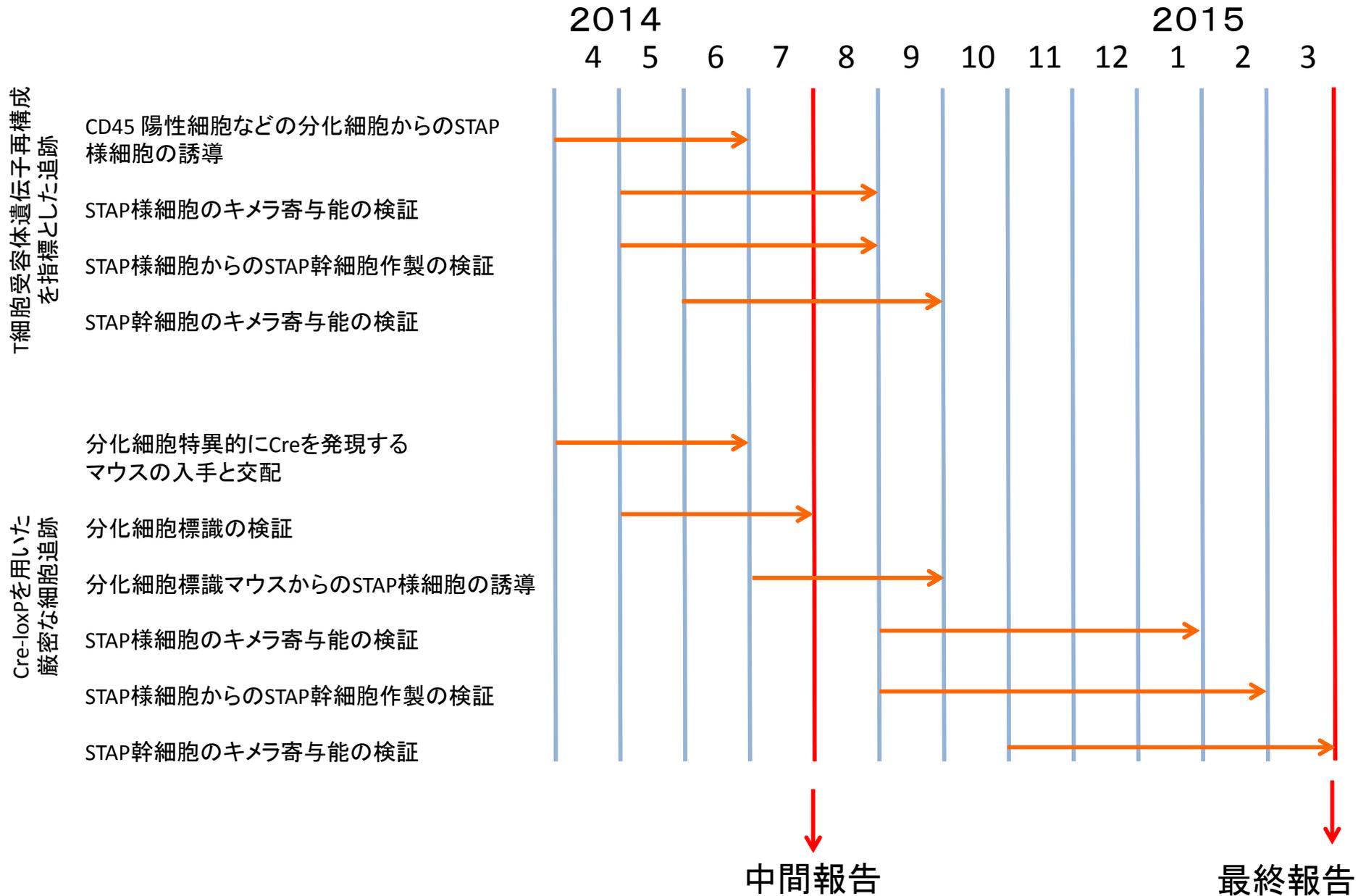


# STAP幹細胞作成を経た多能性獲得の検証



(Obokata et al, Nature, 2014)

# 研究実施スケジュール(予定)



## 研究実施体制

理事長

研究不正再発防止改革推進本部

○実験総括責任者:

独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター  
特別顧問(相澤研究ユニット 研究ユニットリーダー兼務) 相澤 慎一

○研究実施責任者:

独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター  
多能性幹細胞研究プロジェクト プロジェクトリーダー 丹羽 仁史

細胞培養に関わる実験は丹羽以下計4名が担当  
マウスに関わる実験は相澤以下計2名が担当