

調査結果報告

平成26年12月26日

研究論文に関する調査委員会

調査の概要

調査期間:

平成26年9月22日～平成26年12月24日

調査対象論文:

Obokata et al., Nature 505: 641-647 (2014)

Obokata et al., Nature 505: 676-680 (2014)

Obokata et al., Protocol Exchange (2014)

調査対象者:

小保方 晴子、若山 照彦、丹羽 仁史

この調査での「研究不正」の定義

捏造、改ざん、盗用

調査結果

1. 科学的検証の結果について

- STAP幹細胞とFI幹細胞は、調べた限りではすべてES細胞に由来キメラマウスとテラトーマも、その可能性が非常に高い故意か過失か、誰が行ったかは、決定できない
- ChIP-seqやRNA-seqの論文や公開されたデータは、細胞株／マウス系統が登録内容と異なっているその責任は小保方氏だが、故意か過失かは決定できない

2. 論文の図について

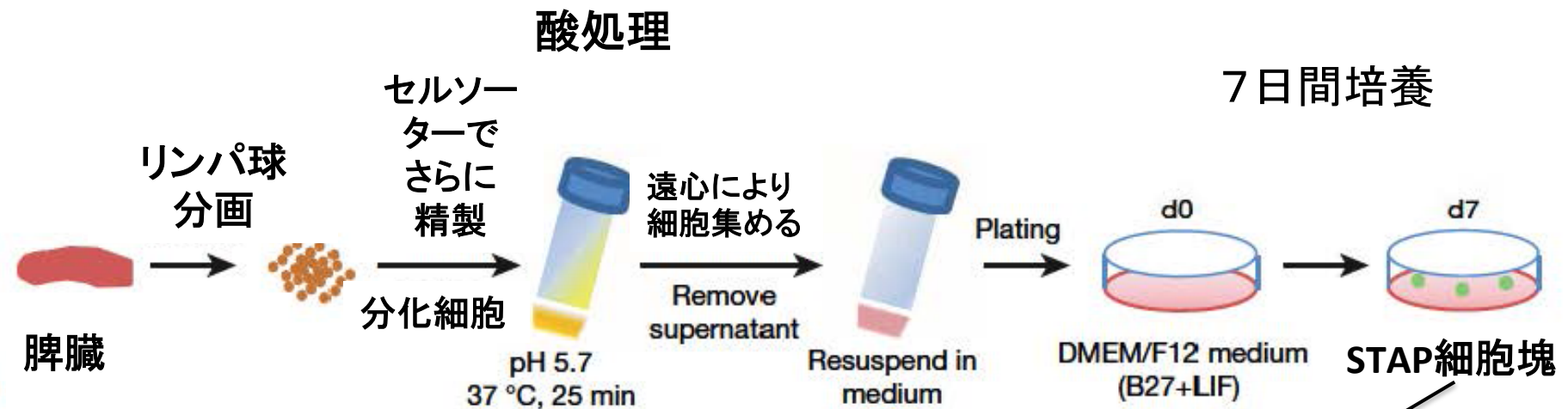
- 2つの図（細胞増殖曲線、DNAメチル化実験）に関して、小保方氏によるデータの捏造を認定

* 若山氏と丹羽氏は、研究不正と認定できるものは、なかった

Nature論文の概要1 Stimulus-Triggered Acquisition of Pluripotency

リンパ球のような分化した細胞が、酸処理で多能性を獲得する (Article)

STAP細胞の誘導

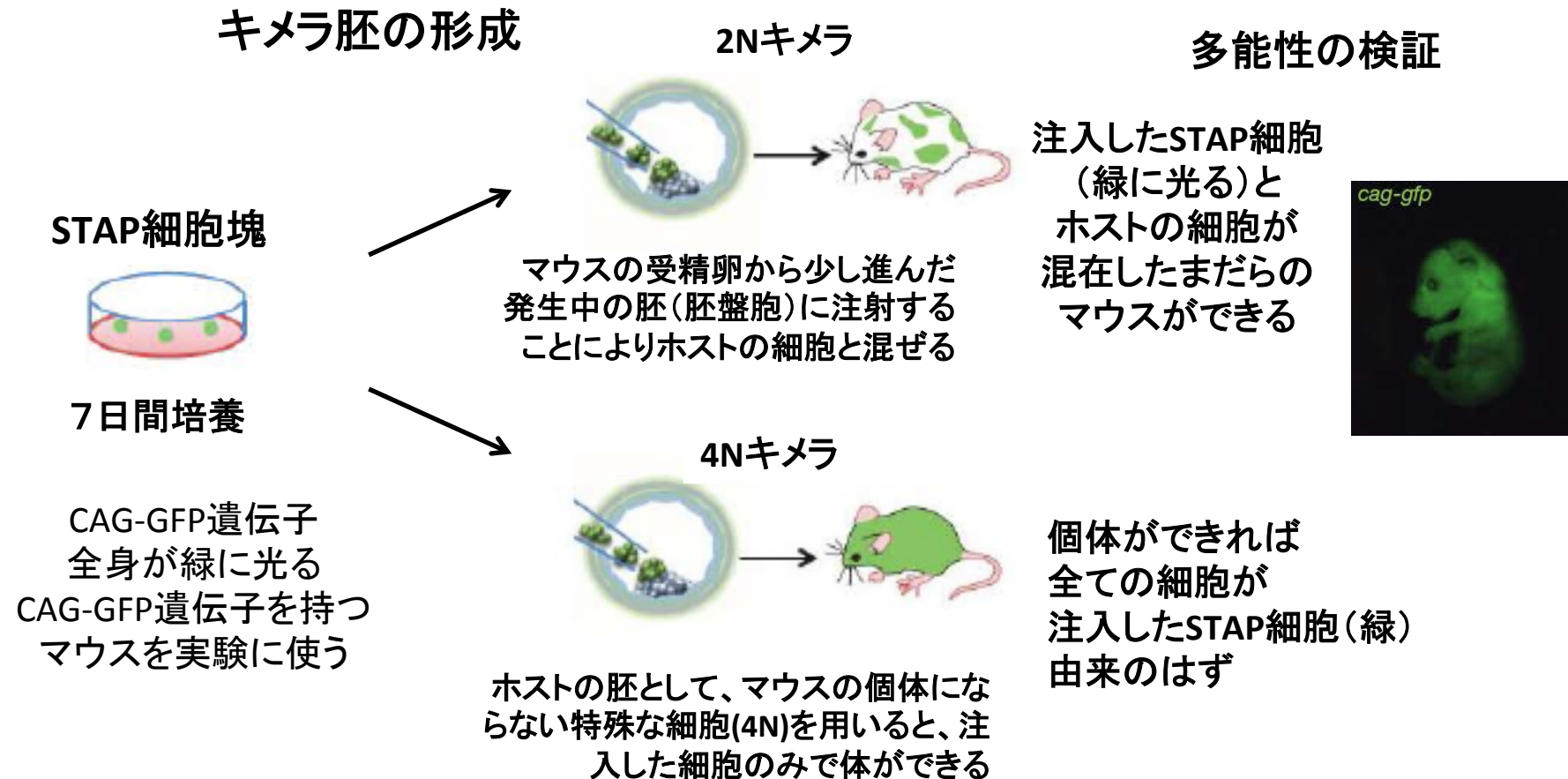


全身が緑に光る
CAG-GFP遺伝子を持つ
マウスを実験に使う

細胞塊はほとんど
増殖しない！
従って現在残って
いない。

Nature論文の概要2 多能性 pluripotency

STAP細胞が体を構成する全ての細胞になる能力を持つことの証明 (Article)



Figures reprinted from Nature 505, 641–647 (30 January 2014) doi:10.1038/nature12968

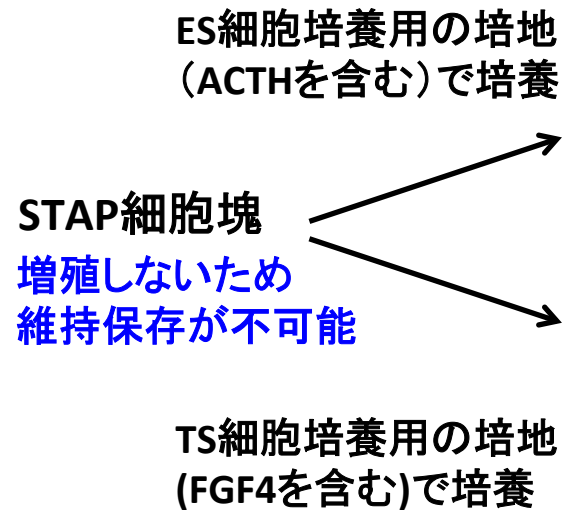
Nature論文の概要3

STAP細胞から増殖維持が可能なES様細胞とTS様細胞を誘導できた:
STAP細胞がES細胞より未分化な証拠 (Letter)

背景: 既存の知識

ES細胞は胎盤にならない

TS細胞は胎児の細胞にならない

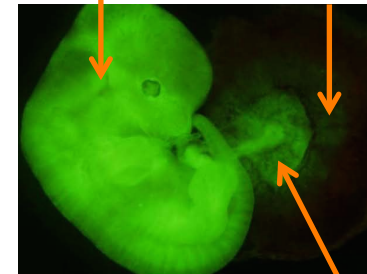


STAP幹細胞 (ES細胞様)

増殖可能なため、細胞株
として維持保存が可能

FI幹細胞 (TS細胞様)

胎児
胎盤(栄養膜がある)
は光らない



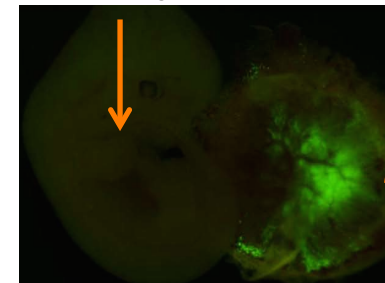
胚盤胞移植により、
胎児となる

胎盤の中に
伸びた胎児
の血管

胚盤胞移植により、
TS細胞と同様の胎盤
の栄養膜になる

胎児(光らない)

胎盤
が光る

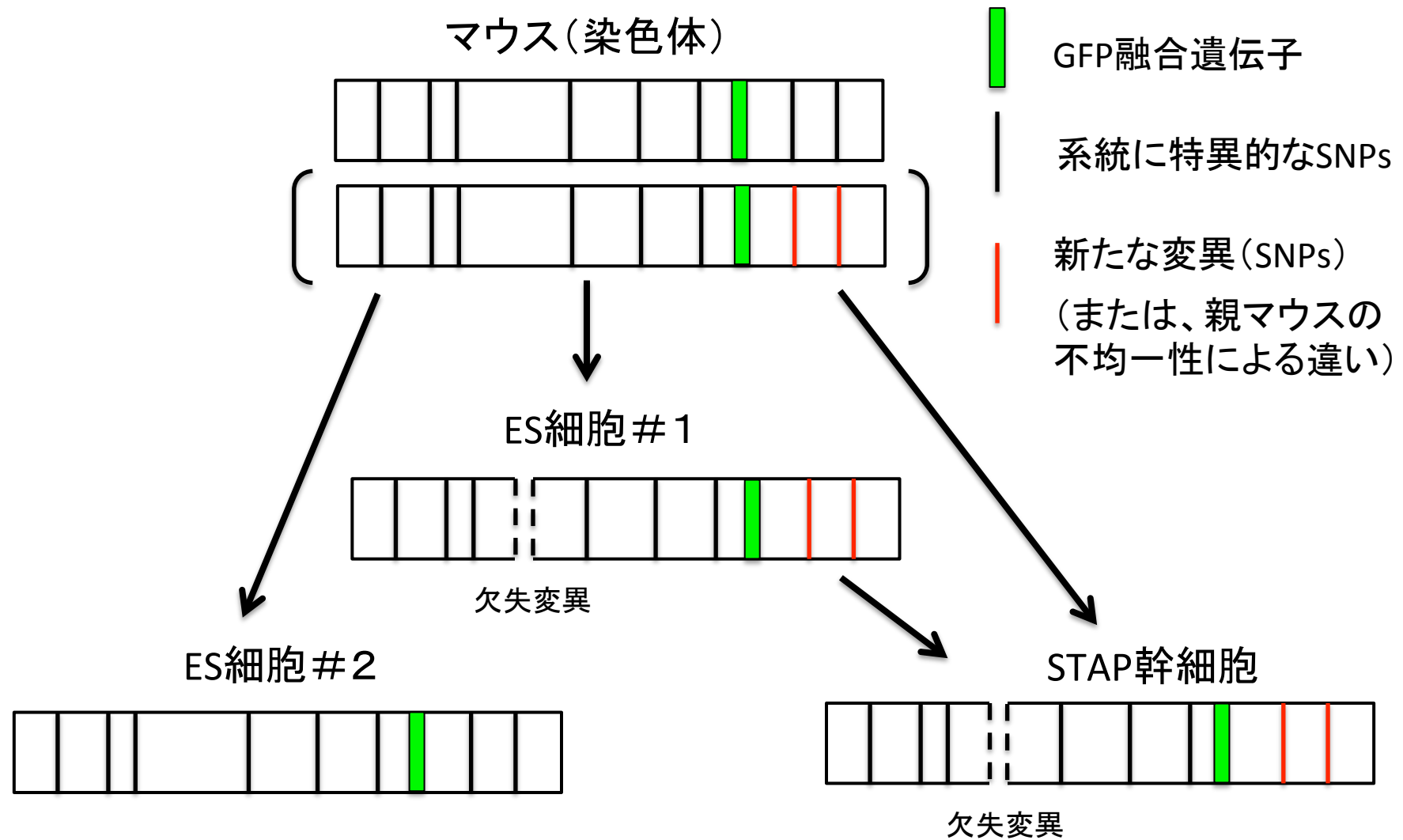


Photographs: Niwa et al.: Cell. 2005 Dec 2;123(5):917-29.

理研による全ゲノム解析結果

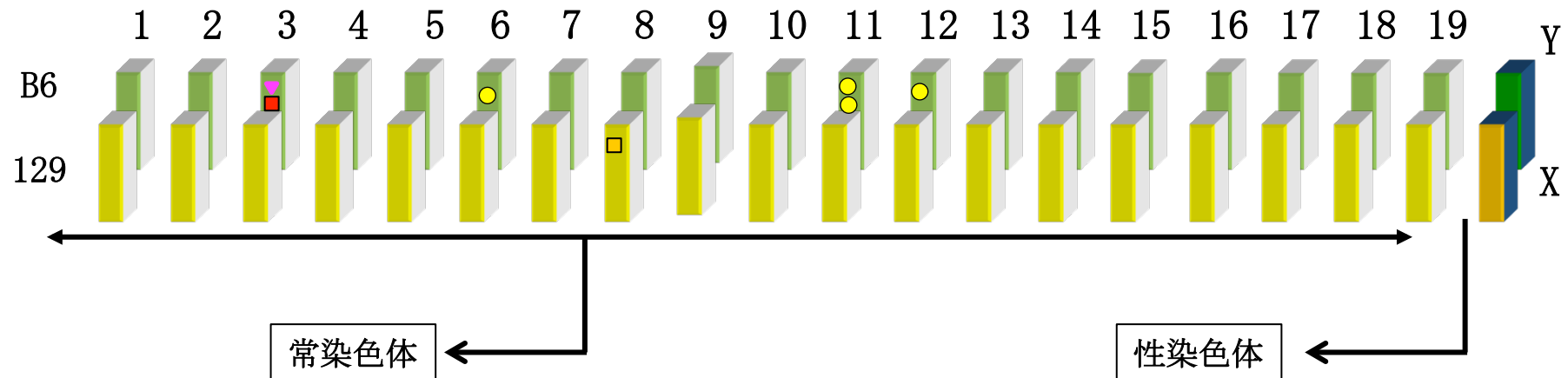
幹細胞株名	幹細胞のタイプ	作製者記載 挿入GFP	NGSで確認され た挿入GFP	性別	樹立日
FLS3	STAP幹細胞	CAG-GFP	Acr-GFP/ CAG-GFP	♂	2012年 1/31～2/2
CTS1	FI幹細胞	CAG-GFP	Acr-GFP/ CAG-GFP	♂	2012年 5/25
GLS1	STAP幹細胞	Oct4-GFP	Oct4-GFP	♀	2012年 1/31
(不明)	FI幹細胞	Oct4-GFP (論文記載)	残存ストック無し (作成された記録不明)		
AC129-1	STAP幹細胞	CAG-GFP	CAG-GFP	♂	2012年 9/4
129B6 F1	受精卵ES細胞 若山氏作製	CAG-GFP	CAG-GFP	♂	2012年 5/25
GOF-ES	ES細胞株 若山研メンバー作製	Oct4-GFP	Oct4-GFP	♀	2011年 5月～10月
FES1	受精卵ES細胞 若山研メンバー作製	Acr-GFP/ CAG-GFP	Acr-GFP/ CAG-GFP	♂	2005年 12/7
129/GFP ES	小保方研ストック 由来不明細胞株	—	Acr-GFP/ CAG-GFP	♂	不明

STAP幹細胞などがES細胞由来であることを示す論理



最終的には、次世代シーケンサーで相同性を調べた

STAP幹細胞FLS, FI幹細胞CTS, ES細胞FES1は共通の特徴をもつ



Acr-GFP/CAG-GFP トランスジーン



欠失(第3染色体):市販のB6、129と
それらの亜系統のいずれにも存在しない



欠失(第8染色体):市販のB6、129と
それらの亜系統のいずれにも存在しない



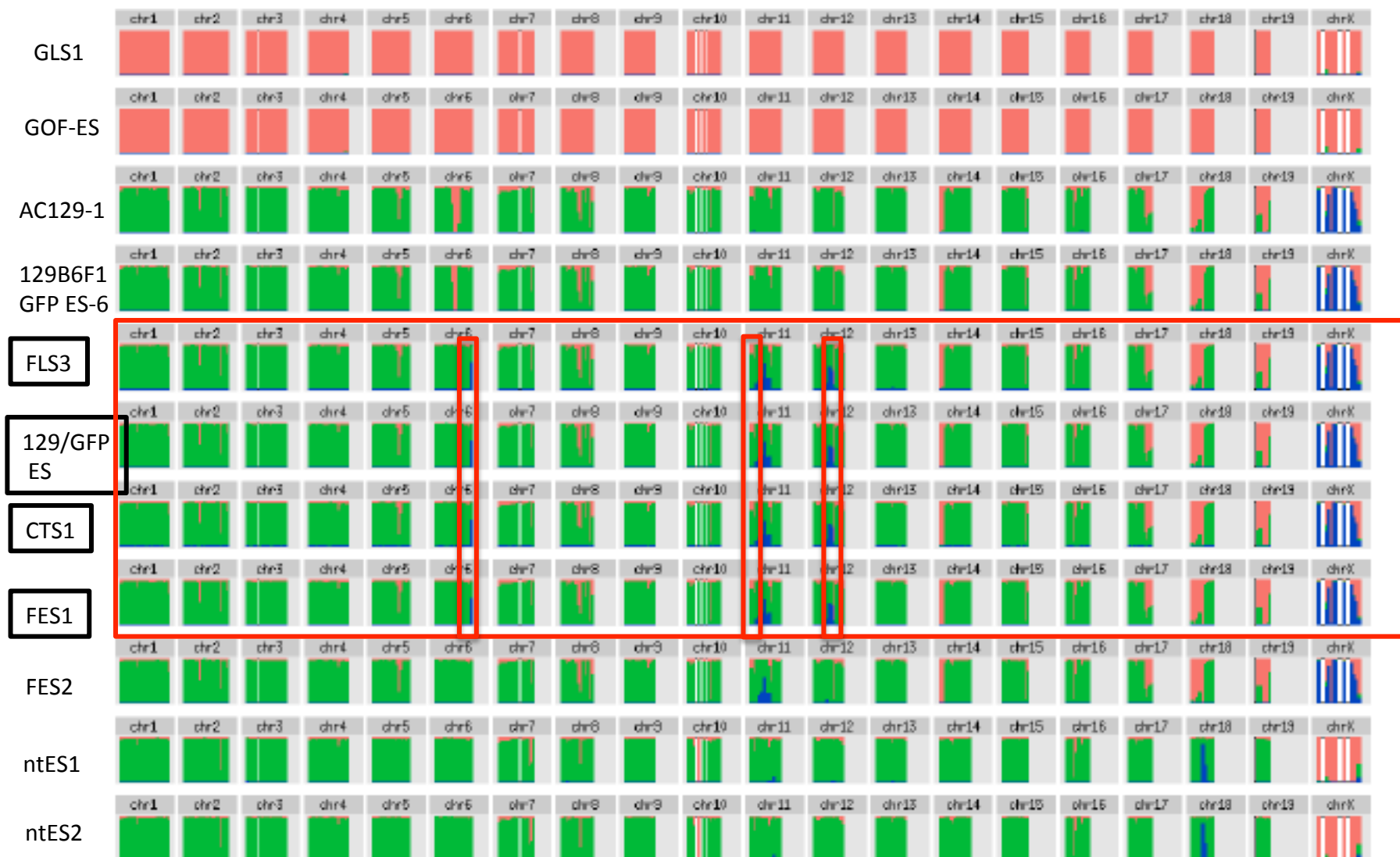
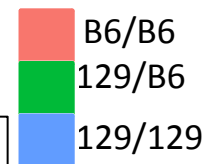
おそらく親マウスの不均一性に由来する
と考えられるSNPs: B6 → 129

X染色体:母親由来
Y染色体:父親由来
(交配系統の父母が分る)
X染色体:129X1/SvJJms
Y染色体:C57BL/6N-Acr/CAG-GFP

結論: STAP幹細胞FLSおよびFI幹細胞CTSは、ES細胞FES1と遺伝的にほぼ同一

B6系統と129系統で異なる一塩基多型の全ゲノム分布

NGSでのSNPsの分布; 疑義のある全ての細胞で同一と言えるほど酷似



FLS3, CTS1, 129/GFP ESはFES2よりFES1により近縁である

Acr-GFP/CAG-GFP (FES1-FES2で異なるSNPsのみ使用して比較)
24,649 sites

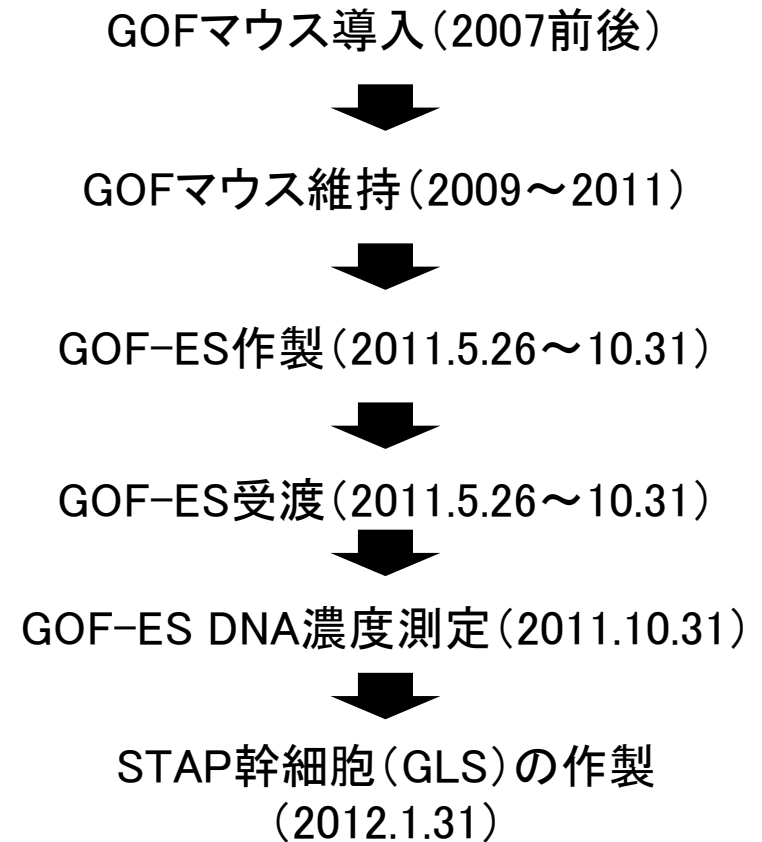
	FLS3	CTS1	FES1	FES2	ntES G1	ntES G2	129/GFP ES
FLS3		99.92%	99.33%	0.56%	4.67%	4.42%	99.95%
CTS1			99.16%	0.63%	4.37%	4.43%	99.93%
FES1				0.00%	4.29%	4.33%	99.28%
FES2					72.04%	68.32%	0.59%
ntESG1						99.95%	4.41%
ntESG2							4.36%
129/GFP ES							

STAP幹細胞GLS1はES細胞GOF-ESに由来する

ゲノムと染色体の所見の比較

	GLS1	GOF-ES
マウス背景	B6 (SNPパターン)	B6 (SNPパターン)
GFP	Oct4	Oct4
性別	メス	メス
X染色体構造異常 (欠失と重複)	あり	あり

時間経過

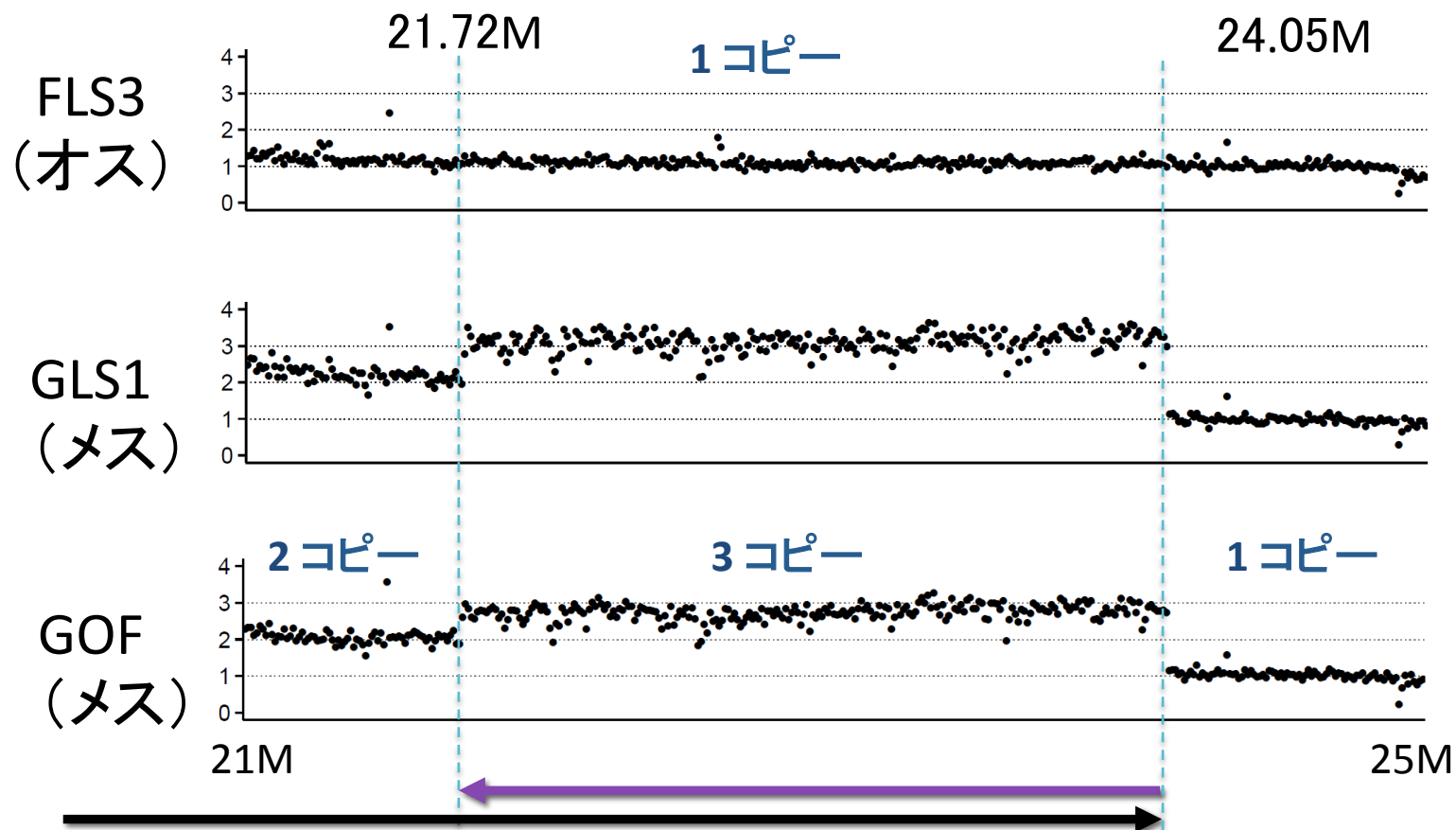


評価

STAP幹細胞に関する図
(Nature Articleの Fig.5と Ex Data Fig.8)
は、GOF-ES細胞に基づくものである。

GLS1とGOF-ESはX染色体欠失＋末端重複逆位接続をもつ

X染色体の21M-25M部分の拡大図



末端に逆位反復配列をもつX染色体断片

STAP幹細胞AC129は受精卵ES細胞129B6F1 ES1に由来する

6番染色体中央付近の特徴的遺伝的背景(NGS解析)

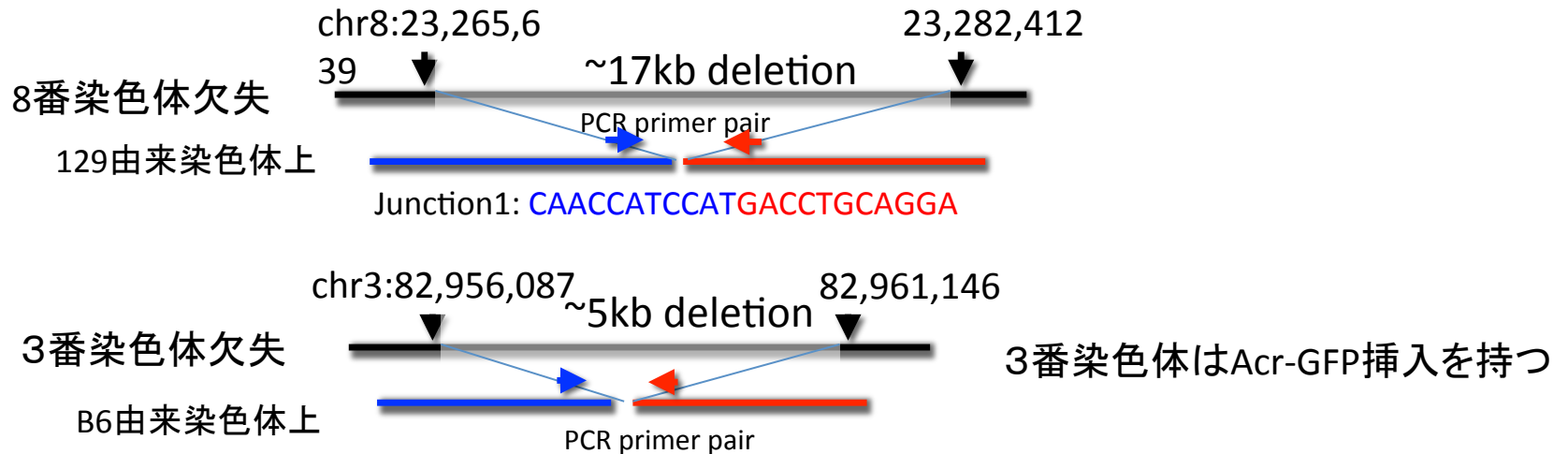


	受精卵 ES1	受精卵 ES2	受精卵 ES3	受精卵 ES4	受精卵 ES5	受精卵 ES6	AC129- 1	AC129- 2	FLS-T1	FLS-T2	B6 CAG- GFP	129 CAG- GFP
性別	♂	♀	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
欠失1	有	有	有	有	有	有	有	有	有	有	無	無
(欠失2)	有	有	有	有	有	有	有	有	有	有	有	無
欠失3	有	無	無	無	無	有	有	有	有	有	無	無
欠失4	有	有	無	無	無	無	有	有	有	有	無	無
重複1	有	無	有	無	無	無	有	有	有	有	無	無
Chr6 B6 homo SNP type	AC129 type	AC129 type	ES6 type	ES6 type	AC129 type	ES6 type	AC129 type	AC129 type	AC129 type	AC129 type	B6	注1

注1:129B6ヘテロであるがAC129タイプより長い

STAP 2Nキメラは受精卵ES細胞FES1に由来する

Acr-GFP細胞株(FES1, FLS, CTS)に共通し、親マウスにないDNA欠失



9個体中、3個体にAcr-GFP挿入

4個体に3番染色体欠失

2個体に8番染色体欠失

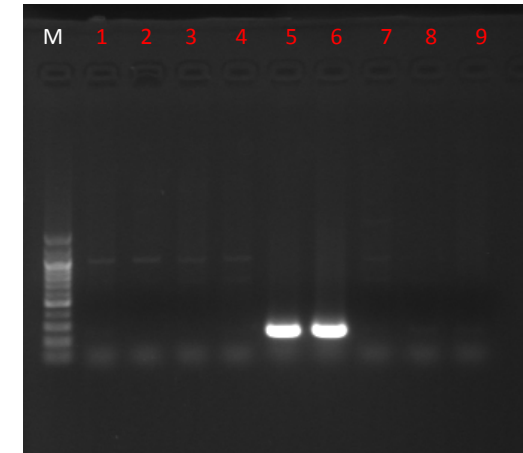
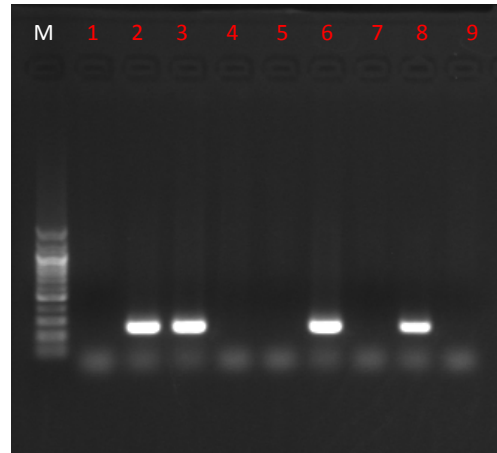
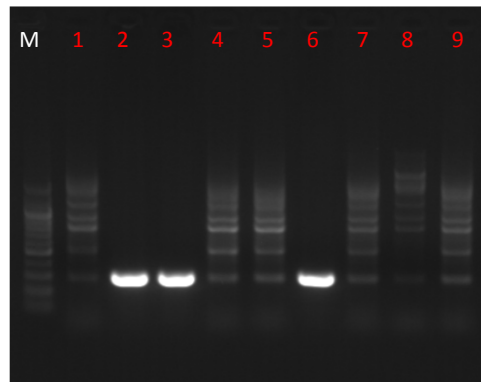
細胞名

Acr-GFP挿入

3番染色体欠失

8番染色体欠失

- 1: カルスキメラ子 1
- 2: カルスキメラ子 2
- 3: カルスキメラ子 3
- 4: カルスキメラ子 4
- 5: カルスキメラ子 5
- 6: カルスキメラ子 6
- 7: カルスキメラ子 7
- 8: カルスキメラ子 8
- 9: カルスキメラ子 9



STAPテラトーマのDNA解析：論文の図、スライドグラス、パラフィンブロック

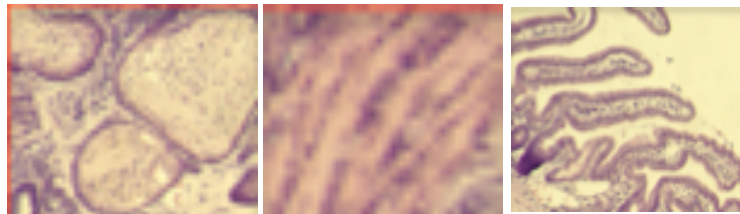
STAP細胞の多能性を示す
テラトーマの形成

Nature article Fig. 2e上段



Figure reprinted from Nature 505, 641–647 (30 January 2014)
doi:10.1038/nature12968

スライドグラスからの画像



STAPテラトーマの画像が
取得されたスライドグラス



パラフィンブロック
「CD45 カルステラトーマ」

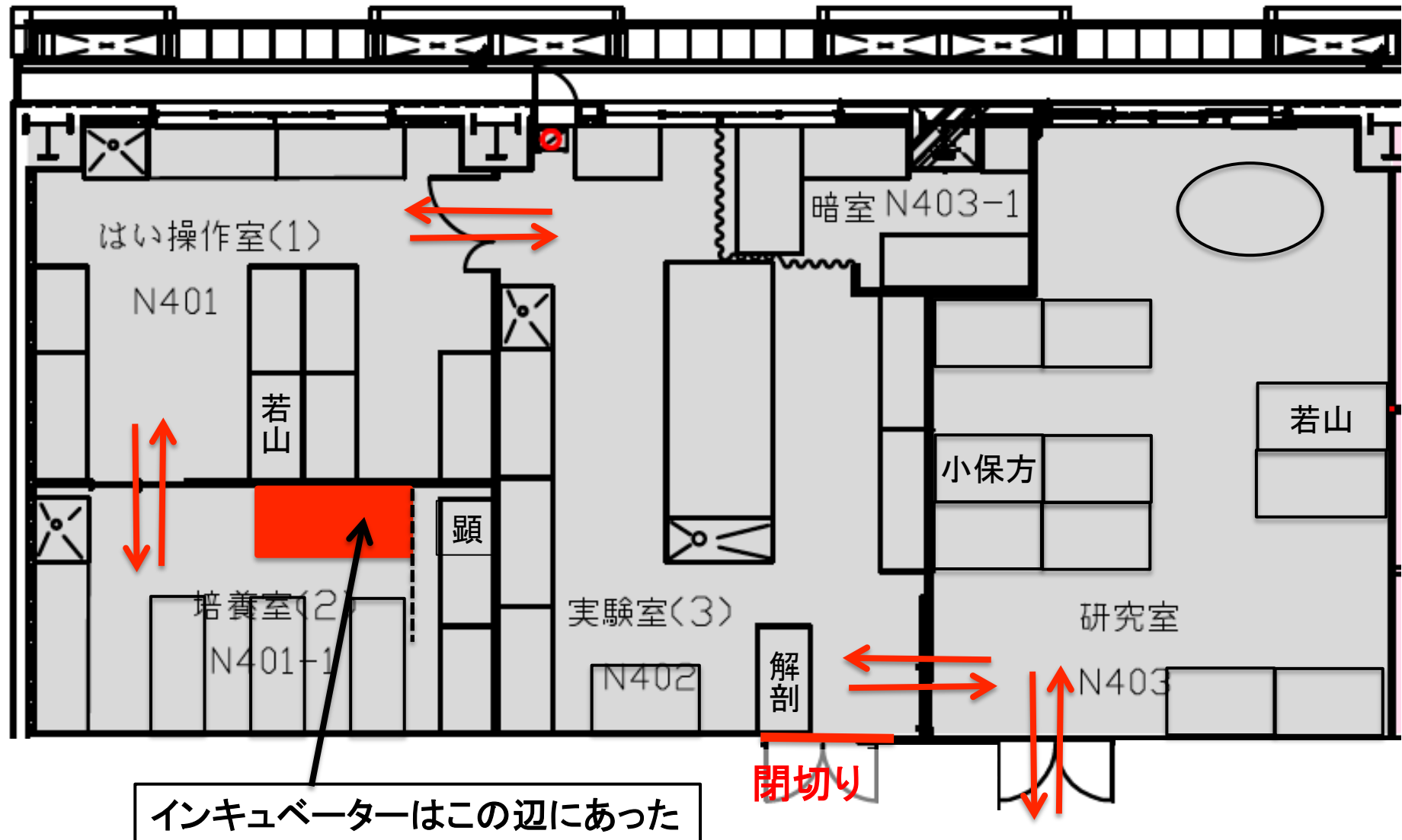


パラフィンブロック「CD45 カルステラトーマ」のDNA解析 (定量PCRによる解析)

- Acr-GFPを持つ
 - STAP幹細胞FLS, FI幹細胞CTS, ES細胞FES1に固有の3番、8番染色体上の欠失変異持つ
- ⇒ STAP細胞から作製されたテラトーマも
ES細胞FES1由来の可能性が非常に高い

CDB C棟4階

STAP細胞研究当時の若山研究室



STAP細胞作製時は、7日間、インキュベーターに放置
インキュベーターのある部屋は、人がいないことも多い
夜間に入ることが可能だった人は多い

ES細胞混入の目撃者なし、直接の証拠なし

全ての関係者がES細胞混入を否認

→ 誰が混入したか、故意か過失かは、決定できない

ChIP-seqやRNA-seqなど公開データに関する疑義

1. 細胞株／マウス系統が論文や公共データベース登録内容と異なっている

	論文／DB	ChIP-seq	RNA-seq(TruSeq)
STAP	129B6F1 CAG-GFP	129B6F1 CAG-GFP	129B6F1 CAG-GFP
STAP幹細胞	129B6F1 CAG-GFP	129B6F1 CAG-GFP	129B6F1 Acr-GFP/CAG-GFP
FI幹細胞	129B6F1 CAG-GFP	129B6F1 Acr-GFP/CAG-GFP	B6 Oct4-GFP +α^*

2. FI幹細胞のRNA-seqデータは二種類の細胞種を持ったサンプルに由来する
3. STAP細胞由来ChIP-seq (input)サンプルはES細胞129B6F1 ES1とほぼ同一である
4. 未登録RNA-seqデータで用いられていた細胞株／マウス系統が論文のものとは異なり、これらを用いるとLetter Fig.2iの系統樹は再現できない

	RNA-seq(2012.8)	RNA-seq(2013.1)	RNA-seq(2013.1:最終)
TS細胞	129B6F1 CAG-GFP	---	CD1系統
FI幹細胞	129B6F1 Acr-GFP/CAG-GFP	129B6F1 Acr-GFP/CAG-GFP	B6 Oct4-GFP + α^*

不正認定項目1:細胞増殖率測定

Article Fig.5c

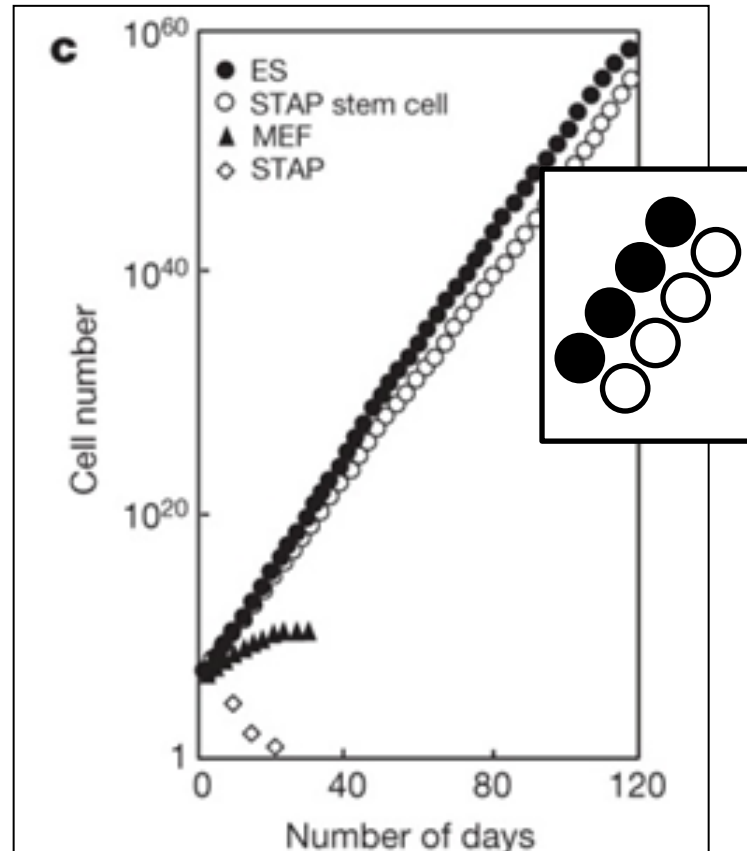


Figure reprinted from Nature 505, 641–647 (30 January 2014)
doi:10.1038/nature12968

実験の記録がない

ES細胞の種類が不明

記憶による実験期間に3日ごとに

来たことが、出勤記録と合わない

○と○の間には

コンフルエントに近く
増えた細胞をばらばらにして
細胞数をきちんと数えて
必要な細胞数に調整して
次のシャーレに播く

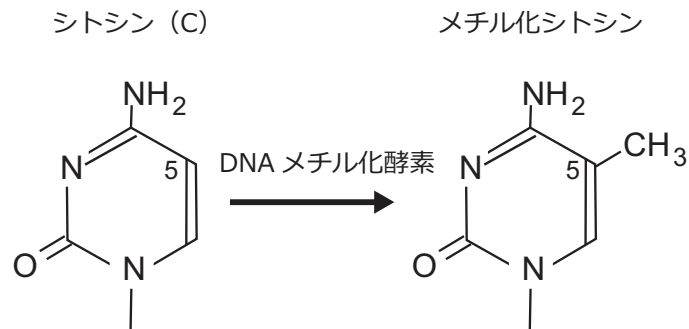
そして数日後に同じ操作を
繰り返すという地道な作業が
必要である！
唯一のルール！

従って、コンフルエントに近く
増えた細胞数を 10^7 個に近いから
 10^7 個としてはいけない。
実証的な研究では細胞の数を
正確に数えないで推定することは
許されない。

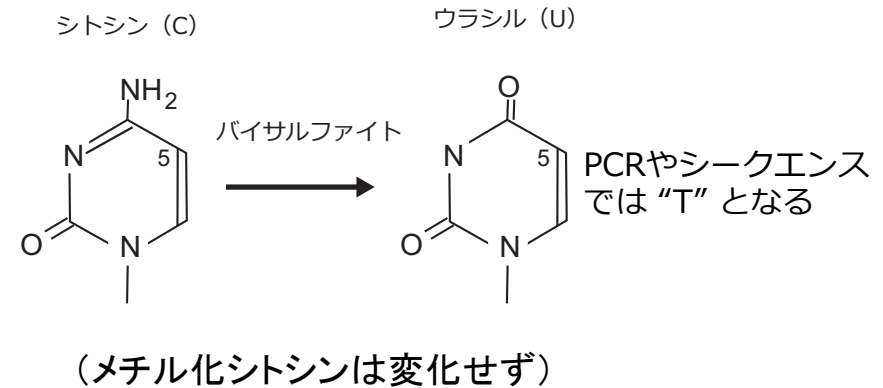
もし、行なえば、それは捏造と
認定をされることになる。

DNAメチル化の役割とその解析法

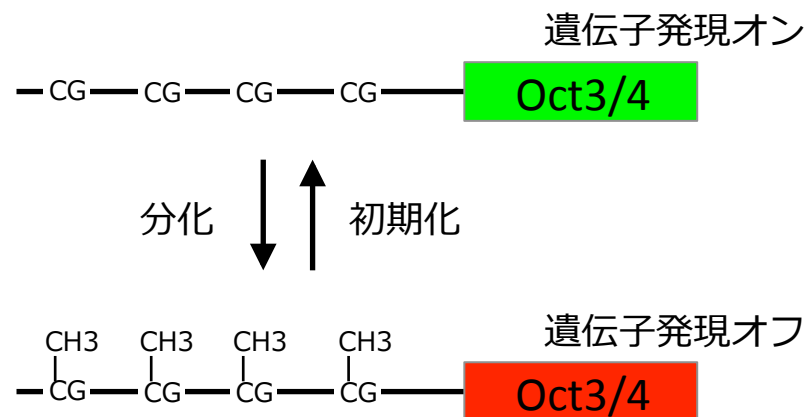
シトシンのメチル化



シトシンのウラシルへの変換を用いた解析法



メチル化による遺伝子発現抑制

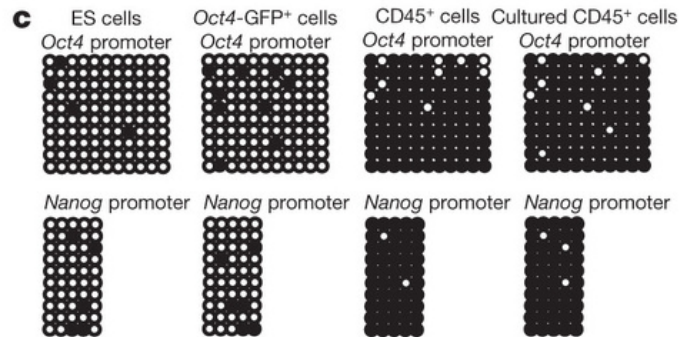


実験の流れ

- 細胞DNA抽出
- ↓
- バイサルファイト処理
- ↓
- 目的遺伝子PCR増幅
- ↓
- 産物をプラスミドと連結、大腸菌へ導入
- ↓
- 大腸菌クローンよりプラスミド抽出
- ↓
- 目的DNA配列のシーケンス決定

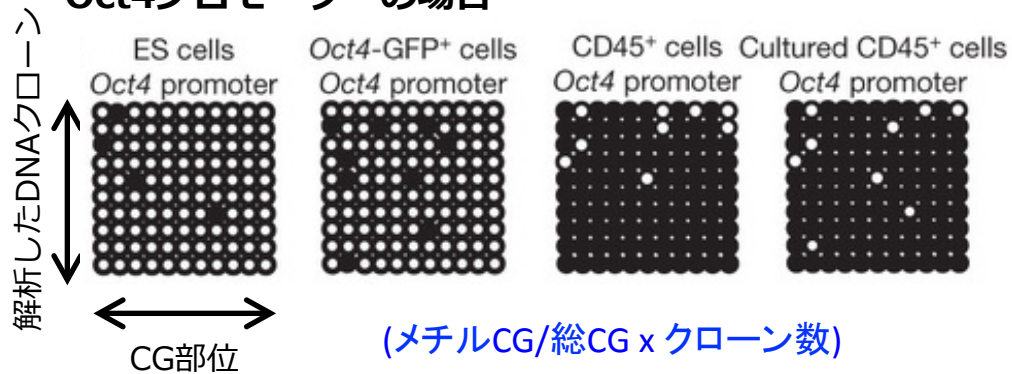
不正認定項目2:メチル化実験

Article Fig. 2c



● : メチル化あり
○ : メチル化なし

Oct4プロモーターの場合



(メチルCG/総CG x クローン数)

0/11 x 6
1/11 x 4

0/11 x 4
1/11 x 4
2/11 x 1
3/11 x 1

11/11 x 5
10/11 x 3
9/11 x 1
7/11 x 1

11/11 x 3
10/11 x 6
8/11 x 6

18例

17例

2例

オリジナルデータとの不一致 ⇒ データ捏造の認定

3例

mCG/CG
< 3/12

mCG/CG
= 4/12 ~ 9/12

mCG/CG
> 9/12

CDBゲノム
資源解析
ユニット
に保存されて
いたデータ
を再解析

高信頼度配列
: 74

低品質解析不能
: 8
: 14

低品質2例

STAP論文、STAP問題とは何だったのか

1. ES細胞の混入が示され、論文の主たる主張が否定
2. 小保方氏の実験記録がほとんどない(提出されない)
論文の図表の間違いが、非常に多い
その一部は、捏造または改ざん
3. 小保方氏を指導する立場にある研究者が、
上記1. 2. の可能性を感知できたはずだが、
実際は、その検討をしなかった