

STAP現象の検証の中間報告

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

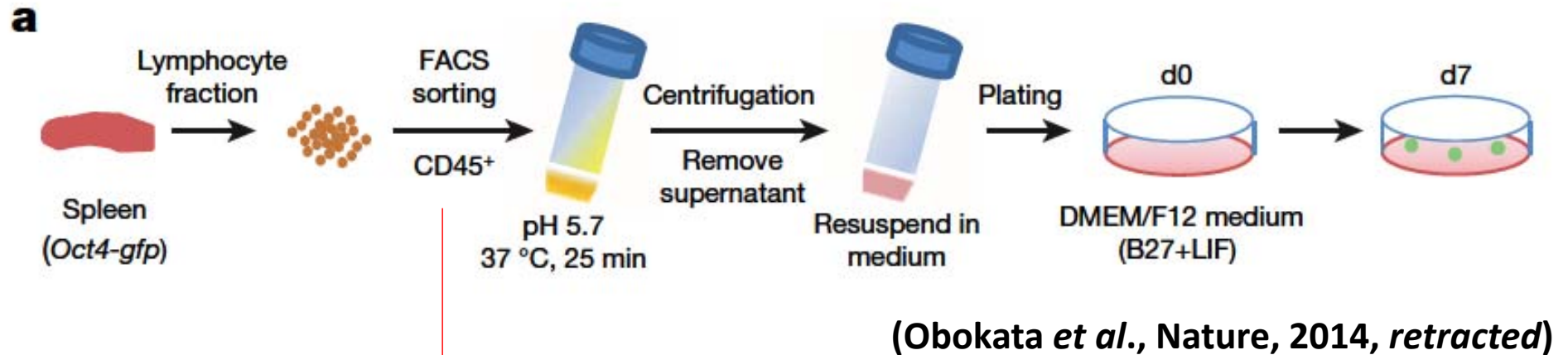
2014年8月27日

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)

論文に記載された主たるSTAP細胞誘導の手順



C57BL/6
Oct3/4-GFP
(GOF)
生後5~10日目

脾臓

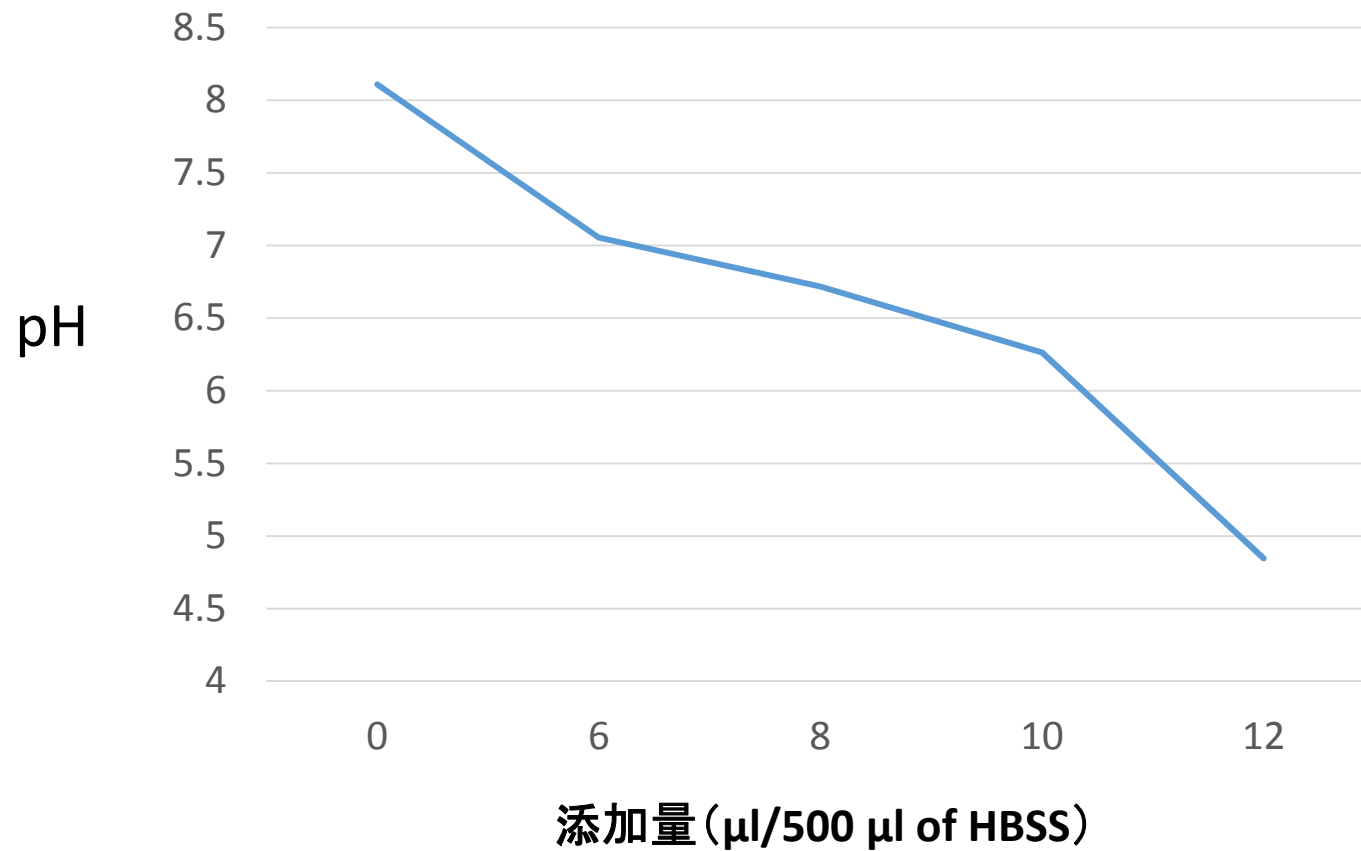
塩酸(HCl)を用いた
弱酸性化

線維芽細胞増殖因子(FGF2)
添加の有無

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

実験結果1

塩酸(HCl)濃度の設定

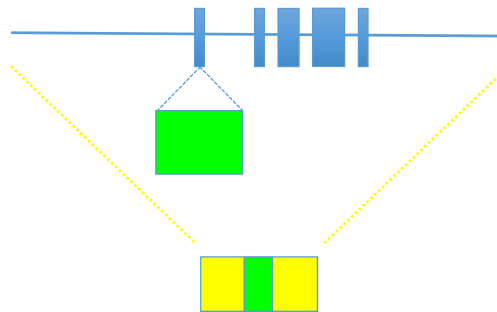


HCl: 10μlの35%HClを590μlのHBSSで希釈したものを添加

Oct3/4-GFP 人工遺伝子(GOF)

17番染色体

Oct3/4遺伝子



遺伝子クローニング

GFP遺伝子の挿入

GOF(人工遺伝子)



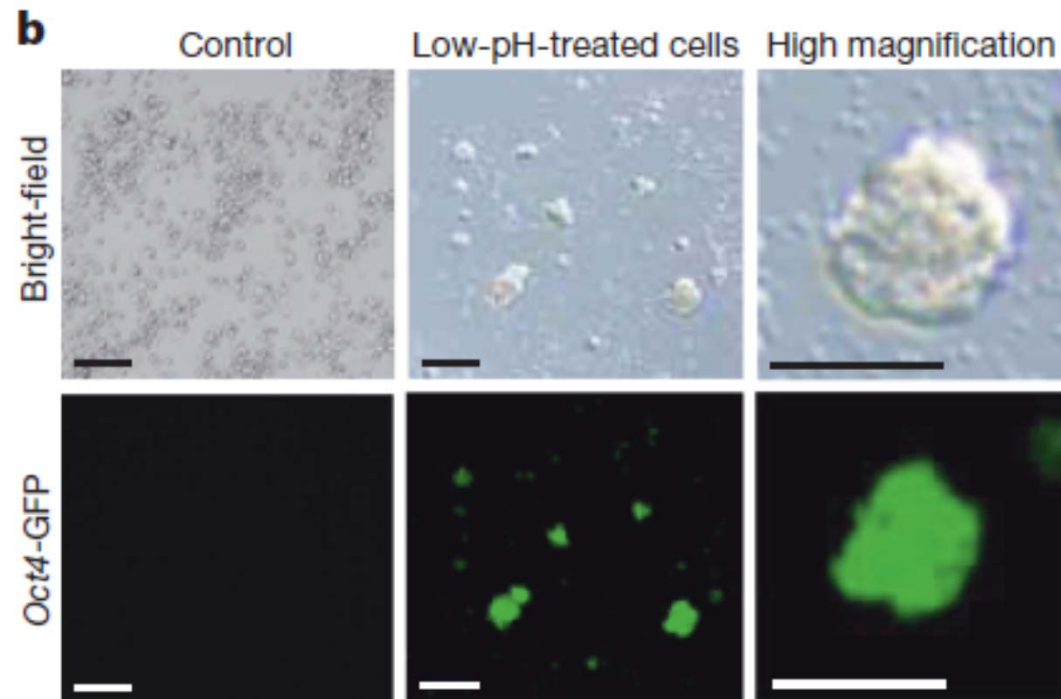
マウス受精卵へのDNA注入

?番染色体



STAP様細胞が誘導されたことを確認する方法

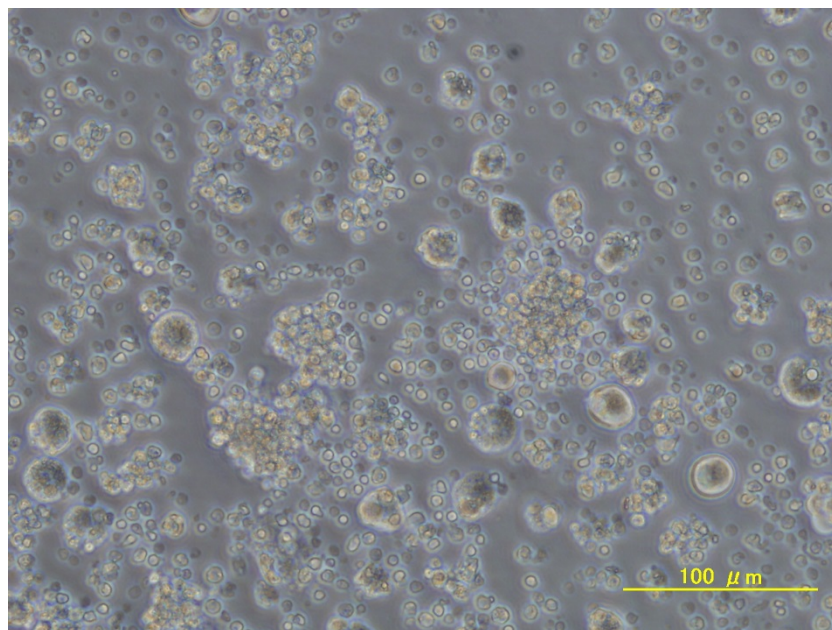
- 1 浮遊細胞塊の出現
- 2 Oct3/4-GFP (GOF)からのGFP蛍光遺伝子発現



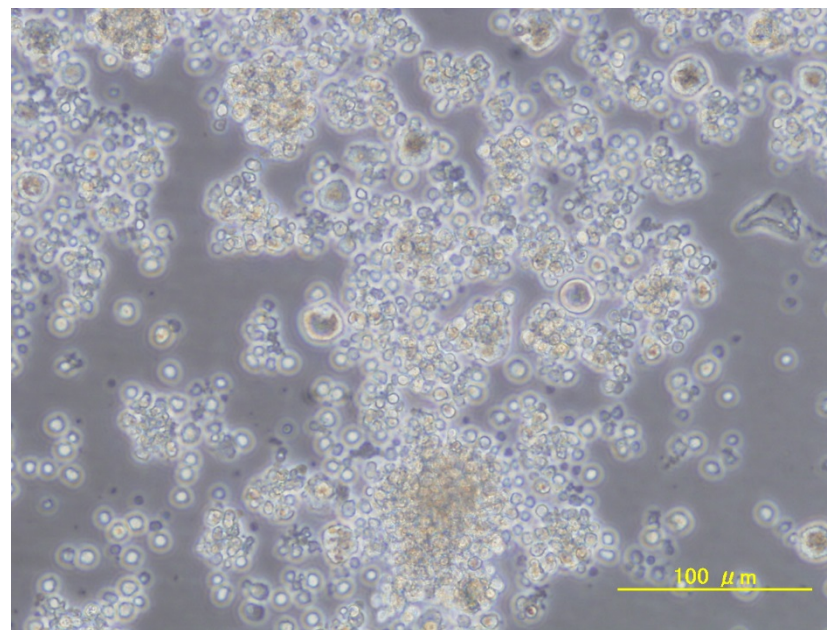
(Obokata *et al.*, Nature, 2014, *retracted*)

実験結果2

塩酸(HCl)を用いた弱酸性条件で処理した脾臓細胞集団から出現した細胞塊(培養7日目)



6 μ l (pH 6.7~7.0)

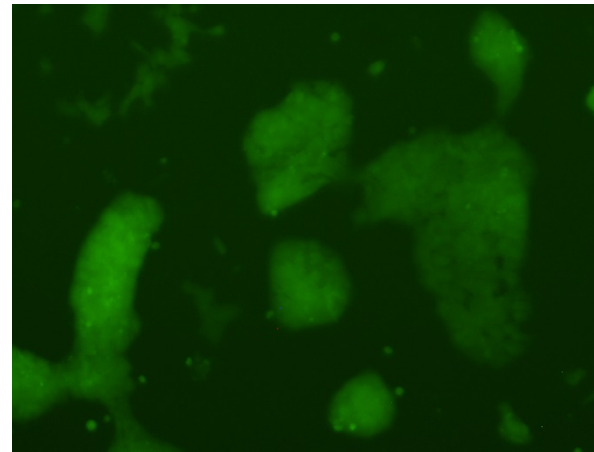
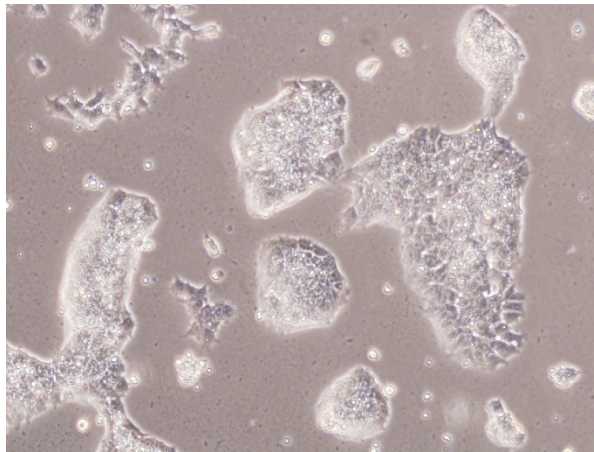


10 μ l (pH 5.7~6.0)

HCl添加量(μ l/500 μ l of HBSS)

蛍光顕微鏡を用いたGFP蛍光の検出

GFP遺伝子を発現する細胞の蛍光顕微鏡観察像(ES細胞)



緑色蛍光観察フィルター

490 nm



520 nm

励起光波長
(中心値)



蛍光波長
(中心値)



赤色蛍光観察フィルター

550 nm



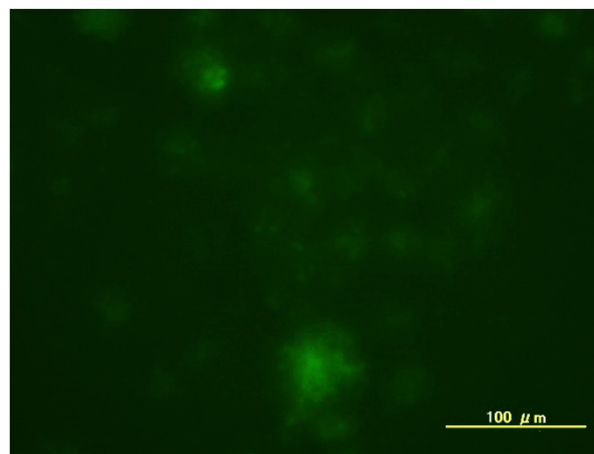
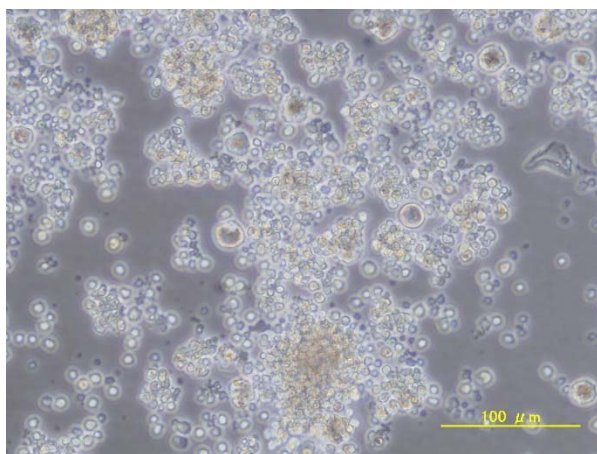
590 nm

GFPの蛍光は緑色蛍光観察フィルターによってのみ検出される

実験結果3

蛍光顕微鏡を用いたGFP蛍光の検出

Oct3/4-GFPを持つ脾臓細胞から得られた細胞塊の蛍光顕微鏡観察像



緑色蛍光観察フィルター

490 nm

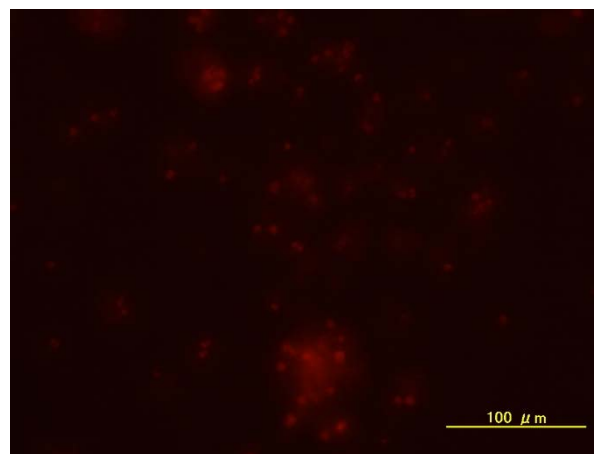


520 nm

励起光波長
(中心値)



蛍光波長
(中心値)



赤色蛍光観察フィルター

550 nm



590 nm

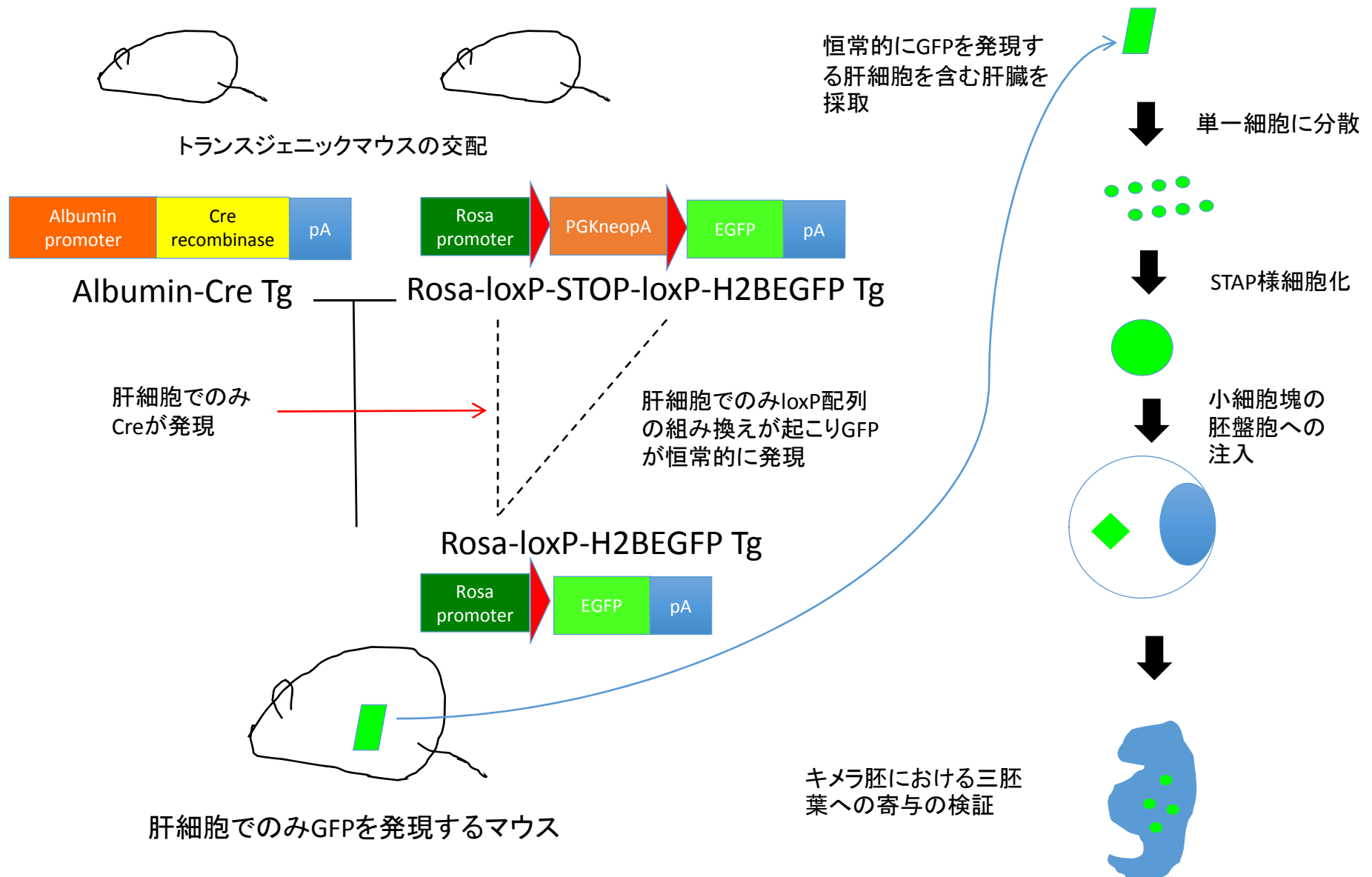
緑色・赤色蛍光観察フィルターともに蛍光が検出される

C57BL/6マウス脾臓細胞から塩酸処理で得られた 細胞集団の解析結果のまとめ

1. 蛍光顕微鏡ならびにセルソーターを用いた解析で、GFPの蛍光を明確に検出することはできていない。
2. 定量PCR法を用いた遺伝子発現解析で、内在性Oct3/4遺伝子の発現上昇は検出できていない。
3. 細胞塊の免疫染色法を用いた解析で、内在性Oct3/4遺伝子の発現上昇は検出できていない。

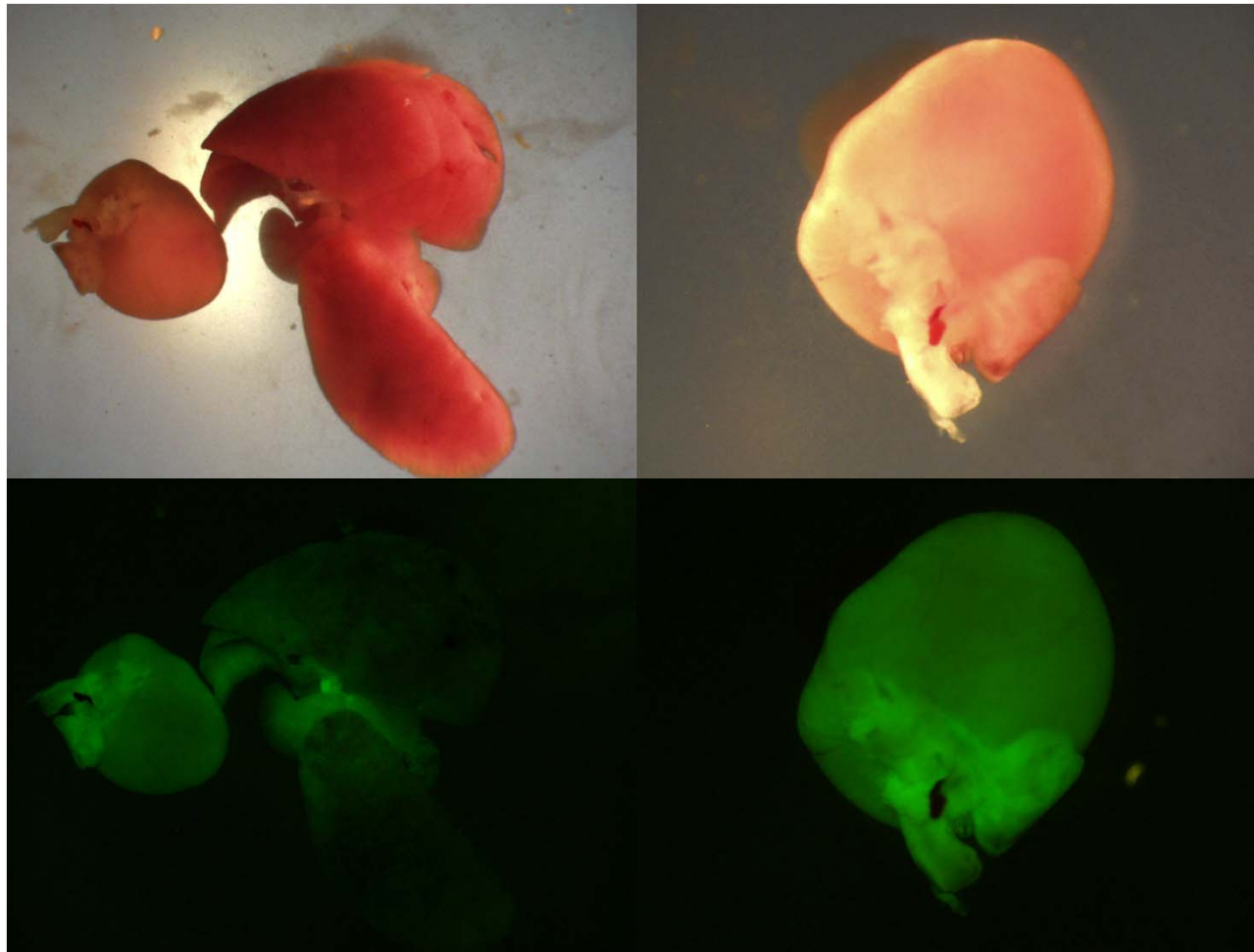
分化細胞特異的Cre組み換え酵素発現による恒常的子孫細胞追跡法

(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)



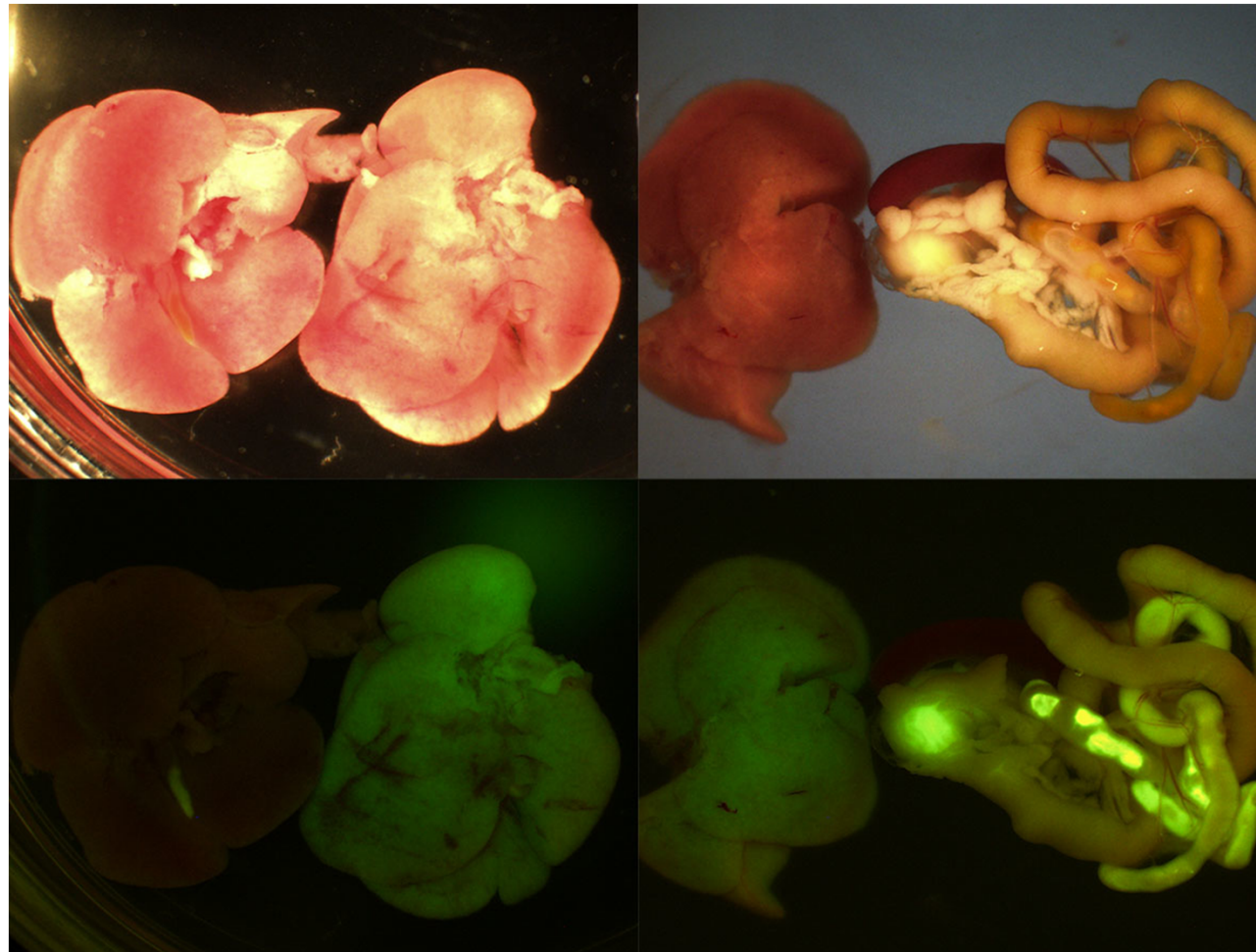
Nkx2.5-Creを用いた心筋細胞の恒常的標識

Nkx2.5-Cre:Rosa26-loxP-STOP-loxP-H2BEGFP P6

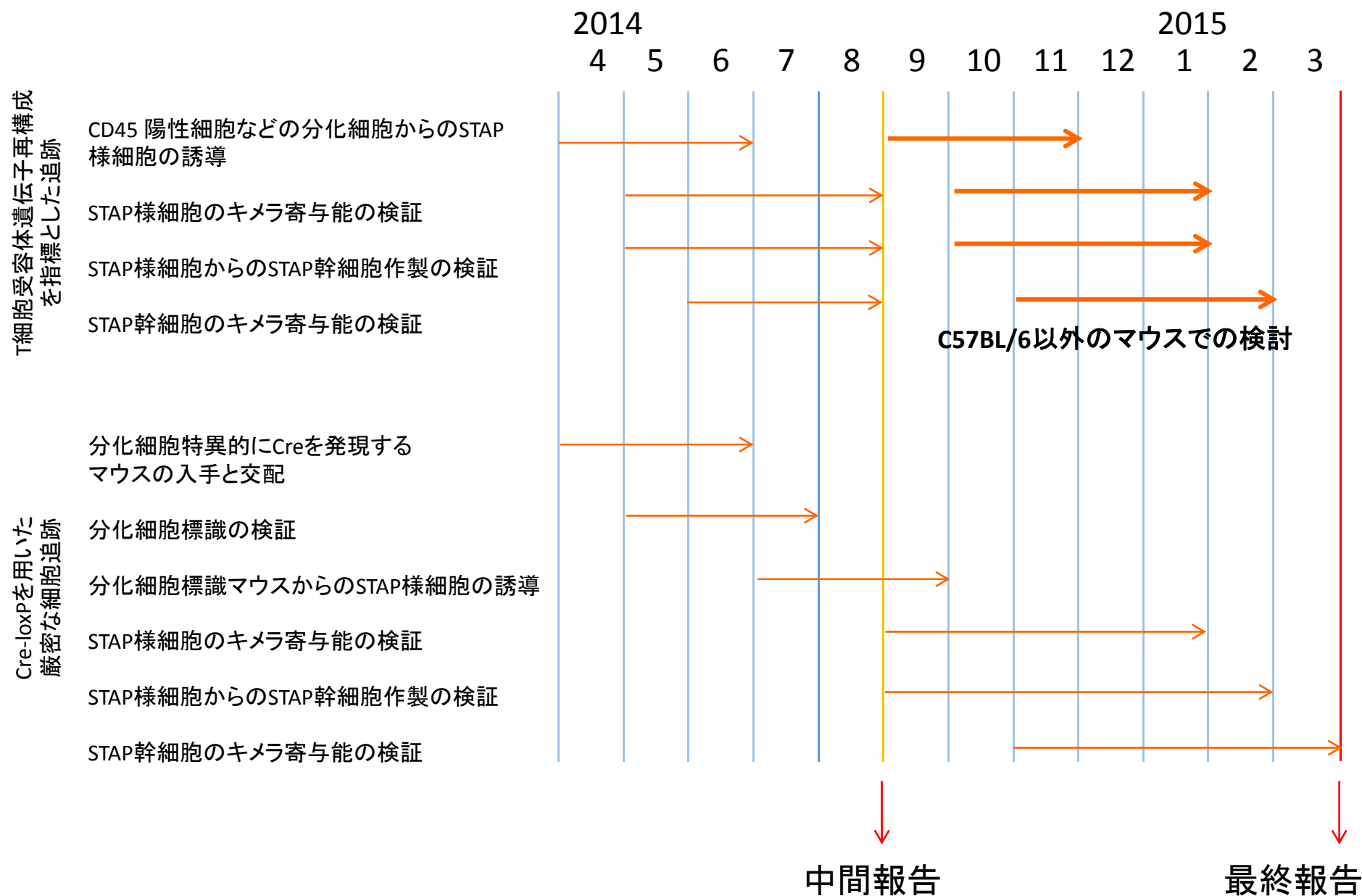


Albumin-Creを用いた肝実質細胞の恒常的標識

Alb-Cre: Rosa26-Rosa26-loxP-STOP-loxP-H2BEGFP P5

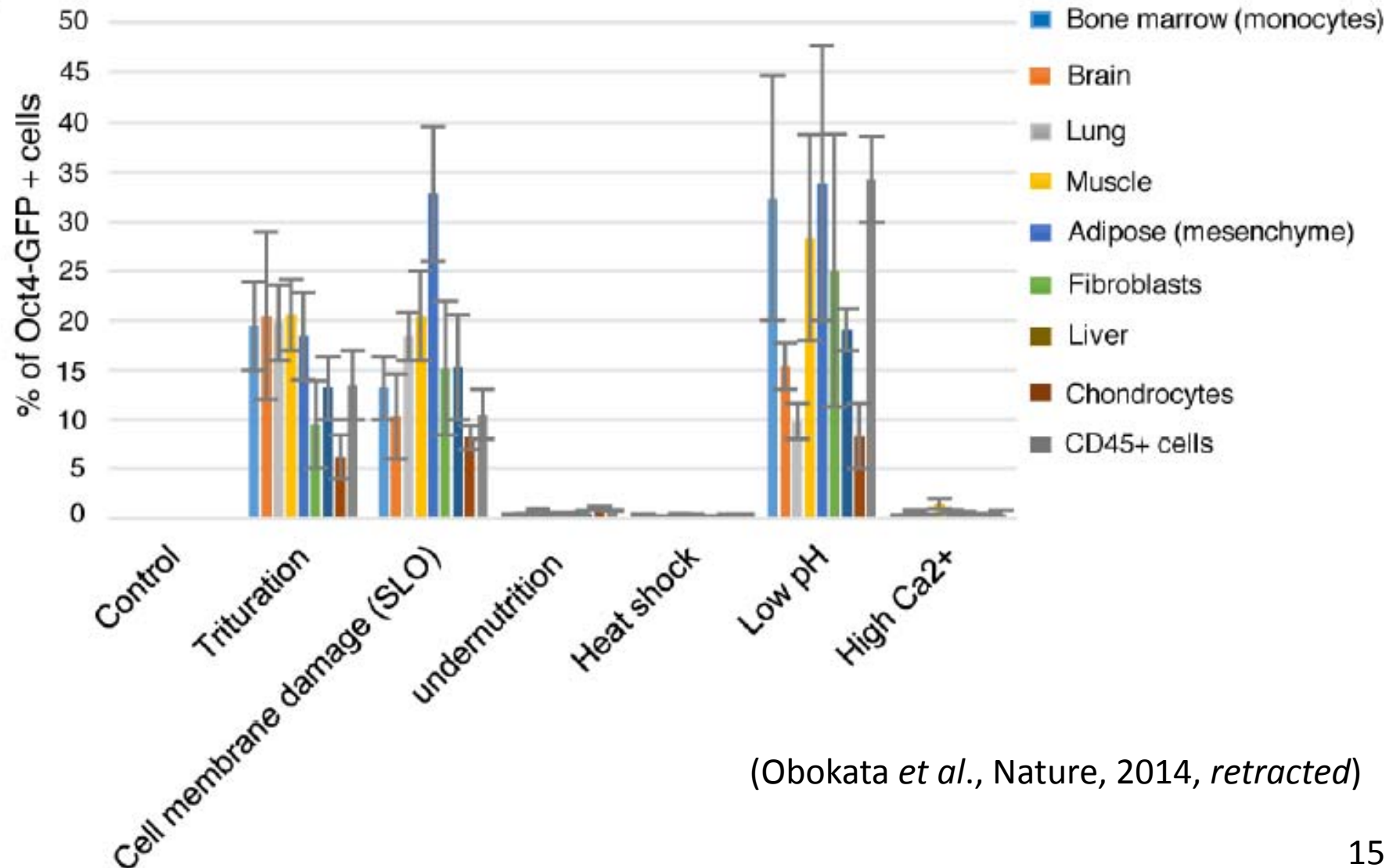


研究実施スケジュール(予定)



種々の臓器に由来する細胞からの 種々のストレス処理によるSTAP細胞誘導

a



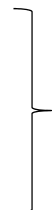
(Obokata *et al.*, Nature, 2014, *retracted*)

今後の検証方針

論文記載の方法

ハーバード大学で公開されている方法

など



の範囲で条件を検討する

検討すべき条件

マウスの遺伝的背景

C57BL/6, 129, C57BL/6x129 F1

臓器

脾臓、肝臓、心臓

ストレス処理方法

毛細管通過刺激 (trituration法)、ストレプトリジン (SLO)
種々の酸処理