

2014年8月27日

STAP現象の検証の中間報告

独立行政法人理化学研究所

1. 概要

一般的な実験マウスである C57BL/6 マウス由来の脾臓について論文に記載されているプロトコールに従って検討を行ったが、論文に報告されたような STAP 細胞様細胞塊の出現を認めることはできなかった。

今後は、11 月末迄の期間に限って小保方氏の参画を得て、同氏による手技を第三者により確認する。また、今回の実験で用いた系統とは異なる系統のマウス、脾臓以外の臓器からの細胞を用いて、論文等に記載された各種処理による完全に分化した細胞（終末分化細胞）からの多能性細胞誘導現象の有無について 3 月末迄を目処に確認する。

2. 多能性細胞の誘導の再現性の有無の検証

- ① 論文に記載されているプロトコールに従って検討を行い、細胞懸濁液の最終 pH が 5.7 付近になる条件を確定した。
- ② 5~7 日齢の C57BL/6 マウスの遺伝的背景を持つ Oct3/4-GFP トランスジェニックマウスから、脾臓を摘出し、リンパ球分離溶液を用いた簡易分画法により、CD45 陽性細胞（核を持つ血液細胞）を濃縮した細胞画分を、遠心分離により回収した。
- ③ 脾臓から得られた CD45 陽性細胞を①で定めた条件で論文のプロトコールに従って 37°C、25 分間で処理し、遠心分離により酸処理液から細胞を回収した。
- ④ ③で得られた細胞を 1 週間培養した。このとき、細胞増殖因子（FGF2）の培養液への添加の有無、細胞培養基質の条件（接着性ないしは非接着性）、播種細胞密度について検討した。
- ⑤ STAP 細胞に特徴的とされる形態の細胞塊の出現ないしは Oct3/4-GFP の蛍光の出現により、誘導の有無を判定した。
- ⑥ これまで 22 回の実験を行い、①で定めた pH5.7 近傍の複数の条件で、③の処理時間も様々に変えて、④の条件の組み合わせを網羅する形で検討を進めた。しかしながら、いずれの条件下でも、論文に報告されたような細胞塊の出現を認めることはできなかった。

3. 分化細胞からの多能性細胞の誘導の可否についての厳密な検証

1. で示した実験によって、多能性細胞の誘導が確認出来た場合、終末分化した細胞からの誘導であることを、より厳密に確認するためのマウスの導入を実施した。

- ① 分化細胞特異的 Cre 組み換え酵素発現のための以下の系統のマウスについて動物施設への導入を完了した。

Albumin-Cre トランスジェニックマウス

Nkx2.5-Cre トランスジェニックマウス

- ② Cre 組み換え酵素で活性化される Rosa26-loxP-STOP-loxP-H2BEGFP マウスとの交配により、ダブルトランスジェニックマウスを作製し、これらの Albumin-Cre では肝臓（肝実質細胞）、Nkx2.5-Cre では心臓（心筋細胞）が GFP により標識される事を確認した。

4. 今後の展開

- 5~7 日齢のマウスからの臓器摘出と細胞の回収には熟練した技術が必要である可能性があることから、11 月末迄の期間に限って小保方氏の参画を得て、同氏による手技を第三者により確認する。
- C57BL/6 以外の遺伝的背景を持つマウス、脾臓以外の臓器からの細胞を用いて、論文等に記載された毛細管通過刺激、各種酸処理等による終末分化細胞からの多能性細胞誘導現象の有無について 3 月末迄を目処に確認する。

以上