
 総 説

日本における角膜再生医療の現状

小泉 範子¹⁾⁴⁾, 西田 幸二²⁾, 天野 史郎³⁾, 木下 茂¹⁾¹⁾京都府立医科大学眼科学教室, ²⁾東北大学医学部眼科学教室³⁾東京大学医学部眼科学教室, ⁴⁾同志社大学再生医療研究センター

要 約

再生医療は、有効な治療法のない難治性疾患に対して、幹細胞や前駆細胞を用いて治療する新しい概念の医療である。眼科領域では、我が国の複数の施設において重症の幹細胞疲弊症に対する培養粘膜上皮シート移植術が既に臨床応用されている。これはドナーあるいは自己の角膜上皮幹細胞や、患者自身の口腔粘膜上皮細胞を少量採取し培養することによって作製した培養粘膜上皮シートを用いて眼表面を再建する角膜上皮の再生医療であり、これまで有効な治療法がないとされていた Stevens-Johnson 症候群や重症化学外傷、眼類天疱瘡など

の難治性疾患に対して外科的治療の可能性をもたらした。さらに角膜内皮疾患に対しても、*in vitro* でヒト角膜内皮細胞を増殖させることが可能になり、培養角膜内皮細胞やその前駆細胞を用いた角膜内皮再生医療の研究が進められている。ここでは我が国における角膜再生医療研究の現状と、将来の展望について述べる。(日眼会誌 111 : 493-503, 2007)

キーワード：角膜再生医療，幹細胞，培養粘膜上皮シート移植，上皮，内皮

 A Review

Progress in the Development of Tissue Engineering of the Cornea in Japan

Noriko Koizumi¹⁾⁴⁾, Kohji Nishida²⁾, Shiro Amano³⁾ and Shigeru Kinoshita¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine²⁾Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine³⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo, School of Medicine⁴⁾Research Center for Regenerative Medicine, Doshisha University

Abstract

Recently, regenerative medicine focusing on tissue-engineering techniques has been developed and established as a new clinical field. In Japan, two types of cultivated mucosal epithelial transplantation have been clinically applied to ocular surface reconstruction of severe stem cell deficiencies; one is allogeneic/autologous cultivated corneal epithelial transplantation and the other is autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation. These new techniques enabled us to treat severe stem cell deficiencies by covering the whole damaged ocular surface with cultivated mucosal epithelial sheets. In the field of corneal endothelial research, recon-

struction of damaged corneal endothelium utilizing cultivated human corneal endothelial cells or their precursors has been developed and its usefulness confirmed in animal models. This review will provide an overview of recent results, as well as an insight into the future of research on corneal regenerative medicine in Japan.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 111 : 493-503, 2007)

Key words : Tissue-engineering of cornea, Stem cell, Cultivated mucosal transplantation, Epithelium, Endothelium,

別刷請求先：602-0841 京都市上京区河原町通り広小路上る梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 小泉 範子
(平成 18 年 12 月 18 日受付, 平成 19 年 1 月 17 日改訂受理) E-mail : nkoizumi@ophth.kpu-m.ac.jp

Reprint requests to : Noriko Koizumi, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyō-ku, Kyoto 602-0841, Japan

(Received December 18, 2006 and accepted in revised form January 17, 2007)

I 緒 言

再生医療は疾病や外傷などによって失われた生体の機能を、幹細胞や前駆細胞などの増殖能をもった細胞や、それらを培養した組織を用いて治療する新しい概念の医療である。眼科領域における再生医療は他の医学領域と比較しても進歩しており、我が国では角膜、網膜、および視神経疾患（緑内障）などに対して臨床応用を目指した高いレベルの研究が行われている。特に角膜上皮の再生医療は、日本の複数の施設において既に臨床応用が始まっており、世界をリードする最先端の研究が行われている。また角膜内皮疾患に対しても、生体内で増殖しないとされるヒト角膜内皮細胞を *in vitro* で培養する技術が既に確立されており、近い将来、日本において世界に先駆けて角膜内皮再生医療の臨床応用が実現されることが期待される。本稿では我が国における角膜再生医療研究の現状と、将来の展望について述べる。

II 角膜移植と再生医療

角膜は感染症や外傷、ジストロフィ、自己免疫疾患などさまざまな原因によって混濁や変形を生じ、視機能に重篤な障害を与える。これらの疾患に対しては全層角膜移植が広く行われており、円錐角膜や角膜白斑などの疾

患には非常に良好な成績が得られることが知られている。その一方で、角膜疾患の中には角膜上皮の幹細胞が障害される幹細胞疲弊症と呼ばれる疾患群があり、それらに対しては幹細胞を移植しない全層角膜移植の効果は一時的であり、角膜上皮幹細胞を何らかの方法で移植することが必要である。また近年増加している水疱性角膜症は、他の疾患と比較して全層角膜移植後の拒絶反応や移植片不全の発症率が高く、予後が不良であることが問題となっている。さらに日本では常に提供角膜が不足しており、角膜移植を必要とする患者は長期にわたる待機期間を強いられているのが現状である。このような医学的および社会的背景のもと、再生医療的アプローチを用いた新しい角膜疾患の治療法の開発が行われるようになった。

III 角膜上皮の再生

1. 角膜上皮幹細胞と幹細胞疲弊症

眼表面は角膜上皮と結膜上皮という2種類の異なる上皮細胞群から構成されており、角膜上が透明な角膜上皮で覆われることは良好な視力を得るうえで重要である。角膜上皮の幹細胞は、角膜と結膜の境界に位置する輪部に存在すると考えられており、臨床的には palisades of Vogt と呼ばれる皺状構造として認められる^{1)~3)}。重症

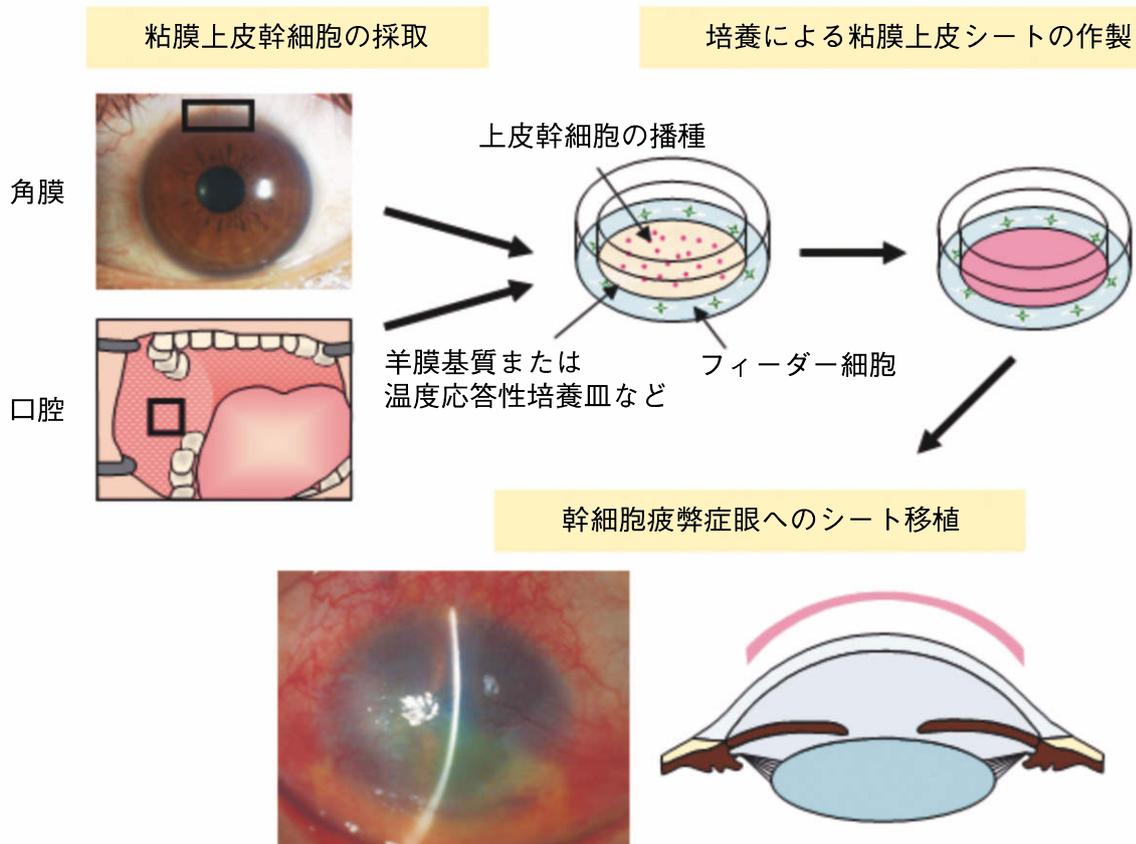


図1 培養粘膜上皮シートを用いた幹細胞疲弊症の治療。

羊膜や温度応答性培養皿などの基質を用いて角膜上皮幹細胞、あるいは口腔粘膜上皮細胞を培養し、幹細胞疲弊症眼の眼表面を再建する。

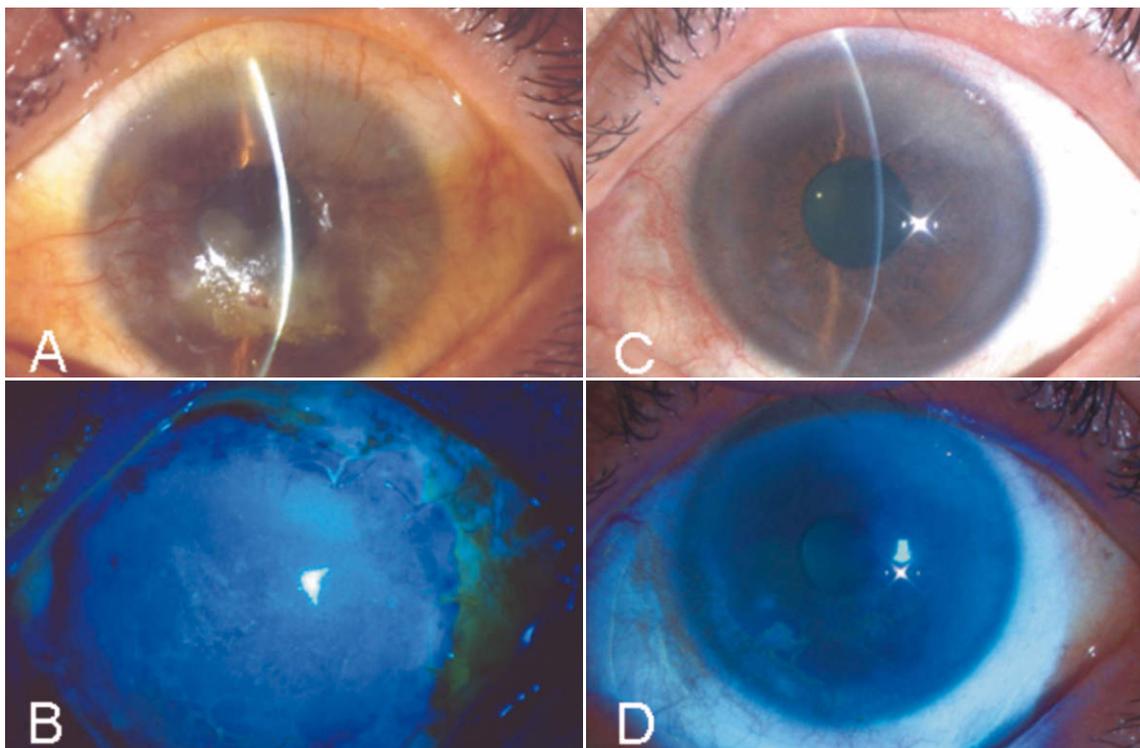


図 2 羊膜を基質として用いたアロ培養角膜上皮シート移植.

A: 化学外傷の癒痕期, palisades of Vogt が全周にわたって消失し, 血管を伴った結膜上皮で覆われている。B: 培養角膜上皮シート移植 48 時間後には, 眼表面に上皮シートが生着し, 上皮欠損を認めなかった。C: 移植後 6 年, 拒絶反応を認めず眼表面は透明なアロ角膜上皮で被覆されている。D: 移植後 6 年のフルオレセイン染色。(A, B は文献 15 より American Academy of Ophthalmology の許可を得て転載)

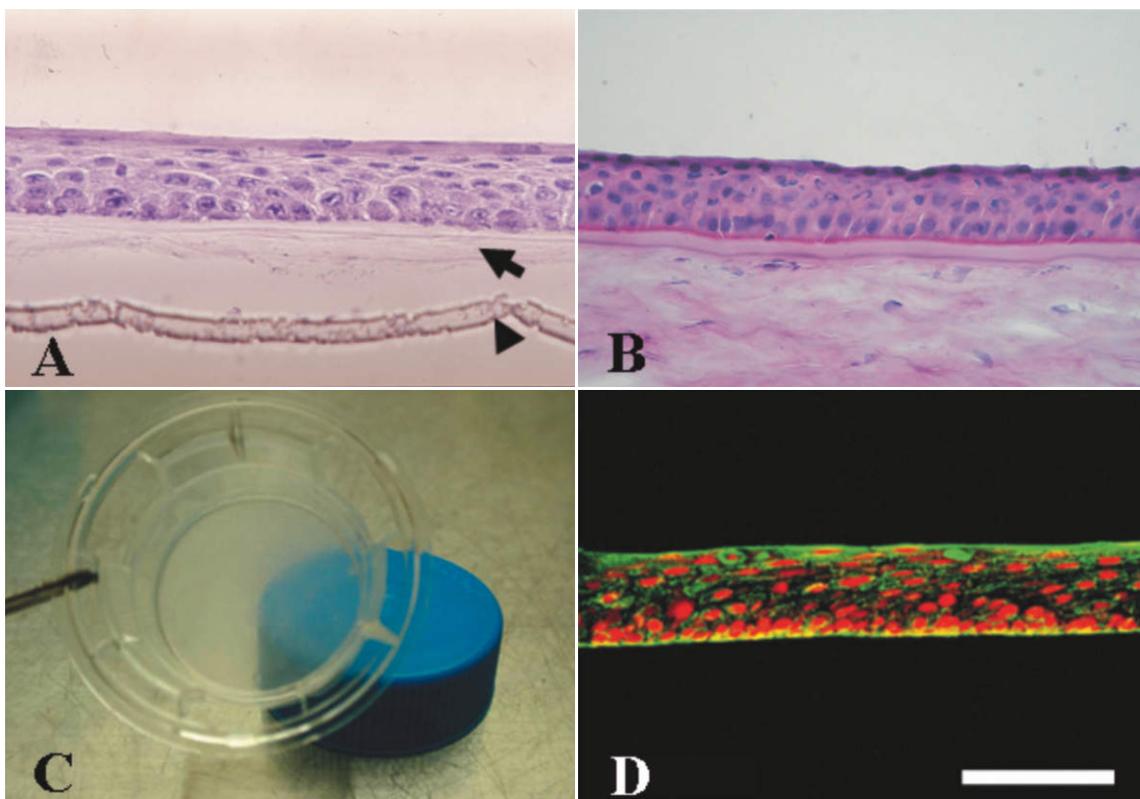


図 3 羊膜を基質として用いた培養口腔粘膜上皮シート.

A: 培養口腔粘膜上皮シートのヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色写真。正常ヒト角膜上皮 (B) に類似した重層化したシートを形成している。C: 培養口腔粘膜上皮シートの透明性は良好である。D: 培養口腔粘膜上皮シートはケラチン 3 を発現している。scale bar=100 μ m。(文献 21 より転載)

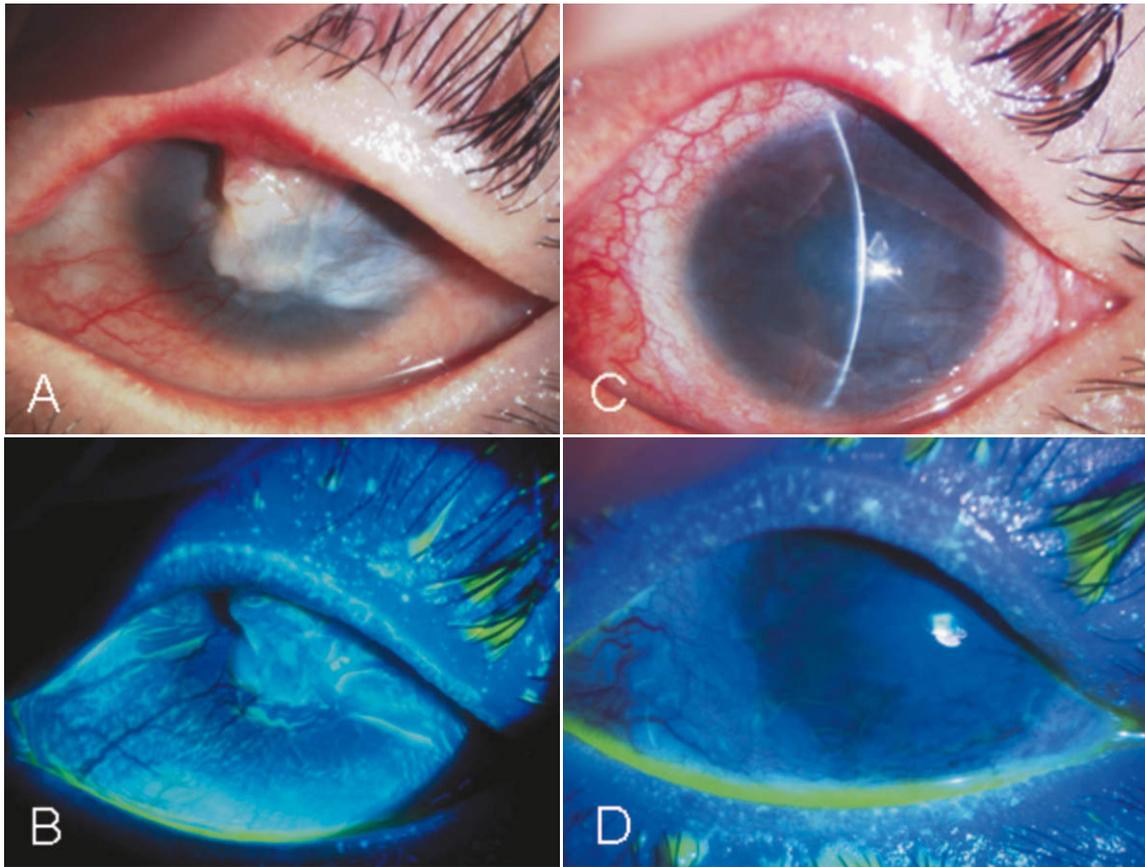


図 4 瘢痕期の重症 Stevens-Johnson 症候群に対する自己培養口腔粘膜上皮移植。

A, B: 術前には輪部上皮がすべて消失し, 眼表面は結膜組織で被覆されていた。C, D: 移植後の眼表面は培養口腔粘膜上皮シートが生着し, 瘢痕性変化を認めない。(文献 21 より転載)

の化学外傷や熱傷, Stevens-Johnson 症候群や眼類天疱瘡などの難治性眼表面疾患では, 広範に角膜輪部の幹細胞が障害されることがあり, その場合角膜上は瘢痕性混濁を伴った結膜組織で被覆されて, 重症の視力障害を生じる。このような疾患を幹細胞疲弊症と呼び, 化学外傷や Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡の他, 薬剤毒性などによる偽眼類天疱瘡, 先天性に角膜上皮幹細胞が欠損する先天無虹彩症, 輪部原発の上皮性悪性腫瘍などが含まれる。これらの幹細胞疲弊症に対する治療法として, 1980 年代以降, ドナーあるいは患者自身の角膜上皮幹細胞を含む組織片を移植する, 角膜上皮形成術⁹⁾や輪部移植術⁵⁾⁶⁾が開発され, 広い意味での角膜上皮再生医療が開始された。しかしこれらの組織移植では, 移植後の眼表面において移植片から上皮細胞が伸展することが必要であり, 強い眼表面炎症を伴う重症眼表面疾患では上皮修復が遅れることがしばしば認められた。

そこで新しい世代の角膜上皮再生医療として注目されているのが, 生体外へ取り出した角膜上皮幹細胞を用いて角膜上皮のシートを作製して移植をする培養角膜上皮移植術である。さらに最近では, 拒絶反応のない患者自身の口腔粘膜組織を培養してシートを作製し, 角膜上皮の再建に用いる培養口腔粘膜上皮移植も臨床応用される

ようになり, 患者自身の細胞を用いた本来の意味での再生医療が可能になっている(図 1)。

2. 培養角膜上皮移植術

培養角膜上皮移植術は角膜輪部に存在する幹細胞を少量採取し, 培養を行って *in vivo* の角膜上皮に類似したシートを作製し, それを用いて幹細胞疲弊症を生じた眼表面を再建する方法である。このコンセプトの治療は, 1997 年にイタリアの Pellegrini らによつてはじめて患者に試みられたものであるが⁷⁾, その数年後には日本においても羊膜を基質として用いることにより角膜輪部の幹細胞を培養したシートを作製する方法が確立された⁸⁾⁹⁾。羊膜は胎盤由来の組織であり, その基底膜は角膜や結膜の基底膜に非常に類似していることが報告されており¹⁰⁾¹¹⁾, 羊膜を角膜上皮幹細胞培養の基質として用いることによつて *in vivo* の角膜上皮に非常に類似した, 重層化して形態的に分化した角膜上皮シートが作製できることが明らかとなった⁹⁾¹²⁾。これらの培養角膜上皮細胞は, 角膜上皮に特異的な細胞骨格蛋白質であるケラチン 3 やケラチン 12 を発現しており, また培養の後半に細胞シートの表面を空気に触れさせる air-lifting 法を用いることにより, 最表層上皮にはタイトジャンクションを形成する¹³⁾。

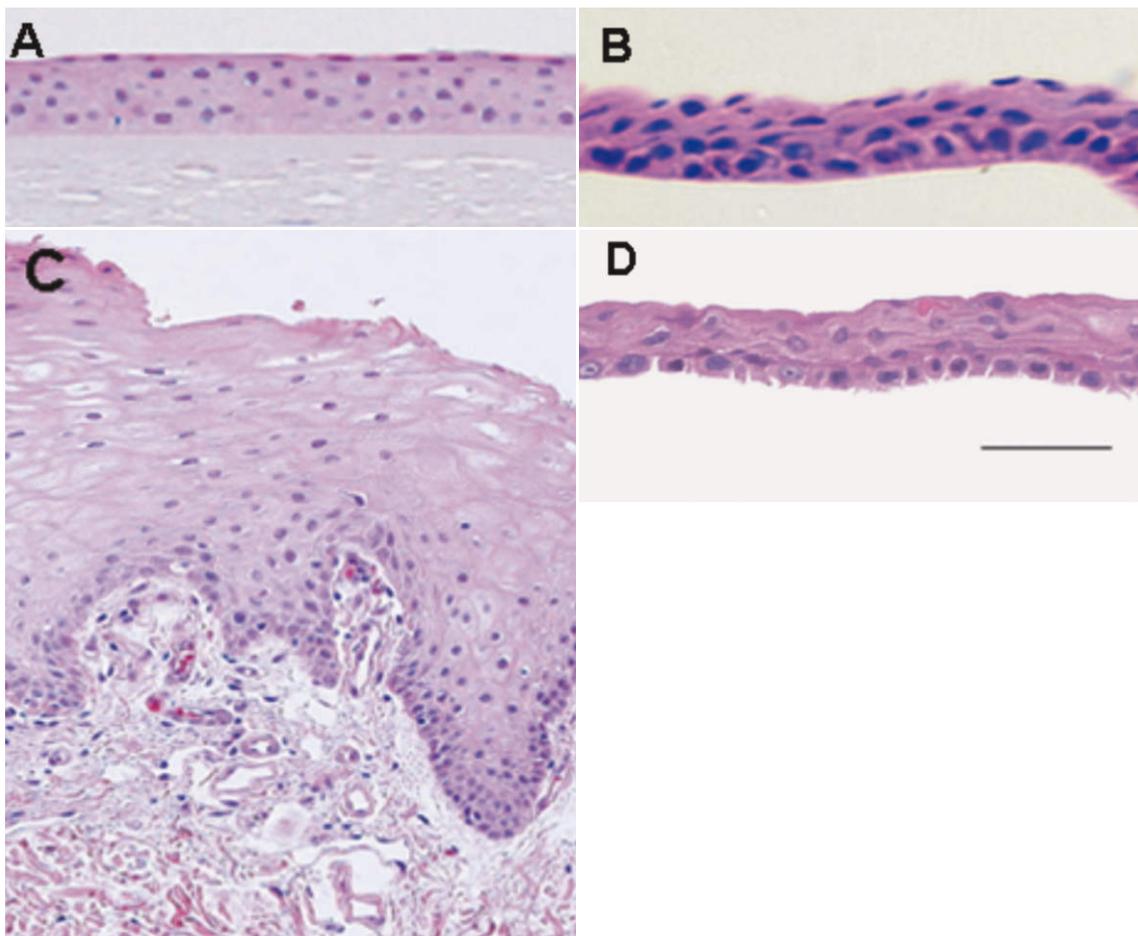


図 5 培養粘膜上皮シートの組織学的構造.

A：正常ヒト角膜上皮。B：輪部上皮から作製した培養上皮細胞シート。C：正常ヒト口腔粘膜上皮。D：口腔粘膜上皮から作製した培養上皮細胞シート。Scale bar=100 μm.(文献 23 を一部改変)

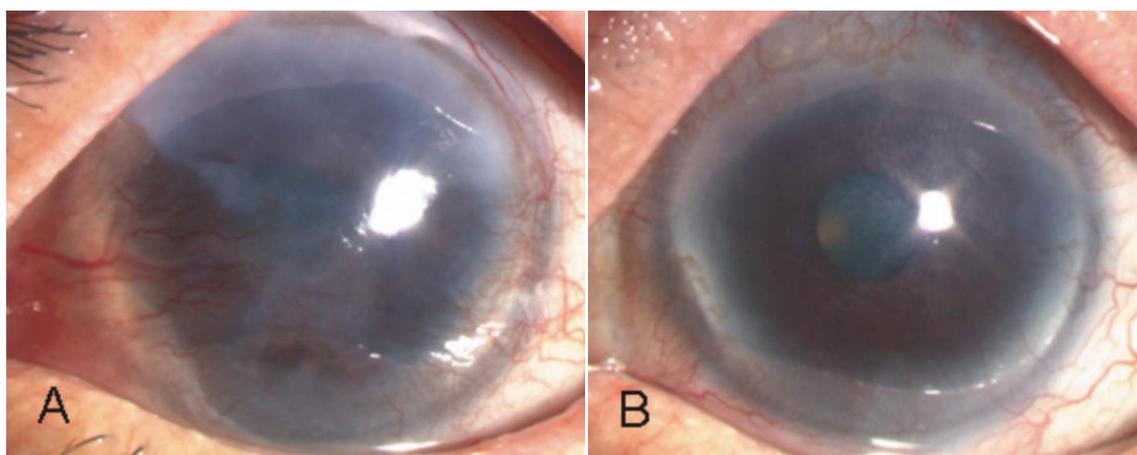


図 6 温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植.

眼類天疱瘡患者に対する自家培養上皮細胞シート移植(口腔粘膜を細胞源)の術前(A：視力 0.01)と術後 14 か月(B：視力 0.7)。(文献 23 を一部改変)

羊膜を基質として用いたアロ培養角膜上皮シート移植は、日本では 1999 年から臨床応用されており、全層角膜移植や輪部移植などの適応のない重症の化学外傷、Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡などに対して行わ

れている^{14)~16)}(図 2)。その結果、急性期の化学外傷や Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡の急性増悪に対し、遷延性上皮欠損を角膜上皮シートで被覆することで速やかな消炎と上皮化が得られ、長期の癍痕性変化の進

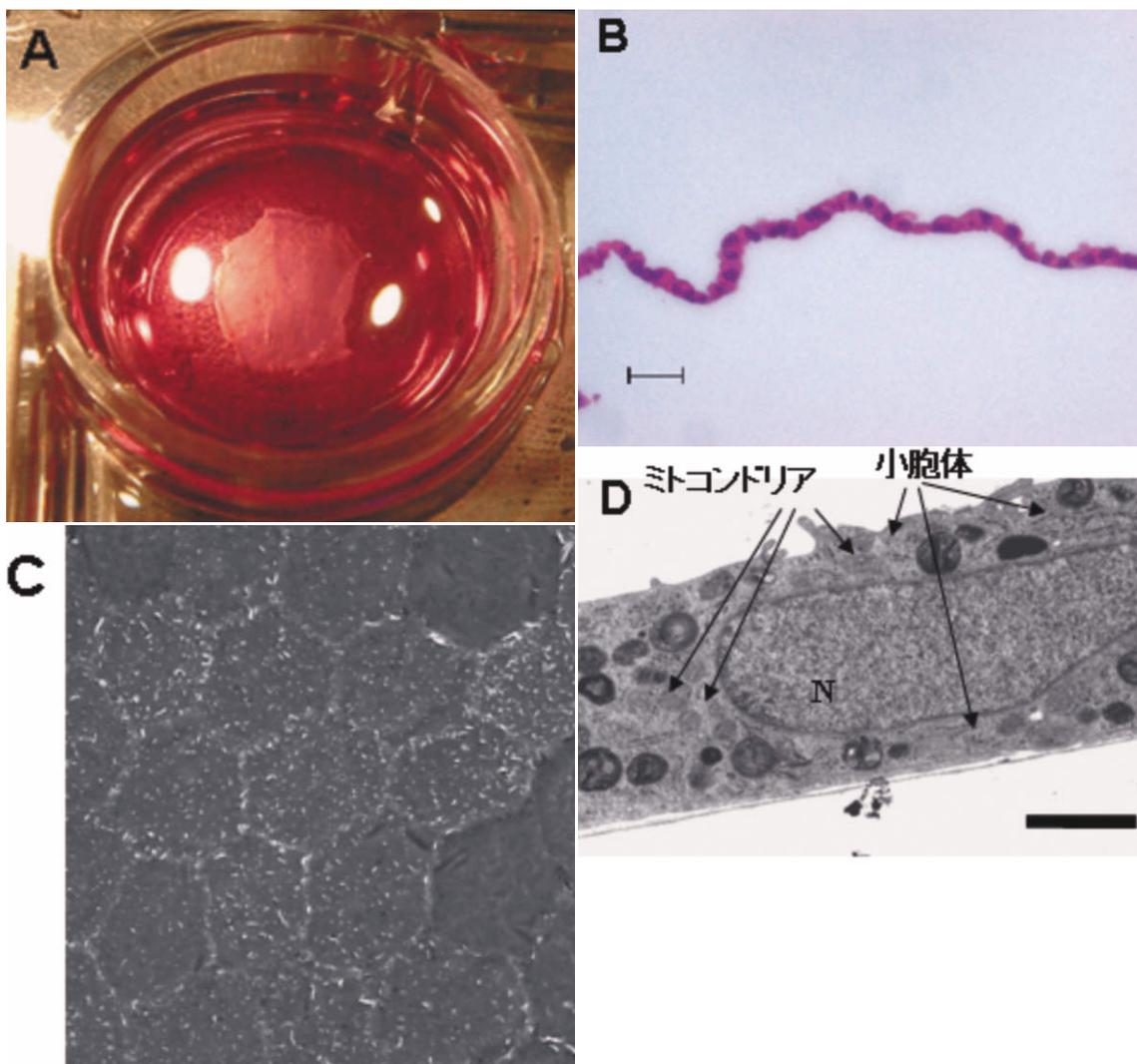


図 7 培養角膜上皮細胞シート。

A: マクロ像. B: 組織像(HE 染色). scale bar=20 μm . C: 走査型電子顕微鏡像. D: 透過型電子顕微鏡像. scale bar=1.0 μm . (文献 36, 37 を一部改変)

行を予防する有用な治療法であることが明らかになった¹⁴⁾¹⁷⁾. 一方、癬痕期の症例に対しても、アロ培養角膜上皮シート移植を行うことにより外科的治療が可能になったが、長期的に安定した眼表面を維持するうえでは拒絶反応や遷延性上皮欠損、薬剤耐性菌による角膜感染症などの問題を解決する必要があることが分かった¹⁵⁾¹⁶⁾. 培養角膜上皮シート移植には、羊膜を基質としたものの以外に、温度応答性培養皿を用いて培養した角膜上皮細胞を基質なしの上皮シートとして移植する方法が開発され、既に臨床応用が行われている¹⁸⁾. また、片眼性の幹細胞疲弊症に対しては、自己の健常眼の輪部組織を用いたオート培養角膜上皮シート移植が可能になり、非常に良好な治療成績が得られている¹⁹⁾.

3. 培養口腔粘膜移植術

その後、両眼性の重症眼表面疾患に対して、拒絶反応の生じない自己の細胞を用いた角膜再生医療の重要性が認識され、患者自身の口腔粘膜上皮細胞を培養して作製

した角膜上皮様シートを用いて眼表面を再建する術式が開発された. 生体内における口腔粘膜は数十層の厚い上皮細胞層から成るが、口腔粘膜から上皮成分のみを選別して培養することによって、角膜上皮に類似した4~5層の厚みの角膜上皮様シートを形成する²⁰⁾. ヒトの培養口腔粘膜シートはケラチン12を発現していないものの、ケラチン3を発現しており、角膜上皮に類似した性質をもつと考えられる(図3). このように作製した培養口腔粘膜シートを用いたオート培養口腔粘膜移植術は、Stevens-Johnson 症候群や化学外傷、眼類天疱瘡などの重症眼表面疾患の眼表面再建に有用であり、拒絶反応を生じないため長期にわたり非常に良好な治療成績が得られる. 口腔粘膜上皮シート移植には、羊膜を基質として用いたものと²¹⁾²²⁾(図4)、基質を用いない温度応答性培養皿を用いて作製するもの²³⁾(図5, 6)と大きく分けて二つの方法がある. いずれの方法を用いても良好な治療成績が報告されており、拒絶反応が問題となる難治性眼

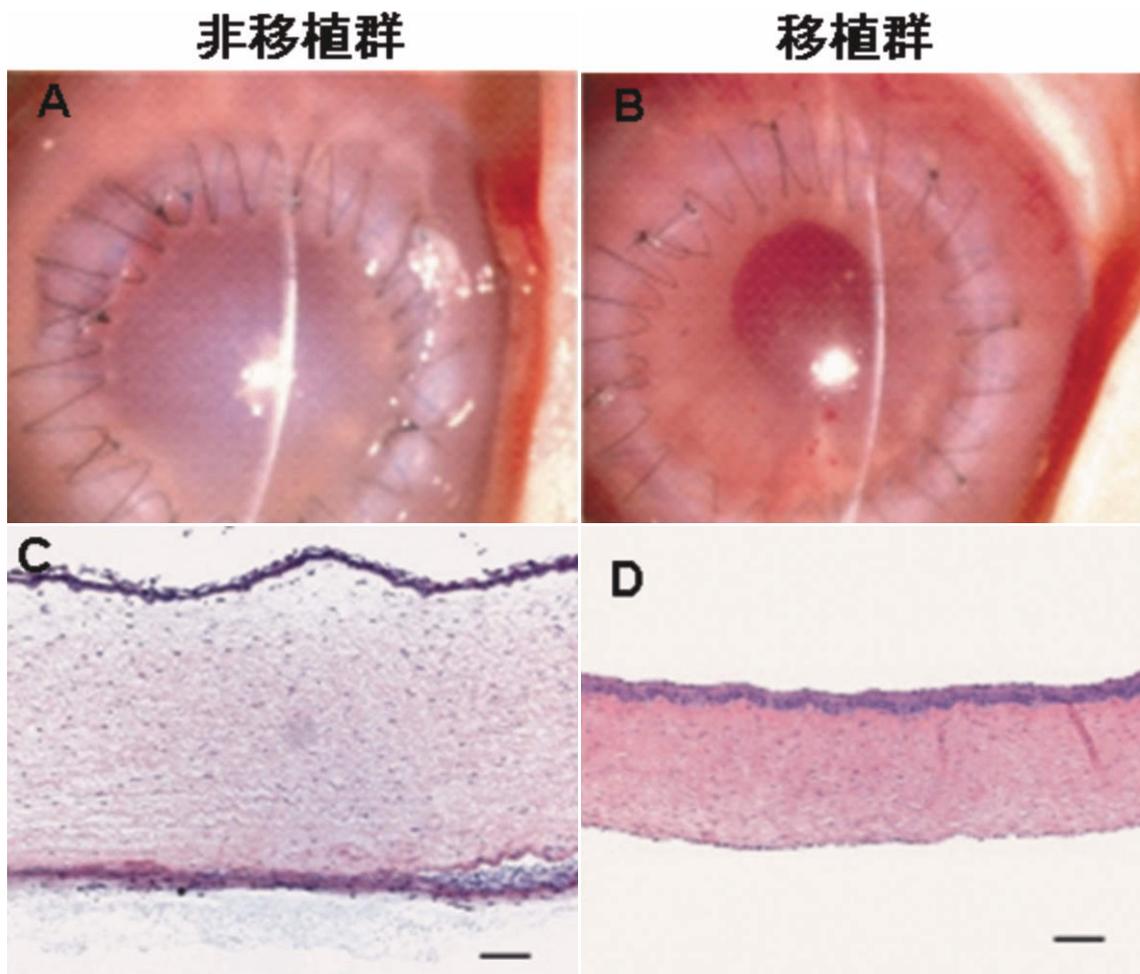


図 8 家兎眼への培養角膜内皮シート移植.

A, C: 非移植群. B, D: 移植群, scale bar=100 μm . (文献 37 を一部改変)

表面疾患の治療法として非常に有効である。また角膜実質混濁を伴った幹細胞疲弊症において、アロ角膜上皮移植と全層角膜移植の併用は拒絶反応の出現率が高く予後が不良であったが、オート培養口腔粘膜移植と全層角膜移植を二期的に行うことにより、良好な視力回復が得られることが報告されており、良好な長期経過が期待される術式である²⁴⁾。

4. 安全面への配慮

一般的にヒト細胞の培養には培養液に動物血清を加える必要があるが、培養角膜上皮シート、培養口腔粘膜シートの作製にもウシ胎仔血清が用いられてきた。しかし、最近では角膜再生医療の長期的な安全性を担保するために、動物由来の成分を用いない患者自身の血清を用いた培養法が確立され、ウシ胎仔血清を用いた場合と遜色ない粘膜上皮シートを作製することが可能になった²⁵⁾²⁶⁾。また角膜上皮の再生医療の材料として使用されている羊膜に関しても、凍結乾燥、滅菌操作を行ったものが開発されており、近い将来に培養粘膜上皮シートの基質としてもより安全な材料を使用できるようになると期待される²⁷⁾²⁸⁾。

IV 角膜内皮の再生医療

1. 培養角膜内皮シート移植の開発

社会の高齢化に伴い、我が国における水疱性角膜症患者は増加傾向にある。水疱性角膜症に対しては全層角膜移植が行われているが、他の角膜疾患に比べて拒絶反応や移植片不全の発症率が高く、治療法として完成されたものとはいい難い。近年パーツ移植という概念から、角膜内皮細胞のみを移植する内皮移植が試みられているが、手技の複雑さとドナー角膜が全層角膜移植と同様に必要であることから、まだ一般的に普及した術式とはいえない²⁹⁾。

水疱性角膜症は、本来角膜内皮細胞の異常によって生じる疾患であるため、初期の段階で健全な角膜内皮細胞を移植すればより良好な治療成績が得られる可能性がある。そこで再生医療的な観点から、角膜内皮細胞あるいはその前駆細胞を生体外で増殖させ、患者へ移植する培養角膜内皮移植の開発が注目されている。これまでにウシ角膜内皮細胞の基質やその代用としてのIV型コラーゲンを用いたヒト角膜内皮細胞培養が報告されており^{30)~}

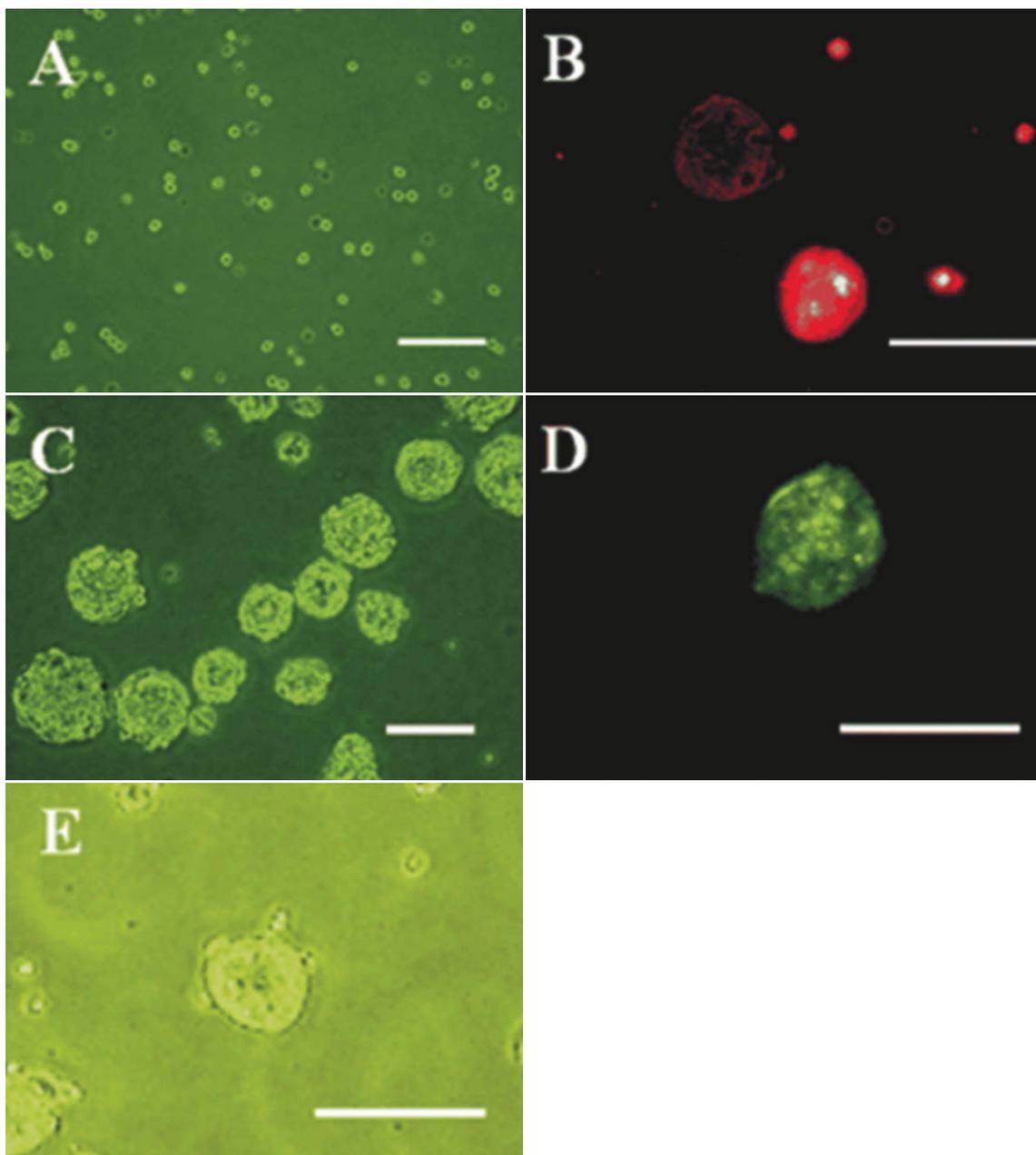


図 9 ヒト角膜内皮細胞(HCEC)からのスフェア.

A: 単一細胞に播種した HCEC. B: 形成されたスフェアは DiI 陽性か陰性. C: 形成されたスフェア. D: スフェアは BrdU 陽性. E: 二次スフェアも形成可能. scale bar=100 μ m(A, B, C, E), 200 μ m(Dのみ). (文献 39 より Association for Research in Vision and Ophthalmology の許可を得て転載)

³³⁾, さらに羊膜やコラーゲンシートなどのキャリアを用いて移植する方法や³⁴⁾³⁵⁾, 温度応答性培養皿を用いて培養した角膜内皮細胞シートをキャリアなしで移植する試み³⁶⁾³⁷⁾が家兎を用いた動物実験で報告されている(図7, 8). これらの移植実験では, 生体外で培養して作製したヒト角膜内皮細胞のシートが, 移植後の家兎眼において機能し角膜を透明に保つことが示された. また最近では, 生体内で角膜内皮細胞が増殖する家兎と異なり, ヒトと同様に角膜内皮の増殖能が非常に低いとされるサルを用いて, 培養角膜内皮シート移植の長期の安全性と有

用性を示す試みも行われている.

2. スフェア法による角膜内皮前駆細胞移植の開発

前述の培養角膜内皮シート移植は機能的に分化した角膜内皮細胞を移植する方法であったのに対し, この方法はスフェア法を用いて角膜内皮の前駆細胞を採取し³⁸⁾, 前房内に注入して Descemet 膜上で角膜内皮細胞へと分化させるコンセプトの治療法である. 成人のヒト角膜内皮細胞から採取したスフェアは, 培養によって角膜内皮細胞様の細胞に分化することが確認されている³⁹⁾⁴⁰⁾(図9, 10). また家兎の水疱性角膜症モデル眼に対して角膜

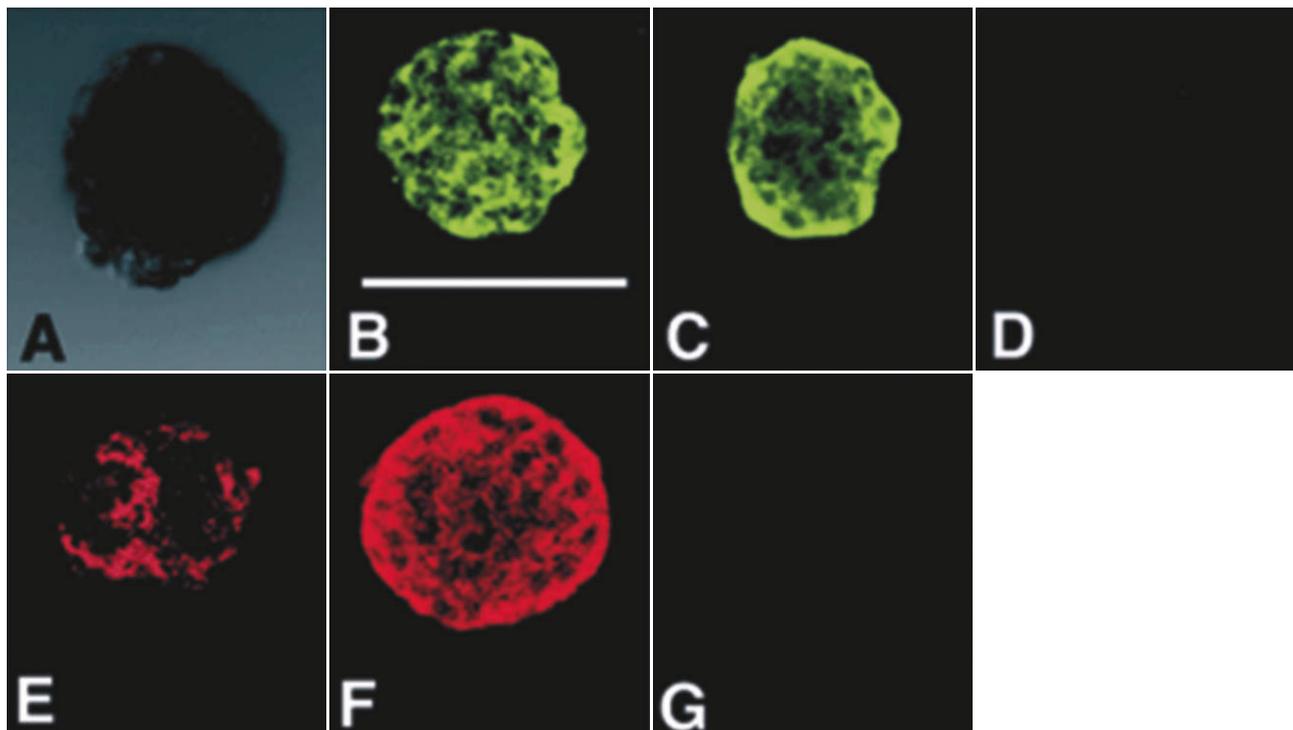


図 10 スフェアの遺伝子発現。

A : Bright field image. スフェアは nestin 陽性(B), α -SMA 陽性(C), β 3-tubulin 陽性(E), GFAP 陽性(F). マウス IgG(D)と正常兎血清(G)では陰性. Scale bar=100 μ m. (文献 39 より Association for Research in Vision and Ophthalmology の許可を得て転載)

内皮前駆細胞の前房内注入による治療法の試みがなされており^{41)~43)}, 将来的な臨床応用が期待されている。

V 角膜実質の再生, 人工角膜の開発

角膜実質の代替組織として, 細胞成分を含まない合成ポリマーを用いた人工角膜の開発が試みられているが⁴⁴⁾, 生体適合性の問題から感染や脱落などの問題があり, 再生医療の分野においてよりも薬剤開発における角膜モデルとしての応用が期待されている。生体適合性を高めた臨床応用可能な人工角膜としては, 患者の歯根部を利用した人工角膜移植法が開発され, 日本においても臨床応用されている。また合成ポリマーを天然ポリマーや羊膜と組み合わせることにより足場として用いる試みが行われている^{45)~47)}。透明性の保持や力学的強度, 血管や神経再生など解決すべき問題点があるが, 今後の発展が期待される分野である。

VI 日本における角膜再生医療の展望

長い歴史をもつ角膜移植治療は, 従来の全層角膜移植から障害されている部分のみを移植するパーツ移植を目指した治療法へと選択の幅が広がりつつあり, さらに近年の再生医学・再生医療の進歩に伴って組織幹細胞を用いた細胞移植治療へと進化している。今後の角膜再生医療の課題としては, 培養角膜上皮移植や培養口腔粘膜移植における幹細胞の同定や培養環境の整備(ニッチの維

持など), 品質管理された環境での移植材料の作製や動物由来成分を用いない細胞培養法の確立など, 機能面でのさらなる向上と安全性の確保が必要である。また, 2006年9月1日以降に行われる再生医療の臨床研究に関しては, 厚生労働省の「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が適応されることになった。現状では既に開始されている臨床研究に関しては継続的に行うことができるようであるが, 内容的にはGMPに準拠した方法にグレードアップして, より安全性に配慮して行く必要がある。また最終的には, 臨床研究の成果を産業化へ結び付けることを目指している企業もあるようである。この分野において, 日本は世界的にみても先進的な研究を行っている国の一つであり, 日本から継続的に最新の成果を発信できることを願っている。

本論文は, 2006年に専門別研究会として発足した眼科再生医療研究会の活動の一環として, 世話人らが作成した総説論文である。眼科再生医療研究会の活動に対する日本眼科学会の支援に深謝いたします。

文 献

- 1) Schermer A, Galvin S, Sun TT : Differentiation-related expression of a major 64 K corneal keratin *in vivo* and *in culture* suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*

- 103 : 49—62, 1986.
- 2) **Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Laverker RM** : Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : implications on epithelial stem cells. *Cell* 57 : 201—209, 1989.
 - 3) **Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, et al** : Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 20 : 639—673, 2001.
 - 4) **Thoft RA** : Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* 97 : 1—6, 1984.
 - 5) **Kenyon KR, Tseng SC** : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96 : 709—722 ; discussion 722—703, 1989.
 - 6) **Tsai RJ, Tseng SC** : Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 13 : 389—400, 1994.
 - 7) **Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M** : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349 : 990—993, 1997.
 - 8) **Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S** : Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 19 : 65—71, 2000.
 - 9) **Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ** : Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2506—2513, 2000.
 - 10) **Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T** : Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 18 : 73—79, 1999.
 - 11) **Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S** : Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the alpha 5 chain of type IV collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1771—1774, 2004.
 - 12) **Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, et al** : An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2114—2121, 2002.
 - 13) **Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, et al** : Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* 76 : 735—743, 2003.
 - 14) **Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S** : Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 119 : 298—300, 2001.
 - 15) **Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S** : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108 : 1569—1574, 2001.
 - 16) **Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimamura S, Tsubota K** : Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 109 : 1285—1290, 2002.
 - 17) **Ang LP, Sotozono C, Koizumi N, Suzuki T, Inatomi T, Kinoshita S** : A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 143 : 178—180, 2007.
 - 18) **Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al** : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77 : 379—385, 2004.
 - 19) **Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S** : Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* 82 : 468—471, 2004.
 - 20) **Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, et al** : The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 106—116, 2003.
 - 21) **Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S** : Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 88 : 1280—1284, 2004.
 - 22) **Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S** : Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 141 : 267—275, 2006.
 - 23) **Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al** : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187—1196, 2004.
 - 24) **Inatomi T, Nakamura T, Kojo M, Koizumi N, Sotozono C** : Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 142 : 757—764, 2006.
 - 25) **Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP,**

- Koizumi N, Yokoi N, et al** : Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 113 : 1765—1772, 2006.
- 26) **Nakamura T, Ang LP, Rigby H, Sekiyama E, Inatomi T, Sotozono C, et al** : The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 909—916, 2006.
- 27) **Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, et al** : Sterilized, freeze-dried amniotic membrane : a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 93—99, 2004.
- 28) **Nakamura T, Inatomi T, Sekiyama E, Ang LP, Yokoi N, Kinoshita S** : Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand* 84 : 401—405, 2006.
- 29) **Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, Shinozaki N, Taguchi T, Kobayashi H, et al** : Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br J Ophthalmol* 89 : 134—137, 2005.
- 30) **Miyata K, Murao M, Sawa M, Tanishima T** : New wound-healing model using cultured corneal endothelial cells. 1. Quantitative study of healing process. *Jpn J Ophthalmol* 34 : 257—266, 1990.
- 31) **Miyata K, Murao M, Sawa M, Tanishima T** : New wound-healing model using cultured bovine corneal endothelial cells. 2. Role of migration and mitosis studied by immunohistochemistry. *Jpn J Ophthalmol* 34 : 267—274, 1990.
- 32) **Miyata K, Drake J, Osakabe Y, Hosokawa Y, Hwang D, Soya K, et al** : Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea* 20 : 59—63, 2001.
- 33) **Amano S, Mimura T, Yamagami S, Osakabe Y, Miyata K, Yokoo S, et al** : Properties of corneas reconstructed with cultured human corneal endothelial cells and human corneal stroma. *Jpn J Ophthalmol* 49 : 448—452, 2005.
- 34) **Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Cannon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al** : Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 800—806, 2004.
- 35) **Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al** : Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2992—2997, 2004.
- 36) **Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, Nozaki T, et al** : Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* 27 : 607—614, 2006.
- 37) **Sumide T, Nishida K, Yamato M, Ide T, Haya-shida Y, Watanabe K, et al** : Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *Faseb J* 20 : 392—394, 2006.
- 38) **Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yanagi Y, et al** : Comparison of rabbit corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3645—3648, 2005.
- 39) **Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, Uchida S, Mimura T, Usui T, et al** : Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1626—1631, 2005.
- 40) **Yamagami S, Mimura T, Yokoo S, Takato T, Amano S** : Isolation of human corneal endothelial cell precursors and construction of cell sheets by precursors. *Cornea* 25 Suppl 1 : S 90—S 92, 2006.
- 41) **Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, et al** : Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3128—3135, 2005.
- 42) **Mimura T, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yamagami S** : Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3637—3644, 2005.
- 43) **Amano S, Yamagami S, Mimura T, Uchida S, Yokoo S** : Corneal stromal and endothelial cell precursors. *Cornea* 25 Suppl 1 : S 73—77, 2006.
- 44) **Minami Y, Sugihara H, Oono S** : Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 2316—2324, 1993.
- 45) **Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato N, Uchino Y, et al** : Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 76 : 56—63, 2006.
- 46) **Shimmura S, Doillon CJ, Griffith M, Nakamura M, Gagnon E, Usui A, et al** : Collagen-poly (N-isopropylacrylamide)-based membranes for corneal stroma scaffolds. *Cornea* 22 : S 81—88, 2003.
- 47) **Uchino Y, Shimmura S, Miyashita H, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, et al** : Amniotic membrane immobilized poly(vinyl alcohol) hybrid polymer as an artificial cornea scaffold that supports a stratified and differentiated corneal epithelium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 81 : 201—206, 2007.