

## 平成 21 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

## 角膜上皮の再生医療と幹細胞

横尾 誠一

東京大学医学部眼科学教室

## 要 約

幹細胞は組織を構成する分化した細胞を供給する。幹細胞研究は盛んに行われ、近年再生医療の実現化などが注目されている。眼科分野では角膜上皮の再生医療が臨床で実施されており、培養法のさらなる改良が行われている。また、成体幹細胞の一種としてその存在が示唆される角膜上皮幹細胞の探索研究がフローサイトメトリー法や選択培養法などさまざまな方法で行われてきた。本総説では主に角膜上皮の再生医療にかかわる培養法と幹

細胞研究について、近年我々が見出した幹細胞の新たな特徴である高付着能と単離法、角膜上皮幹細胞にかかわる結果をあわせて紹介する。(日眼会誌 114 : 968—975, 2010)

キーワード：角膜上皮幹細胞、再生医療、フローサイトメトリー、選択培養法、高付着能

## A Review

## Regenerative Medicine and Stem Cells of Corneal Epithelium

Seiichi Yokoo

*Department of Ophthalmology, University of Tokyo*

## Abstract

Stem cells supply differentiated cells that compose the body organs. Stem cell research is increasing and their use in regenerative medicine is drawing a lot of attention. In ophthalmology, regenerative medicine of the corneal epithelium is already practiced by clinicians, and there is constant improvement in the culture methods. Research leading to the isolation of corneal epithelial stem cells, a kind of adult stem cell whose existence has been suggested, is done using various methods such as flow cytometry and selective culture methods. In this review, regenerative medi-

cine of the corneal epithelium, stem cell isolation and culture methods are explained; and our new discoveries of stem cells' features such as their high adhesive ability is explained.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 114 : 968—975, 2010)

Key words : Corneal epithelial stem cell, Regenerative medicine, Flow cytometry, Selective culture methods, High adhesive ability

## I はじめに

幹細胞は組織や臓器を構成する細胞を供給し、組織や臓器を形成し得る細胞である。この能力を保つには幹細胞が他の細胞へ分化した細胞を供給し、かつ自身の幹細胞としての性質を保持しなければならない。一般的に知

られている幹細胞は一個の細胞から個体を発生させる全能性 (totipotency) をもつ受精卵である。また近年は胚性幹細胞 (ES 細胞 : embryonic stem cells), 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞 : induced pluripotent stem cells) など単体では個体の発生はできないが身体を構成する全細胞へ分化する多能性 (pluripotency) をもつ幹細胞が人為的に

別刷請求先 : 113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学医学部附属病院眼科学教室 横尾 誠一

(平成 22 年 4 月 8 日受付, 平成 22 年 7 月 27 日改訂受理) E-mail : syokoo-ky@umin.ac.jp

Reprint requests to : Seiichi Yokoo, Ph.D. Department of Ophthalmology, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

(Received April 8, 2010 and accepted in revised form July 27, 2010)

表 1 幹細胞の分化能による分類

|                     |                                  |          |       |
|---------------------|----------------------------------|----------|-------|
| 全能性(totipotency)    | 受精卵, 初期胚                         | 個体の発生    |       |
| 分化万能性(pluripotency) | 胚性幹細胞(ES細胞), 人工多能性幹細胞(iPS細胞) 奇形種 | 全細胞へ分化   |       |
| 多分化性(multipotency)  | 間葉系幹細胞                           | 複数の細胞へ分化 | 成体幹細胞 |
| 単一分化性(unipotency)   | 皮膚表皮, 角膜内皮幹細胞                    | 一種の細胞へ分化 |       |

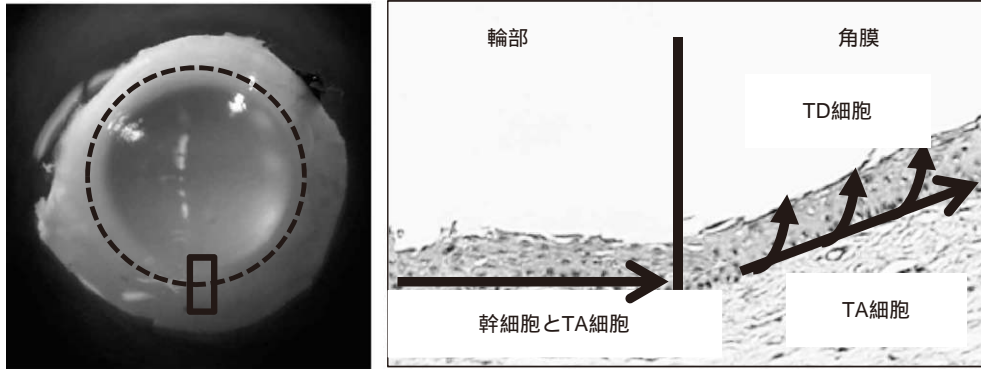


図 1 角膜輪部に存在する幹細胞と細胞供給のモデル。

角膜と結膜の境目である角膜輪部に幹細胞の存在が示唆される。幹細胞は角膜輪部に留まったまま増殖能が活発な transient amplifying (TA) 細胞を角膜へ供給し、TA 細胞から最終的に分化した terminally differentiated (TD) 細胞が供給される。

(文献 34 より許可を得て転載, 一部改変)

構築されている<sup>12)</sup>。個体が発生するにつれ全能性は早期に失われ、ある程度限定された細胞分化能をもつ多分化性(multipotency)をもつ幹細胞が現れてくる。これら多分化性をもつ幹細胞は体性幹細胞(somatic stem cells)と呼ばれる。さらに分化できる細胞が一種類に限定されている場合もあり、単一分化性(unipotency)である前駆細胞(precursor cell)も存在する。これら体性幹細胞や前駆細胞は成体にも存在し、成体幹細胞(adult stem cell)と呼ばれることも多い(表1)。幹細胞の研究をこれら分類で分けるならば、全能性、多能性をもつ受精卵、ES細胞、iPS細胞の研究と、多分化性と単一分化性をもつ成体幹細胞の研究に分けられる。角膜上皮に存在する幹細胞は成体に存在するため成体幹細胞である。幹細胞研究が進展するにつれ不可逆的に失われた身体機能を回復させる再生医療の実現化が真剣に検討されるようになった。

## II 成体幹細胞と角膜上皮幹細胞

1960年代から1970年代にかけて骨髄からの間葉系幹細胞が発見されたこともあり、これらを通じて成体幹細胞の特徴の多くが明らかにされた。幹細胞は活発に増殖しない slow-cycling な細胞であることや、幹細胞からより活発増殖する transient amplifying cells (TA 細胞) が分化し、そこから最終的に分化した terminally differentiated cells (TD 細胞) が供給されること<sup>3)</sup>、幹細胞が分

化した細胞を生み出し、かつ未分化な幹細胞を残すには「非対称分裂」と「再複製能(self-renewal)」<sup>4)5)</sup>が必要であること、そのためには幹細胞の性質を維持するための環境「niche」<sup>6)</sup>が必要なことなどおおよそ現在まで幹細胞の特徴を語る学説はこの頃までに提唱されている。

角膜上皮幹細胞については1971年にDavangerとEvensenにより角膜輪部から角膜上皮細胞が供給されることが提唱されており<sup>7)</sup>、実際にBuckが1985年にはネズミを用いた研究で角膜周辺から中央に向けて上皮細胞が移動している様子を報告している<sup>8)</sup>。1986年にはSchermerらによって角膜輪部基底層に幹細胞が存在し、そこから角膜上皮基底層にTA細胞を供給するという説が唱えられた<sup>9)</sup>。またCotsarelisらによりslow-cyclingな細胞が角膜輪部に存在することも1989年に発見され<sup>10)</sup>、角膜輪部に幹細胞が存在することが強く示唆された。角膜中央部の上皮細胞が障害されても幹細胞が存在する角膜輪部が残存していれば角膜上皮細胞が供給され角膜の透明性を維持すると考えられている(図1)。しかし、角膜上皮幹細胞自体の単離は近年に至るまで成し遂げられておらず、その特徴は不明な点が多い。幹細胞の詳細を調べるには幹細胞の単離が必要だが、幹細胞を単離するためには幹細胞の特徴を明らかにせねばならず、特徴を明らかにするためには培養法の開発が必要であり、幹細胞の培養法を開発するためには幹細胞の単離が必要であるという、片方を明らかにするに

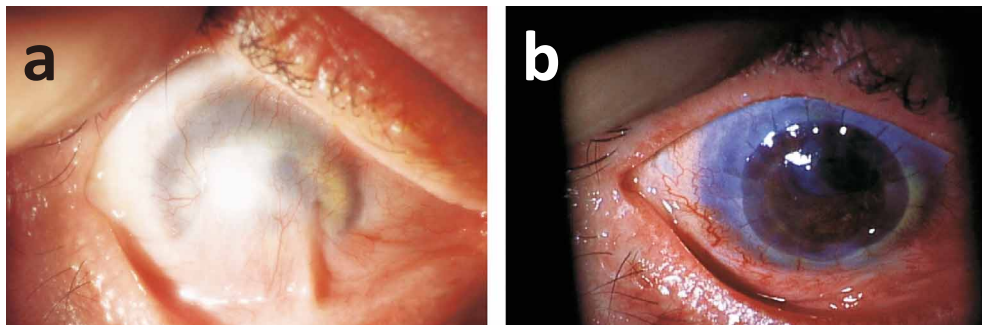


図 2 化学熱傷に対する培養口腔粘膜上皮シート移植.

a: 角膜上皮幹細胞が失われ結膜で被覆された角膜. b: 培養口腔粘膜上皮シート移植後に角膜移植を施し透明性を回復できた.

はもう片方が既に明らかでなければならぬというきわめて困難な状況である。現在のところ角膜上皮の再生医療の実施も兼ねて培養法の検討が続けられる一方、角膜上皮の幹細胞特異的マーカーの探索が活発に進められているので紹介したい。

### Ⅲ 角膜上皮の再生医療

角膜上皮幹細胞が、アルカリや酸による化学熱傷、あるいは Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡などの疾病といったさまざまな原因で消失すると角膜上皮細胞が供給されなくなり、結膜上皮が角膜表面を覆い角膜の透明性は失われ失明に至る。これら難治性角膜上皮疾患に対して有効な治療法の開発が望まれた。1989 年 Kenyon らにより自己角膜輪部を移植するモデルが提唱された<sup>11)</sup>。しかし自己移植の場合、両眼性の疾患には障害を受けていない自己角膜輪部組織が残されておらず、さらに片眼性であっても正常な角膜より移植に必要な組織を採取するには極力低侵襲であることが望まれた。そして、1997 年に Pellegrini らにより患者自身の角膜輪部を培養して角膜上皮シートを作製する手法で低侵襲での難治性角膜上皮疾患克服が可能となった<sup>12)</sup>。さらに 2000 年には Tsai らにより羊膜をキャリアとした培養角膜輪部上皮による移植治療が報告され<sup>13)</sup>、一気に難治性角膜上皮疾患に対する角膜上皮の再生医療が臨床で用いられるようになった。両眼とも障害された疾患に対処するために Nakamura らは 2003 年にウサギを用いて、失われた角膜輪部上皮の代わりに培養した口腔粘膜上皮を眼表面に移植することで難治性角膜上皮疾患を治療できる可能性を示した<sup>14)</sup>。翌年には Nishida らが温度応答性培養皿を使った羊膜を伴わない口腔粘膜上皮シートによる失明克服を報告し<sup>15)</sup>、両眼性の難治性角膜上皮疾患に対しても角膜上皮の再生医療実施が可能となっている(図 2)。

### Ⅳ 角膜上皮の培養法

角膜上皮の再生医療が実施されてきたが、この間、培養法の研究は進捗しておらず劇的な進歩はみられていな

かった。1997 年の Pellegrini らの報告以降、培養法はほぼ同一であり、すなわちマウス 3T3 フィーダー細胞を用いて動物血清の存在下で行われている。これは培養表皮の培養法であり、動物血清や 3T3 フィーダー細胞が産生するなんらかの増殖寄与因子の助けを借りる。この角膜上皮を増殖させる因子は EGF (epidermal growth factor) や KGF (keratinocyte growth factor) などが有名である。近年では 3T3 フィーダー細胞がマウス由来であり未知の異種感染症のリスクが存在することから、これを回避する目的でヒトの細胞をフィーダー細胞として用いる研究が多い。2007 年の Notara らによるヒト胎児由来の細胞株 MRC-5<sup>16)</sup>や、2008 年の Sugiyama らによるヒト間葉系幹細胞を用いた系がある<sup>17)</sup>。また血清も多種多様な未知因子を含む成分で構成されているため lot 差や感染症リスクが存在し、効果的な培養法を導き、安全性を高めるためにも無フィーダー・無血清培養法の実現が望まれていた。

著者らは研究に用いられる多くの培養液は脂溶性栄養素が添加されていなく、それらが含まれる血清も 10% 程度の濃度で使用され、脂溶性必須栄養素が培養液中で補えていないことに気がつき、2008 年にレチノールの添加で角膜上皮細胞の無フィーダー・無血清培養が可能になることを見出し、神経細胞の培養添加カクテルとして使用されるレチノール含有 B-27 supplement と EGF の組合せで角膜上皮シートの無フィーダー・無血清培養が可能であることを報告した<sup>18)</sup>。角膜上皮以外の組織・細胞培養研究でも脂溶性栄養素の効果はあまり検討されていないので、今後の各分野での検討が望まれる。

### Ⅴ 幹細胞の探索

眼科領域では幹細胞の発見を伴わずに再生医療の臨床応用が進んだのが特色で、再生医療の実現に必ずしも幹細胞の発見が必須ではないことが分かる。しかし現在までの培養上皮シートによる移植は、幹細胞移植ではなく培養輪部上皮や培養口腔粘膜上皮シート移植術であることに注意が必要である。角膜をはじめ上皮幹細胞が未

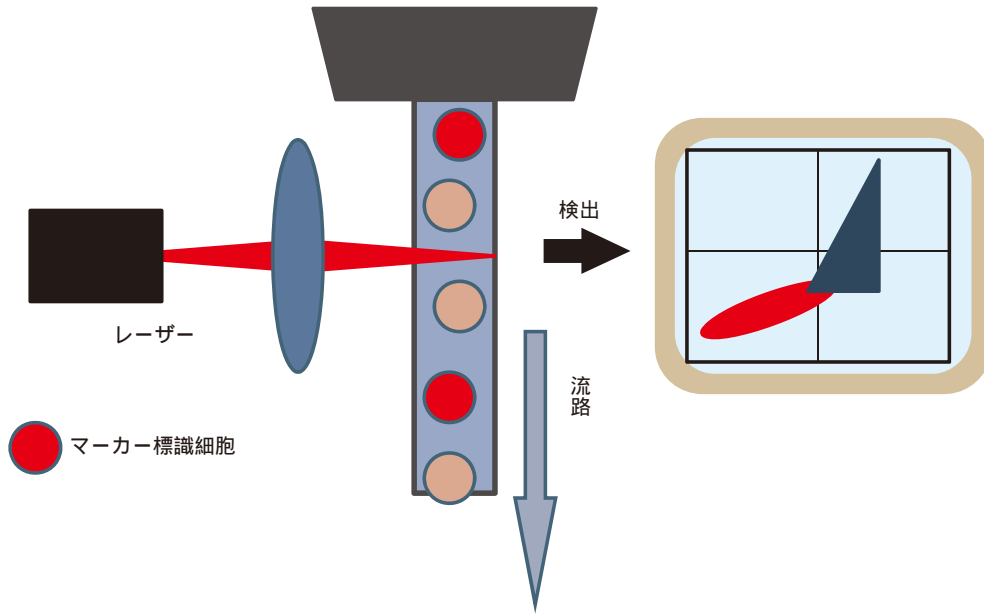


図 3 幹細胞の探索法.

フローサイトメトリー法は、フローサイトメーターを用いて行う幹細胞をはじめとする検出法で幹細胞特異的マーカーなど蛍光標識した個々の細胞を細い流路中で連続的に解析できる。幹細胞がわずかしこ存在しなくても蛍光標識してあれば高感度に検出でき、組織中に極少数しか存在しない幹細胞を個別に取り分けることもできる。

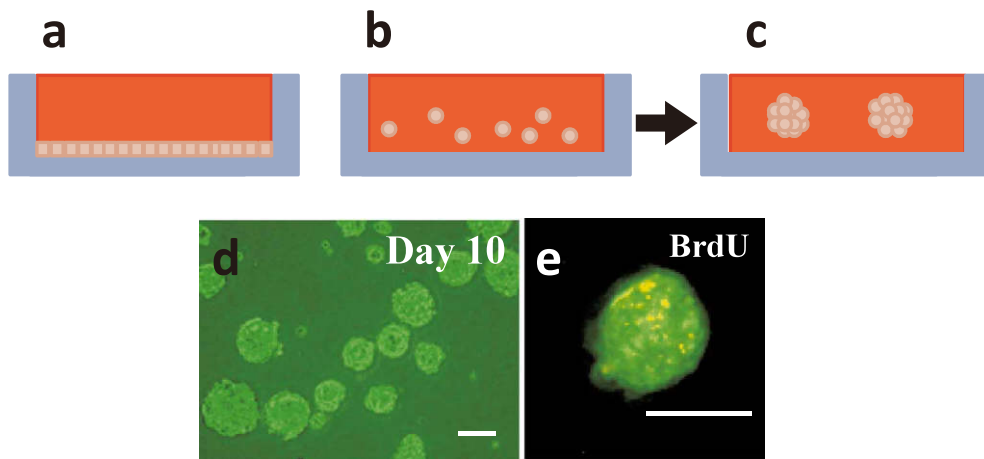


図 4 Sphere 法.

Sphere 法は本来培養皿などに付着しないと生育できない細胞(a)を浮遊した状態で培養することで(b)、生き残った単一幹細胞由来の細胞塊として得ることができる(c)。写真は成人から採取された角膜内皮前駆細胞(d)と DNA 複製の際に取り込まれる 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)を蛍光標識し増殖能の有無を評価したもの(e)。Bar = 100  $\mu$ m(d), 100  $\mu$ m(e)。

発見であるためこれら上皮シートに幹細胞が含まれ一生涯にわたって角膜透明性を維持できるかといった評価や、幹細胞を移植するリスクについてなど不明であった。

しかし、組織中にわずかしこ存在しないと考えられる幹細胞を単離するのは容易ではなく、大多数の細胞と少数の幹細胞を見分けるための目印が必要である。例えば間葉系幹細胞では hoechst 33342 色素の排出能が強い side population cell (SP 細胞)や CD 34 のように幹細胞に

発現する特徴や幹細胞マーカー (stem cell marker)がある程度判明しており、これらを目印にフローサイトメトリー (flow cytometry) を用いて分離する<sup>19)20)</sup>。フローサイトメトリーは細胞個々の特徴をカウントし、選別することが可能であるため、目印が判明している場合には威力を発揮する(図 3)。幹細胞マーカーを特定するためには、まず組織ごとに幹細胞の特徴やマーカーを推定する必要がある。生きた幹細胞をその後の研究や治療で用いるには有害な色素は使えず、マーカーも細胞表面に存在

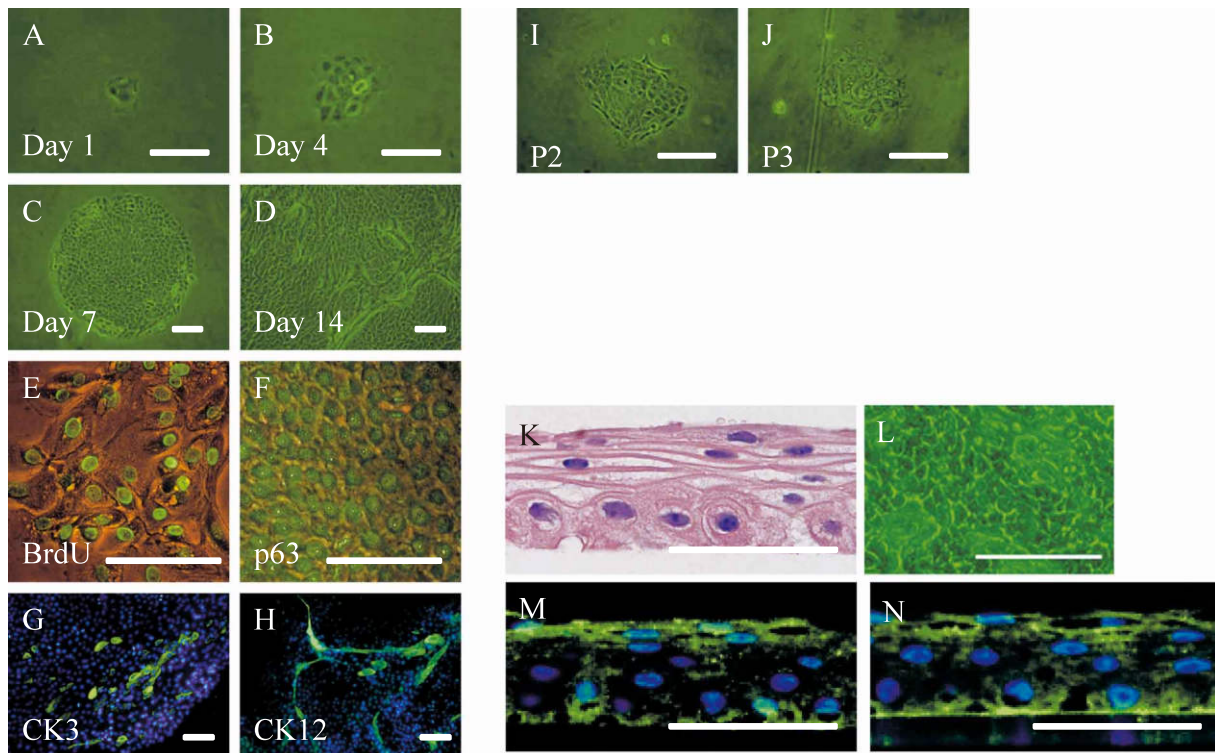


図 5 浮遊培養用培養皿で単離された角膜上皮幹細胞。

角膜輪部上皮には浮遊培養用培養皿に付着する高付着能細胞が存在する(A)。Epidermal growth factor (EGF)存在下で単一細胞由来コロニーを形成し(B, C), 2週間で重層化も目立つようになる(D)。コロニーはBrdUを用いて増殖能を評価したところ蛍光が観察できることから増殖能を有し(E), 基底層に発現するp63陽性の細胞で構成されている(F)。角膜上皮細胞分化マーカーとして知られるCytokeratin(CK)3, CK12はコロニー上に存在し, 角膜上皮細胞へ分化していることが分かる(G, H)。再複製能は単一細胞由来の細胞集団を再分散し同様の細胞集団を再形成し得るかで判断する。本研究では, 連続2回の再形成がみられ(I, J), 再複製能が備わっていることが判明した。分化能と再複製能の保持により幹細胞と判明した。また, 単一の角膜上皮幹細胞から角膜上皮組織を形成できる。写真はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色による断面図(K)と, 上方からの顕微鏡写真(L), およびCK3とCK12の免疫染色(M, N)。Bar=100 $\mu$ m (A~J), 50 $\mu$ m (K~N)。

(文献33より許可を得て転載, 一部改変)

する蛋白質の中から選ばなければならない。そしてフローサイトメーターなどの分析装置などで幹細胞と思われる細胞を採取する。採取した細胞が幹細胞であるか詳細に検討するが, 適切に増殖するとは限らないため培養法の検討も必要となる。そして採取した細胞が幹細胞でなければ研究は一からやり直しである。このように幹細胞単離の研究は莫大な研究資金を必要とし, 成功は保証されない。研究には多大なリスクと困難を伴う。

角膜上皮幹細胞の探索に寄与する, 間葉系幹細胞と同じ特徴が角膜上皮幹細胞にも存在するかもしれない。2004年にWatanabeらは間葉系幹細胞で用いられた手法であるフローサイトメトリーを角膜輪部上皮で検討し, 間葉系幹細胞の特徴とされるSP細胞が角膜輪部上皮中にも存在することを見出した。SP細胞の特徴であるATP結合カセット輸送体の一種であるABCG2が発現しており, 幹細胞マーカーとして注目された<sup>21)</sup>。また角膜輪部の発現蛋白質を詳細に検討し, 幹細胞の特徴を見極めるための研究も広く行われている。一部を挙げて

みても角膜上皮幹細胞のマーカー候補として, ABCG2の他にp63<sup>22)</sup>やNotch-1<sup>23)</sup>, Integrin  $\alpha$ 9<sup>24)</sup>, Cytokeratin 14, 15<sup>25)</sup>, N-cadherin<sup>26)</sup>, Importin 13<sup>27)</sup>など非常に多彩な検討がなされてきた。しかし採取したSP細胞は明確な増殖性を示さず<sup>28)</sup>, また幹細胞マーカーも決定的な発見が現在までなく, 近年角膜上皮幹細胞マーカーの探索研究は混沌としてきている。

## Ⅶ 選択培養法による探索研究と高付着能を有する角膜上皮幹細胞

このように努力が続けられている一方, 培養法の改良による幹細胞の単離も試みられてきた。間葉系幹細胞は実験動物に移植した骨髄細胞が脾臓に単一細胞由来の結節を生じたことで発見された<sup>4)5)</sup>。眼科分野ではPellegrianiらが結膜上皮コロニーを詳細に調査し, 結膜上皮幹細胞の杯細胞への分化能について報告している<sup>29)</sup>。他にSphere法によってなされた神経幹細胞の発見がある<sup>30)</sup>(図4)。眼科分野では我々によって2005年にSphere法

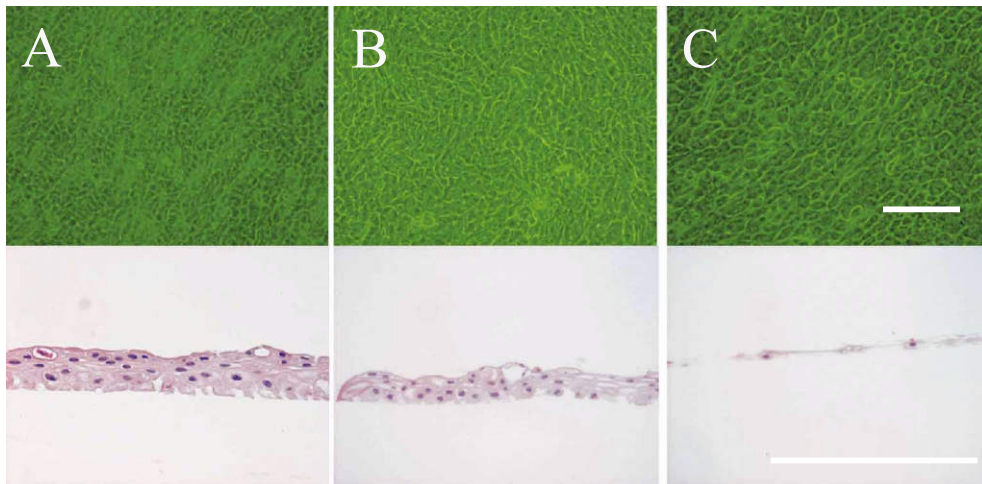


図 6 単一幹細胞由来角膜上皮シート。

コロニーごとの組織形成能には差異があり，最も細胞供給が優れているコロニーは全体の 26% であり，細胞形態も小さく 5~6 層に重層化した角膜上皮組織を形成する (A)．Bar : 200  $\mu$ m.

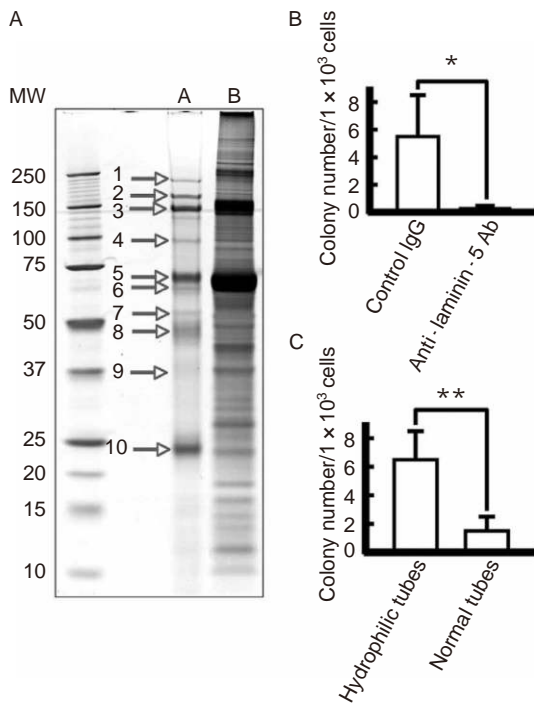


図 7 角膜上皮幹細胞の高付着能要因の探索。

幹細胞コロニーの細胞成分を蒸留水で破壊し，細胞外基質中の蛋白質を探索した結果，Laminin-5 が多く検出された (A)．検出蛋白質は，1 : Laminin  $\alpha$ 3b chain variant, 2 : Laminin-5, Laminin  $\alpha$ 3 chain precursor, 3 : Laminin-5  $\beta$ 3 chain, 4 : putative mitochondrial outer membrane protein import receptor, 5 : Albumin, 6 : Cytokeratin 5, 7 : Cytokeratin 14, 8 : Cytokeratin 19, 9 : unnamed protein product, 10 : Albumin. そこでブロッキング抗体とともに角膜輪部上皮を浮遊培養用培養皿に播種すると有意に付着細胞が減少することから (B, C), Laminin-5 が幹細胞の高付着能に大きく関与していると考えられる. \* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p = 0.018$ .

(文献 33 より許可を得て転載，一部改変)

を用いてヒトから角膜実質，角膜内皮の幹細胞などが相次いで発見された<sup>31)32)</sup>。

このような状況の下，我々は上皮細胞の付着・増殖が不可能と考えられてきた浮遊培養用培養皿に付着，増殖できる高付着能を有する角膜輪部上皮細胞が極少数存在することや，遠心管壁面に付着し遠心操作でも回収できない細胞の存在に気がついた．そこで我々は遠心管やチップなどの培養基材に蛋白質が吸着しないコーティングを施したところ細胞の回収率が上がり，浮遊培養用培養皿に付着する細胞も増加した。

これら高付着能は幹細胞の新たな特徴ではないかと考え，前述の B-27 supplement と EGF を添加した無血清培養液を用いて浮遊培養用培養皿表面上で高付着能細胞の単離と付着培養を行い幹細胞であるか評価を行った．角膜上皮の高付着能細胞は活発な増殖能をもち単一細胞由来のコロニーを生成し，幹細胞の特徴の一つである再複製能を有しており，発現蛋白質を免疫染色法にて調べると角膜上皮マーカーである Cytokeratin 3, 12 の他，基底細胞層に発現がみられる p63 の発現がみられた．さらに 3 週間ほど培養を続けると角膜全面を覆うほどの角膜上皮組織が作製できることが判明した．断面をみると 5~6 層の角膜上皮組織を形成できる組織形成能が備わっており，単一細胞から角膜上皮組織をも形成できる能力をもつ角膜上皮幹細胞と判断した (図 5)．ただし，この組織形成能はコロニーによって差があるようで，5~6 層に重層化する低分化な細胞と，3~4 層にしか重層化できない中分化の細胞，さらに 1~2 層にしかならず重層化困難な高分化な細胞と三種類に分けられる<sup>33)</sup>．この増殖能の差は Pellegrini らが報告した結膜上皮幹細胞と酷似している<sup>29)</sup> (図 6)．角膜上皮幹細胞の高付着能の原因蛋白質を突き止めるべく，幹細胞コロニーを蒸留水で破壊し培養皿に付着している蛋白質を分析したとこ

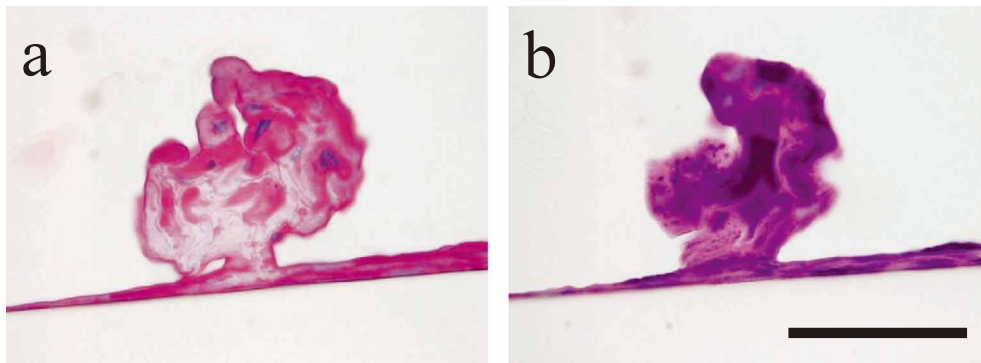


図 8 角膜上皮幹細胞の杯細胞への分化。

EGF 存在下では高付着能細胞は角膜上皮細胞になるが、basic fibroblast growth factor (bFGF) 存在下では杯細胞へ分化する。写真は bFGF 存在下杯細胞へ分化したコロニーの断面 HE 染色(a)と PAS 染色(b)。Bar : 50  $\mu$ m.

(文献 34 より許可を得て転載, 改変)

ろラミニン-5 (Laminin-5 : LN-5) が候補として挙がったため、ブロッキング抗体を用いて角膜輪部上皮細胞の LN-5 の機能を封じたところ浮遊培養用培養皿への付着を阻害したことから、角膜上皮幹細胞の高付着能は LN-5 が寄与する部分が大いと考えられる (図 7)。

### VIII おわりに

ほとんどの幹細胞の特徴は間葉系幹細胞で調べられており、多くの研究手法が先行しているこれらの研究の焼き直しに過ぎない。角膜上皮幹細胞の研究から高付着能という特性が新たに見つかり、今度は逆に他の組織での幹細胞研究へ応用できる可能性がある。また角膜上皮幹細胞が、単一分化性の前駆細胞か、他の種類の細胞へ分化する多分化性をもつ幹細胞であるかは今後の報告で明らかになるだろう。少なくとも角膜上皮幹細胞は bFGF 存在下で杯細胞へ分化する可能性を見出し、多分化性をもった体性幹細胞である可能性が高い<sup>34)</sup> (図 8)。また、これら幹細胞の特徴と培養法の研究の進歩により角膜上皮幹細胞マーカーの探索も容易になると考えられる。そうなれば幹細胞の増幅を評価でき、より効率がよく安全性が高い培養法の開発や創傷治癒機構の解明に大きく前進すると考えられる。

稿を終えるにあたり、受賞講演の機会を与您いただきました学術奨励賞選考委員各位、第 114 回日本眼科学会総会長の寺崎浩子教授に心より感謝申し上げます。幹細胞の高収率採取のきっかけは共同研究者の小野恭子先生が遠心管に付着した細胞を発見したことによります。内田彩子先生には低付着コーティングの方法などを教えていただきました。また山上 聡准教授には実験や研究指導を賜り感謝申し上げます。本受賞のきっかけとなった一連の研究は自由な発想を生み出すための自由な研究環境があって可能となりました。天野史郎准教授や新家 眞教授をはじめ東京大学眼科学教室の先生方が長年かけて築き上げてこられた研究環境がなければ本研

究は成し得ませんでした。心より御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) **Evans MJ, Kaufman MH** : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 : 154—156, 1981.
- 2) **Takahashi K, Yamanaka S** : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663—676, 2006.
- 3) **Lavker RM, Sun TT** : Epidermal stem cells. *Invest Dermatol* 81 : 121—127, 1983.
- 4) **Becker AJ, McCulloch EA, Till JE** : Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197 : 452—454, 1963.
- 5) **Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE** : The distribution of colony-forming cells. Among spleen colonies. *J Cell Physiol* 62 : 327—336, 1963.
- 6) **Schofield R** : The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4 : 7—25, 1978.
- 7) **Davanger M, Evensen A** : Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 229 : 560—561, 1971.
- 8) **Buck RC** : Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 : 1296—1299, 1985.
- 9) **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.
- 10) **Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker 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.
- 11) **Kenyon KR, Tseng SC** : Limbal autograft trans-

- plantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96 : 709—722, 1989.
- 12) **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.
  - 13) **Tsai RJ, Li LM, Chen JK** : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 343 : 86—93, 2000.
  - 14) **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.
  - 15) **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.
  - 16) **Notara M, Haddow DB, MacNeil S, Daniels JT** : A xenobiotic-free culture system for human limbal epithelial stem cells. *Regen Med* 2 : 919—927, 2007.
  - 17) **Sugiyama H, Maeda K, Yamato M, Hayashi R, Soma T, Hayashida Y, et al** : Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2 : 445—449, 2008.
  - 18) **Yokoo S, Yamagami S, Usui T, Amano S, Araie M** : Human corneal epithelial equivalents for ocular surface reconstruction in a complete serum-free culture system without unknown factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 2438—2443, 2008.
  - 19) **Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC** : Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 183 : 1797—1806, 1996.
  - 20) **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al** : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143—147, 1999.
  - 21) **Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, et al** : Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett* 565 : 6—10, 2004.
  - 22) **Ponzin D, McKeon F, De Luca M** : p 63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 3156—3161, 2001.
  - 23) **Thomas PB, Liu YH, Zhuang FF, Selvam S, Song SW, Smith RE, et al** : Identification of Notch-1 expression in the limbal basal epithelium. *Mol Vis* 13 : 337—344, 2007.
  - 24) **Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ** : Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* 22 : 355—366, 2004.
  - 25) **Figueira EC, Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D** : The phenotype of limbal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 144—156, 2007.
  - 26) **Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, Sumide T, Yang J, Okano T, et al** : N-Cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 25 : 289—296, 2006.
  - 27) **Wang H, Tao T, Tang J, Mao YH, Li W, Peng J, et al** : Importin 13 serves as a potential marker for corneal epithelial progenitor cells. *Stem Cells* 27 : 2516—2526, 2009.
  - 28) **Umemoto T, Yamato M, Nishida K, Yang J, Tano Y, Okano T** : Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state. *Stem Cells* 24 : 86—94, 2006.
  - 29) **Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, et al** : Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 145 : 769—782, 1999.
  - 30) **Reynolds BA, Weiss S** : Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255 : 1707—1710, 1992.
  - 31) **Uchida S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Yokota C, Mimura T, et al** : Sphere formation and expression of neural proteins by human corneal stromal cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1620—1625, 2005.
  - 32) **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.
  - 33) **Yokoo S, Yamagami S, Shimada T, Usui T, Sato TA, Amano S, et al** : A novel isolation technique of progenitor cells in human corneal epithelium using non-tissue culture dishes. *Stem Cells* 26 : 1743—1748, 2008.
  - 34) **横尾誠一, 山上 聡** : ヒト角膜の組織幹細胞採取と臨床応用. *細胞工学* 26 : 532—537, 2007.