

平成 22 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

より質の高いヒト角膜培養上皮シート作製方法の開発

川北 哲也

慶應義塾大学医学部眼科学教室

要 約

これまで角膜上皮幹細胞のニッチとしては、実質細胞、あるいは液性因子がクローズアップされていたが、上皮の中に細胞塊を形成しており、上皮細胞自身も幹細胞のニッチとなっている可能性があると考えた。角膜輪部組織から角膜上皮細胞を分離する過程において、この細胞塊を壊さない程度に酵素処理して培養上皮シートを作製する方法が、角膜上皮幹細胞を維持する可能性がある、との仮説をもとにこの研究を行った。上皮シートを作製する細胞源としては、①細胞の塊をすべて酵素処理により崩しバラバラにしてから用いる、②輪部組織を直接培養皿に静置し組織から伸展してくる上皮細胞を用いる、の2つが現在一般的に用いられている培養方法である。

①については、上皮基底細胞の増殖性を活かした培養方法であり早期に上皮シートを作製できる反面、シートにどのくらいの未分化細胞が維持されているか、はっきりしない。②については、①よりも生理的な上皮細胞の増殖を疑似しているが、増殖スピードが遅く、組織によっては上皮が伸展してこないこともあり、安定した上皮シート作製という面から問題となる。本総説論文では、上皮幹細胞のニッチをある程度維持したまま、培養上皮細胞シートを作製する(①、②の利点を活かした)方法を概説する。(日眼会誌 115 : 1007—1014, 2011)

キーワード：角膜上皮，幹細胞，p63，再生医療

A Review

Improvement in the Method of Cultivated Corneal Epithelial Sheet Generation

Tetsuya Kawakita

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

Abstract

Stromal cells and/or soluble factors such as growth factors have been considered until now as the main niche of corneal epithelial stem cells. We found that cultivated epithelial cells had epithelial clusters when cultured, maintaining the sheet structure. Therefore, we hypothesized that the epithelial cells themselves might be a niche of the stem cells, and the cell clusters could be maintained during the gentle enzymatic digestion of the limbal epithelial sheets. The main methods of generating cultivated limbal epithelial sheet for clinical application are, the cell suspension method (complete enzymatic digestion of limbal epithelia), and the explant method (cells grown from limbal explants). For cell suspension, it is good to expand cells and generating sheets quickly, but it is not clear whether these sheets maintain the normal homeostatic levels of the progenitor cells. Explants maintain homeostatic levels more similar to *in vivo*

homeostasis, but the low proliferative speed of epithelial expansion and reproducibility are the problem. In this review, we hypothesize that to generate cultivated epithelial sheets while maintaining a corneal epithelial stem cells' niche is a better way to proceed as it includes the advantages of both the cell suspension and explant methods. The growth potential, colony-forming efficiency of p63-positive cell clusters, and immunostaining by differentiation/undifferentiation markers, demonstrated that progenitor cells could be maintained by these gentle enzymatic digestion maintaining cell clusters. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 115 : 1007—1014, 2011)

Key words : Corneal epithelium, Stem cells, p63, Regenerative medicine

別刷請求先：160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 川北 哲也

(平成 23 年 4 月 1 日受付，平成 23 年 6 月 8 日改訂受理) E-mail : kawakita@a2.keio.jp

Reprint requests to : Tetsuya Kawakita, M.D., Ph.D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received April 1, 2011 and accepted in revised form June 8, 2011)

I はじめに

角膜上皮細胞は角膜の最も外側にある 5~7 層の細胞

表 1 培養上皮シートの細胞ソースの特徴

細胞ソース	拒絶反応	細胞数	血管侵入	透明性
自己輪部上皮	○	×	○	○
自己結膜上皮	○	○	不明	不明
自己口腔粘膜上皮	○	○	×	×
他家輪部上皮	×	○	○	○

○：利点, ×：欠点.

表 2 主な培養条件の比較

培養条件	バリエーション
1. 血清	ウシ血清, 自己血清, 無血清
2. フィーダー細胞	3T3 細胞, 間葉系幹細胞, 自己脂肪細胞
3. 基質	羊膜, フィブリン, 無
4. Air-lifting	有, 無

層であり, 角膜の実質, 内皮と比較しても最も高いバリア機能を持ち, 細菌の侵入, 有害物質の拡散などを防ぐ防壁となっている. また角膜上皮表面に水分を保持し, 涙液層をつくることにより眼光学的に視機能を維持する意味でも重要な役割を持っている. この角膜上皮細胞は, ターンオーバーが速い細胞で, 外傷により角膜上皮層が一部傷害を受けても, 数日で創傷治癒するのは周知のとおりである. 臨床的には, 角膜と結膜の境界部分である角膜輪部が全周にわたり, 上皮基底細胞レベルの深さまで傷害を受けると(角膜輪部機能不全), 角膜上皮は再生せず, 血管を伴った結膜上皮が角膜上に侵入するか, 遷延性角膜上皮欠損になることが知られている. このことから, 角膜輪部の上皮基底細胞層に角膜上皮の幹細胞が存在すると推測されている. この角膜輪部機能不全の原因疾患としては, アルカリ眼外傷, 熱傷といった外傷, Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡, といった自己免疫性疾患が多い.

こういった輪部機能不全に対する治療法としては, 角

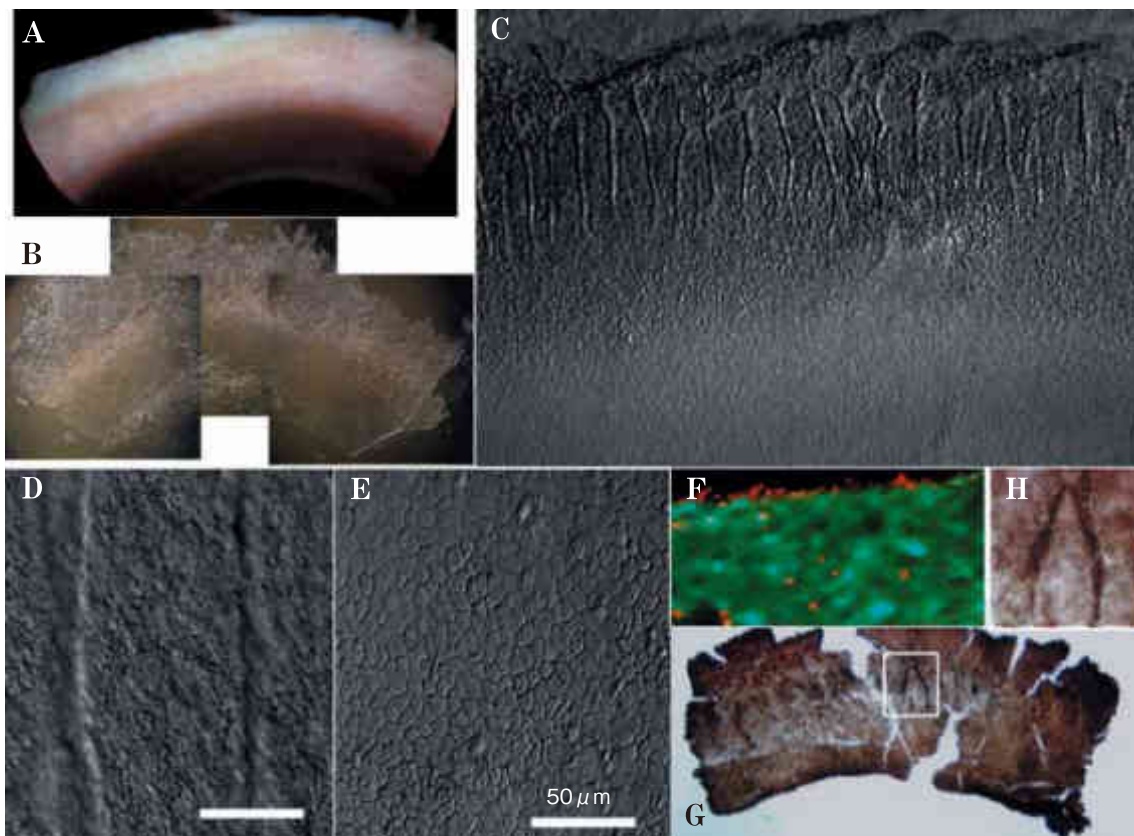


図 1 ヒト角膜輪部上皮シートの分離と p63 陽性細胞の分布.

角膜移植後の余剰強角膜を 1/4 に切除し(A), 角膜輪部上皮シートを酵素処理(Dispase II)によって, その構造を維持したまま分離した(B). そのうち 1/4 をナイフで切除し(すなわち全体の 1/16), プラスチック培養皿に静置し観察すると(C), 酵素処理前に色素を帯びた輪部上皮(A)は酵素処理後も維持されており複雑な皺状構造を palisades of Vogt (POV) の場所に示していた(B, C). その輪部基底層では細胞サイズが小さい一方(D), 周辺部角膜では平たく, サイズが大きかった(C, E). 分離された角膜上皮シートの細胞はほとんどが生細胞であり(緑), ナイフで切除した部分に死細胞(赤)が多く観察された(F). 免疫染色では p63-陽性細胞は輪部のあたりに多く存在していた(G, H は G の拡大図). スケールバーは 50 μm を示す.

(文献 15 より許可を得て転載)

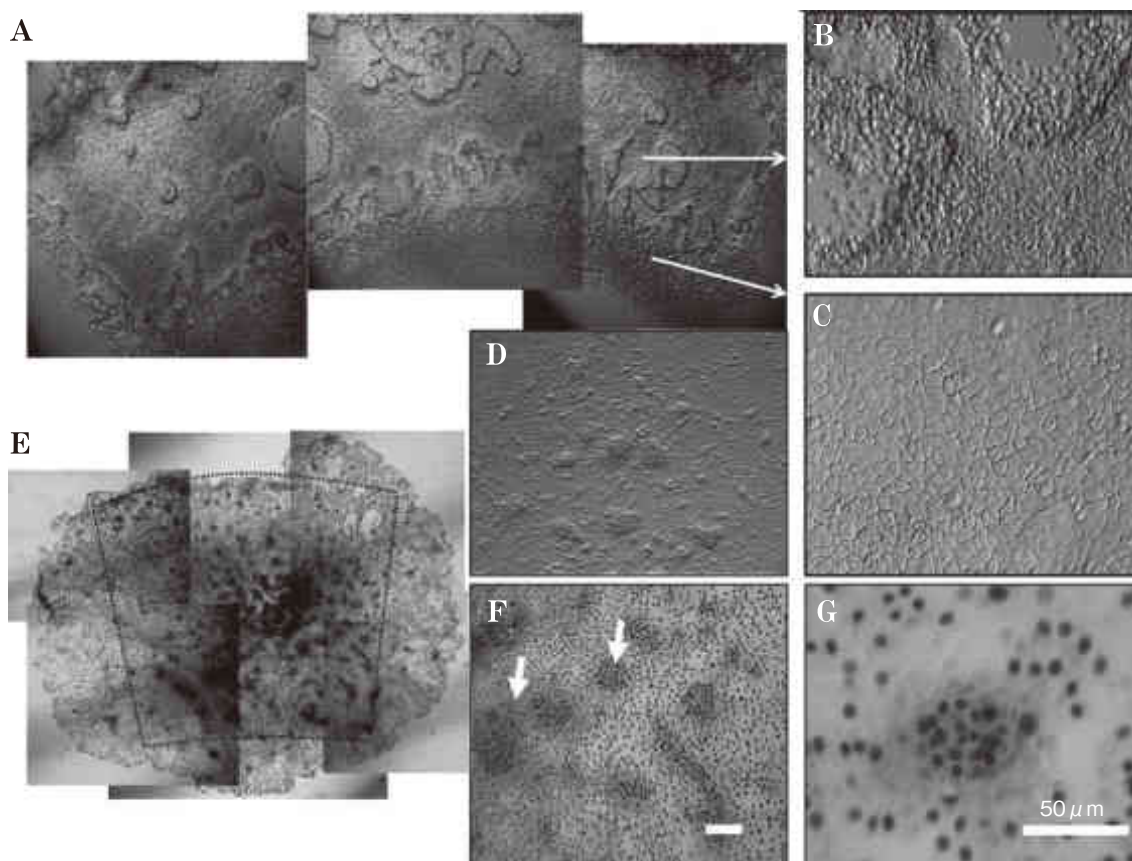


図 2 ヒト角膜輪部上皮シートでの p63 陽性細胞塊の分布.

酵素処理によって分離した角膜上皮シートを培養皿上で 48 時間、培養液 (SHEM) で培養すると、ほとんどの表層細胞は接着することができず、単一層の上皮シートに細胞塊が点在していた (A)。またそれらの細胞塊は主に輪部の POV に相当する部位に点在していた (B)。その一方で周辺部角膜に相当する部位では細胞塊を認めず、細胞サイズも大きかった (C)。その細胞塊をさらに 48 時間培養すると、それらの細胞塊は小円形のさらにまとまった細胞集団となった (D)。免疫染色の結果では、それらの培養後の細胞塊は細胞サイズの小さい、p63 強陽性の細胞で構成されていた (E~G；矢印 F)。スケールバーは 50 μm を示す。

(文献 15 より許可を得て転載)

膜輪部移植、培養角膜上皮移植、培養口腔粘膜上皮移植、と再生医療の先駆けとなるさまざまな手術方法があるが、これらは日本の研究グループから発表されてきた。角膜輪部移植は、幹細胞移植の概念としてはじめて眼に応用されたケース¹⁾であり、それまでは角膜移植の禁忌とされていた輪部機能不全に対する治療として、脚光を浴びた。その後も、輪部組織を羊膜上に静置して器官培養することにより上皮シートを作製し移植する方法²⁾、輪部組織から上皮を分離して培養する方法³⁾、口腔粘膜を細胞ソースに用いる方法⁴⁾、基質を用いずに培養、移植する方法⁵⁾、一細胞からの角膜上皮シート作製⁶⁾など、次々と新しい角膜再生医療の研究進歩が報告される中で、日本では世界でも注目されるような研究、臨床応用を多数報告してきている。

こういった再生医療研究を担う基盤技術の中で、最も重要な要素の一つに、培養条件の選定がある。マウスが、飲み水をいつもと変えるだけで研究の結果に重大な影響を及ぼすことがあるように、細胞においても、その培地

や培養条件が少し変化するだけで重大な影響を及ぼすことがある。培養細胞は、通常の生体内のホメオスタシスから、生体外でまったく別の環境に置かれているわけであり、それはかなりのストレスとなるはずである。我々は、角膜上皮細胞のオリジナルな構造を維持しつつ、培養することがニッチの維持につながり、幹細胞培養に適している、と仮説し、角膜輪部上皮シートの培養を最初に行った。その際、培養過程の中で細胞塊が上皮シートの輪部付近にできてくることを発見した。この細胞塊に含まれる細胞が重要であることを示すため、本研究を行った。本稿では、角膜上皮細胞培養のレビューとともにその研究について概説する。

II 角膜上皮再生医療の細胞ソースと培養方法

角膜上皮細胞培養は、1970 年代の Green らのグループによる 3T3 フィーダー細胞の研究⁷⁻⁹⁾により進んだ皮膚ケラチノサイトの培養方法の進歩から多大な恩恵を受けてきた。近年飛躍的に、その培養技術、質の高い上皮

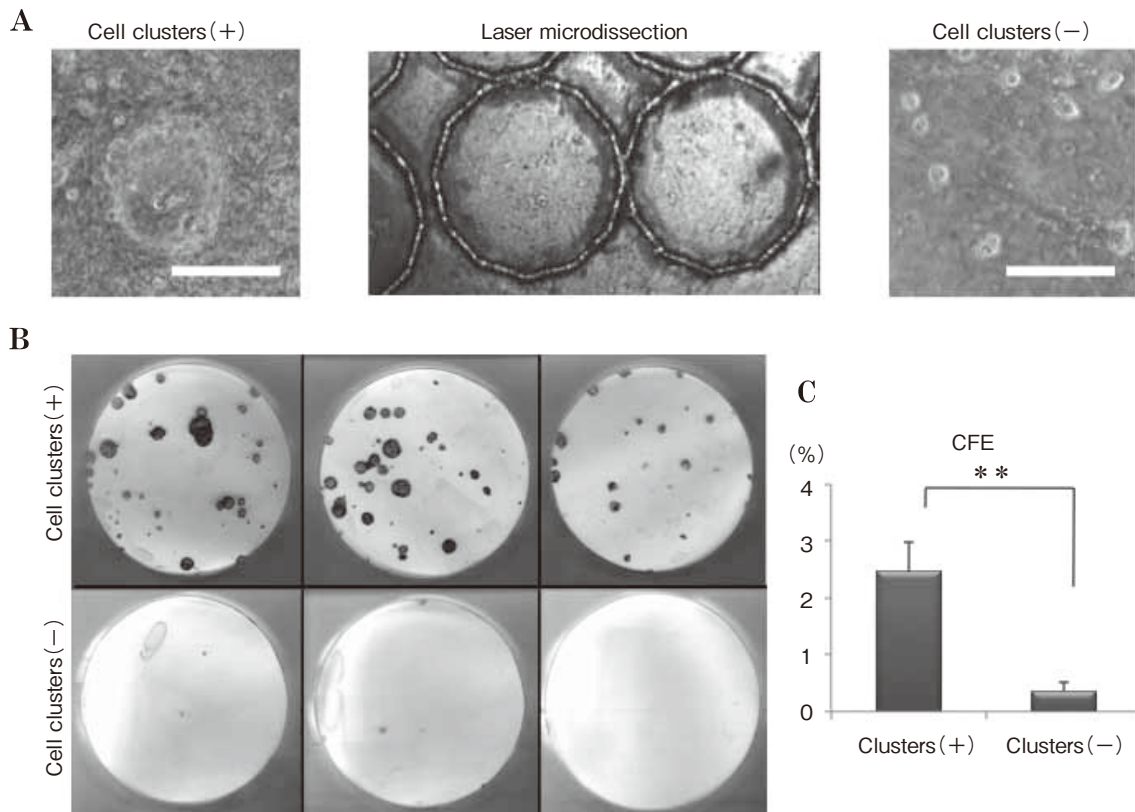


図 3 p63 陽性細胞塊のより高いコロニー形成能.

酵素処理によって分離した角膜上皮シートを培養皿上で 48 時間, SEM で培養し(図 2), p63 陽性細胞塊のある部分[cell clusters(+)]とない部分[cell clusters(-)]から細胞を, レーザーマイクロダイセクターを用いて分離した(A). その分離した細胞は trypsin/EDTA で単細胞にし, 3T3 細胞の上に 14 日間培養した. p63 陽性細胞塊のある部分では, より大きな(B), また数の多いコロニーが観察された(C, **: $p < 0.01$). CFE: colony forming efficiency. スケールバーは 50 μm を示す.

(文献 15 より許可を得て転載)

シートの作製技術が発展してきており, 現在, 臨床でも日本において数多くの培養上皮移植が行われている. その角膜上皮再生医療に用いる細胞ソースには, 表 1 に示したように自己角膜輪部上皮, 結膜上皮, 口腔粘膜上皮と他家角膜輪部上皮の 4 つが報告されているが, 自己結膜上皮移植についてはまだあまり臨床報告がない. ここに示すように細胞ソースによる差は, その量(手術により切除しても障害を生じない程度の量, 再採取できるか)と, 質(シート形成したときの透明性, 移植後の血管侵入など)である. 角膜上皮たりうるには, 透明であり血管侵入がなく, 角膜表面がスムーズなことが重要であるが, 培養移植の適応となる症例はいずれもそのすべてが侵されていることが多い. もちろん, 片眼性疾患の場合, 僚眼の角膜輪部を細胞ソースに用いることが最もリスクが少なく, 利点を活かせる方法である. しかし, アルカリ眼外傷や Stevens-Johnson 症候群といった原因疾患が多い輪部機能不全は両眼性のことも多く, またその結膜上皮も炎症による瞼球癒着を起こしたりして正常でないケースも多い. その場合, 自己口腔粘膜上皮, もしくは他家輪部上皮を細胞ソースとすることとなる.

細胞ソースが決まれば, 上皮細胞の分離が次のポイントとなる. シート状に上皮を分離した後, そのままの形で組織培養のように上皮シートを培養するのか, 酵素処理により単細胞化して培養するのかにより細胞増殖のスピードや細胞分化の状態は違ってくることを後に示す. その他に, 近年の報告では上皮をシート状に剝離しただけでは, 上皮幹細胞をあまり採取できなという報告もあり, 注意が必要である.

次に培養方法が重要である. 細胞ソースにより培養方法を変えるわけではなく, 角膜上皮細胞培養で実績のある方法を用いることが多い. 表 2 に, 現在の培養条件のバリエーションを示す. 現在でも 3T3 細胞を用い, ウシ胎仔血清を培地に入れ, 基質に基底膜成分や羊膜を用い, air-lifting をして分化させるここ 10 年来施行されている培養方法が主流である. しかし, 安全性の観点から他種細胞をフィーダーとして用いず, 動物血清も培地に入れずに, 組成の分かる因子のみで構成された培地で培養上皮シートを作製することが望ましい. そのため, 同種, あるいは自己フィーダー細胞を用いたり, 自己血清, あるいは無血清での培地を用いたりさまざまな工夫が

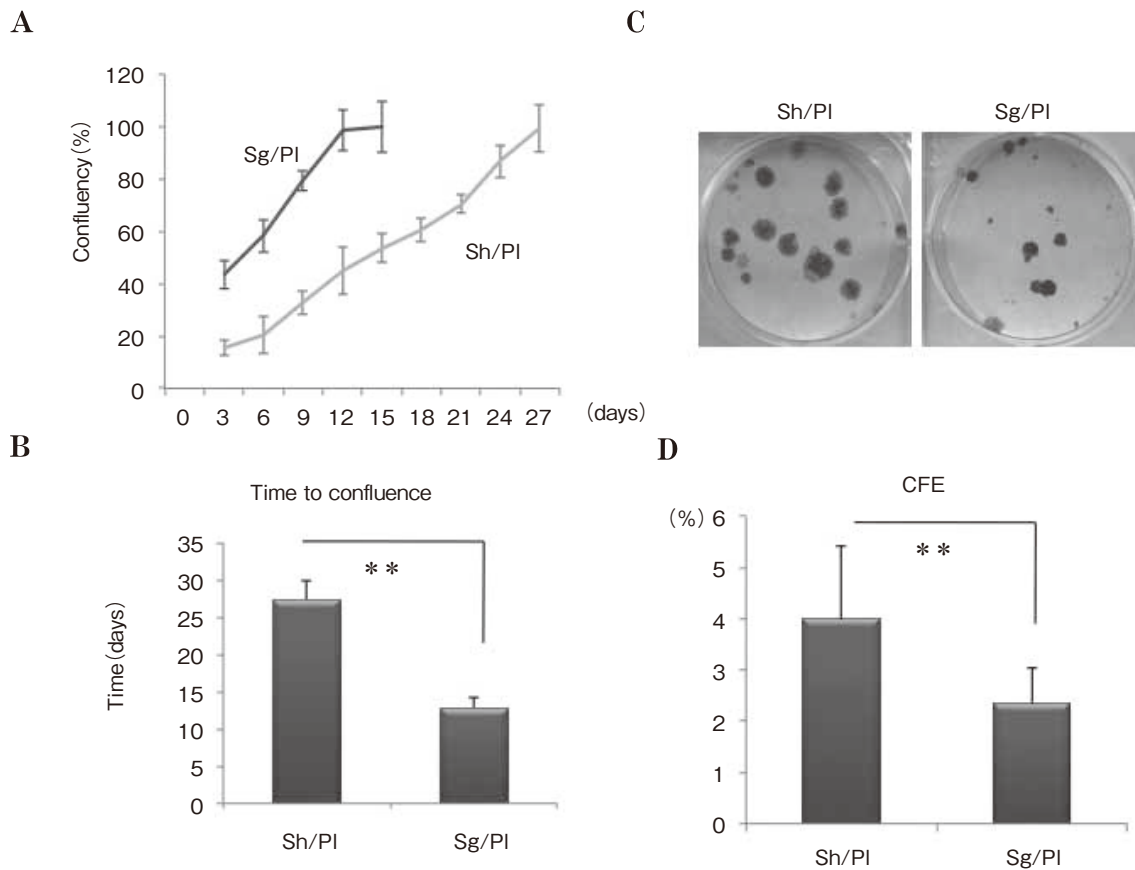


図 4 シートとシングルセルでのコロニー形成能の比較.

酵素処理によって分離した角膜上皮シートは、trypsin/EDTA で処理する条件(Sg/PI: 単一細胞化)、しない条件(Sh/PI: シートのまま)で 27 日間、SHEM で培養した。上皮の伸展は、培養皿状に占める細胞の面積で測定すると、単一細胞化したほうが、シートからよりも、より広範囲に(A)、またより速く増加した(B, **: $p < 0.01$)。また上記 2 条件から同じ数の細胞を 3T3 細胞上に撒くと、シートからのコロニーがより大きく(C)、コロニー形成能も有意に高かった(D) (**: $p < 0.01$)。

(文献 15 より許可を得て転載)

なされ、今日も細胞培養の技術革新がどこかで行われている。今後は、効率良く細胞を採取し、増殖能を維持した細胞を増やし、均一な上皮細胞シートを作製するため、プロセスのばらつきをなくしていく必要もある。

III 角膜上皮幹細胞マーカー

角膜上皮幹細胞のみが持つ真のマーカーは何なのか、それはずっと探されているが、いまだ誰も完全には証明できていない。分化マーカー、いわゆる角膜上皮のマーカーとしてはサイトケラチン 3(K3)やサイトケラチン 12(K12)が真っ先に挙げられ、他の上皮との区別に頻用されている。その他にもバリア機能や扁平上皮化といった機能、形態からさまざまな分化マーカーが存在する。一方、上皮系の未分化マーカーとしては、p63(重層化する能力のある上皮基底細胞のマーカー)などが挙げられる^{10,11)}。p63 の正常角膜での染色パターンを観察すると、中央部の角膜基底細胞もしっかり染色されており、未分化細胞のマーカーではない、と否定している報告も散見する。しかし重層化する能力のある上皮基底細胞のマ-

ーカーであり、その遺伝子をノックアウトすると、正常な上皮形成ができないことから上皮細胞の正常分化においてとても重要な役割を果たし¹²⁾、重層化、増殖能を持つ(今増殖している、ではない)細胞に発現すること¹³⁾は間違いない。どんなマーカーであれ、生体内、すなわち組織での染色と、生体外、すなわち培養細胞での染色パターンは必ずしも一致しない。p63 と幹細胞についての研究を続けている Pellegrini らは、p63 の isoform の発現パターンを詳細に観察し、上皮幹細胞のマーカーとして説明できるとしている¹⁴⁾。生体外で角膜上皮細胞をある程度培養しても発現が認められ、増殖能やコロニー形成能に優れる細胞を示すマーカーがあれば、臨床にも有用であろう。現時点では p63 の角膜基底細胞での発現について、報告されている論文は数多く存在し、論文間で発現パターンも類似していることから、再現性の意味でも信頼できる増殖能をもつ基底細胞(幹細胞を含む細胞群)のマーカーであると考えられる。

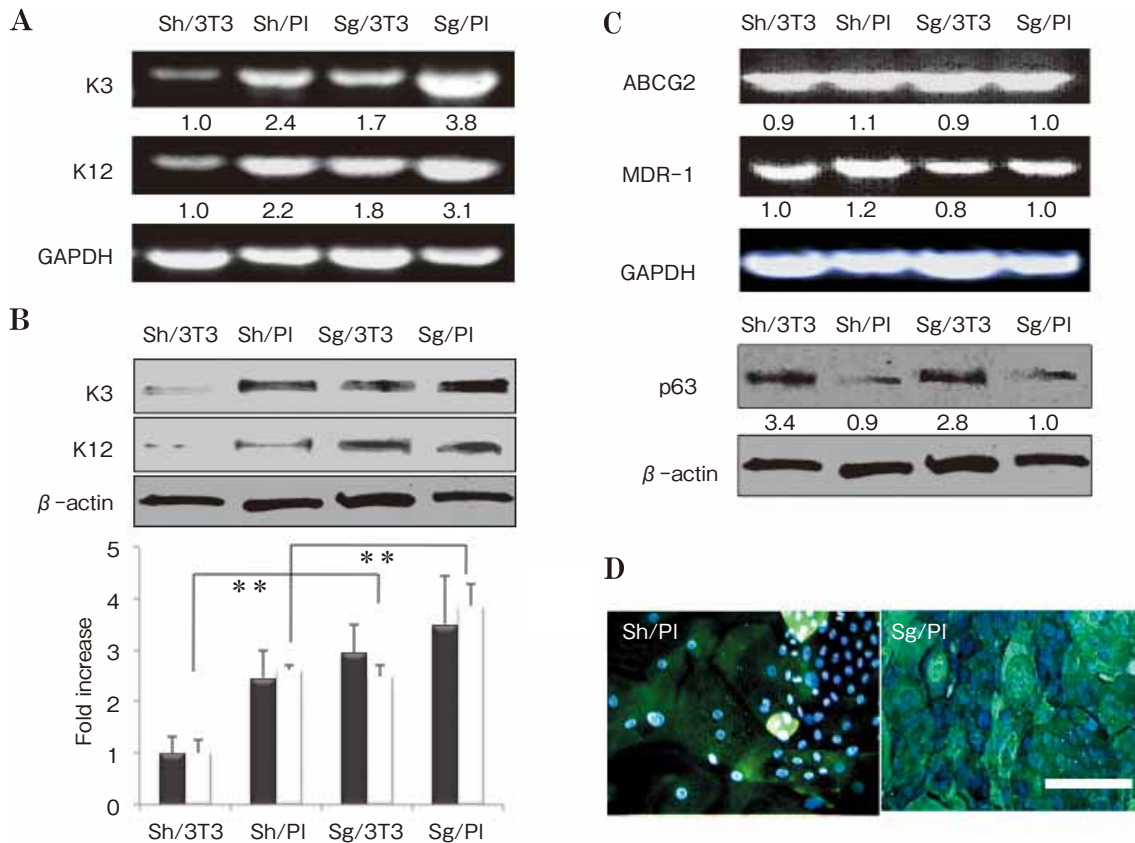


図 5 分化・未分化細胞マーカーの発現。

Reverse transcription polymerase chain reaction では、分化マーカーである K3 と K12 の RNA 発現がシートから 3T3 細胞上に伸展させた細胞で最も低かった (Sh/3T3) (A)。ウエスタンブロッティングの結果でも、K3 と K12 の蛋白質レベルでの発現は Sh/3T3 で最も低かった (B, ■: K3, □: K12, **: $p < 0.01$)。ABCG2 や MDR-1 の発現は 4 条件下で差はなかったが、p63 の発現亢進は、シートでも単一細胞でも 3T3 細胞による影響が大きかった (C)。K3 の免疫染色は培養皿上のシート (Sh/PI) ではところどころ陽性であったが、培養皿上の単一細胞 (Sg/PI) ではほぼすべての細胞が陽性を示した (D)。スケールバーは 50 μm を示す。(文献 15 より許可を得て転載)

IV 角膜上皮細胞塊を維持した培養

角膜上皮細胞塊についての我々の研究を概説する¹⁵⁾。アメリカのフロリダ州アイ・バンクより提供されたドナー角膜の角膜移植後の余剰強角膜を 1/4 に切除し (図 1 A)、角膜輪部上皮シートを酵素処理 (Dispase II) によって、その構造を維持したまま分離した¹⁶⁾ (図 1 B)。そのうち 1/4 をナイフで切除した後 (すなわち全体の 1/16)、プラスチック培養皿に静置し観察すると (図 1 C)、酵素処理前に色素を帯びた輪部上皮 (図 1 A) は酵素処理後も維持されており複雑な皺状構造を、もともと palisades of Vogt (POV) が存在していた場所に観察できた (図 1 B, C)。また免疫染色では p63-陽性細胞は輪部のあたりに多く存在していた (図 1 G, H に G の拡大図を示す)。その酵素処理によって分離した角膜上皮シートを培養皿上で 48 時間、培養液 (SHEM) で培養すると、ほとんどの表層細胞は接着することができず、単一層の上皮シートに細胞塊が点在し、またそれらの細胞塊は主に輪部の POV に相当する部位に点在していた (図 2 A,

B)。その細胞塊をさらに 48 時間培養すると、それらの細胞塊は小円形のさらにまとまった細胞集団となった (図 2 D)。免疫染色の結果では、それらの培養後の細胞塊は細胞サイズの小さい、p63 強陽性の細胞で構成されていた (図 2 E~G; 矢印 F)。この p63 陽性細胞塊のある部分とない部分から細胞をレーザーマイクロダイセクターを用いて分離し (図 3 A)、trypsin/EDTA で単細胞にし、3T3 細胞の上に 14 日間培養すると、p63 陽性細胞塊のある部分では、より大きな (図 3 B)、また数の多いコロニーが観察された (図 3 C, $p < 0.01$)。

また角膜上皮シートは、trypsin/EDTA で処理する (単一細胞化)、しない (シートのまま) の各条件で 27 日間、SHEM で培養すると、単一細胞化したほうが、シートからよりも、より広範囲に (図 4 A)、またより速く上皮が伸展した (図 4 B, $p < 0.01$)。また 3T3 細胞上に撒くとシートからのコロニーがより大きく (図 4 C)、コロニー形成能も有意に高かった (図 4 D, $p < 0.01$)。すなわち、上皮伸展速度はシートでは遅いが、未分化細胞をより維持していた。細胞塊を維持する程度の酵素処理で

あれば、未分化能をある程度維持したまま培養できる可能性が示唆された。分化・未分化細胞マーカーの発現パターンでは、分化マーカーである K3 と K12 の RNA 発現がシートから 3T3 細胞上に伸展させた細胞(Sh/3T3)で最も低かった(図 5 A)。ウエスタンブロッティングの結果でも、K3 と K12 の蛋白質レベルでの発現は同条件で最も低かった(図 5 B, $p < 0.01$)。ABCG2 や MDR-1 の発現は 4 条件で差はなかったが、p63 の発現亢進は、シートでも単一細胞でも 3T3 細胞による影響が大きく、3T3 細胞は上皮の未分化性に関与している可能性が高い(図 5 C)。K3 の免疫染色は培養皿上のシート(Sh/Pl)ではところどころ陽性であったが、培養皿上の単一細胞(Sg/Pl)ではほぼすべての細胞が陽性を示した(図 5 D)。

V 臨床における意義と今後の展望

こういった培養技術の他、上皮細胞培養から臨床応用をもたらしたもう一つの大きな発見は、胎盤組織の羊膜の眼科領域への応用であろう¹⁷⁾。いまや羊膜は角膜上皮培養の足場として、あるいは抗炎症、上皮化促進、新生血管抑制、増殖組織の瘢痕化抑制などを目的として角結膜手術で頻用されている。この羊膜は角膜上皮幹細胞のニッチとしても働くと考えられており、上皮細胞の接着、遊走を促す IV 型、V 型コラーゲンとラミニンを含み、抗炎症作用もあるため¹⁸⁾、培養角膜上皮細胞移植の基質にも用いられている¹⁹⁾。また、羊膜そのものは胎盤由来であるために、免疫原性が低く、拒絶反応が少ないことも利点である。羊膜中に含まれるさまざまな成長因子やサイトカインが上皮創傷治癒過程や実質細胞の瘢痕抑制にも貢献しているという報告もある²⁰⁾。基質として羊膜も移植すると透明性がやや落ちることも懸念されるが、炎症が強い環境に移植をする場合、基質がないとダイレクトに実質の炎症が上皮に伝わり、生着に影響することもある。症例に応じて、基質を用いる方がよいかどうかについて、適応を考える必要がある。レシピエント側の眼表面環境を整えることは、シート移植後の上皮生着、安定化の予後に大きく影響する。具体的には、涙液分泌機能、結膜下増殖線維組織、炎症などを術前にコントロールすることにより、角膜上皮シートの生着率を高めることである。また、この上皮移植術自体が眼表面の炎症抑制、涙液安定性、眼表面積の増加などに貢献することにより、レシピエント眼表面を安定化させ、二期の角膜移植を受ける環境を整えることに成功している。それにより、角膜幹細胞移植として脚光を浴びた角膜輪部移植では治療できなかった難治症例なども治療可能になってきた。

稿を終えるにあたり、受賞講演の機会を与えてくださいました学術奨励賞選考委員の先生方、第 115 回日本眼科学会総会長望月 學教授に心より感謝申し上げます。また御指導を

賜りました慶応義塾大学医学部眼科学教室坪田一男教授、榛村重人准教授、東京歯科大学市川総合病院眼科島崎 潤教授、研究にご協力いただきました方々に心より感謝いたします。

利益相反：利益相反公表基準に該当なし

文 献

- 1) Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, et al : Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Eng J Med* 340 : 1697—1703, 1999.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Rheinwald JG, Green H : Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 : 331—343, 1975.
- 8) Sun TT, Green H : Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture : formation of the cornified envelope. *Cell* 9 : 511—521, 1976.
- 9) Rheinwald JG, Green H : Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 265 : 421—424, 1977.
- 10) Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al : p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398 : 714—718, 1999.
- 11) Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al : p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 98 : 3156—3161, 2001.
- 12) **Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F** : p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* 129 : 523—536, 2007.
 - 13) **Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ, Roop DR** : p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev* 18 : 126—131, 2004.
 - 14) **Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M** : Isoforms of Δ Np63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 9523—9528, 2005.
 - 15) **Kawakita T, Shimmura S, Higa K, Espana EM, He H, Shimazaki J**, et al : Greater growth potential of p63-positive epithelial cell clusters maintained in human limbal epithelial sheets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 4611—4617, 2009.
 - 16) **Espana EM, Romano AC, Kawakita T, Di Pascuale M, Smiddy R, Tseng SC** : Novel enzymatic isolation of an entire viable human limbal epithelial sheet. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4275—4281, 2003.
 - 17) **Kim JC, Tseng SC** : Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14 : 473—484, 1995.
 - 18) **Tseng SC, Espana EM, Kawakita T, Di Pascuale MA, Li W, He H**, et al : How does amniotic membrane work? *Ocul Surf* 2 : 177—187, 2004.
 - 19) **Tseng SC, Meller D, Anderson DF, Touhami A, Pires RT, Gruterich M**, et al : *Ex vivo* preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane for treating corneal diseases with total limbal stem cell deficiency. *Adv Exp Med Biol* 506 : 1323—1334, 2002.
 - 20) **Tseng SC, Li DQ, Ma X** : Suppression of transforming growth factor- β isoforms, TGF- β receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 179 : 325—335, 1999.
-