

20080600/B

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

角膜上皮細胞の生体外での
未分化能維持の研究

平成18年度～20年度 総合研究報告書

主任研究者 川北哲也

平成21(2009)年3月

目次

I. 総合研究報告書

角膜上皮細胞の生体外での未分化能維持の研究----- 2

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----12

III. 研究成果の刊行物・別刷-----13

厚生労働科学研究費補助金(再生医療等実用化研究事業)
(総合)研究報告書

角膜上皮細胞の生体外での未分化能維持の研究
主任研究者 川北哲也 慶應義塾大学医学部眼科学教室講師

マウス角膜上皮未分化細胞の培養では、低細胞外カルシウムイオン濃度と無血清の培地で、150継代以上、細胞サイズ、形態、未分化マーカーを維持して培養が可能であり、なおかつ継代培養によるコロニー形成能力の低下も認めなかった。

角膜上皮特異的タンパクであるケラチン12の発現を失ったため、眼形成のマスター遺伝子であり、その遺伝子導入によりケラチン12の発現を認めたと報告されているPax6をアデノウイルスベクターを用いて、この未分化細胞に遺伝子導入したが、導入効率は低く、また遺伝子導入された細胞も再度ケラチン12を発現しなかった。このことからPax6はケラチン12を発現する必要十分条件ではないことがわかった。

80継代を過ぎた細胞の中も自然発生的にケラチン12を発現する細胞集団が存在することがわかった。1%未満の細胞集団ではあるが、免疫染色では明らかに陽性を示した。しかしこれらの細胞をSHEM培地、3T3細胞との共培養により重層化させ上皮シートを作成したものの凍結切片では、免疫染色で注意深く観察しても、ケラチン12陽性細胞をみつけることはできなかった。

角膜実質の上で上皮シートを器官培養することにより、ケラチン12を誘導することを試みたが、この上皮シートとマウス角膜実質とのリコンビナントモデル1週目の組織評価では、生着は得られたが、上皮はケラチン12の発現を誘導するには至らなかった。またケラチン10の発現もなく、角化上皮に異常分化していることもなかった。そこで、ケラチン12がエピジェネティックに制御されていると考え、トリコスタチンA培地添加実験を施行した。その結果、ケラチン12がRNAレベルで発現することが確認された。

角膜未分化細胞の異常分化の研究では、継代培養の際、細胞播種密度を高くすると、(5000 cells/cm²以上)ParacrineなTGF- β の刺激により、Smadを介したシグナルの活性化により、細胞がEMTを起こし、 α SMAとp63を同時発現する細胞が出現することがわかり、通常培養時にも注意が必要であることがわかった。

角膜未分化細胞維持の研究では、海外アイバンクのドナー眼の角膜輪部組織を用い、ヒトでの角膜上皮細胞の生体外での未分化能維持に輪部の構造が影響しているかどうかを調べた。角膜上皮シートとして一塊に分離した輪部シート構造の中にはp63陽性の細胞塊が局在し、そのp63陽性の細胞塊を多く含む領域は、少ない領域と比較し、コロニー形成率が有意に高かった。

分担研究者

榛村 重人

慶應義塾大学医学部眼科学教室 准教授

比嘉 一成

東京歯科大学市川総合病院眼科 研究技

術員

A. 研究目的

化学外傷、熱傷などに続発する重症角結膜疾患においては、角膜上皮幹細胞が存在すると考えられている角膜輪部が傷害されており、角膜上皮が供給されないために、結膜上皮が新生血管を伴って侵入するのみならず、強い炎症によりその結膜上皮下に線維芽細胞の侵入によるファイブローシスを形成する。この角膜上皮を再建するために、自己の片眼、他眼、自己口腔粘膜を用い、生体外で培養し、移植するアプローチを当院では開始している。その上皮培養の方法を、マウスを用いて検討し、より少ない組織から幹細胞の未分化能を維持する方法を開発し、臨床応用することにより、より安全に角膜上皮再生医療が行われるようになる。また広く上皮幹細胞の培養、増殖における研究にも貢献すると考えられる。

多くの施設で角膜上皮幹細胞の分離が試みられている。角膜上皮細胞は体内でも血管に栄養されておらず、観察しやすいという利点もあり、幹細胞及びその微小環境(ニッチ)の研究において優れたモデルといえる。角膜上皮幹細胞の培養研究は、まだまだ不明な点が多く、今回申請する研究はマウス角膜上皮細胞を用いたin vitroの研究であり、マウス角膜、輪部上皮細胞の培養、継代に成功しているのは我々のグループのみであり、誰も着手していない。この研究では、少数のマウス角膜上皮幹細胞から成体マウスの角膜を覆うだけの細胞数に、未分化性を保持したまま増殖させ、なおかつ生体内もしくは角膜実質とのリコンビナントで角膜の表現型に分化をすることを確認する、またその細胞が継代により、細胞老化、異常分化といった現象を起こすことがないかも検証してい

く。

現在、このマウス角膜上皮未分化細胞は150以上の継代を経てもそのクローナルに増殖し、p63とK14を強発現しコンパクトで数石状の細胞形態は変化していない。p63とK14という重層上皮の基底細胞のマーカーが強陽性ということが示す用に、この細胞をヒトに臨床応用されている培養上皮シート作成の条件(羊膜上培養、SHEM、3T3をフィーダー細胞に使用、エアリフトリング)を適用すると、重層化し、マウス角膜培養上皮シートを作成できた。

B. 研究方法

我々は世界ではじめてマウス角膜上皮細胞の分離培養に成功し、その培養には、低細胞外カルシウムイオン濃度と無血清が必要であることを明らかにした。(Invest Ophthalmol Vis Sci. 45(10):3507-12. 2004)。その細胞培養方法により、p63強陽性、かつClonalに培養可能なマウス角膜上皮細胞の分離培養に成功した。現在この細胞を用いて、ひとつの未分化角膜上皮細胞から、角膜を覆う重層化培養上皮シートを作成し、マウスに移植を開始している。また、この細胞を用いて、いろいろな培養条件下で他系統の細胞への分化誘導、および異常分化の抑制を目指した研究をする。

1. マウス角膜培養上皮細胞の分離培養、上皮シート作成

我々が樹立したマウス角膜上皮未分化細胞を、羊膜上(アンモニア処理にて羊膜上皮細胞を除去した羊膜)で2週間培養する。培養期間後期、3T3 fibroblastとの共培養、培養液を減らし培養細胞の表面を空気に触れさせるair-lift法を併用し重層化を促進させる。培養液としてはKSFMを用い、重層化させる際にSHEMにかえる。こうして重層化させたマウス上皮シートは一部移植前に分化マーカー(p63, Keratin12, Keratin14, Keratin10, Pax6, involucrin)での組織学的検討、とRT-PCRを行った。

2. マウス上皮シートをウサギ、マウス角膜へ

移植

マウス、ウサギの角膜上皮を、輪部を含め、大きく擦過除去する。フルオレセイン染色で上皮完全欠損を確認し、さらに結膜上皮を輪部で全周に渡り切除することにより、角膜輪部機能不全モデルを作成する。同時にマウス角膜上皮シート移植を施行し、ウサギには上皮保護にコンタクトレンズを挿入、眼板縫合を行った。マウスにはコンタクトレンズを入れず眼板縫合を行った。上記の方法以外にウサギ実質とマウス上皮シートのリコンビナントの器官培養も行い、実質(ニッチ)だけでも上皮の表現型を変化させるのを調べる。

3. *in vitro*での分化、異常分化のメカニズムの解明

このマウス上皮細胞はある条件下では平滑筋、瘢痕組織に認められるMyofibroblastのマーカーである α -SMAを発現する。その事実は上皮マーカーであるp63との二重染色にて確認した。どのような条件下で上皮が間葉系細胞のマーカーを発現するかを調べるため、細胞播種密度に着目し、低密度(50 cells/cm²)から高密度(50000 cells/cm²)で細胞形態、 α -SMA、S100A4の発現を免疫染色で調べた。また

そのメカニズムについて、Smad4(Smad-mediated TGF- β signaling)、 β -catenin、LEF-1、E-cadherin(Wnt pathway)の発現を免疫染色で調べた。さらに、高細胞密度の培養液を回収し、Boiplex®を用いて炎症性サイトカインの濃度を測定、及びこの回収培養液の低細胞密度培養への影響を調べた。

4. 継代培養細胞のコロニー形成率

通常継代した培養細胞を40 cells/cm²で60mm培養皿に播種し、10日後100 cells以上のコロニー数をカウントし、コロニー形成率を求めた。

5. p63の遺伝子導入

Pax6(-)の角膜未分化細胞に、adenoviral vector carrying EGFP-Pax6を導入し、ケラチン12発現を誘導できるかどうかを免疫染色で確認する。

6. リコンビナントモデル

50-80継代の細胞を用いて、角膜上皮重層化シートを以下の方法で作成した。

1. 通常継代した培養細胞をセミコンフルエントになるまで培養する。
2. 3T3細胞と、非接触で共培養する。
3. コンフルエントになったら、Air-lifting(空気液層に暴露)をする。

その後、マウスの角膜上皮をスクレイパーで除去した全眼球をExplantとして培養容器に固定し上皮シートをその上に置き、Air-liftingで器官培養を1週間行った。1週間後、その組織をOCTに埋没させ、切片を作成し、ケラチン12、10の染色を行った。

7. TSA刺激実験

マウス角膜上皮未分化細胞の通常培養(100継代以上のもの)を通常培養し、TSAを0, 10, 100, 300, 1000 nMの濃度で24時間培養液に添加し刺激した。その後RNAを回収し、RT-PCRでケラチン12の発現をみた。タンパクレベルでの発現を免疫染色で観察した。

8. 通常培養におけるEMTの発生頻度とメカニズムの解明

TGF- β の刺激によるEMTの誘導実験を行い、高細胞密度で長期に培養すると、 α -SMAの発現を認めることがわかった。細胞播種密度を変えて(500, 5000, 50000 cells/cm²)培養し、 α -SMAの発現に差があることを確認した。またそのメカニズムにParacrine mannerのTGF- β が関与していた。ELISAで炎症性サイトカインのレベルを測定した。それぞれの細胞密度で1週間培養し、 α -SMA細胞の陽性率を確認した。

マウス角膜上皮未分化細胞の通常培養(100継代以上のもの)を通常培養にTGF- β 刺激(5ng/ml)48時間刺激した。その後細胞を固定し、Smad3、 β カテニンの免疫染色で核内移行があるか観察した。またRNAを時間経過で回収し、snailそのほかのEMT関連分子の発現を確認した。

9. 角膜輪部上皮組織構造のニッチとしての

役割の研究

アイバンク(海外)の輪部組織をDispase処理(14h, 4°C)し、輪部組織から上皮シートを分離した。シートをそのまま培養皿に静置して48時間培養した。(コントロールとしてシートをcollagenase処理したシングルセルを用いた)分離直後、あるいは培養した後、p63(4A4)の免疫染色を行い、p63陽性細胞塊を観察した。p63陽性細胞塊の多い部分、少ない部分をレーザーマイクロディセクションで切り出し、コロニー形成率を比較した。(図)

C. 研究結果

1. マウス角膜培養上皮細胞の分離培養、上皮シート作成(図1, 2, 3)

長期継代培養した細胞からも重層化マウス上皮シートを作成できた。免疫染色ではKeratin 12(-)、Pax6(-)、Keratin 14(+), Keratin 10(-) p63(+)/Involucrin 上層(+)で、RT-PCRの結果も免疫染色の結果を支持していた。

2. マウス上皮シートをウサギ、マウス角膜へ移植

ウサギ角膜輪部機能不全モデルへの上皮シート移植は、炎症が強いため上皮の生着が困難であった。睑板縫合、保護用コンタクトレンズ挿入といった眼瞼結膜による機械的刺激的の防御を行ったが、実験の再現性が良好でなかった。またマウスモデルでは、移植シートが容易にとれてしまった。その原因としては、睑板縫合をどれだけ追加しても、糸がきれてしまうことが一因であった。そのため、現在、炎症が少なく、再現性の高いウサギ角膜上皮欠損モデルを作成しており、現在その方法論を確立している。

3. *in vitro*での分化、異常分化のメカニズムの解明

マウス角膜輪部上皮細胞を培養する際、高密度(50000 cells/cm²)の細胞領域で、 α -SMAの発現を認めた。さらに同領域で、Smad4の核内移行を認めた。また β -catenin,の核内移行も同領域に認め、LEF-

1も似た同行を観察した。コロニー中心部では細胞間に発現したE-cadherinは周辺部ではしだいに細胞間の発現は減弱した。コロニー形成中に、ある程度コロニーが大きくなるとこういった現象が起こることから、細胞密度が関係あると仮説をたて、細胞播種密度をかえ、液性因子、とくにTGF- β に着目し、以下の実験結果を得た。

3-1. 高細胞密度培養のほうが、 α -SMAの発現率が低細胞密度培養よりも有意に高かった。

3-2. 高細胞密度培養において、細胞培養液中のTGF- β 1, 2の濃度は上皮を刺激するレベルに上昇していた。

3-3. 低細胞密度培養に高細胞密度培養の培養液(Volume/Volume; 40%)を加えると、 α -SMAの発現率が有意に上昇した。

3-4. 高細胞密度培養において、anti-TGF- β antibodyを加えて培養すると、有意に α -SMAの発現率が下降した。

4. 継代培養細胞のコロニー形成率

継代培養した細胞においても、細胞播種密度、培地を管理すれば、コロニー形成率(3-5%)、小細胞サイズ、数石状形態を保つマウス角膜上皮由来の未分化細胞を維持可能であった。

5. p63の遺伝子導入

導入効率は5%未満と低く、EGFP陽性細胞でもPax6の免疫染色を確認できなかった。

6. リコンビナントモデル

リコンビナントモデルにおいて、1週間上皮シートとマウス角膜実質を器官培養により接触させたが、ケラチン12の発現は認めなかった。またそのほか、ケラチン10の発現も認めなかった。

7. TSA刺激実験(図4)

上記でケラチン12陽性細胞の存在を確認した。ケラチン12陰性の細胞もケラチン12を誘導発現することができるか、をみるため、TSAで刺激した。300, 1000 nMの濃度でRNAレベルのケラチン12発現上昇を認めた。しかし、タンパクレベルでの免疫染色の発現は、通

常培養と有意差なく1%未満であった。

8. EMTの誘導メカニズム

細胞播種密度を変えて(500, 5000, 50000 cells/cm²)培養し、 α SMAの発現に差があることを確認した。またそのメカニズムにParacrine mannerのTGF- β が関与していることを、TGF- β 中和抗体でその発現が抑制されることで証明した。ELISAでの炎症性サイトカインのレベルを測定では、TGF- β 1が、高細胞密度での濃度が密度依存的よりも有意に高く、そのほかIL-1, GM-CSFも高値を示した。

マウス角膜上皮未分化細胞をTGF- β で刺激(5ng/ml)48時間刺激することにより、Smad3、 β カテニンの細胞間から細胞質への移行、また核内にも移行する染色像が観察された。またsnailといったEMT時に上昇する分子も上昇が確認された。

9. 角膜輪部上皮組織構造のニッチとしての役割の研究(図5-9)

海外アイバンクのドナー眼の角膜輪部組織を用い、ヒトでの角膜上皮細胞の生体外での未分化能維持に輪部の構造が影響しているかどうかを調べた。角膜上皮シートとして一塊に分離した輪部シート構造の中にはp63陽性の細胞塊が局在し、そのp63陽性の細胞塊を多く含む領域は、少ない領域と比較しコロニー形成率が有意に高かった。

D. 考察

これらの結果から、コロニーを形成する未分化細胞を継代培養する条件として、低細胞密度が挙げられ、細胞は一定以上の高細胞密度に生体外で培養すると異常分化する可能性が示唆された。

現在、これらの方法を用いて、アメリカアイバンク眼の角膜輪部より単離した角膜上皮細胞を、マウスの場合と同様な培地で培養し、コロニー形成率、および単一のコロニーから2次コロニーが培養皿上でできるかどうかを検討している。

また、Pax6を遺伝子導入してもケラチン12

の発現を得られなかったことから、Pax6に依存してケラチン

12の発現がなくなったわけではなく、そのほかのメカニズムが関与している可能性が高い。他の角膜上皮細胞株でもケラチン12の発現はなく、Primary Cultureでは数代の継代後、ケラチン12の発現がなくなること、それらにはエピジェネティクスが関与しているとの報告もあり、この細胞にも培養の環境変化によるDNAのメチル化やヒストンのアセチル化による影響が働いていると考え、トリコスタチンAなどの薬剤を用いて、異常なメチル化を抑制すればケラチン12の発現を誘導できるのではないかと考えている。

E. 結論

我々の樹立した角膜輪部由来の未熟細胞(p63+, K14+, K10-, K12-, Pax6-の表現型を持ち、低密度培養でコロニーを形成する)を用いて、通常培養時に異常分化が誘導されるかどうかを、組織癒着の原因のひとつと考えられている上皮間葉系移行のマーカーを用いて調べた。

通常培養時のコロニーの中央部ではE-cadherin、 β -cateninが細胞間に認められ、Smad4も核内移行は認められなかったが、コロニーの周辺部ではSmad4、 β -cateninの核内移行とともに、 α -SMAの発現を認めた。すなわち、Smad-TGF- β signaling, Wnt pathwayの活性化を認め、その結果、上皮間葉系移行を惹起し、 α -SMAの発現に至ったと考えられる。興味深いことに、この α -SMA+の細胞群は、増殖能がないと予想していたが、PCNAとの2重染色では、 α -SMA+PCNA+の細胞が存在していた。これは、生体では、癒着組織において、増殖性病変を認める際、まさにその場所でも癒着形成していると考えられている α -SMA+細胞が上皮由来、かつ増殖している可能性を示唆している。眼科領域においては、重症性癒着性眼表面疾患や翼状片が、このメカニズムに関与している可能性があると考えられる。角膜由来の未熟細胞がこれらの疾患の発症メカニズムに関与しているならば、ヒトの細胞を用い

た生体外モデル、またマウスなど動物を用いた生体モデルでそれらを証明する事が必要であると考えている。それらが証明されれば、どうやって、そういった疾患に対して、上皮間葉系移行による癒着化を防ぐことができるかに焦点が当てられる。この実験で、マウス細胞モデルでは、TGF- β が最も強く関与していたが、それも同様のメカニズムが主因となっているのかどうかを検証する必要がある。

また昨今、再生医療に置いては、ステムセルバンクといった、自己の細胞または他家細胞を冷凍保存しておいて、必要などときに増やして組織構築させるという考え方がある。

しかし、それにはそれぞれの細胞に応じた生体外での分化能、とその組織の細胞ニッチがどういったものなのか、を把握していないと、細胞老化による異常分化、や腫瘍化を招く恐れがあると考えられる。今回の実験では、細胞播種密度という単純なことで、コロニーの周辺部の細胞の性質、形態に異常分化を生じ、それが主にTGF- β によるものであることをつきとめた。ヒト角膜輪部細胞においても、さらなる検討が必須であると考えている。

マウス角膜上皮未分化細胞を、低細胞密度に保つことにより、ParacrineなTGF- β によるEMTを抑制し、上皮細胞形態を維持することができた。また80継代目の細胞では、通常培養下で1%以下のケラチン12陽性細胞群を含んでいた。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

①. 論文発表

1. Kawakita T, Shimmura S, Higa K, Espana EM, He H, Shimazaki J, Tsubota K, Tseng SC. Greater Growth Potential of p63-positive Epithelial Cell Clusters Maintained in Human Limbal Epithelial Sheets. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Mar

25. [Epub ahead of print]

2. Ma X, Shimmura S, Miyashita H, Yoshida S, Kubota M, Kawakita T, Tsubota K. Long-Term Culture and Growth Kinetics of Murine Corneal Epithelial Cells Expanded from Single Corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Feb 14. [Epub ahead of print]
 3. Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Kawakita T, Yoshida S, McGrogan M, Shimazaki J, Tsubota K. The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Jan 10. [Epub ahead of print]
 4. Kawakita T, Shimmura S, Higa K, Espana EM, He H, Shimazaki J, Tsubota K, Tseng SC. Stratified epithelial sheets engineered from a single adult murine corneal/limbal progenitor cell. J Cell Mol Med. 2008 Aug;12(4):1303-16.
 5. Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Yoshida S, Kawakita T, Shimazaki J, Tsubota K. A novel NIH/3T3 duplex feeder system to engineer corneal epithelial sheets with enhanced cytokeratin 15-positive progenitor populations. Tissue Eng Part A. 2008 Jul;14(7):1275-82.
 6. Miyashita H, Higa K, Kato N, Kawakita T, Yoshida S, Tsubota K, Shimmura S. Hypoxia enhances the expansion of human limbal epithelial progenitor cells in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Aug;48(8):3586-93.
 7. Higa K, Shimmura S, Kato N, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, Tsubota K. Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Feb;48(2):597-604.
- ②. 学会
1. Kawakita T, Shimmura S, Tsubota K, Shimazaki J, Tseng SCG. Epithelial Mesenchymal Transition Occurred in aged cultur

- e during Clonal Expansion of Murine Limbal Epithelial Cells ARVO annual meeting Fortlauderdale, USA 2007/5/9
2. Kawakita T., Shimmura S., Higa K., Kazuo Tsubota, Tseng SCG Epithelial Mesenchymal Transition by Cellular Senescence Gordon Conference (Aging of Biology) Les Diablerets, Switzerland 2007/9/27
 3. Kawakita T., Hornia A., Shimmura S., Higa K., Miyashita H., Tsubota K., Shimazaki J., S.C.G. Tseng Corneal epithelial sheet equivalent Generated From A single Murine Corneal/limbal Epithelial Progenitor cell The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, May 1st-5th, 2006, Florida, U.S.A.
 4. Kawakita T., Kawashima M., Satake Y., Higa K., Shimmura S., Tsubota K., Shimazaki J.. Optical Keratoplasty following Cultivated Limbal Epithelial Transplantation: clinical outcome and phenotypic study American Academy of Ophthalmology, Annual meeting, , Nov. 11th-14th, Las Vegas, U.S.A. 2006
 5. 川北哲也 Single Cellからの培養上皮シート作成 角膜カンファレンス シンポジウム 東京、2008/2/28

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他
なし

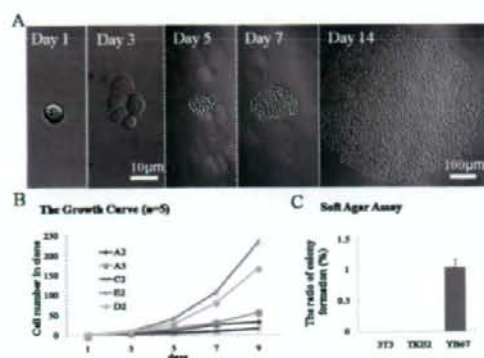


図1

A; 20継代目でクローニングした増殖性の高い角膜上皮由来細胞は培養皿上に、無血清低カルシウム培地、フィーダー細胞無しの条件下で、正円形のコロニーを形成した。B; クローニングの結果、そういった増殖性が高いもの、低いものに二分された。C; Soft Agarでの非接触培地ではコロニーを形成しなかった。

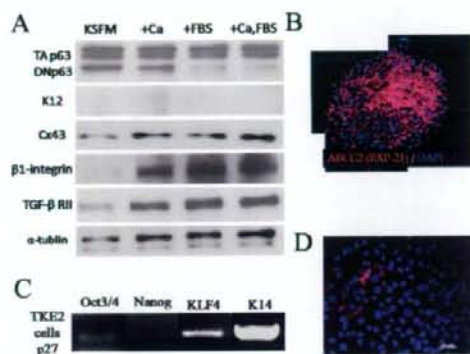


図2

カルシウム、牛胎児血清を加えると、未分化マーカーであるDNp63のはつげんが低下し、分化マーカーであるCx43 TGF-β RII, の発現が増強した。ケラチン12/ハツゲンタンパクレベルでは、長期培養したものでは、発現を認めなかった。未分化マーカーであるOct3/4, Klf4, K14はRNAレベルで発現を認めたが、Nanogは陰性であった。

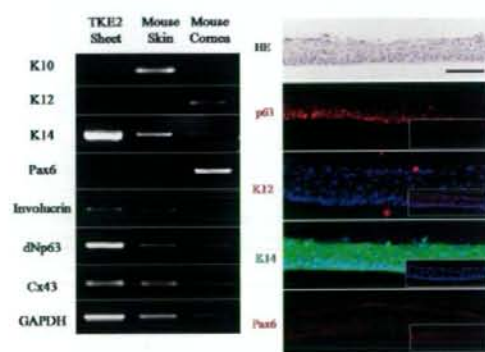


図3

通常の臨床応用されている方法ももちいて、重層化角膜上皮シートは作成科のであった。その上皮シートでも、pax6, K12のは右舷は認めなかった。

Kawakita T, Shimmura S et. al. J Cell Mol Med. 2008 Aug;12(4):1303-16.より引用

TKE2におけるTSA処理後のCytokeratin12の発現
(24hr, RT-PCR 38cycles)

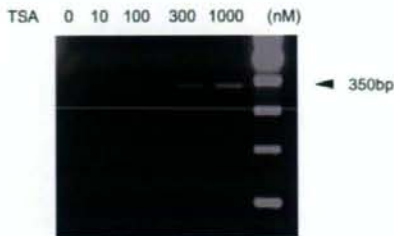


図4

0-1000nMのトリコスタチンA刺激により、ケラチン12の発現がRT-PCRで確認された。またその発現は用量依存的に増える傾向にあった。

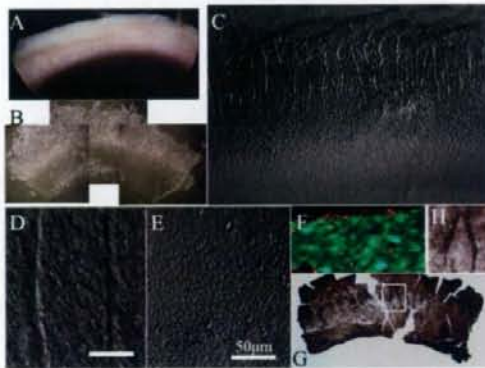


図5

A:角膜輪部組織
B, C:分離した輪部上皮シート
D:シートのしわ状構造
E:角膜周辺の上皮構造
F:このシートの細胞はViabilityもよく、シートのままp63の抗体で免疫染色すると、しわの部位に一致して濃染し、(G)その部位を拡大すると、p63陽性細胞が密になっていた。

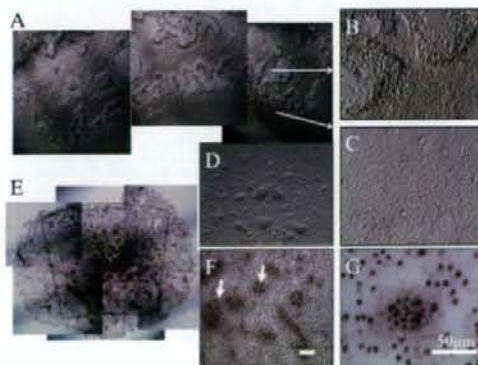


図6

A:輪部上皮シートを培養すると、しわ状構造が崩れ、B, Cのような構造になる。もう少し(3days)培養すると、細胞塊(D)が出現し、これらはp63陽性(F)の小細胞の集団であった。(G)

Kawakita T, Shimmura S et.al. Invest Ophthalmol Vis Sci.2009より引用

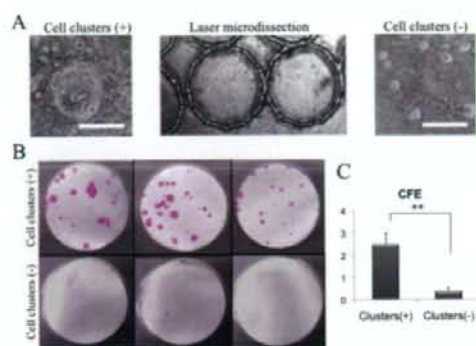


図7
細胞塊が豊富な場所、近接するが細胞塊の内場補をレーザーマイクロダイセクションで切り出し (A)、コロニー形成率を比較すると、明らかに細胞塊を含むほうがコロニー形成率は高かった。(B, C)

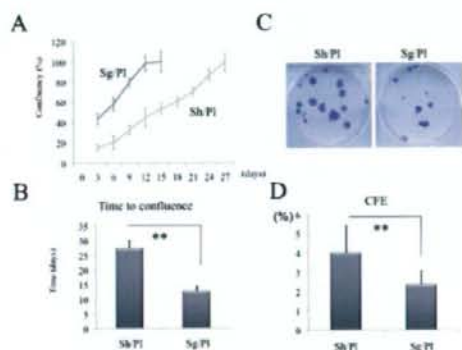


図8
細胞塊を崩して培養した方が、細胞塊を維持して培養するより、増殖が早い (A, B) 一方、コロニー形成能が落ちていくのも早かった。(C, D)

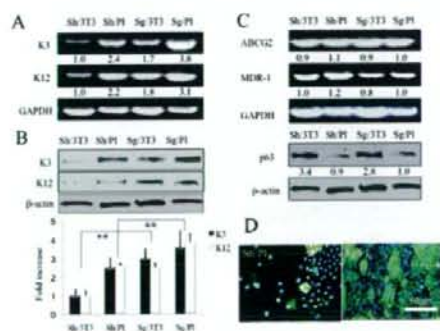


図9
ケラチン3, 12といった分化マーカーは細胞塊を維持して培養したほうが、発現は低かった (A, B, D)。未分化マーカー (p63, ABCG2) は細胞塊よりも3T3フィーダー細胞の有無に左右された。(C)

Kawakita T, Shimmura S et.al. Invest Ophthal Mol Vis Sci.2009より引用

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Kawakita T</u> , <u>Shimmura S</u> , <u>Higa K</u> , Espana EM, He H, Shimazaki J, Tsubota K, Tseng SC.	Greater Growth Potential of p63-positive Epithelial Cell Clusters Maintained in Human Limbal Epithelial Sheets	Invest Ophthalmol Vis Sci.	In print		2009
Ma X, <u>Shimmura S</u> , Miyashita H, Yoshida S, Kubota M, <u>Kawakita T</u> , Tsubota K.	Long-Term Culture and Growth Kinetics of Murine Corneal Epithelial Cells Expanded from Single Corneas	Invest Ophthalmol Vis Sci.	In print		2009
Omoto M, Miyashita H, <u>Shimmura S</u> , <u>Higa K</u> , <u>Kawakita T</u> , Yoshida S, McGrogan M, Shimazaki J, Tsubota K.	The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	In print		2009
Miyashita H, <u>Shimmura S</u> , <u>Higa K</u> , Yoshida S, <u>Kawakita T</u> , Shimazaki J, Tsubota K.	A novel NIH/3T3 duplex feeder system to engineer corneal epithelial sheets with enhanced cyokeratin 15-positive progenitor populations.	Tissue Eng Part A	14	1275-1282	2008
<u>Kawakita T</u> , <u>Shimmura S</u> , Hornia A, <u>Higa K</u> , Tseng SC	Stratified epithelial sheets engineered from a single adult murine corneal/limbal progenitor cell.	J Cell Mol Med.	12	1303-1316	2008
Miyashita H, <u>Higa K</u> , Kato N, <u>Kawakita T</u> , Yoshida S, Tsubota K, <u>Shimmura S</u> .	Hypoxia enhances the expansion of human limbal epithelial progenitor cells in vitro.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	48	3586-3593.	2007
<u>Higa K</u> , <u>Shimmura S</u> , Kato N, <u>Kawakita T</u> , Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, Tsubota K.	Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	48	597-604	2007

Proliferation and Differentiation of Transplantable Rabbit Epithelial Sheets Engineered with or without an Amniotic Membrane Carrier

Kazunari Higa,¹ Shigeto Shimmura,^{1,2} Naoko Kato,² Tetsuya Kawakita,¹ Hideyuki Miyashita,² Yuji Itabashi,³ Keiichi Fukuda,³ Jun Shimazaki,^{1,2} and Kazuo Tsubota^{1,2}

PURPOSE. To report a novel method of engineering transplantable, carrier-free corneal epithelial sheets by using a biodegradable fibrin sealant and to compare its characteristics with epithelial sheets cultivated on denuded amniotic membrane carriers.

METHODS. Stratified corneal epithelial sheets were prepared in culture dishes coated with biodegradable fibrin glue. Amniotic membrane (AM) carriers served as the control. The quality of cultivated sheets was compared by immunohistochemistry for cytokeratin (K)3, K12, K14, p63, occludin, and integrin β 1; electron microscopy; and colony-forming assays. K3 protein expression was compared by Western blot analysis. In a limbal-deficient rabbit transplantation model, postoperative adaptation and proliferation of BrdU-labeled cell sheets were examined by histology and anti-Ki67 staining.

RESULTS. Epithelial sheets were successfully engineered by using a biodegradable fibrin sealant. Cell sheets in both groups were multilayered, expressed K3, K12, and K14, and had functioning occludin⁺ apical tight junctions as well as p63 and integrin β 1 staining in basal cells. The carrier-free sheets appeared to be more differentiated than the AM sheets, which was also demonstrated by the higher levels of K3 in the Western blots. The colony-forming efficiency of dissociated cells was similar in both groups, although larger colonies were observed on the AM sheets. AM sheets retained higher levels of BrdU-labeled cells and fewer Ki67⁺ cells compared with carrier-free sheets after transplantation.

CONCLUSIONS. Tissue engineering with a commercially available fibrin sealant was an effective means of creating a carrier-free, transplantable corneal epithelial sheet. Carrier-free sheets were more differentiated compared with AM sheets, while retaining similar levels of colony-forming progenitor cells. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:597-604) DOI:10.1167/iov.06-0664

From the ¹Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College, Chiba, Japan; and the Departments of ²Ophthalmology and ³Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

Supported in part by a grant from Advanced and Innovative Research Program in Life Sciences from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (TK) and a Grant-in-Aid for Scientific Research (SS).

Submitted for publication June 15, 2006; revised September 22, 2006; accepted December 14, 2006.

Disclosure: K. Higa, None; S. Shimmura, None; N. Kato, None; T. Kawakita, None; H. Miyashita, None; Y. Itabashi, None; K. Fukuda, None; J. Shimazaki, None; K. Tsubota, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Shigeto Shimmura, Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan; shige@sc.itc.keio.ac.jp

The use of allogenic or autologous cell sources for regenerative surgery is already common practice in the reconstruction of the ocular surface in patients with stem cell deficiency.^{1,2} After the success of limbal transplantation, a second generation of regenerative corneal surgery has emerged in the form of cell sheet transplantation by tissue-engineering techniques.³ Cell sheet transplants currently in clinical use are prepared by using biological carriers such as fibrin⁴ or amniotic membrane (AM)⁵⁻⁷ or as carrier-free cell sheets.^{8,9} Although there is still debate as to whether the cultivated sheets include progenitor or stem cells, both carrier and carrier-free techniques have restored a clear ocular surface for at least 1 year, the empiric goal for successful stem cell surgery.^{7,9}

One of the major benefits of cell sheet transplants, is that it can avoid the problem of donor availability. In vitro expansion provides a stratified cell sheet suitable for transplantation from a millimeter-scale tissue source procured from the healthy eye of the same patient or from a living relative in the case of bilateral disease. Ectopic cell sources such as the buccal membrane can also be modified in vitro to form a stratified epithelial sheet for ocular surface reconstruction with autologous tissue.⁹⁻¹¹ Yet, the number of clinical cases has not met the needs of patients because of ethical and technical constraints. Using AM as a carrier is one possibility as a standardized technique to produce transplantable epithelial sheets; however, AM tissue may not be readily available.

The development of a carrier-free method to produce corneal epithelial sheets was first reported by Nishida et al.,⁸ who used a novel temperature-responsive polymer that changes molecular conformation and hydrophobicity at 20°C to release intact sheets. Clinical cases in which this technique has been used have shown that a carrier-free strategy is feasible and that transplantation can be performed without the use of sutures. In the present study, we developed a different technique by using commercially available fibrin sealants to produce carrier-free sheets. Our method is different from the fibrin carrier sheets described by Rama et al.,⁴ as we allowed the fibrin to be degraded by intrinsic proteases before transplantation.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies

Mouse monoclonal antibodies (mAbs) for cytokeratin (K)3, K14, laminin, p63, integrin β 1, and Ki67 were purchased from Progen (AE5; Heidelberg, Germany), Abcam (B429; Cambridgeshire, UK), Laboratory Vision (4C7; Fremont, CA), Calbiochem (4A4; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Chemicon International Inc. (LM534; Temecula, CA), and DakoCytomation (MIB-1; Glostrup, Denmark), respectively. Mouse IgM antibody for fibrin was purchased from Monosan (Uden, The Netherlands). Rabbit polyclonal antibody for K12, goat polyclonal antibody for type IV collagen and rat mAb for BrdU (ICR1) were purchased from TransGenic, Inc. (Kumamoto, Japan), Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL) and Abcam. Isotype goat IgG, mouse IgG1,

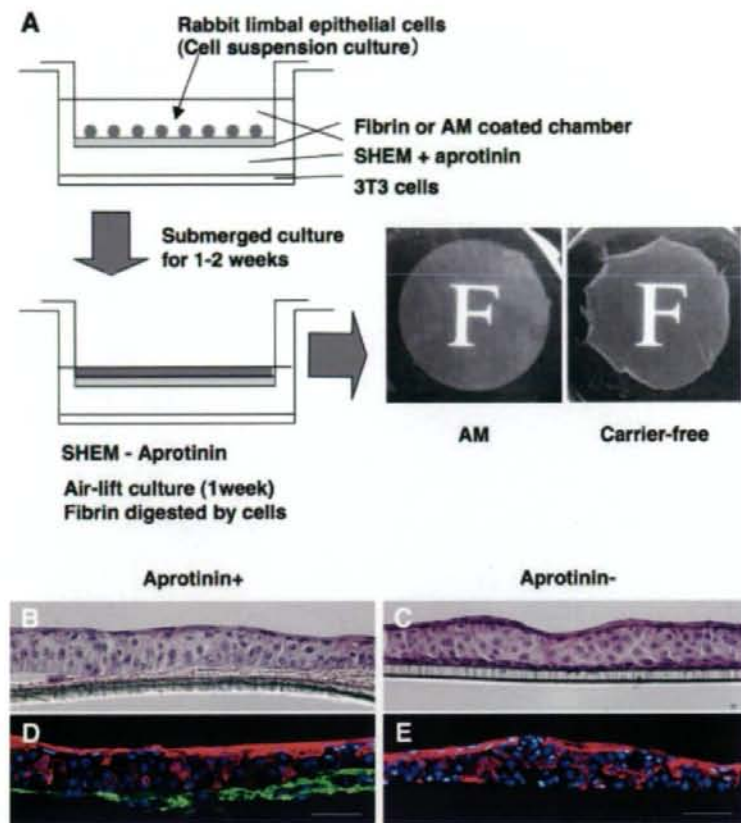


FIGURE 1. Cultivation of carrier-free epithelial sheets. Limbal epithelial cells were collected and seeded on fibrin- or AM-coated chambers (A). After 1 to 2 weeks in submerged culture with MMC-treated 3T3 feeder fibroblasts, the cells were allowed to stratify at the air-liquid interface for 1 week. HE staining (B, C) and immunohistochemistry against fibrin (green) and K12 (red) (D, E) showed that fibrin acted as a scaffold during cultivation with the protease inhibitor aprotinin (B, D) and was allowed to dissolve by removing the aprotinin before transplantation (C, E).

mouse IgM, rabbit IgG and rat IgG as control were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Dako Cytomation, and Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), respectively. FITC-, rhodamine-, and Cy3-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories and Chemicon International Inc.

Preparation of Epithelial Cells Sheets

All experimental procedures and protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Tokyo Dental College and conformed to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Fibrin sealant was purchased from Fujisawa (Bolheal; Osaka, Japan), and its constitution was performed as reported previously.¹² In brief, a solution containing 40 mg of human fibrinogen and 0.18 U of thrombin was diluted with 7.5 mL saline, and 0.3 mL was spread rapidly onto the upper chambers of a six-well plate with culture inserts (Transwell; Costar Corning, Corning, NY). Two hours later, the polymerized fibrin-coated top chambers were obtained and stored at 4°C. AMs were donated by mothers who were seronegative for human immunodeficiency virus and hepatitis B and C virus at the time of cesarean section, after written informed consent was obtained, in accordance with the Declaration of Helsinki. AM was stored with 15% dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) with PBS at -80°C until use. Denuded AM was prepared as previously described.⁷ Membranes were rinsed in PBS, spread onto the upper chambers of a six-well insert, frozen at -80°C, and air-dried at room temperature.

Primary cultures of limbal epithelial cells were prepared from eyes of 2.5- to 3.0-kg female Japanese white rabbits (Japan CLEA, Tokyo,

Japan) with anesthesia induced by intravenous injection of 4 mL pentobarbital sodium (50 mg/mL). Limbal rims of corneoscleral tissue were prepared by careful removal of excess sclera, iris, corneal endothelium, and central cornea. Epithelial sheets were isolated as described previously.¹³ Dispersed epithelial sheets were treated with trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 10 minutes, to suspend cells, which were seeded onto fibrin- or AM-coated wells (2×10^5 cells/mL) with supplemented hormonal epithelial medium (SHEM)⁷ containing 666 KIU/mL aprotinin (Wako, Osaka, Japan) and cocultured with mitomycin C (MMC)-treated 3T3 fibroblasts (Fig. 1A). The cultures were submerged in medium until confluence, cultured in air-liquid interface for 1 week, and finally incubated without aprotinin for 4 days. To evaluate the proliferation of transplanted epithelium and to identify cells of donor origin, cell sheets were labeled with 10 μ M BrdU for 48 hours before surgery. After labeling with BrdU, the epithelial cell sheets were washed with fresh medium and then used for surgery.

Transmission Electron Microscopy

Epithelial cell sheets were processed for transmission electron microscopy. Epithelial cell sheets from both groups were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in 60 mM HEPES buffer solution for 4 hours. After washing, samples were postfixated in 1% osmium tetroxide, dehydrated in a series of ethanol and propylene oxide, and embedded in epoxy resin. Semithin sections (1- μ m) were stained with toluidine blue. Then, ultrathin specimens were sectioned with a microtome (LKB, Gaithersburg, MD). Sections in the range of gray to silver were collected on 150-mesh grid, stained with uranyl acetate and lead

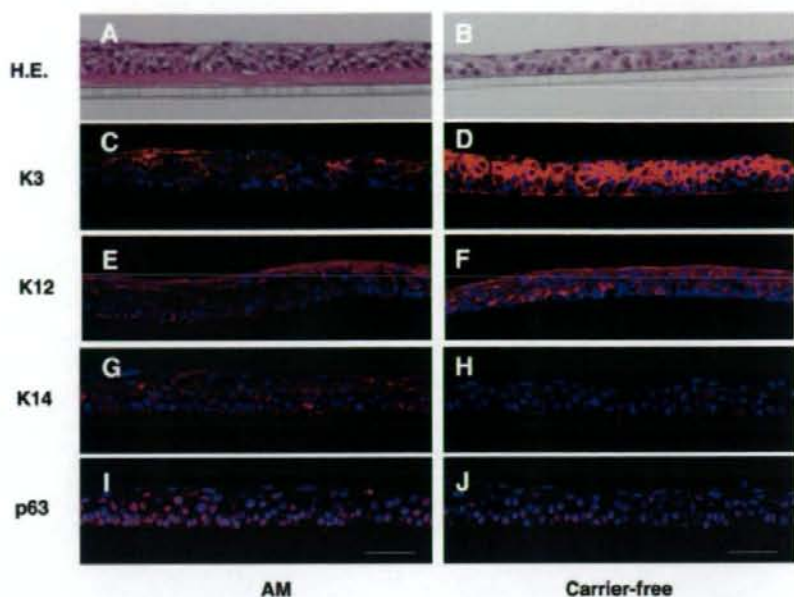


FIGURE 2. Differentiation markers in epithelial sheets. Hematoxylin and eosin staining of AM (A) and carrier-free (B) epithelial cell sheets. (C–J) Immunohistochemistry of K3, K12, K14, and p63 in epithelial sheets. Carrier-free sheets showed stronger K3/K12 staining and weaker K14/p63 staining than did AM sheets. Nuclei of cells were stained with DAPI. Scale bar, 50 μ m. The difference in K3 expression was confirmed by Western blot (K), which showed significantly higher levels of K3 in carrier-free sheets than in AM sheets, when compared semiquantitatively (L, $n = 6$, $P = 0.002$).

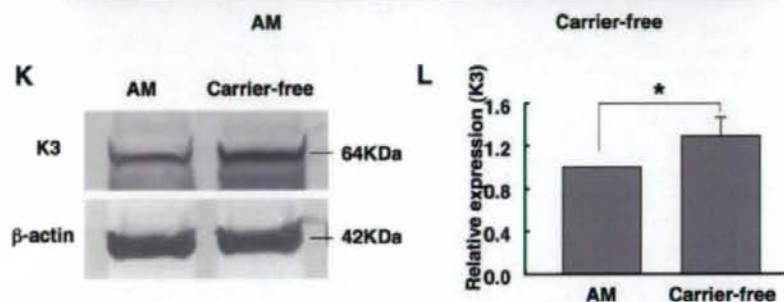
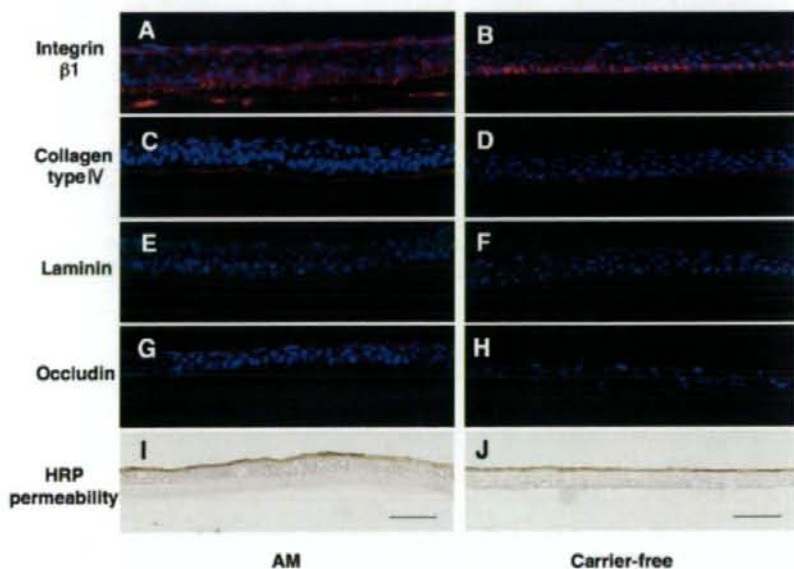


FIGURE 3. Basement membrane components and barrier function in epithelial sheets. Immunohistochemistry of integrin β 1, collagen type IV, laminin, and occludin in AM (A, C, E, G) and carrier-free (B, D, F, H) epithelial sheets. Nuclei of cells were stained with DAPI. (I, J) Barrier function (HRP permeability) of the epithelial sheets. Scale bar, 50 μ m.



citrate, and examined under an electron microscope (model 1200 EXII; JEOL, Tokyo, Japan).

Colony-Forming Efficiency

To evaluate the proliferative potential of cells in the cultured sheets, MMC-treated 3T3 fibroblasts were used in a colony-forming efficiency (CFE) assay, as previously described.¹⁴⁻¹⁶ NIH 3T3 fibroblasts in DMEM containing 10% FCS were treated with MMC (4 μ g/ml) for 2 hours at 37°C and then treated with trypsin-EDTA and plated at a density of 3×10^5 cells in 100-mm culture dishes. Single cells were prepared from both treated epithelial cell sheets (Acutase; Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA) for 60 minutes at 37°C. Each dish was seeded at 1×10^3 cells/dish. CFE was calculated by the percentage of colonies at day 14 generated by the number of epithelial cells plated in the dish. Quantification of size (in square millimeters) and number of colonies obtained from AM or fibrin sheets ($n = 5$) was performed by NIH Image (available by ftp at zippy.nimh.nih.gov/ or at http://rsb.info.nih.gov/nih-image; developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Growth capacity was evaluated on day 14 when cultured cells were stained with rhodamine B (Wako) for 30 minutes.

Epithelial Sheet Transplantation

All animals were handled in full accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and institutional guidelines. Rabbits were anesthetized with intramuscular injection of xylazine hydrochloride (2.5 mg/ml) and ketamine hydrochloride (37.5 mg/ml). The left eye in each rabbit was rendered totally limbal stem cell deficient by 1-*n*-heptanol (Sigma-Aldrich) mechanical debridement of the corneal epithelium, and surgical removal of the limbal and conjunctival epithelium was performed up to 2 mm from the limbus. Carrier-free sheets were gently detached from the mesh with a cell scraper,¹² transferred by microforceps and then expanded on the bare corneal stroma with a surgical sponge or forceps. Cell sheets were allowed to attach for 5 minutes without sutures. AM carrier sheets were sutured to the corneal surface with 10-0 nylon sutures. Rabbits with denuded corneas without sheet transplants served as the control. After surgery, all rabbits were fitted with a bandage contact lens and topical antibiotic (levofloxacin), and steroids (betamethasone) were applied twice daily.

The percentage of the cornea covered by epithelium at 1 week after surgery was calculated by measuring the area of the epithelial defects. The defect area was analyzed by tracing fluorescein images and calculated using the NIH Image program. Rabbits were then killed to observe BrdU-labeled cells as a means to confirm the donor origin of epithelium. The proliferation of transplanted epithelial cells was examined by calculating the percentage of BrdU⁺ and Ki67⁺ nuclei by immunohistochemistry.

Immunohistochemistry

Paraffin sections (K3, K14, p63, BrdU, and Ki67) were deparaffinized in xylene and rehydrated. Frozen sections (type IV collagen and laminin) were fixed for 10 minutes in cold acetone before blocking. Frozen sections (integrin β 1 and K12) were fixed for 10 minutes in 2% paraformaldehyde (Wako). Sections were blocked by incubation with 10% normal donkey serum (Chemicon International Inc., Temecula, CA) and 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) for 1 hour at room temperature (RT). Antibodies to K3 (1:50), K12 (1:100), K14 (1:100), p63 (1:50), BrdU (1:100), Ki67 (1:50), type IV collagen (1:50), laminin (1:50), and integrin β 1 (1:100) were applied and incubated for 90 minutes at RT, followed by incubation with rhodamine- or Cy3-conjugated secondary antibody. After three washes with TBST, the sections were incubated with 1 mg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan) at RT for 5 minutes. Finally, the sections were washed three times in TBST and coverslipped after mounting with an antifade medium (50 mM Tris buffer saline, 90% glycerin; Wako), 10% 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane (Wako).

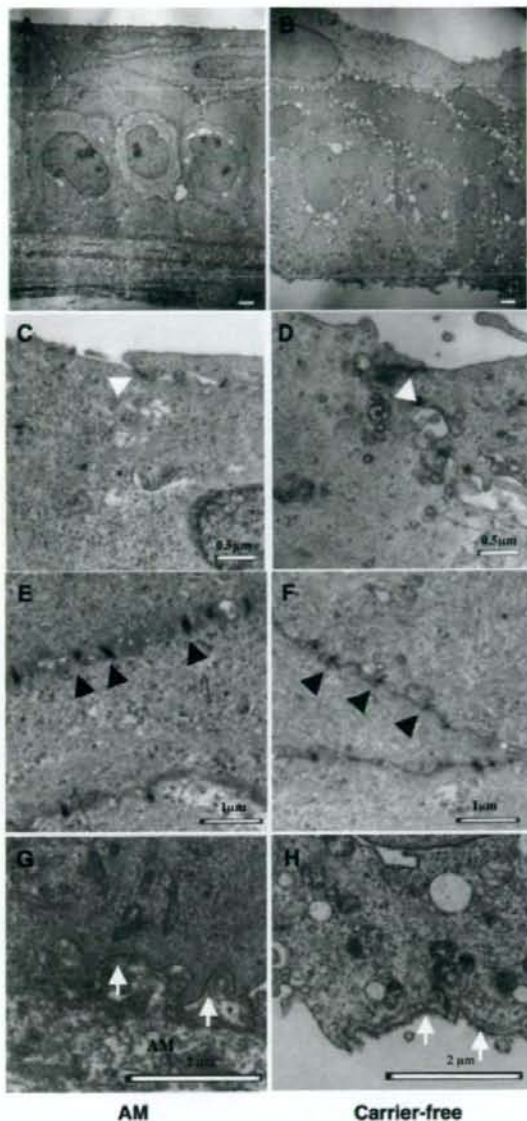


FIGURE 4. Transmission electron micrographs of AM and carrier-free sheets. Both AM (A, C, E, G) and carrier-free (B, D, F, H) sheets formed five to six layers of well-stratified epithelial cells, with columnar basal epithelial cells. High-magnification views show tight junction formation in apical cells (C, D, white arrowheads), and desmosome formation in the intermediate layers (E, F, black arrowheads). Basal cells formed an intact basement membrane in the AM sheets (G, arrows), whereas carrier-free sheets had residual material attached to the basal cell membrane (H, white arrows).

Western Blot Analysis

Epithelial sheets were dissociated with lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40; Calbiochem, Darmstadt, Germany) and homogenized. Each epithelial cell sheet was incubated for 40 minutes at 4°C, and then centrifuged at 15,000 rpm for 30 minutes at 4°C. Protein concentration of the supernatant was deter-

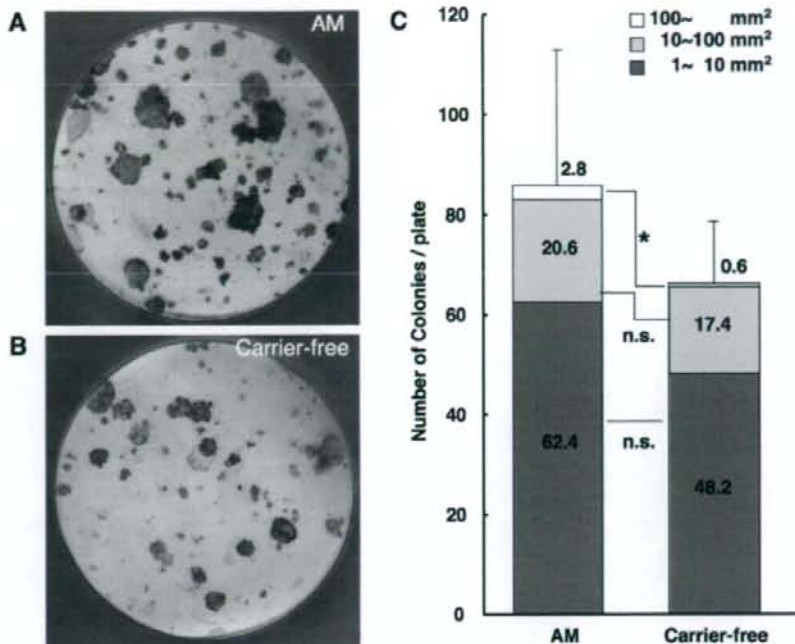


FIGURE 5. Colony formation by disassembled cells. Colony formation by epithelial cells dissociated from AM (A) and carrier-free (B) sheets. Colonies were stained with rhodamine B after 2 weeks. (C) Quantification of size and number of colonies obtained from epithelial sheets ($n = 5$, mean \pm SD). There was no significant difference in total colony formation. When cultures were compared by the area of each colony, a significant difference was observed only in the largest colony size ($*P = 0.014$; Student's *t*-test, $n = 5$).

mined by a protein assay (DC assay; Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA). All samples were then diluted in 2 \times sample buffer (100 mM Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20% glycerol (Wako), 12% 2-mercaptoethanol (Wako), and boiled. Ten micrograms of each sample were loaded on a 10% Bis-Tris gel (Novex NuPAGE; Invitrogen) and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, MA). The membranes were blocked with 5% skim milk (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1.5% normal goat serum, and PBS for 60 minutes at RT. The membranes were reacted with K3 (AE5) and β -actin (mabcam8226; Abcam) for 60 minutes at RT. After the membranes were washed three times in TBST, donkey biotinylated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) was added for 30 minutes at room temperature. Protein bands were visualized (Vectastain ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) with DAB (Vector Laboratories) as the substrate. The plot profile of the bands was analyzed with the NIH image 1.63 software with band density of AM sheets in each group standardized at 1.0.

Statistical Analysis

Statistical comparisons of Western blot band intensity, CFE, epithelialization, and BrdU and Ki67 staining were performed with the non-paired Student's *t*-test (Excel; Microsoft, Redmond, WA).

RESULTS

Generation of Carrier-Free Epithelial Cell Sheets

Rabbit corneal epithelial cells were cultured with 3T3 feeder cells for 1 to 2 weeks, followed by airlift cultures to produce stratified epithelium on plastic coated with fibrin polymer (Fig. 1A). Fibrin remained at the bottom of the cell sheet when cultured with aprotinin (Figs. 1B, 1D) and was dissolved after removal of aprotinin, presumably due to intrinsic proteolytic activity (Figs. 1C, 1E).

In Vitro Characteristics of Cultivated Sheets

We performed a comparative study of carrier-free corneal epithelial sheets with epithelial sheet cultivated on AM carriers. Stratified epithelium was engineered on both AM (Fig. 2A) and plastic coated with degradable fibrin polymer (Fig. 2B). The use of aprotinin did not affect cell growth or stratification on the AM carriers.

Immunohistochemistry using anti-K3 and K12 antibodies showed that carrier-free cultures produced uniform layers of cells expressing both differentiation markers (Figs. 2C-F). Sporadic cells in the basal layer were K3 negative, which is characteristic of immature limbal basal cells in vivo. Both AM and carrier-free sheets expressed K14 (Figs. 2G, 2H) and p63 (Figs. 2I, 2J). The epithelium on AM carriers appeared to express higher levels of K14 and p63, and less K3, K12, suggesting that the AM maintains epithelial cells in a less differentiated state. The difference in K3 expression was also demonstrated by Western blot analysis (Figs. 2K, 2L). Both AM and carrier-free sheets show an intact superficial tight junction, as shown by immunohistochemistry of occludin (Figs. 3G, 3H) and the exclusion of HRP (Figs. 3I, 3J). Basement membrane components such as collagen IV and laminin were more prominent in the AM sheet in vitro (Figs. 3C, 3E). These proteins were not as evident in the carrier-free sheets before transplantation (Figs. 3D, 3F). However, the adhesion molecule integrin β 1 was expressed in both sheets (Figs. 3A, 3B).

Transmission electron microscopy revealed that the ultrastructure of the epithelium was similar between the AM and carrier-free sheets, consisting of five to six layers of stratified epithelial cells with typical columnar basal cells and superficial cells with microvilli (Figs. 4A, 4B). Both cells sheets showed tight junction formation in apical cells (Figs. 4C, 4D) and desmosome formation (Figs. 4E, 4F). Although a basement membrane structure was observed in AM sheets (Fig. 4G), the carrier-free sheets showed residual material attached to the

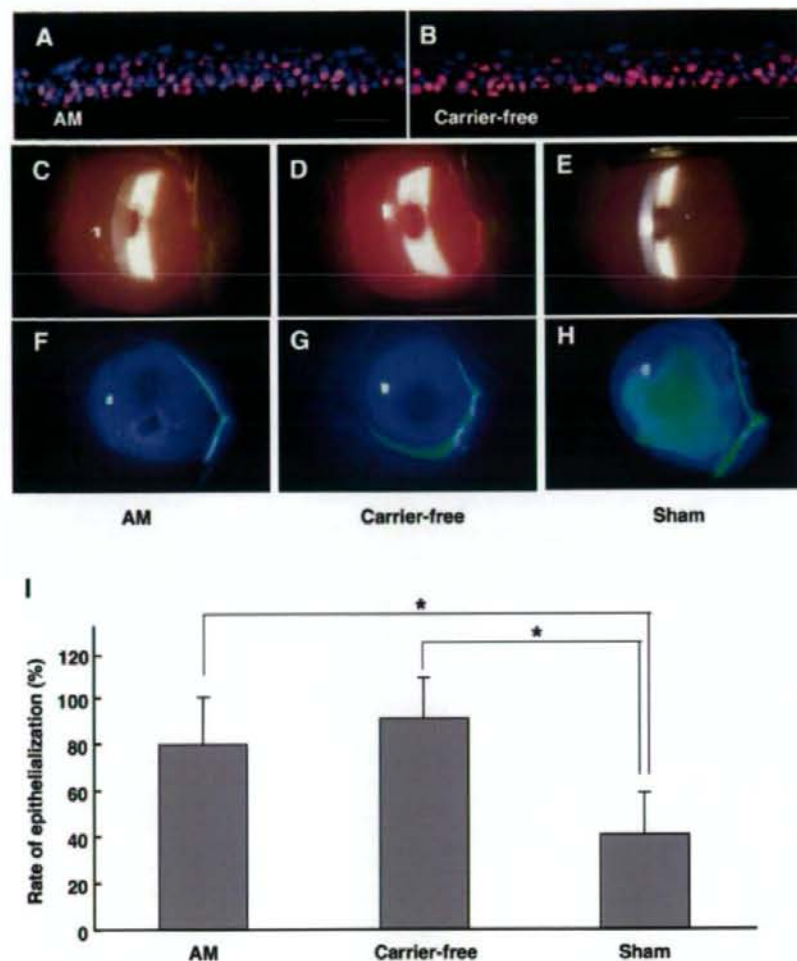


FIGURE 6. Epithelial sheet transplantation in rabbits. Immunohistochemistry of BrdU (A, B) in epithelial sheets before transplantation. Slit lamp photographs (C–E) and fluorescein staining (F–H) of rabbit eyes 1 week after epithelial sheet transplantation. (C, F) AM, (D, G) carrier-free, (E, H) sham. (I) Area of intact epithelium was larger in rabbit eyes after epithelial sheet transplantation compared with sham (* $P < 0.05$). Carrier-free sheets had a smoother epithelial surface with minimal inflammation. Scale bar, 50 μ m.

basal epithelial membrane (Fig. 4H) which may represent components of the basement membrane structure such as integrin β 1, collagen IV, and laminin observed by immunohistochemistry (Figs. 3B, 3D, 3F).

Colony-Forming Efficiency

Isolated epithelial cells from both carrier-free ($6.6\% \pm 1.2\%$) and AM carrier sheets ($8.6\% \pm 2.7\%$) maintained the ability to form colonies in a 3T3 feeder layer (Figs. 5A, 5B). Although the number of large colonies (100 mm^2) was higher in AM sheets (AM: 2.8 ± 1.3 colonies, fibrin: 0.6 ± 0.8 colonies, $P = 0.014$, $n = 5$), the difference in the total number of colonies was not statistically significant (Fig. 5C).

Cultivated Sheet Transplantation

BrdU labeling was performed on the AM (Fig. 6A) and carrier-free (Fig. 6B) sheets before surgery, showing that most of the cells in both groups are viable with proliferative potential. Rabbits without cell sheet transplants characteristically had epithelial defects at 1 week after surgery, as shown by the positive staining with fluorescein dye in Figure 6H (dotted line). An intact epithelial layer excluded the dye in the AM (Fig.

6F) and carrier-free (Fig. 6G) sheet transplants. The irregular staining in the AM sheet corresponds to folds in the transplant. Optical clarity was higher in the carrier-free group (Fig. 6D) than in the group with AM sheet transplants (Fig. 6C). Rabbits in the AM sheet group also had inflammation of the conjunctiva due to the presence of sutures. The area of intact epithelium at 1 week after surgery was significantly higher in both AM ($79.4\% \pm 20.4\%$) and carrier-free ($90.7\% \pm 17.4\%$) epithelial sheet groups compared with the sham-surgery control ($40.2\% \pm 18.3\%$, $P < 0.05$; Fig. 6I).

Immunohistochemistry of postoperative corneas showed normal K3 expression in the transplant sheets (Figs. 7C, 7D). Sham-surgery eyes exhibited partial epithelialization by K3-negative epithelium of conjunctival origin. Basement membrane components such as collagen IV were more prominent in the AM sheet group (Figs. 7E, 7F). Proliferation of transplanted cells was observed by the distribution of BrdU staining, which was uniformly present in cells before surgery. BrdU-positive cells were observed in both groups, indicating that these cells were of donor origin and were slow cycling during the 1-week period after surgery (Figs. 7G, 7H). The number of BrdU-positive cells in the AM group was significantly higher

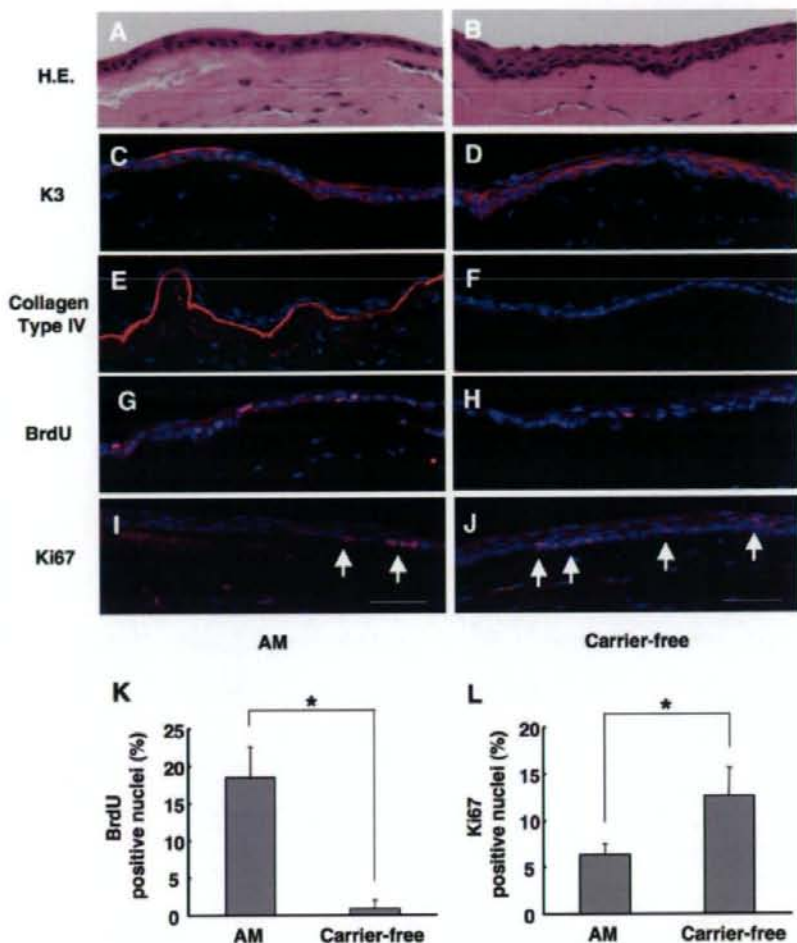


FIGURE 7. Postoperative histology of epithelial sheet transplantation. Light micrograph of hematoxylin and eosin-stained sections of AM (A) and carrier-free (B) epithelial sheets. Immunohistochemistry of K3 (C, D), Collagen type IV (E, F), BrdU (G, H), and Ki67 (I, J). AM sheets retained significantly higher levels of BrdU (K) and expressed lower levels of Ki67 (L) than did carrier-free sheets ($P < 0.05$, Student's *t*-test). Scale bar, 50 μ m.

than that in the fibrin group (AM: $18.4\% \pm 4.2\%$, fibrin: $1.1\% \pm 1.1\%$, $P = 0.0002$, $n = 4$; Fig. 7K). Staining of the proliferation marker Ki67 was also observed in the basal layers of both groups (Figs. 7I, 7J), with significantly less Ki67-positive cells in the AM group than in the fibrin group (AM: $6.3\% \pm 1.2\%$, fibrin: $12.6\% \pm 3.1\%$, $P = 0.0087$, $n = 4$; Fig. 7L). BrdU- and Ki67-positive cells were uniformly distributed throughout the epithelial sheet in both groups, and there was no tendency of higher localization of label retaining cells in the limbus under the conditions of the study.

DISCUSSION

The homeostasis of cells undergoing constant turnover depends on the healthy supply of regenerating cells, as well as an intact interaction between surrounding tissues. In the case of the corneal epithelium, stem cells in the basal limbus supply transient amplifying (TA) cells to the corneal basal layer, which proliferate and slough off the ocular surface after approximately 2 weeks. The proliferation and differentiation of epithelial cells is regulated by stromal-epithelial interaction with keratocytes, the major mesenchymal cell in the corneal stroma. Chemokines and growth factors secreted by keratocytes are

involved in the proliferation and differentiation of the overlying epithelium.¹⁷ We found that although both AM sheets and carrier-free sheets were viable in transplant-recipient eyes, carrier-free transplants demonstrated a more robust layer of fully differentiated cells.

We observed more BrdU labeled cells and fewer Ki67-labeled cells in AM sheets compared with carrier-free sheets after transplantation. Previous studies have shown that cell-cycle kinetics and cell phenotype characteristic of limbal epithelial progenitor cells are preserved during *ex vivo* expansion on AM.^{18,19} The difference in cell-cycle kinetics may be due to the presence of the AM basement membrane, which may modulate epithelial cell adhesion, proliferation, and differentiation.^{18,20,21} In contrast, epithelial cells in carrier-free sheets seem to become integrated into the host tissue earlier, suggesting that the AM may be interfering with interactions between the epithelium and stromal cells. The absence of a carrier will restore epithelium-stromal interactions immediately after surgery, may have several advantages in maintaining a healthy epithelium, and may also allow the regeneration of a normal subepithelial nerve plexus. It can be argued that a larger yield of undifferentiated cells may be preferable in the treatment of stem cell-depleted cases. However, a mature corneal epithel-