

特集：再生医療の臨床応用

総説

多能性幹細胞の T 細胞研究への応用

上田 樹^{*1,2}, 金子 新^{*1}

Pluripotent stem cells as a source for T cell research and clinical application

Tatsuki UEDA^{*1,2} and Shin KANEKO^{*1}^{*1}Department of Cell Growth and Development, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University^{*2}Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University Graduate School of Medicine

(Accepted March 10, 2015)

summary

Recently, promising clinical outcomes of cancer immunotherapy including administration of an anti PD-1 antibody targeting for T cell reactivation has gained particular attention worldwide. Adoptive cell therapy with tumor infiltrating lymphocytes and TCR/CAR (Chimeric Antigen Receptor) transgenic T cells are also under development. Although it has become clearer that the efficacy of adoptive cell therapy correlate with the quality of infusing T cells, antigen specific T cells in patients with chronic infection and cancer have been exhausted. We have succeeded to generate rejuvenated antigen specific T cells by reprogramming to pluripotency and differentiation. In this article, we introduce fundamentals of this technology and describe its potential for adoptive cell therapy in the future.

Key words——regeneration of T cell; antigen specificity; cell exhaustion; adoptive cell therapy; autograft and allograft

抄録

抗 PD-1 抗体などを用いた T 細胞の賦活化による腫瘍免疫療法が最近注目されており、T 細胞を用いた免疫細胞療法においても腫瘍浸潤リンパ球や TCR/CAR (Chimeric Antigen Receptor) 導入などによる方法が徐々に成果をみせはじめている。免疫細胞療法の奏功において分化のあまりすすんでいないメモリーフェノタイプの細胞が重要であることが指摘される一方で、患者体内に存在する抗原特異的 T 細胞は細胞疲弊による機能低下やアポトーシス感受性の増加をきたしているという問題がある。今回我々は細胞疲弊を解除し T 細胞を“若返らせる”方法として iPS 細胞を介した T 細胞再生に成功した。本稿ではこの新しい技術を紹介するとともに、この技術を用いた免疫細胞療法の今後の可能性について述べたい。

はじめに

再生医療における T 細胞再生

再生医療とは生体機能を幹細胞などを用いて復元させる医療である。その臨床応用には大きな期待が寄せられており、昨年 9 月に iPS 細胞から作成した網膜細胞を患者に移植する世界初の手術が行われたことは記憶に新しい。今後、パーキンソン病の治療や心筋再生などさまざまな分野において再生医療の臨床応用がすすむことが期待されている。血液の分野においても赤血球¹⁾や血小板²⁾が iPS 細胞から作成できることが基礎研究において報告されており、

今後献血によらない供給源として実用化に大きな期待が寄せられている。では T 細胞による再生医療についてはどうだろうか。T 細胞による再生医療の大きなテーマとしてあげられるのが免疫細胞療法である。免疫細胞療法とはその名の通りウイルスや腫瘍などに対して攻撃性のある、もしくは攻撃を補助するような免疫細胞を投与する治療である。現在著者らは、iPS 細胞から誘導した T 細胞を用いたウイルスや腫瘍に対する免疫細胞療法を目指した取り組みを行っている。先ほど再生医療は生体機能を復元するための医療であると述べたが、対象疾患が臓器あるいは機能の欠損ではない点が、一般的に言われる再生医療から考えると、T 細胞による再生医療は少し異色といえるかもしれない。

^{*1} 京都大学 iPS 細胞研究所増殖分化機構研究部門^{*2} 京都大学医学部消化器内科

腫瘍に対する免疫療法は2013年サイエンス誌において抗CTLA抗体、抗PD-1抗体、キメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor; CAR) の研究成果を受け“Breakthrough of the Year”に選ばれるなど、現在大きな期待が寄せられている治療の一つとなっている。免疫治療はながらく手術、放射線治療、化学療法に次ぐ第4の治療と考えられながら、なかなか現実的な成果があげられずにいた中で、大きな転換点にあるといえよう。

免疫治療の中でも、免疫細胞療法はこれまで患者体内から取り出した細胞を体外で増殖、あるいは遺伝子操作を行ったものを体内に戻す手法で行われてきた。T細胞の再生について述べるにあたり、そもそもこれまで行われているように体外で増殖させることができるT細胞を、なぜわざわざiPS細胞を用いて再生させる必要があるのか。まずこれについて述べたうえで、実際のT細胞の再生について解説する。

細胞障害性T細胞の特性と細胞疲弊

T細胞は獲得免疫において中心的な役割を果たす。特に細胞障害性T細胞 (CTL) は微生物やウイルス、あるいは腫瘍に対する反応において重要な役割を果たす。T細胞はT細胞受容体 (TCR) によってHLA拘束性に抗原を認識して増殖し、細胞障害性やサイトカイン放出などのエフェクター機能を発揮する。

感染の際にナイーブCD8T細胞が抗原提示細胞によって抗原提示を受けると著しい増殖をとげ、サイトカインの放出や細胞障害性を持つエフェクターT細胞への分化とともに、末梢組織へ遊走し病原体の除去を行う。一部の細胞はメモリーT細胞となって免疫記憶をつかさどり、次の抗原暴露の際の素早い免疫応答を導く³⁾。メモリーT細胞はIFN γ やTNF, IL-2などの様々な炎症性サイトカインの産生能や非常に強い増殖能を持っている。のちに述べるように免疫細胞療法ではこのメモリー細胞を用いることが非常に重要であることが知られている。一方、制御困難な病態、たとえば腫瘍や慢性感染などでは抗原刺激が持続することにより、エフェクターT細胞は炎症性サイトカインの産生能や増殖能、細胞障害能などの機能を失うことが知られており^{4,5)}、これを細胞疲弊 (cell exhaustion) という。細胞疲弊が起きるとエフェクターT細胞は表面にPD-1やLAG-3, CD244, CD160といった多様な抑制性の受容

体を発現し、また容易にアポトーシスを引き起こす。さらに細胞疲弊の影響はエフェクター細胞のみにとどまらず、メモリーT細胞にも変化が及ぶ。メモリーT細胞の一部はIL7やIL-15などのサイトカインに依存して恒常的な自己複製 (self-renewing) を行っており、免疫記憶が長期にわたり維持されている。しかし腫瘍や慢性のウイルス感染症においては持続的なTCR刺激により分化方向への負荷がかかるとともに、サイトカインに対する反応性が低下し、恒常性が失われメモリー機能が果たせなくなってしまう^{6,7)}。

免疫細胞療法とT細胞の質

免疫細胞療法はT細胞免疫治療として患者から採取したT細胞を体外で増殖させた後に体内へ戻す治療で、腫瘍やウイルスの治療として大きな期待が寄せられている。Rosenbergらは、メラノーマの患者に対して腫瘍内に存在するT細胞を体外で増殖させたのちに再輸注する方法で22%のCRを得たと報告している⁸⁾。この中でT細胞のテロメア長、CD27⁺細胞の比率、1ヶ月後の体内での輸注細胞の生存率に治療効果との相関が見られている。言い換えると、テロメアの長い、メモリーT細胞あるいは幹細胞様メモリーT細胞⁹⁾など、いわゆる分化が進んでいない細胞が免疫細胞療法で輸注に適した細胞といえる。すなわち、免疫細胞療法はただ単純に攻撃する細胞の数を増やして投与すれば効果があるわけではなく、輸注する細胞の質をいかにしてあげるかが重要であることを示唆している。しかし先にも述べた通り、腫瘍や慢性のウイルス感染症においてT細胞は細胞疲弊を起こしており、良質の細胞を一定量得ることが難しい。たとえ良質の細胞を少量得ても、それを投与に必要な量 (一般には体重1 kgあたり $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ と考えられている) にするため刺激して増やすことは、テロメア長の短縮やメモリーフェノタイプの喪失につながる¹⁰⁾。免疫細胞療法において治療に適した質の良い細胞を必要量得ることが課題となっている。この課題に対する新しいアプローチとして著者らは、今回iPS細胞を用いたT細胞再生によって細胞疲弊を回復させることができることを報告した¹¹⁾。

T細胞の再生

iPS細胞の特性とTCR再構成

iPS細胞はエピジェネティックリプログラミング

により誘導される自己複製能と多分化能という2つの特徴を持つ細胞である。抗原特異的なT細胞から樹立したiPS細胞はエピジェネティックな情報はリセットされるが、TCR再構成によって不可逆に編集されたTCR遺伝子が決定する抗原特異性の情報は、iPS細胞のゲノムに引き継がれている。これをT細胞へ抗原特異性を維持した状態で再分化することができれば細胞疲弊のない“若返った”T細胞を無限に生み出すことができる。これは免疫細胞療法のための細胞の供給源として非常に有用なツールとなる(図1)。

T-iPS細胞の樹立

まず、著者らはHIV-1のNef蛋白に対する抗原特異的なCD8CTLにSendai virus (SeV)を用いてiPS細胞を樹立した。樹立したT-iPS細胞のTCR再構成を確認したところオリジナルのT細胞と同一であった。すなわちプログラミングを経てもiPS細胞のゲノムには抗原を特異的に判別するための情報が、オリジナルのT細胞から受け継がれていることを確認した。

T-iPS細胞からの抗原特異的T細胞の再分化誘導

次にT-iPS細胞のT細胞への分化誘導をおこなった(図2)。C3H/10T1/2支持細胞上で14日間サイ

トカインを加えた培地で培養を行うことで $CD34^+$ の造血幹細胞あるいは造血前駆細胞に分化誘導することができる¹²⁾。つづいてDelta-like1を強制発現させたOP9間質細胞(OP9/DLL1)上でさらに21-28日間サイトカインを加えた培地で培養を行う¹³⁾と $CD45^+CD3^+CD7^+TCR^+$ のT細胞系統へ分化誘導された。

漫然と維持培養を続けていると分化に伴ってDNA再構成酵素(RAG)が産出されるようになり、TCRを構成するサブユニットのひとつであるTCRA遺伝子に追加の遺伝子再構成がおき、T-iPS細胞で保持されていた抗原特異性が損なわれてしまう。胸腺での正の選択(positive selection)においてTCRシグナルがRAG遺伝子の発現を終結させTCRのさらなる再構成を防ぐことが知られており¹⁴⁾、分化誘導したT細胞系統の細胞のTCRを刺激することでCD8T細胞を産出することに成功した。

再分化T細胞の性質

再分化誘導したCD8T細胞は表面抗原のみならずcDNAのマイクロアレイにおいてオリジナルのT細胞に近い遺伝子発現プロファイルであることを確認した。機能評価において再分化T細胞はオリジナルのT細胞が認識する同じエピトープに対して細胞障害性を示し、同じ抗原でも別のエピトープ

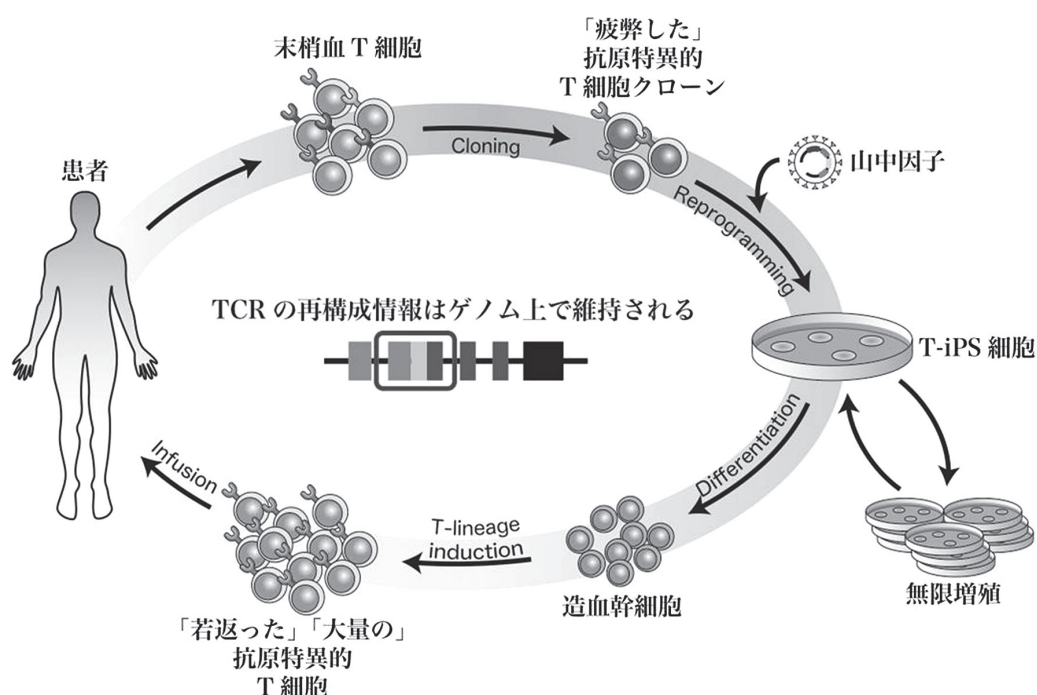


図1 「疲弊した」抗原特異的T細胞からの「若返った」抗原特異的T細胞の再生

T細胞に由来するiPS細胞はゲノムにTCR遺伝子再構成情報を保ち、適切な分化誘導を行えばプログラミング前の抗原特異性を保った大量の若いT細胞が得られる。作図：CiRA 安井 裕

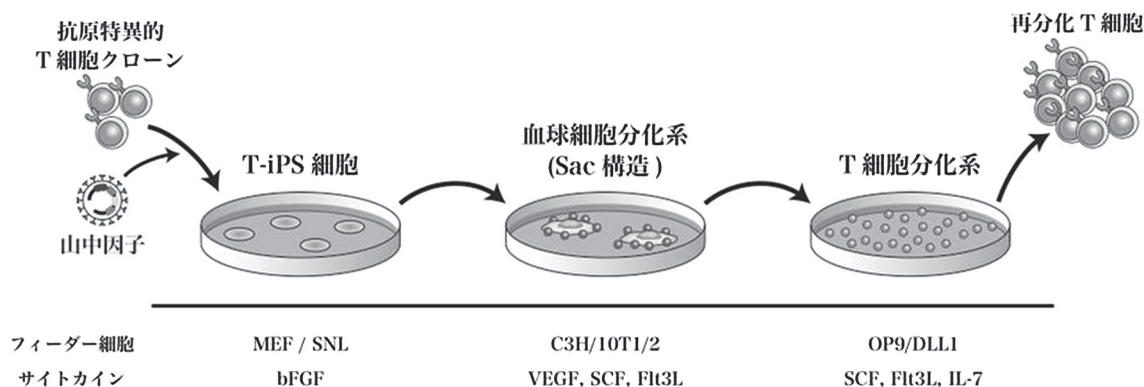


図2 T-iPS細胞の樹立とT細胞への分化誘導

山中因子によって樹立した T-iPS 細胞を C3H/10T1/2 と共培養を行い造血幹細胞あるいは造血前駆細胞に分化誘導する。その後 Delta-like1 を強制発現させた OP9 間質細胞 (OP9/DLL1) と共培養し T 細胞へ分化誘導する。作図: CiRA 安井 裕

や、同じエピトープでも変異の入ったエピトープに対しては細胞障害性を示さず、抗原特異性が維持されていることが示された。再分化 T 細胞は CCR7, CD27, CD28 といったメモリー T 細胞の表面抗原を発現し、オリジナルの T 細胞の 10–100 倍にもおよぶ高い増殖能を示した。また、テロメア長の伸長も確認された。

臨床応用への課題と期待

このように抗原特異的 T 細胞から iPS 細胞を樹立し、それを T 細胞へ再分化誘導することで、理論上抗原特異性を維持したメモリー細胞の表現系を持ち、高い増殖能と伸長したテロメアをもつ“若返った” T 細胞を無限に作成することができることが示された。実際の臨床応用に向けては、再生 T 細胞の体内での機能を含めた動態や、腫瘍化のリスクなどについてマウスや非ヒト霊長類を用いた *in vivo* での評価が必要であり、実際の輸注にあたっては培養環境に含まれる動物由来成分の問題など取り組むべき課題は多いが、今後免疫細胞療法に適した細胞を提供するためのツールとして期待される。

遺伝子操作のプラットフォームとしての iPS 細胞の可能性

iPS 細胞は自己複製することができ、人為的に加えた遺伝子変化を維持するための強力なプラットフォームとなる。ウイルスや非ウイルスによる遺伝子導入のみならず、最近では TALEN¹⁵⁾ や CRISPR/Cas9^{16, 17)} などゲノム編集技術の発達により比較的簡便に遺伝子のノックアウトやノックインを行うことが可能となった。プライマリーの T 細胞に対してこのような技術を用いることも可能であるが、*in*

vitro での長期の培養が exhaustion につながるという問題がある。ゲノム編集を iPS 細胞の段階で行っておけば、その細胞はゲノム編集を受けた T 細胞の無限の供給源となることは iPS 細胞による再生 T 細胞療法の大きな可能性を意味する。

TCR 遺伝子導入とキメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor: CAR)

遺伝子導入を用いた免疫細胞療法において最も開発が進んでいるのが、人為的に抗原特異性を細胞に与える TCR 遺伝子導入や CAR 遺伝子導入である。TCR 遺伝子導入による免疫細胞療法とは腫瘍抗原を認識する TCR を末梢血の T 細胞に遺伝子導入することで、腫瘍に対して細胞障害性を持った T 細胞を作成し治療に用いる方法である¹⁸⁾。一方、CAR とは標的抗原に対する抗体の可変領域の軽鎖 (VL) と重鎖 (VH) を直列に結合させた単鎖抗体 (ScFv) と CD3 ζ 鎖を直列に繋ぎ合わせたものである。CAR を発現させた T 細胞は ScFv で抗原を認識するとシグナルが CD3 ζ 鎖を介して細胞内に伝わり、抗原を発現する細胞に対して細胞障害性を発揮する。TCR と異なり表面抗原のみしか認識できないが、MHC に拘束されずに細胞障害性を発揮することができるという利点を持つ。T 細胞の活性化を増強するために ScFv と CD3 ζ 鎖の間に CD28 や 4-1BB などの共刺激分子を組み込んだ第二、第三世代の CAR の開発もすすんでいる。CAR を用いた免疫細胞療法としては CD19 を標的とした白血病治療など血液腫瘍の分野で大きな成果があげられており現在大きな注目を浴びている¹⁹⁾。患者体内に存在する腫瘍抗原特異的な T 細胞を用いた免疫細胞療法と比べると TCR 導入も CAR 導入もソースとなる T 細胞を先に

述べたような免疫細胞療法に適したメモリー細胞を選択することで、治療効果の増加を期待することができるという利点がある。再生T細胞療法においてもTCRもしくはCARを用いればT細胞に抗原特異性を与えることが可能で、2013年にはCARを導入したT-iPS細胞からT細胞を再分化誘導できることが報告されており、腫瘍株の皮下移植モデルにおいて抗腫瘍効果が示されている²⁰⁾。

ゲノム編集技術などの遺伝子操作による様々な工夫

多能性幹細胞に対する遺伝子導入はウイルスによる方法が一般的であるが、ランダムインテグレーションで導入された遺伝子の発現はしばしば分化中に消失され得ることが、特に神経細胞分化などで知られている²¹⁾。いわゆるサイレンシングという現象である。サイレンシングは遺伝子導入される部位や導入遺伝子の発現プロモーターの影響を受けることが知られている。これに対してSafe Harborとよばれている遺伝子領域は、様々な細胞で転写活性を有し、さらにその領域が欠失してもフェノタイプに影響を及ぼさない。安定した細胞供給と治療効果を目指す上でゲノム編集技術を用いたSafe HarborへのTCRやCARの導入が有用かもしれない²²⁾。またウイルスによる遺伝子導入で起きうるランダムインテグレーションは予期せぬ発癌のリスクがあるため、Safe harborへのノックインはこのようなリスクを避けることにもつながると思われる。

CAR導入免疫細胞療法は非常に強い細胞障害性とサイトカイン産出能による抗腫瘍効果が期待される反面、サイトカインストームなど致死的となりうる強い副作用のリスク^{23, 24)}がある。自殺遺伝子HSV-TKやiCas9の導入は免疫細胞療法において、発症したGVHDを速やかに沈静化することが実証されている^{25, 26)}。安全性の確保のため自殺遺伝子の導入も有用と考える。

免疫細胞療法は全身投与であり、投与した細胞の腫瘍への遊走も重要である。マウスモデルにおいて標的腫瘍が産生するケモカインに対する受容体を導入することにより抗腫瘍効果が増す²⁷⁾という報告があり、こういった様々な遺伝子操作を複合的に用いる際には自己複製能をもつプラットフォームとしてiPS細胞が威力を発揮すると思われる。

同種移植による再分化T細胞療法の可能性

自家移植と同種移植

これまで行われてきた免疫細胞療法は患者から採取した細胞を同じ患者に戻す自家移植を中心としてきた。抗原特異性をもつ再生T細胞による治療もまずは自家移植での臨床応用を考えている。しかし、移植にはもう一つ同種移植という方法がある。本来非自己の細胞は同種抗原に対して強力な免疫反応により生体内から排除されるため、同種移植においてはホストの免疫細胞が投与した細胞を攻撃する拒絶反応と逆に投与したT細胞がホストの細胞を攻撃するGVHDが問題となる。しかし、造血幹細胞移植後の免疫不全状態において、第三者から採取した抗原特異的CTLの投与が十分な治療効果を示す例が報告されており²⁸⁾、HLAをある程度一致させることで同種移植による免疫細胞療法が実際に可能であることがわかってきた。iPS細胞からの再生T細胞療法を同種移植で行う可能性について考えてみたい。

同種移植のメリット

自家移植と比べて同種移植が優れている点として細胞調整に必要な時間とコストが挙げられる。プライマリーの細胞を用いて自家移植するためには細胞の採取、体外での増殖というステップに加えて、遺伝子操作などのステップも加わりうる。iPS細胞による再生T細胞療法においては抗原特異的なT細胞のクローニング、iPS細胞の樹立、再分化を行うというステップがありそれぞれのステップでコストと時間がかかり、これは実用化に向けて一つの課題となっている。同種移植であれば、患者ごとに細胞を調整する必要がない分コストカットにつながるうえ、輸注可能な状態で凍結保存しておけばすぐに使用することができるという利点がある。このように同種移植を念頭に置いた再生T細胞療法にも大きな可能性があると考えられる。

GVHDと拒絶反応

同種移植において問題となるのがGVHDと拒絶反応である。GVHDを回避する方法として2つの方法が考えられる。一つはサイトメガロウイルスやEBウイルスに対する抗原特異性をもったT細胞から樹立したT-iPS細胞を用いる²⁹⁾ことが挙げられる。もう一つはTCRをゲノム編集技術によりノック

クアウトしてしまう方法である。TCR をノックアウトすれば当然内在性の TCR による GVHD を防ぐことができる。さらに TCR 導入の場合、内因性の TCR は導入した TCR とミスペアリングをおこし、予期せぬ抗原特異性を持ちその結果としてさらに GVHD が起こる可能性が危惧されている³⁰⁾。TCR ノックアウトはこのミスペアリングのリスクも避けることにも繋がる。

拒絶反応については、例えば CiRA の HLA ハプロタイプ一致 iPS 細胞ストックに TCR や CAR を遺伝子導入して用いるといった拒絶されにくい HLA ハプロタイプを持つドナーから作成した iPS 細胞を用いる³¹⁾ 方法が考えられる。ゲノム編集による方法としては HLA ホモ接合体のノックインや HLA 自体をノックアウトしてしまう方法も試みられている³²⁾。

その他の T 細胞

CD4T 細胞

これまで、おもに CD8T 細胞を中心に述べてきたが、最後にその他の T 細胞のサブセットについて述べて本稿を終えたい。腫瘍に対する細胞免疫反応は主に CD8T 細胞によるところが大きい。しかし最近では転移性の胆管癌に対して変異抗原に特異的な腫瘍浸潤 CD4T 細胞を体外で増殖させて輸注することで抗腫瘍効果を得た報告³³⁾ があるなど、CD4T 細胞による腫瘍免疫細胞療法も今後期待される治療法である³⁴⁾。また CD4T 細胞による免疫細胞療法は腫瘍の治療に限らない。制御性 T 細胞の免疫細胞療法は関節リウマチや SLE、1 型糖尿病の治療として基礎研究において³⁵⁾ 効果が示されており、今後期待される治療法である。しかし残念ながら CD4T 細胞の再生については、今のところ多能性幹細胞からの in vitro での分化誘導の報告はない。生体内で CD4T 細胞は CD4CD8 陽性 T 細胞を介して胸腺内で分化するが、CD4 T 細胞と CD8T 細胞の分化選択には TCR 刺激の強さと長さに関して理想的なチューニングが必要であり、その人為的な誘導は容易ではないからである。今後の研究成果が期待される。

自然免疫型 T 細胞

T 細胞には CD4T 細胞や CD8T 細胞などの獲得免疫において重要な役割を果たす細胞の他に、TCR が多様性を示さず T 細胞の受容体の V-J の組み合わせが決まっている T 細胞があり、自然免疫

型 T 細胞と呼ばれている。この中にはインバリアント NKT 細胞や粘膜関連インバリアント T 細胞 (Mucosal-Associated Invariant T cell: MAIT cell) があり、いずれも iPS 細胞からの再分化誘導の報告がある^{36, 37)}。特にインバリアント NKT 細胞は腫瘍免疫細胞療法において非常に興味深い細胞である。インバリアント NKT 細胞は MCH 分子に類似した CD1d に提示された糖脂質を認識して迅速に多様なサイトカインを多量に産出するという特徴をもち、適応免疫系への橋渡しを行っている³⁸⁾。肺癌や頭頸部癌の臨床試験において α -galactosylceramide を提示した樹状細胞を投与すると、NKT 細胞が刺激を受けて Th1 サイトカインを放出することで抗腫瘍効果を発揮することが示されている³⁹⁾。しかし、ヒトにおいて NKT 細胞は非常に少なく、多くの症例において体内の NKT 細胞が不足していることが治療効果の妨げとなっている。現在 iPS 細胞から NKT 細胞の再分化誘導の報告はマウスの iPS 細胞に限られているが、ヒトで実現すれば NKT 細胞による腫瘍免疫細胞療法のさらなる発展に寄与すると考えられる。

おわりに

細胞疲弊を解除する新しいアプローチとして T 細胞の再生について解説した。ゲノム編集などの他の新しい技術の進歩は著しく、こうした技術との組み合わせにより今後の新しい免疫細胞療法の可能性が広がる。また CD8T 細胞以外の T 細胞、あるいは T 細胞に限らず樹状細胞などの抗原提示細胞の再生技術の開発も進んでおり、これらの細胞とのコンビネーションによる免疫細胞療法も今後非常に期待される分野と考えられる。

文 献

- 1) Hirose, S.I., et al.: Immortalization of erythroblasts by c-MYC and BCL-XL enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. **1**, 499–508, 2013.
- 2) Nakamura, S., et al.: Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. **14**, 535–548, 2014.
- 3) Klebanoff, C. a et al.: CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev*. **211**, 214–224, 2006.
- 4) Wherry, E.J., et al.: Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribu-

- tion and Results in Distinct Stages of Functional Impairment Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Im. *J Virol.* **77**, 4911–3927, 2003.
- 5) Gattinoni, L., et al.: Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest.* **115**, 1616–1626, 2005.
 - 6) Shin, H., et al.: Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med.* **204**, 941–949, 2007.
 - 7) Wherry, E.J., et al.: Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 16004–16009, 2004.
 - 8) Rosenberg, S. a et al.: Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* **17**, 4550–4557, 2011.
 - 9) Gattinoni, L., et al.: A human memory T cell subset with stem cell-like properties. **17**, 2011.
 - 10) Tran, K.Q., et al.: Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy. *J Immunother.* **31**, 742–751, 2009.
 - 11) Nishimura, T., et al.: Short Article Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation. *Stem Cell.* **12**, 114–126, 2011.
 - 12) Takayama, N., et al.: vitro via ES-sacs , VEGF-promoted structures that concentrate Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. **111**, 5298–5306, 2011.
 - 13) Timmermans, F., et al.: Generation of T cells from human embryonic stem cell-derived hematopoietic zones. *J Immunol.* **182**, 6879–6888, 2009.
 - 14) Turka, L. a et al.: Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science.* **253**, 778–781, 1991.
 - 15) Miller, J.C., et al.: A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol.* **29**, 143–148, 2011.
 - 16) Wyman, J., et al.: Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science.* **339**, 819–824, 2013.
 - 17) Yang, L., et al.: RNA-Guided Human Genome. *Science.* **339**, 823–826, 2013.
 - 18) Schmitt, T.M., Greenberg, P.D.: Re-adapting T cells for cancer therapy: from mouse models to clinical trials. 145–164, 2014. doi:10.1111/imr.12141.
 - 19) Cheadle, E.J., et al.: CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic. *Immunol Rev.* **257**, 91–106, 2014.
 - 20) Themeli, M., et al.: Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* **31**, 928–933, 2013.
 - 21) Xia, X., et al.: Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. *Stem Cells Dev.* **16**, 167–176, 2007.
 - 22) Zou, J., et al.: Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood.* **117**, 5561–5572, 2011.
 - 23) Morgan, R. a et al.: Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther.* **18**, 843–851, 2010.
 - 24) Brentjens, R., et al.: Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther.* **18**, 666–668, 2010.
 - 25) Kaneko, S., et al.: self-renewing central memory human T lymphocytes IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene – modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes. 1006–1015, 2009. doi:10.1182/blood-2008-05-156059.
 - 26) Di Stasi, A., et al.: Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy. *N Engl J Med.* **365**, 1673–1683, 2011.
 - 27) Peng, W., et al.: Transduction of tumor-specific T cells with CXCR2 chemokine receptor improves migration to tumor and antitumor immune responses. *Clin Cancer Res.* **16**, 5458–5468, 2010.
 - 28) Barker, J.N., et al.: Successful treatment of EBV-associated posttransplantation lymphoma after cord blood transplantation using third-party EBV-specific cytotoxic T lymphocytes Brief report Successful treatment of EBV-associated posttransplantation lymphoma after cord blood t. *Blood.* **116**, 5045–5049, 2010.
 - 29) Terakura, S., et al.: Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8+ T cells derived

- from virus-specific central memory T cells. *Blood*. **119**, 72–82, 2012.
- 30) Bendle, G.M., et al.: Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med*. **16**, 565–570, 1p following 570, 2010.
- 31) Okita, K., et al.: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. **8**, 409–412, 2011.
- 32) Rioloobos, L., et al.: HLA engineering of human pluripotent stem cells. *Mol Ther*. **21**, 1232–1241, 2013.
- 33) Tran, E., et al.: Cancer Immunotherapy Based on. *Science (80-.)*. **9**, 641–645, 2014.
- 34) Zanetti, M., Zanetti, M.: Tapping CD4 T Cells for Cancer Immunotherapy: The Choice of Personalized Genomics. *J Immunol*. 2049–2056, 2015. doi:10.4049/jimmunol.1402669
- 35) Haque, R., et al.: Programming of regulatory T cells from pluripotent stem cells and prevention of autoimmunity. *J Immunol*. **189**, 1228–1236, 2012.
- 36) Watarai, H., et al.: Induced pluripotency as a potential path towards iNKT cell-mediated cancer immunotherapy. *Int J Hematol*. **95**, 624–631, 2012.
- 37) Wakao, H., et al.: Article Expansion of Functional Human Mucosal-Associated Invariant T Cells via Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation. *Stem Cell*. **12**, 546–558, 2011.
- 38) Bendelac, A., et al.: The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. **25**, 297–336, 2007.
- 39) Motohashi, S., et al.: Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin. Immunol*. **140**, 167–176, 2011.