OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Development of ARL4C antisense oligonucleotide with reduced off-target effects and enhanced efficacy as an anti-cancer drug
Author(s)	河合, 夏苗
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105676
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨

Synopsis of Thesis

氏　　名 Ｎａｍｅ	河合　夏苗
論文題名 Title	Development of ARL4C antisense oligonucleotide with reduced off-target effects and enhanced efficacy as an anti-cancer drug （オフターゲット効果の低減及び抗腫瘍効果の増強を目指したARL4C標的アンチセンス核酸の研究開発）

論文内容の要旨

〔目　的(Objective)〕

アンチセンス核酸（ASO）は標的mRNAやmiRNAと相補的に結合し、遺伝子発現を制御する一本鎖DNAであり、従来の低分子薬や抗体薬では標的化が困難な分子に対しても直接作用できる新規モダリティとして注目されている。ADP-ribosylation factor（ARF）-like protein 4c（ARL4C）はARFファミリーに属する低分子量Gタンパク質で、WntおよびEGF/Rasシグナルの下流で発現誘導される。ARL4Cは細胞骨格制御を介した細胞運動の調節や、YAP/TAZを介した細胞増殖促進に関与し、多くのがん種で高発現する。当研究室ではこれまでにヒトARL4Cを標的とする15-mer ASO（ASO-1316-A）を開発し抗腫瘍効果を確認したが、その効果は限定的であった。また、核酸医薬における課題として、標的外遺伝子への結合によるオフターゲット毒性が挙げられる。そこで本研究では、オフターゲットリスクの低減と標的結合性の向上を目的として18-merのヒトARL4C標的ASOを探索し、そのオフターゲットリスクおよび抗腫瘍効果を評価した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

*In silico*解析により選抜した18-mer ヒトARL4C標的ASO14種類を合成し、膵がんおよび肺がん細胞株を用いてmRNA抑制効果を評価した。その結果、ASO-1316-Aより高い*ARL4C* mRNA抑制効果を示すASO-2025-A/Lを取得した。ウェスタンブロッティングにより、ASO-2025-A/LはARL4Cタンパク質発現も強く抑制することを確認した。さらに、膵がんおよび肺がん細胞株において、ASO-2025-A/LはASO-1316-Aよりも強い細胞増殖抑制および細胞遊走抑制効果を示した。

次にオフターゲット解析を行ったところ、ASO配列に対してミスマッチまたはギャップが2以内のhuman pre-spliced RNA数はASO-1316-Aが16,813であったのに対し、ASO-2025-A/Lは98であった。これらがコードする遺伝子のうち、実際にRNA-Seqにより遺伝子発現低下が確認されたのはASO-1316-Aで107遺伝子、2025-A/Lで3遺伝子（ARL4C、ZBTB-20、RCHY1）であった。ヒト正常肝細胞において、配列依存的なオフターゲットリスク遺伝子であるZBTB-20及びRCHY1のmRNA発現を抑制したところ、細胞増殖に影響を与えず、2025-A/Lの正常細胞への毒性リスクは低いことが示唆された。さらにエンリッチメント解析により、ASO-2025-A/Lで発現が低下した遺伝子群は細胞接着や細胞間結合に関わる機能を有することが示され、実際に膵がんおよび肺がん細胞株においてがん細胞接着能の低下が確認された。

最後に*in vivo*抗腫瘍効果を確認した。ヒトがん細胞株をヌードマウスの皮下に移植した異種移植膵がん及び肺がんモデルにASO-2025-A/Lを静脈内投与したところ、腫瘍形成が有意に抑制された。腫瘍組織の免疫染色ではARL4C発現の低下およびKi-67陽性細胞率の減少が認められた。生体内でのASO濃度を確認したところ、腫瘍組織中のASO濃度が血清中より高く、ASO-2025-A/Lが腫瘍に蓄積することが示された。さらに、血清ALT/AST値は投与後も変動せず、肝毒性リスクは低いと考えられた。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究では、ヒトARL4Cを標的とする18-mer ASOを開発し、高いmRNAおよびタンパク質発現抑制効果を示すASO-2025-A/Lを取得した。ASO-2025-A/Lは従来の15-mer ASO-1316-Aよりも強力な細胞増殖・遊走抑制効果および細胞接着抑制効果を示し、配列依存的オフターゲットリスクおよび正常細胞毒性リスクも低かった。さらに、膵がんおよび肺がん異種移植モデルにおいて腫瘍形成を抑制した。以上より、ASO-2025-A/Lはオフターゲットリスクを低減し薬効を増強した有望な抗がん薬候補であり、ASO鎖長の最適化が安全性向上の有効なアプローチであることを示した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　河合　夏苗

論文審査担当者	（職）	氏　名	
主　査	大阪大学教授	岡村 康司	署　名
副　査	大阪大学教授	谷内田 真一	署　名
副　査	大阪大学教授	森中 東一	署　名

論文審査の結果の要旨

ヒトADP-ribosylation factor (ARF) -like protein 4c (ARL4C) を標的とする従来の15 mer ASO-1316-Aは、薬効が限定的かつオフターゲットリスクが高いことが課題であった。そこで、18 merのアンチセンス核酸 (ASO) を開発し、高いmRNAおよびタンパク質発現抑制効果を示すASO-2025-A/Lを取得した。ASO-2025-A/LはASO-1316-Aよりも強力な細胞増殖・遊走抑制効果および細胞接着抑制効果を示し、配列依存的オフターゲットリスクおよび正常細胞毒性リスクも低かった。さらに、ヒト膵がんおよび肺がん異所移植マウスモデルにおいて腫瘍形成を抑制した。ASO-2025-A/Lはオフターゲットリスクを低減し薬効を増強した有望な抗がん薬候補であり、ASO鎖長の最適化が安全性向上の有効なアプローチであることを示したことから、本論文は学位の授与に値すると考えられる。