

200833043A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

Duchenne型筋ジストロフィーのエクソンスキッピング誘導治療

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 松尾 雅文

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
Duchenne型筋ジストロフィーのエクソンスキッピング誘導治療	----- 1
松尾 雅文	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 5
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 7

Duchenne型筋ジストロフィーのエクソンスキッピング誘導治療

主任研究者：松尾 雅文（神戸大学大学院医学研究科 教授）

（研究要旨）

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）のエクソンスキッピング誘導治療の臨床応用に向けた研究を行った。ジストロフィン遺伝子の各エクソンにエクソンとしての強さに差があり、エクソンスキッピング誘導に際し潜在的スプライスサイトの活性化が生じ、予想外の治療結果を得る可能性があることを明らかにした。また、エクソンスキッピングの治療をはかるためGMPグレードのアンチセンスオリゴヌクレオチド合成体制の整備、あるいは治療効果判定の指標となるDMDのバイオマーカーの検索をDMD症例を対象として行った。

（分担研究者）

松尾 雅文
神戸大学大学院医学研究科
教授

竹島 泰弘
神戸大学大学院医学研究科
准教授

本研究は神戸大学大学院医学系研究科の松尾雅文と竹島泰弘が共に分担研究者として共同して研究を推進してきた。本報告書は重複を避けるため2名の研究内容をまとめて記したものである。

A. 研究目的

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）は進行性の筋萎縮症で、未だ有効な治療法はない。DMDの多くはジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失により、ジストロフィン

mRNAのアミノ酸読み取り枠にずれを生ずるアウトオブフレーム変異を有している。そのため、欠失の下流でストップコドンが出現し、骨格筋でジストロフィン欠損を呈している。

本研究者は、ジストロフィン遺伝子のスプライシング時にエクソンスキッピングを誘導することにより、アウトオブフレームをインフレームにかえてアミノ酸読み取り枠を修正し、ジストロフィンを産生させるDMDの治療法を世界で初めて提唱した。そして、このエクソンスキッピング誘導治療の実用化に向けた研究を推進している。

神戸大学小児科でフォローしているDMD患者のエクソン欠失型の検討から、エクソン45のスキッピング誘導が最も多くの患者を治療できることが判明し、エクソン45のスキッピングをアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて誘導する治療法を確立する研究を行うものである。

また、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピング誘導を効率的に行う方針を確立するため、DMD患者でジストロフィン遺伝子のスプライシング産物を解析してきたところ、エクソン45のスプライシング時の特性を明らかにしたので報告する。さらに、治療効果を判定するためのバイオマーカーについて検討を行った。

B. 研究方法

①エクソンスキッピング誘導に関する研究

エクソン45のスプライシング誘導治療の治療となる症例数を神戸大学小児科受診中のDMD例で検討した。同時に、エクソンスキッピング誘導能を有するRNA/ENAキメラによるジストロフィン発現能を患者培養筋細胞で検討した。最も重要なことであるRNA/ENAキメラのGMP合成についても引き続き検討した。

エクソン45のスプライシング時にスキッピングを誘導するための検討を重ねた。そして、DMD患者で、スプライシングのコンセンサス配列のスプライスドナーサイトの1番目の塩基のGがAに置換した異常を有しながらも、スプライシングの様式がエクソンにより異なることを見出した。エクソン25では、エクソンスキッピングが誘導され、エクソン45では、潜在的スプライスサイトの活性化がもたらされた。

これらの2つのエクソンに見いだされた変異をin vitroのスプライシング系を用いて解析した。正常と変異のあるエクソン25あるいは45の配列とその両側のイントロン配列のそれぞれを発現ベクターに挿入し、pre-mRNAを産生させた。このpre-mRNAを核抽出液と混じ、そのスプライシング産物をRT-PCR解析した。また、文献報告の中でジストロ

フィン遺伝子の+1G>A変異例を検索し、そのスプライシング様式を検討した。

②治療効果判定のためのバイオマーカー検索

従来、DMDの診断には血清中のクレアチンキナーゼ(CK)が極めて有力なバイオマーカーとして知られていた。このCKが治療効果判定に生かせるか否かをDMD患者のデータを集積し解析した。

また、DMD患者の血清アミノ酸分析を行い、血中アミノ酸のバイオマーカーとしての意義を検討した。

C. 研究結果

①エクソンスキッピング誘導に関する研究

(1)ジストロフィン遺伝子のエクソン45のスプライシング誘導治療対象患者の選定

神戸大学小児科でフォローアップ中のDMD患者の遺伝子異常の解析とそのまとめを行った。その結果、ジストロフィン遺伝子の異常の中で、エクソン45のスプライシング誘導治療対象として、エクソン44を欠失した10例、エクソン46~47を欠失した7例が多い型であることが判明した。

(2)エクソンスキッピング誘導治療

RNA/ENAキメラのエクソンスキッピングの有効性を先に明らかにしたDMD患者由来培養筋細胞で明らかにするため、患者の筋生検で得た筋より細胞を樹立した。そして、RNA/ENAキメラを用いたエクソンスキッピング誘導、並びにエクソンスキッピングによるジストロフィン発現に関して検討した。

(2)GMPグレードのアンチセンスヌクレオチドの合成

GMPグレードのアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成を早急にはかるための準備を行った。

(3) *in vitro*のスプライシング系での検討
正常の配列のpre-mRNAは、スプライシングが正常に進行した。しかし、エクソン25の+1G>A変異はエクソンスキッピングを誘導した。一方、エクソン45の変異ではスプライシング産物として、3種のものが得られた。1つはエクソン45内の潜在的スプライスサイトが活性化されたものであり、1つはイントロン内の同じく潜在的スプライスサイトが活性化されたもの、もう1つはイントロンの配列がすべてあるものであった。

*in vitro*のスプライシングにおいてもエクソン25と45は異なるスプライシング様式を示した。現在まで、こうしたスプライシングのコンセンサス配列の異常では、遺伝子の異常に近接した潜在的スプライス部位の有無がスプライシング様式を決定するとの説が有力であった。実際エクソン45の異常の場合はこの説を支持した。しかし*in vitro*では、エクソン25の変異は潜在的スプライス部位が存在するにもかかわらず、その活性化を起こしていなかった。このことは、スプライス部位の決定は、潜在的スプライスサイトの有無によるのではなく、エクソン自体の性質によることを示した。

そこで、ジストロフィン遺伝子の+1G>A変異の報告例を文献的に調べ、それらの例でのスプライシング様式とエクソンの特性について検討した。その結果、エクソンのスプライシングアクセプターサイトのスコアが高くかつエクソンのサイズが長い特性をもつ4つの強いエクソンが潜在的スプライス部位の活性化をもたらすことが明らかとなった。それ以外の弱いエクソンではエクソンスキッピングをおこすことが判明した。

そこで、DMDのエクソンスキッピング誘導治療の当面の標的となる欠失のホットス

ポットにあるエクソンをこの基準にあてはめて、強いエクソンと弱いエクソンに分けてみた。ジストロフィン遺伝子のエクソン40から60の中で、エクソン45をはじめとして4つのエクソンが強いエクソンに分類された。こうしたエクソンでは、人工的なスプライシング誘導において潜在的スプライス部位の活性化が発生する可能性が指摘された。

②血清バイオマーカーの探索

(1) 血清CK

DMDを治療するに際して、その評価法が大きな課題である。治療に際して運動能力の改善をはかることは必須の要件ではあるが、小児においては筋力の評価は極めて困難である。これまでに神戸大学小児科に受診中のDMD患者の年令毎のCKの変動についての解析を行った。その結果、CKの年令変化には3つのフェーズが存在していた。まず、第一フェーズの6歳まででは、血清CKの値は極めて高い値をとっている。そのCK値はおおよそ10,000IU/l以上である。

こうした極めて高いCK値をとる時期がヒト発生のどの段階からであるかは不明である。そこで、未熟児で生まれた男児でDMDを発症した例の全国調査を実施した。全国の主要な小児科にアンケートを発送した。その結果、回答のあった施設から2例の報告があり、神戸大学の1例を合わせて計3例の未熟児発症例を見出した。3例の未熟児発症例について今後周産期のCKの変化について検討してゆく予定である。この結果から、DMD患者でCKの上昇する時期を明確にし、DMDの治療法の確立の暁には、これを指標とすることが可能である。

また、DMD患者の血清CKは6歳を過ぎて急激に低下するフェーズと、10歳を過ぎて比

較的低いレベルを維持するフェーズもあることが判明した。今後、DMDの治療開始の際にはこの様なフェーズの変化も効果判定に有用と考えられた。

(2) アミノ酸

DMD患者の血中アミノ酸分析を行い、病態の解明に有用なバイオマーカーの探索を行った。33種のアミノ酸を一挙に解析し、その病態との関連について検討した。その結果、1つのアミノ酸がDMDのバイオマーカーになり得る可能性が判明した。今後、さらに検討を加え、新しいバイオマーカーとしての意義を明らかとする。

D. 考察

①エクソンスキッピング誘導に関する研究
ジストロフィン遺伝子のエクソン45のスキッピング誘導治療において、より良い治療効果を挙げるための検討を行った。そして、ジストロフィン異常症患者で発見したエクソン45のスプライシングドナーサイトの遺伝子の異常について解析し、エクソン45のエクソンスキッピング誘導に際しては、潜在的スプライスサイトの活性化などの副次現象の発生の可能性が明らかとなった。この発見は今後のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたエクソンスキッピング誘導治療において極めて重要な点である。

GMPグレードのアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成についても進展がみられ、実際の治療への展開を期待されることとなった。

②バイオマーカーの検索

DMDのバイオマーカーとして血清CKの意味づけに成功したので今後これを指標と

した治療評価を行うことが可能となった。

E. 結論

本研究課題でエクソンスキッピング誘導治療の臨床応用に向けた研究成果が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
一覧表参照
2. 学会発表
一覧表参照

H. 知的財産権の出願・登録状況 (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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松尾雅文 (竹島泰弘, 中里俊晴)	遺伝病の患者サポートと諸問題	高岡裕、久野慎一、 大田美香、清野進、 高井義美	実践ゲノムの最前線	六然社	東京都	2009	302-310

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
Habara, Y. Doshita, M. Hirozawa, S. Yokono, Y. Yagi, M. Takeshima, Y. Matsuo, M.	A Strong Exonic Splicing Enhancer in Dystrophin Exon 19 achieves proper splicing without an upstream polypyrimidine tract	J Biochem.	143	303-10	2008
Zhang, Z. Takeshima, Y. Awano, H. Nishiyama, A. Okizuka, Y. Yagi, M. Matsuo, M.	Tandem duplications of two separate fragments of the dystrophin gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy	J Hum Genet.	53	215-9	2008
Kimura, S. Ito, K. Ueno, H. Ikezawa, M. Takeshima, Y. Yoshioka, K. Ozasa, S. Nakamura, K. Nomura, K. Matsukura, M. Mitsui, K. Matsuo, M. Miike, T.	A 2-bp deletion in exon 74 of the dystrophin gene does not clearly induce muscle weakness	Brain & Development	18	672-7	2008
Nisiyama, A., Takeshima, Y., Zhang, Z., Habara, Y., Tran, TH., Yagi, M. and Matsuo, M.	Dystrophin nonsense mutations can generate alternative rescue transcripts in lymphocytes.	Ann Hum Genet	72	717-24	2008
Awano, H., Takeshima, Y., Okizuka, Y., Saito, K., Yagi, M. and Matsuo, M.	Wide ranges of serum myostatin concentrations in Duchenne muscular dystrophy patients.	Clin Chim Acta	391	115-7	2008

学会発表

発表者氏名	演題名	学会名	発行年
Okizuka, Y. Awano, H. Yagi, M. Takeshima, T. Matsuo, M.	Splicing errors caused by small mutations in the dystrophin gene are different between lymphocytes and muscle tissues.	Pediatric Academic Societies' 2008 Annual Meeting	2008
Yagi, M. Yamamori, M. Morioka, I. Yokoyama, N. Okamura, T. Nakamura, T. Sakaeda, T. Matsuo,	VEGF 936C>T is predictive of retinopathy of prematurity in Japanese infants with gestational age of 30 weeks or less.	The American Society of Human Genetics 58th Annual Meeting	2008
Takeshima, Y. Yagi, M. Okizuka, Y. Awano, H. Zhang, Z. Saiki, K. Matsuo, M.	Mutation spectrum of the dystrophin gene in 433 Japanese dystrophinopathy cases.	The American Society of Human Genetics 58th Annual Meeting	2008
起塚 庸、栗野宏之、八木麻理子、竹島泰弘、松尾雅文	MLPA法で異常を示したジストロフィン遺伝子のナンセンス変異の1例	第50回日本小児神経学会	2008
八木麻理子、栗野宏之、起塚 庸、松尾雅文	ジストロフィン遺伝子の微小変異によって誘導されるスプライシング異常に関する検討	第50回日本小児神経学会	2008
起塚庸、竹島泰弘、八木麻理子、栗野宏之、張竹君、斉木加代子、松尾雅文	ジストロフィン異常症433例における遺伝子変異解析	第53回日本人類遺伝学会	2008
八木麻理子、竹島泰弘、栗野宏之、起塚庸、張竹君、斉木加代子、松尾雅文	ジストロフィン遺伝子重複変異症例における遺伝子型と表現型の関連	日本人類遺伝学会分科会 第8回臨床遺伝研究会	2008

遺伝病の患者サポートと諸問題

はじめに

遺伝性疾患は大きく単一遺伝子病、染色体異常症、多因子遺伝病に分けることができるが、通常、遺伝病という場合、単一遺伝子病を指す。遺伝病に分類される疾患は多岐にわたり、疾患自体に対する治療法の有無や障害の重症度などが疾患により様々であるため、患者・家族の抱える問題点も疾患により異なる。

たとえば、アミノ酸代謝異常症の代表的な疾患であるフェニルケトン尿症は、以前は重篤な知的障害を残す疾患であったが、1950年台にフェニルアラニン制限食という治療法が開発されたことにより、今日では多くの患者が成人になっても通常の社会生活を営んでいる。また、リソソーム蓄積症であるゴーシェ病、ファブリー病は、近年、酵素補充療法が開始されたことにより疾患のコントロールが可能になった。一方、遺伝病の中には有効な治療法が無く、対症療法のみによって対応せざるを得ない疾患も多い。そのような疾患の患者・家族は、患者のQOL改善に関わる医療的、心理的、社会的な多くの問題を抱えている。また、遺伝病の患者・家族にとっては、遺伝する疾患であるということ自体も大きな問題である。

本稿では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを例に挙げ、患者・家族の抱える諸問題を示し、そのサポート体制のひとつである患者会の問題点と意義を具体的に述べる。

I. 筋ジストロフィーの病態

(1) デュシェンヌ型筋ジストロフィーの病態

筋ジストロフィーとは遺伝性進行性の筋萎縮症であり、原因遺伝子により30以上に分類されている。その中で最も頻度の高い疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。デュシェンヌ型筋ジストロフィーはX染色体上に位置するジストロフィン遺伝子異常により筋細胞においてジストロフィン蛋白が欠損するために発症し、その頻度は出生男児3500人に1人と非常に高頻度である。

乳幼児期に運動発達の遅れで気づかれるが、中には偶然採血した際に高CK血症(乳幼児期では通常10000 IU/L以上)を指摘されたことを契機に診断されることも多い。症状の年齢による変化を図1に示す。処女歩行の遅れがみられることもあるが、歩行は可能となる。しかし、幼児期から学童期にかけて登はん性起立、動揺性歩行、尖足、側彎がみられるようになり、同年齢の児童との運動機能の差が明確になる。そして、小学校半ばころより遅くとも12歳までには車椅子生活となる。また、10歳代より呼吸筋・心筋の障害による呼吸不全・心不全が進行する。呼吸機能は10歳台より低下がみられ、10歳代後半から20歳前後で人工呼吸療法を要する症例が多い。心機能障害については、早い例では10歳台前半より心不全治療を要することがあり、10歳台後半では多くの例で心機能の低下がみられる。およそ1/3の症例で精神遅滞がみられるが進行性ではない。

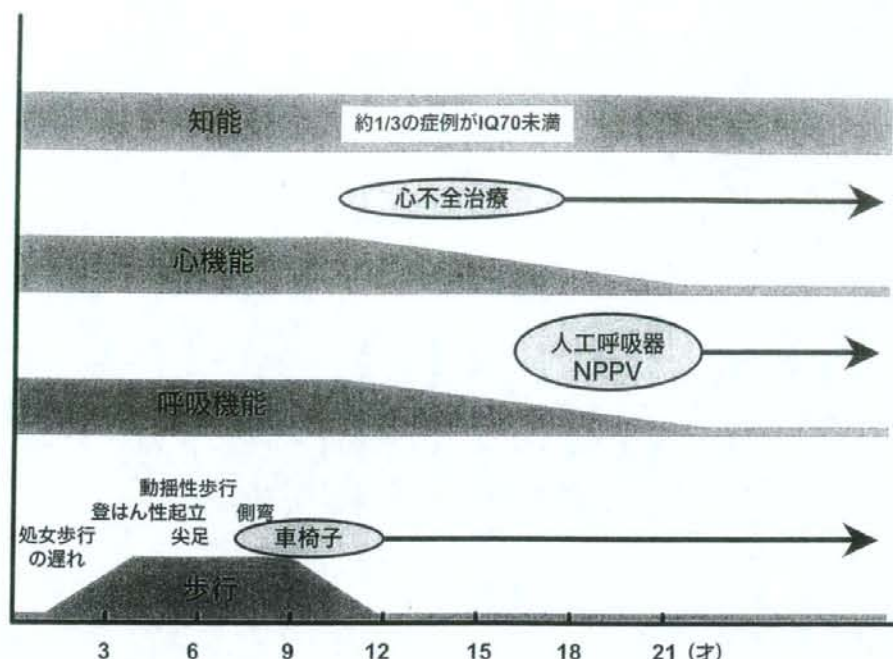


図1 デュシェンヌ型筋ジストロフィーの症状の年齢による変化。歩行・運動機能：処女歩行の遅れがみられることもあるが、歩行は可能となる。しかし、幼児期から学童期にかけて登はん性起立・動揺性歩行・尖足・側弯がみられるようになり、小学校半ばころより遅くとも12歳までには車椅子生活となる。

呼吸機能：10歳台より低下がみられ、10歳代後半から20歳前後で人工呼吸療法を要する症例が多い。

心機能：早い例では10歳台前半より心不全治療を要することがあり、10歳台後半では多くの例で心機能の低下をみる。

知能：およそ1/3の症例で精神遅滞がみられるが進行性ではない。

(2) 病気の診断・告知

運動発達の遅れあるいは高CK血症により専門病院を紹介され、ジストロフィン遺伝子解析あるいは筋生検によって確定診断される。多くの場合患者が小児であるため診断は両親に伝えられることになるが、「筋ジストロフィー」という病名を伝えられた両親の精神的な負担は大きい。先天異常を有する子どもを生んだ後の親の心理過程を、Drotarらは、ショック・否認・悲哀と怒り・適応・再起の5段階で説明している。実際の臨床の場において必ずしもこのような段階を踏むわけでは無いと思われるが、両親が疾患を受容せずして医療的な支援を行うことはできない。時間をかけて受容に導くことが第一段階である。

患者の成長とともに、患者に対する病気の告知という問題がでてくる。いつ、だれが、どのように説明するかということである。家族・病院・学校間で連絡をとり、患者にとって最善の方法を模索するが、もちろんこれに対する模範解答があるわけではない。患者の体験談の中には、小学校に入り友人との運動能力の差が日に日に広がっていく状況で、「実は病気であるということ」を伝えられたことによって救われた」というものもある。医療者が考える以上に「告知」には多くのバリエーションがあり、画一的に考えるものではないであろう。

II. 患者と家族への支援

(1) 医療的支援

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する医療的な支援は、病気の進行によってそのポイントが異なる。各病期における医療的な介入を図2に示す。乳幼児期は先に述べたように確実な診断が第一である。歩行可能な学童期は、関節拘縮を予防することが重要であり、特に足関節の拘縮による尖足が歩行機能を大きく左右する。さらに病期が進行すると呼吸不全・心不全に対する医療的な介入が必要となる。呼吸不全に対しては従来の気管切開ではなく、鼻(口)マスクによる非侵襲的人工呼吸療法(noninvasive positive pressure ventilation: NPPV)が導入され、患者のQOLが大きく改善している。

(2) 学校生活・社会生活

多くの遺伝病は身体的あるいは知的な障害を有しており、そのことが学校生活あるいはその後の社会生活における大きな問題点となる。

平成18年6月の学校教育法改正(平成19年4月施行)により、従来の特殊教育は特別支援教育となった。特別支援教育とは、「障害のある幼児児童生徒の自立や社会参加に向けた主体的な取り組みを支援するという視点に立ち、幼児児童生徒一人一人の教育的ニーズを把握し、

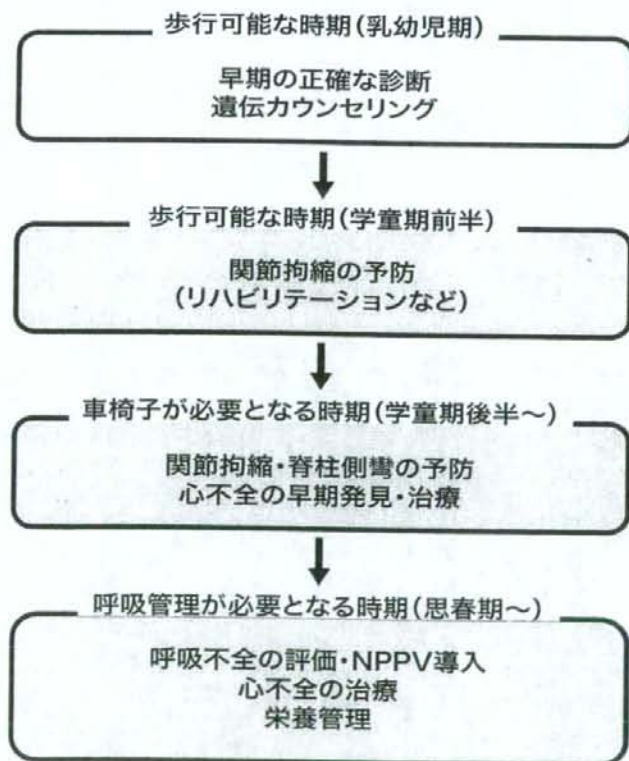


図2 デュシェンヌ型筋ジストロフィーの各病期の対応。

その持てる力を高め、生活や学習上の困難を改善又は克服するため、適切な指導及び必要な支援を行うもの」と説明されており、障害のある幼児児童の教育にとどまらず、自立や社会参加のための主体的な取り組みの支援を行うという視点に立っている。

このような変化の中、従来は療養所に入所し小学校より特別支援学校（以前の養護学校）に通う患者が多かったが、最近ではほとんどの患者が地域の小学校に通っており、また中学校においてもその傾向が強くなっている。中には普通高校に入学し、心不全治療を行い、NPPVを装着しながら大学を卒業する患者もいる。普通学校においても障害をもった生徒がバリアフリーで過ごせる環境作りが求められている。

障害を有する患者の教育は、普通学級での教育、普通学級で教育を受けながら特別支援学級（以前の特殊学級）に通う（通級）、特別支援学級での教育、特別支援学校での教育と大きく4つに分けられるが、一概に普通学校・普通学級が優れているわけではない。患者・家族・学校・医療者が話し合い、個々の患者で最もしい方法を選択することが必要である。

障害を有する患者の社会への進出については、リハビリテーションによる障害の克服が社会生活復帰への一つの方法であるが、筋ジストロフィーなどの進行性の遺伝病にはあてはまらない。障害に関する国際的な分類として、平成13年に従来の国際障害分類に変わって、国際生活機能分類がWHOにおいて採択された。概念を図3に示す。従来の国際障害分類は身体機能の障害による生活機能の障害（社会的不利）を分類するという考えに基づいたものであったが、国際生活機能分類は、例えばバリアフリー等の環境因子を評価するように構成されている。あくまでも分類法の一つであるが、疾病による障害を見るのではなく、健康状態と環境因子・個人因子から生活機能をみるというものであり、障害者が社会で活動する上での、社会の在り方の方向性を示しているものといえる。

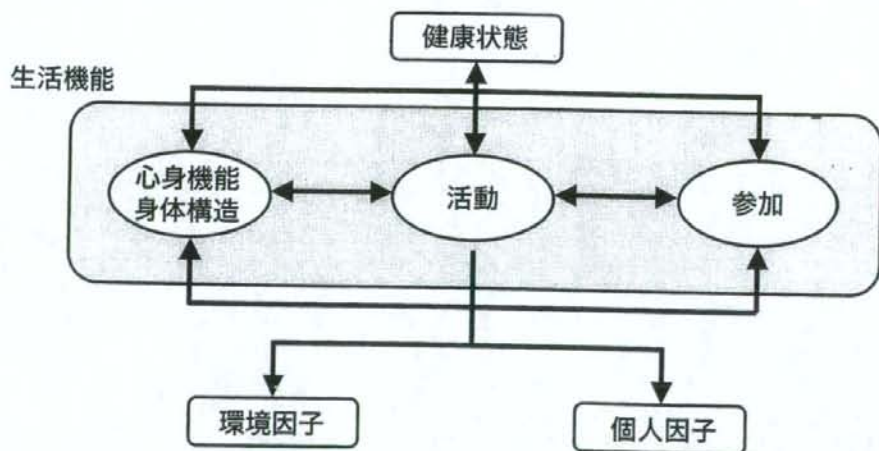


図3 国際生活機能分類。従来のように障害というマイナス面を評価するのではなく、「心身機能・身体構造」、「活動」、「参加」の3要素を「生活機能」として評価する。そして、「生活機能」に影響を及ぼす因子は「疾病」より広い概念である「健康状態」であり、また、「環境因子」「個人因子」であるという考えに基づく。各語の意味は以下の通りである。「健康状態」：「疾病」に変わってより広い概念となり、疾病・外傷・ストレス・妊娠などを含む。「心身機能・身体構造」：心・体の働き、身体の部分。「活動」：生活行為全般。「参加」：家庭や社会生活で役割を果たすこと。「環境因子」：人を取り巻く物的・人的環境、制度。「個人因子」：年齢、性別、価値観など。

(3) 遺伝

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは X 連鎖遺伝病であるため、通常は男児にのみ発症する。およそ 1/3 は突然変異であるが、残りは遺伝性であり母親は保因者である。また患者の姉・妹も保因者の可能性がある。家族にとって次子が罹患者として出生してくるのか、あるいは患者の姉・妹が保因者であるのかということは深刻な問題である。他の遺伝病においても、遺伝に関する事項は患者のケアとともに大きな問題であり、医療的な支援のみならず心理的支援、社会的支援が不可欠であるが、遺伝に関する諸問題の詳細は他稿を参照していただきたい。

(4) 根治治療の取り組み

デュシェンヌ型筋ジストロフィーをはじめとした遺伝病は、通常、単一遺伝子の異状によって発症する。従って、正常な遺伝子を導入することが治療法の一つとして考えられるが、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対してジストロフィン遺伝子を導入する治療は未だ臨床に應用できる成果を上げていない。そのような中で、我々は遺伝情報を修正するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療を開発し、臨床における有効性を明らかにしている。

このような根治治療の開発が、多くの遺伝病においても現在進行している。このような成果によって、近い将来遺伝病が克服される可能性があり、そのことが患者・家族の毎日に生活における大きな希望の光となっている。

(5) 患者会の意義

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する根治治療への取り組みが進むものの、現時点では満足いくものではない。また、心不全・呼吸不全などに対する医療的介入は日々進歩しているものの、それのみによって患者・家族の生活が満足いくものになるわけではなく、心理的・精神的支援、社会的支援も不可欠である。このような点は、筋ジストロフィーのみではなく、多くの遺伝病において共通するものである。

そのような中で、患者会は次のような意義を有している。①医療者との交流あるいは患者間での交流によって疾患自体のこと、疾患による障害への対処の方法などを正しく知ること、②お互いに励ましあって病氣と戦う気概をもつこと、③福祉の面において、また新たな治療法開発などの医療面において社会に対して働きかけること。

次項で筋ジストロフィーの患者会の事例を挙げ、具体的活動内容とその問題点について述べる。

III. 患者会の活動

ここでは患者会の事例としてハッピースマイルクラブ(以下、HSC と略記)の活動を解説し、その問題点を患者・家族の視点から考察する。

(1) 患者会の概要と設立経緯

HSC は神戸大学の大学病院を受診した筋ジストロフィーの患者・家族の会で、患者の多くはデュシェンヌ型である。この会の会則には「患者と家族の生活の質の向上と精神的な支援を図ることを活動の目的」とし、この目的を実現するために「①会合・親睦会の開催、②医療・福祉・教育情報の交換、③その他目的に合致する事業」を行うと定めている。2008年6月現在、一般会員(患者・家族:89名)と専門会員(医療者:6名)からなり、未成年の患者が多いことか

ら、一般会員の多くは患者の保護者である。

医療者が限られた診察時間内に、患者や家族に遺伝子治療やリハビリテーションの詳しい情報を説明するのは困難である。そのため来院した患者を集めて説明会を開催したのが HSC の始まりである (2002 年 3 月)。初めは会員数が少なく、説明会に集まる患者が相互に情報交換が可能であったが、会員数の増加に伴ってそれが困難になった。前項「(5) 患者会の意義」に記した事項を実現しようとする、患者相互の情報交換が不可欠であり、これを促進しようすると、患者の連絡先などの個人情報を他の患者と交換する必要が生じる。しかし、守秘義務がある医療スタッフが患者会の運営管理に当たっている場合は名簿の発行などが難しい。そこで、運営管理の主体を医療スタッフ側から患者家族側に移管した (2004 年)。医療者は来院した患者に HSC とその登録方法を紹介し、任意で HSC に登録してもらう方式になっている。

患者会の設立にあたっては、最初から患者・家族が主体となって立ち上げるのは困難な場合が多い。最初は医療者が主体となって患者会の母体を作り、その運営をしながら活動のコアとなる会員を探し、上記のように患者会の運営を託すと医療者と患者・家族が相補的な関係を作ることができる。

(2) 患者・家族間の情報交換

HSC が設立されて間もなく、1 年に 1 回の医療情報の提供だけでなく、日常的に介護や地域情報を交換して QOL 向上につなげたいとの要望が患者・家族からあり、電子メールによるメイリングリスト (以下、ML) を立ち上げた。最初は医療者が ML の管理を行っていたが、患者会の運営移管と同時に ML の管理を患者・家族に移した。会員の ML への登録は任意であるが、登録前に ML 運用規定に同意することを条件にしている。この運用規定は会員が安心して投稿できる環境作りが第一の目的で、①誹謗中傷の禁止、②投稿記事の無断転用禁止、③投稿記事の免責、など会員が守るべきルールからなる。また、ML 運営の円滑化を図るために、ML 管理者の仕事 (権限と義務) を明確にしている。

会員は実名を伏せ、ハンドルネームで投稿可能である。これと ML の特性から、①匿名化、②(事実上の)リアルタイム化、③グローバル化、④情報の共有化を実現している。特に④に関しては、後から入会する会員も過去の投稿記事を閲覧できるようにしてある。

当初の ML の目的は地域情報や介護情報の交換であったが、交信を続けるうちに障害児を持つ親の「悩み相談」や「教育問題」、それに対する経験者からの励ましのメールが増えてきた。ML に流れる情報 (話題) を分類すると、次のとおりである。

a) 会合の案内・報告

定期的で開催される総会や散発的なオフラインミーティング (有志集会) の案内や報告である。同時に参加表明者リストも流しているので参加者数を把握するのに便利である。

b) 介護・介助用品の紹介・入手方法

車椅子や福祉車輛など選択時のポイントや展示会場などの情報が多い。自作の介助器具の情報もある。関西地区の地域情報が多い。

c) 悩み相談

筋ジストロフィーの告知を受けた子どもの親が、精神的なショックや将来への不安から

経験者(先輩)に質問するケースが多い。(表1(a)参照)先輩からの情報で将来を予測し、子どもの病気を受容する効果もあるが、先輩が質問に答えて自分の経験を投稿して後輩を励ます過程を通し、逆に先輩自身が励まされる効果もある。MLのこの種の記事には自助グループの典型的な特徴が現れており、このような精神的なケアは医療者だけで実現するのは難しい。

d) 教育問題

教育問題も親の悩み的一种であるが、親の精神的な問題だけではなく教育制度や運用上の問題が大きいので別項目に分けた。前項「(4) 学校生活・社会生活」で述べた特別支援教育の「主体的取り組み」は地域格差が大きいのが実情で、普通学校に入学した患者が実質的な差別を受けている場合がある。

表1(b)の例は音楽室など特別教室への移動を伴う授業が受けられないことを訴えている。

表1 メイリングリストの投稿記事の例(名前は仮名、本文は原文どおり)
「CPK」は「CK」と同義、「DMD」は「デュシェンヌ型筋ジストロフィー」の略

(a)「悩みごと」の例

うちの子は、6ヶ月のときに高熱が出て、母乳を飲まなくなったので、心配になって検査をうけました。それで、偶然にCPKの数値が高いのが見つかってしまいました…。病名がはっきりするまで、とてもつらい日々でした。もちろん、はっきりDMDだと判ったときは、地獄に突き落とされたようでしたが。

今回、少しお聞きしたいことがあります。発達のことなんです、今1才3ヵ月でまだつかまり立ちが出来ていません。移動もハイハイではなくて、お尻でにじって進みます。みなさんのお子さんは、どうでしたか？歩けるようになるのか心配してしまいます。

(花子:和歌山県)

(b)「教育問題」の例

今年から息子が中学生になり、学校生活を送るにあたって、いろいろ問題が出てきましたので、みなさんのお力をお借りできればと思いメールさせていただきました。

入学する前は、昇降機があり、学校の校舎の1階から2階へ移動するのに問題は無いように説明を受けていたのですが、いざ入学してみると、昇降機が息子の体に合わない・車椅子から昇降機へ息子を移せられないなど、学校側から言われ、移動を伴う授業の場合は、一人教室で自習をしています。

以前、何かの新聞等で車椅子ごと、階段を登れるのを見た記憶があるのですが…(本来ならエレベータが一番望ましいのですが、予算の関係で無理だと言われていて、普通の学校へ通うのはハードルが高いです)実際、学校生活を送られているご家族の方で、私のような問題をクリアしている方がいましたら情報をお願いします。

(太郎:愛媛県)

る。しかし、他の地域では専任の教員が児童生徒を特別教室まで担ぎ上げている。設備の面では学校のバリアフリー化は経費が必要なので簡単な問題ではないが、体制の整備や運用の面では障害者教育に対する学校の基本的姿勢の違いが地域格差となって現れている。

患者本人への告知の問題の他に、教師や同級生・PTA への告知が問題になる場合がある。遺伝病の性質上、病気を秘匿したい親の要求と、告知しないと周囲の理解と協力が得られないジレンマがある。未就学児童の場合は病態が潜在化しているため、周囲に告知しない例が見られるが、顕在化する学童期には学校への告知が行われる。この場合、教師が同級生に患者の病気を理解させる方法が問題になることがあり、障害者支援の専門知識を有する教師の養成や研修の必要性を感じる。

このような地域格差や教師のスキルの問題を解決するためには、優良地域の情報を発信して患者・家族に具体的な交渉材料を提供する必要がある。MLによる情報交換を通して、患者・家族間の情報交換の重要性が更に高まったと言える。

e) 医療情報

医療に関する情報を大別すると患者の容態を訴える医療相談と先進医療などの情報提供に分かれる。医療相談に対する医療者の回答は一般論に留まる。MLでは個別の対応ができないので医療機関の受診を促すことになる。先進医療情報に関しては新聞やホームページなどに掲載された遺伝子治療関連の情報が多く、ほとんどが国内情報である。患者・家族は新聞の解説記事などは理解できるが、専門情報は専門用語の壁に阻まれて理解が困難で、専門家の解説が必要になる。

上記の例で分かるように、MLによる情報交換の存在意義は大きい。しかし、会員の情報リテラシーには個人差があり、これが問題になる場合がある。MLに登録はしているが、パソコンが苦手なMLを活用していない場合や、記事を読んではいるが、文字による自己表現が苦手な議論に参加できない場合などがその例である。このような場合、患者・家族が集まって顔を合わせて話し合う会合(オフラインミーティング)が最も基本的な情報交換の手段であり、相互に親睦を深め、信頼関係を築くために重要である。MLでは議論しにくい話題もある。このため、会合をなくすことはできないが、障害者用トイレや会場の収容人数の問題があり、安価な会場確保に苦慮する場合が多い。情報手段が多様化して便利になる一方で、情報リテラシーや情報環境などによる実質的な差別を少なくする努力が求められており、患者会の運営で対応が難しい問題の一つである。

(3) 個人情報の管理と内部開示

特に遺伝病の場合、患者・家族にはその形質を社会的に秘匿したい要求がある。そのため会員名簿などの個人情報、特にパソコンと記録媒体に関しては「個人情報の保護に関する法律」に準じた管理を行っている。

会員名簿の内容は氏名・住所・郵便番号・電話番号・電子メールアドレスで、名簿に記載を希望する会員にのみ紙で配布することになっている。HSC内部でこれらの情報を開示または非開示にする選択は入会時に任意で行っている。しかし名簿発行に伴い、患者の年齢も名簿に記載

して欲しいとの要求が出ている。これは同年齢の障害児を持つ保護者同士が親しく情報交換したいという願望から発生した要求である。しかし入会時の登録情報には患者の年齢が含まれていないため、名簿に年齢を掲載しようとするとう全会員から改めて個人情報を集める必要がある。このように患者会を設立する場合は、個人情報の内部開示の制度設計に注意を払い、可能な限り早い時期に問題点を見つけて会員数が増加する前に改善しておく必要がある。

(4) 患者会の社会的役割

上記では患者会内部における患者・家族相互の関係を論じた。しかし、遺伝病の新たな治療法が開発されれば、その研究を促進し、治療法を確立普及させるために、患者会は社会的な働きかけを通して医療者を支援する役割を演ずることになる。患者・家族はその日が訪れるのを待ち望むだけでなく、他の患者会や福祉団体などとの交流を図るなどしてその準備を進める必要がある。

患者会が社会的役割を果たすためには内部のまとまりが大切である。患者・家族は医療者の研究開発に大きな期待を寄せているが、報道される最先端の研究成果と実際の臨床現場とのギャップにも注意を払う必要がある。あまりにも過大な期待から来る反動が患者会の危機につながらないように、患者・家族の期待と関心を集めると同時に常に正確な情報を提供するバランス感覚が必要である。このためには患者会のコーディネータと医療者間の対話と意思疎通が重要な鍵になる。

参考図書

- 野村文夫ら編、チーム医療のための遺伝カウンセリング入門、中外医学社 (2007)
河原仁志編、筋ジストロフィーってなあに? (改定第2版)、診断と治療社 (2008)
竹島泰弘ら、小児科臨床, 59, 1891-1901 (2006)

A Strong Exonic Splicing Enhancer in Dystrophin Exon 19 Achieve Proper Splicing Without an Upstream Polypyrimidine Tract

Yasuaki Habara¹, Mari Doshita², Sadako Hirozawa², Yuka Yokono², Mariko Yagi^{1,*}, Yasuhiro Takeshima¹ and Masafumi Matsuo¹

¹Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe 650-0017; and

²Kobe Pharmaceutical University, Kobe 658-8558, Japan

Received October 17, 2007; accepted November 3, 2007; published online November 26, 2007

Proper splicing is known to proceed under the control of conserved *cis*-elements located at exon–intron boundaries. Recently, it was shown that additional elements, such as exonic splicing enhancers (ESEs), are essential for the proper splicing of certain exons, in addition to the splice donor and acceptor site sequences; however, the relationship between these *cis*-elements is still unclear. In this report, we utilize dystrophin exon 19 to analyse the relationship between the ESE and its upstream acceptor site sequences. Dystrophin exon 19, which maintains adequate splicing donor and acceptor consensus sequences, encodes exonic splicing enhancer (dys-ESE19) sequences. Splice pattern analysis, using a minigene reporter expressed in HeLa cells, showed that either a strong polypyrimidine tract (PPT) or a fully active dys-ESE19 is sufficient for proper splicing. Each of these two *cis*-elements has enough activity for proper exon 19 splicing suggesting that the PPT, which is believed to be an essential *cis*-element for splicing, is dispensable when the downstream exon contains a strong ESE. This compensation was only seen in living cells but not in 'in vitro splicing'. This suggests the possibility that the previous splicing experiments using an *in vitro* splicing system could underestimate the activity of ESEs.

Key words: acceptor site sequences, dystrophin, exonic splicing enhancer, polypyrimidine tract, splicing.

Abbreviations: AO, antisense oligonucleotide; AR, ampicillin resistant gene; BMD, Becker muscular dystrophy; BPS, branch point sequence; CV, Shapiro's splice site consensus value; DK, dystrophin Kobe; DMD, Duchenne muscular dystrophy; dys-ESE19, dystrophin exonic splicing enhancer 19; ESE, exonic splicing enhancer; PPT, polypyrimidine tract; RT-PCR, reverse transcription-PCR.

The dystrophin gene, one of the largest genes in the human genome, is characterized by the extraordinary length of its introns (1), and its splicing regulatory mechanism is not fully understood. In dystrophin Kobe, which harbours a 52 nt deletion in exon 19 of the dystrophin gene, exon 19 was totally skipped in mature mRNA; however, this deletion does not disturb either splicing donor or acceptor site consensus sequences (2). This exon skipping suggested that the deleted region contains an exonic splicing enhancer (ESE), a *cis*-acting splicing signal located within an exon that stimulates the inclusion of that exon in the mature mRNA (3). ESEs are thought to be recognized by protein factors such as SR proteins, which comprise a family of splicing factor containing an N-terminal RNA-binding domain and a C-terminal RS (arginine/serine-rich) domain (4). The exon 19 skipping observed in patients was replicated when an antisense oligonucleotide (AO), which hybridized to the region deleted in dystrophin Kobe, was introduced into cultured cell (5). Both *in vitro* and *in vivo* studies suggest that part of the exon sequence is essential for proper splicing; this part was named dystrophin exonic splicing enhancer 19 (dys-ESE19).

It is not clear why exon 19 requires ESE for proper splicing. Our previous study indicated that dys-ESE19 is necessary for intron 18 splicing, but not for intron 19 splicing (6). This suggested that the acceptor site of exon 19 is a weak splice site, as it has been suggested that ESEs are essential for the proper splicing of an exon with weak splice consensus sequences (4, 7). However, the Shapiro's splice site consensus value (CV) for the acceptor site of exon 19 (8) is not notably low among all of the 78 acceptor sites in the dystrophin gene exons: the CV for the exon 19 acceptor site is 0.91, while the average CV for all 78 acceptor sites in dystrophin gene exons is 0.87 (9). Therefore, there are unknown factors or rules that determine the exon 19 splicing patterns.

In this report, we investigate the relationship between dys-ESE19 and the quality of a polypyrimidine tract (PPT) using a minigene reporter made from dystrophin exons 18, 19, 20 and the adjacent introns. Our results suggest that either a strong PPT or a fully active dys-ESE19 is sufficient for the correct splicing of dystrophin exon 19.

MATERIALS AND METHODS

Minigene Reporter Construction—To study splicing patterns, minigene expression plasmids containing three exons (exon 18, 19 and 20 of the human dystrophin gene)

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-78-382-6090, Fax: +81-78-382-6099, E-mail: myagi@med.kobe-u.ac.jp

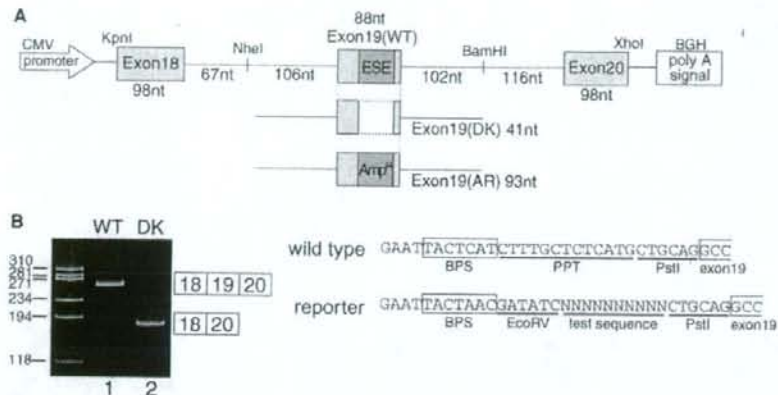


Fig. 1. The structure of the dystrophin exon 18-19-20 minigene and examples of its splice pattern analysis. (A) The structure of the dystrophin exon 18-19-20 minigene. Dystrophin exons 18, 19 and 20, and the adjacent introns, were amplified by PCR using primers containing a restriction enzyme cutting site, as shown in the figure. Then, three fragments (KpnI-NheI, NheI-BamHI and BamHI-XhoI) were ligated step by step using cloning vectors, and finally cloned into the pcDNA3 human expression vector with KpnI and XhoI. Two modified exon 19 constructs—DK exon 19, from which dys-ESE19 was replaced by HindIII cutting site, and AR exon 19, in which dys-ESE19 was replaced by a part of the AR gene—are shown below the WT exon 19. Open arrow and open box indicate the CMV promoter and the BGH polyadenylation signal of the pcDNA3 vector, respectively. Shaded boxes and lines indicate dystrophin exons and their flanking introns, respectively. Dark shaded boxes are dys-ESE19 (in WT exon 19) or a part of the AR gene (in AR exon 19). The sizes

of the dystrophin exons and the flanking introns are also shown. The actual minigene sequences are shown in Supplementary Data Fig. S1. (B) The result of minigene reporter splice patterns. HeLa cells transfected with the minigene reporter plasmid were harvested 24 h after transfection using ISOGEN. After RNA purification and RT-PCR, samples were separated on an 8% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. A 267 bp fragment (lane 1) shows that the WT exon 19 is included in the mature mRNA and a 179 bp fragment shows exon 19 skipping (lane 2). A schematic description of these RT-PCR products is shown on the right. The names of the exon 19 types are shown on the top. (C) The splice acceptor site sequence of human dystrophin exon 19 (wild type) and the sequence of the same region of the minigene reporter for PPT sequence exchange analysis (reporter). Boxes show a BPS and the first 3 nt of exon 19. Between the EcoRV and PstI sites, 11 different sequences of PPT (see Fig. 2) were inserted and tested.

and the adjacent introns were constructed (Fig. 1A) and cloned into a pcDNA3 mammalian expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using KpnI and XhoI sites. The actual minigene sequences are shown in Supplementary Data Fig. S1. For minigene construction and other splicing analysis, we used standard molecular cloning methods (10). To make PPT- and branch point sequence (BPS)-modified reporters, an altered BPS and an EcoRV recognition site were introduced into intron 18 of the minigene using PCR-based methods. Synthesized PPT oligonucleotides containing EcoRV and PstI sites were then cloned into the same restriction site (Fig. 1C). All minigene sequences amplified by PCR were confirmed by DNA sequencing using an ABI model 310 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Transfection—HeLa cells were grown in 12-well plates to ~70% confluency in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 5% fetal bovine serum (Trace Biosciences, Castle Hill, Australia) at 37°C under 5% CO₂. Minigene reporter expression plasmids (0.75 µg each) were transfected into cells using Plus Reagent and Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Cells were harvested 24 h after transfection and total RNA was extracted using ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., Japan).

Analysis of Splicing Products—Five micrograms of total RNA was subjected to reverse transcription (RT)

using random hexamer primers or specific primers (YH353, 5'-AAGTCTCTCACTTAGC-3') with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a total volume of 20 µl. PCR was performed using a forward primer corresponding to a segment of exon 18 (YH307, 5'-ATTACTCGCTCAGAAGCTGTGTTGC-3') and a reverse primer complementary to a segment of exon 20 (YH308, 5'-AAGTCTCTCACTTAGCAACTGGCAG-3'). Amplification was carried out in a total volume of 20 µl containing 4 µl of cDNA, 2 µl of 10 × Ex Taq Buffer, 2 µl of 2.5 mM dNTPs, 10 pmol of each primer and 1 U of Ex Taq Polymerase (Takara Bio, Inc., Kyoto, Japan). PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 2 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were separated on an 8% polyacrylamide gel and stained using ethidium bromide.

In Vitro Splicing Assay—To make substrate pre-mRNA, template DNA fragments for the *in vitro* transcription were synthesized by standard PCR amplification using forward [T7(19), 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'] and reverse (YH304, 5'-CTCGAGCAGCCAGTTAAGTCTCTCAC-3') primers with plasmid templates, which were the same plasmids utilized in the splicing assays in HeLa cells. Then, fragments were purified using a MiniElute PCR Purification Kit (QIAGEN, GmbH, Germany) and purified

name, sequences	exon19, BPS									
	WT UAAC	WT UAAU	WT UCAC	WT UCAU	DK UAAC	DK UAAU	DK UCAC	DK UCAU	AR ₁ UAAC	AR ₂ UAAU
U10	UUUUUUUUUU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U8G2	UUGUUUUGUU	+							+/	+
U8A2	UUUUUUUUUU	+								+
U8G4	UUGUUUGUGU	+							+/	+
U6A4	UUUUUUUUUU	+								+/
C10	CCCCCCCC	+								+/
U4G6	GGUGUGUGU	+	+	+	+					+/
U4A6	AAUUUUUUUU	+	+	+	+					+/
U2G4A4	GAUGAAUGA	+/	+/	-/+	-/+					
G6A4	GGAGGAGAGA	-								
A6G4	AAGAAGAGAG	-								

Fig. 2. All results of splicing assay using reporter minigenes transfected into HeLa cells. Name and sequence columns show the names and actual sequences of the PPT in the EcoRV-PstI cassette, which is shown in Fig. 1C. Exon 19 and BPS categories show the exon 19 types (WT: wild type; DK: 52 nt deletion the same as dystrophin Kobe; AR: ampicillin resistance gene fragment inserted in DK) and the last 4 nt of the branch site sequences (the first 3 nt of the branch site are same UAC for all constructs and were not shown in the figure). The splicing

patterns are categorized into four types based on the results of acrylamide gel electrophoresis. Exon 19 included: +; exon 19 skipped: -; both included and skipped bands are observed and included was dominant or the densities of the two bands were almost the same: +/-; skipped band was dominant: -/+. Blank cells mean no such plasmid was made. Each cell is coloured as described below: light shaded: + or supposed to be +; dark shaded: - or supposed to be -; shaded medium colour: +/- or -/+; white: unknown.

templates were subjected to *in vitro* transcription using a mMESAGE mMACHINE T7 Kit (Ambion, Austin, TX, USA). After DNaseI treatment, the resultant RNAs were purified on Quick Spin Columns G-50 (Roche, IN, USA) and the concentration and size of RNAs were confirmed using an ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) and an Agilent2100 bioanalyser with an RNA nano kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), respectively. Standard *in vitro* splicing reactions were carried out at 37°C for 2 h in a total volume of 20 μ l containing 50% (v/v) HeLa nuclear extract (HNE; CIL BIOTEC, Mons, Belgium), 1.6 mM MgCl₂, 0.5 mM ATP, 20 mM creatine phosphate, 25 ng pre-mRNA and 20 U of RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After ProteaseK treatment, RNAs were extracted by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. Splice patterns were analysed using the same RT-PCR methods as described above, except that the PCR cycle number was reduced to 15. When samples showed both exon included and skipped bands, these two bands were quantified by capillary electrophoresis using an Agilent2100 bioanalyser with a DNA1000 kit. The molecular ratio of the upper and lower bands was calculated using an index of peak height number divided by nucleotide length.

RESULTS

Effects of PPT Alteration with/without ESE on the Exon 19 Splice Pattern—To investigate dys-ESE19 function during the splicing reaction, we first synthesized minigene reporters, which contain dystrophin exons 18, 19, 20 and the adjacent introns (Fig. 1A). Minigenes containing a wild-type exon 19 (WT) or a dys-ESE19 deleted exon 19, mimicking the dystrophin Kobe mutation (DK), were cloned downstream of a CMV promoter in pcDNA3 vectors and transfected into HeLa cells. One day after transfection, cells were harvested and splicing patterns were analysed by RT-PCR. The minigene with the WT exon 19 showed a normal splicing pattern

(Fig. 1B, lane 1), whereas the minigene with the DK exon 19 showed an exon 19-skipped splice pattern (Fig. 1B, lane 2). This result confirmed that this minigene reporter system reproduces the *in vivo* splicing patterns seen in both healthy controls and the DK patient who has a 52 nt dys-ESE19 deletion in exon 19 (2). This splice pattern was also confirmed in other cell-lines (MRC5 and NIH3T3, data not shown). We concluded that this reporter system recapitulates the *in vivo* splice pattern as all of the cell-lines used showed the same splice patterns as healthy controls and the patient; we used HeLa cells for following experiments.

The splice acceptor site sequence contains three different elements (11, 12): a BPS, a PPT and a 3' end consensus sequence AG. First, we analysed the relationship between the PPT and the dys-ESE19. For this purpose, we modified the PPT of exon 19 in reporter plasmids to make minigenes with different PPT sequences (Fig. 1C). In total, 11 different 10 nt artificial PPTs were inserted between the BPS and the 3' splice site consensus sequence, and the splicing pattern with or without dys-ESE19 was analysed (Fig. 2). As the most efficient type of PPT sequence is a poly(U)-tract (13, 14), a U10 test sequence was examined first. Reporters containing a U10 PPT and the WT exon 19 showed a splice pattern that included exon 19, as expected (Fig. 3A, lane 1). Interestingly, reporters with a U10 PPT and the DK exon 19 also showed a splice pattern that included exon 19 (Fig. 3A, lane 2; the band size is smaller than that in lane 1 because the DK exon 19 is shorter than the WT exon 19), indicating that dystrophin exon 19 does not require the ESE if the upstream PPT has enough strength. It also suggests the possibility that dystrophin exon 19 requires the ESE because the upstream PPT is too weak to define exon 19, even though the PPT contains enough pyrimidines (10 out of 13 nt) and its CV is sufficiently high (see 'Introduction' section). To elucidate the relationship between PPT sequence and ESE requirement, we tested a series of minigenes with different PPTs, in which pairs of uridines were replaced