



Title	脊柱後縦靱帯骨化症の遺伝学的研究
Author(s)	小池, 良直
Description	配架番号 : 2799
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15573号
Issue Date	2023-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15573
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90409
Type	doctoral thesis
File Information	KOIKE_Yoshinao.pdf



学 位 論 文

脊柱後縦靱帯骨化症の遺伝学的研究
(Genetic study for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine)

2023年6月

北海道大学

小池 良直

学 位 論 文

脊柱後縦靱帯骨化症の遺伝学的研究
(Genetic study for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine)

2023年6月

北海道大学

小池 良直

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
第一章		
緒言	9 頁
方法	10 頁
結果	15 頁
考察	21 頁
第二章		
緒言	23 頁
方法	24 頁
結果	28 頁
考察	31 頁
結論および総括	33 頁
謝辞	34 頁
利益相反	35 頁
引用文献	36 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Yoshinao Koike, Masahiko Takahata, Masahiro Nakajima, Nao Otomo, Hiroyuki Suetsugu, Xiaoxi Liu, Tsutomu Endo, Shiro Imagama, Kazuyoshi Kobayashi, Takashi Kaito, Satoshi Kato, Yoshiharu Kawaguchi, Masahiro Kanayama, Hiroaki Sakai, Takashi Tsuji, Takeshi Miyamoto, Hiroyuki Inose, Toshitaka Yoshii, Masafumi Kashii, Hiroaki Nakashima, Kei Ando, Yuki Taniguchi, Kazuhiro Takeuchi, Shuji Ito, Kohei Tomizuka, Keiko Hikino, Yusuke Iwasaki, Yoichiro Kamatani, Shingo Maeda, Hideaki Nakajima, Kanji Mori, Atsushi Seichi, Shunsuke Fujibayashi, Tsukasa Kanchiku, Kei Watanabe, Toshihiro Tanaka, Kazunobu Kida, Sho Kobayashi, Masahito Takahashi, Kei Yamada, Hiroshi Takuwa, Hsing-Fang Lu, Shumpei Niida, Kouichi Ozaki, Yukihide Momozawa, Genetic Study Group of Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligaments, Masashi Yamazaki, Atsushi Okawa, Morio Matsumoto, Norimasa Iwasaki, Chikashi Terao, and Shiro Ikegawa.

Genetic insights into ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine.
eLife 2023 (in press)

本研究の一部は、以下の学会で発表した。

1. 小池良直、遠藤努、今釜史郎、加藤仁志、坂井宏旭、海渡貴司、川口善治、岩崎倫政、池川志郎、寺尾知可史、高畑雅彦
後縦靭帯骨化症の新規遺伝子領域の発見と肥満との因果関係
第37回日本整形外科学会基礎学術集会
令和4年10月14日
シーガイアコンベンションセンター（宮崎）
2. 小池良直、高畑雅彦、中島正宏、脊柱靭帯骨化症 GWAS 研究グループ、寺尾知可史、池川志郎
Genetic insights into ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine
第67回日本人類遺伝学会
令和4年12月15日
パシフィコ横浜（神奈川）

要旨

【背景、目的】

脊柱後縦靭帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine : OPLL)は椎体後面を縦走する後縦靭帯が骨化することで脊柱管の狭窄をきたし、重篤な運動・感覚障害を生じる難病である。症状が重度な進行例に対しては、脊髄の除圧目的の手術が選択されるが、根本的な治療方法は無く、予防法すら確立されていない。

治療・予防法の確立のためには病因を明らかにする必要がある。OPLLは遺伝的要因と環境要因が複雑に組み合わさることで発症する多因子遺伝疾患と推定されている。OPLLの遺伝的要因を明らかにするため、過去に全ゲノム関連解析 (genome-wide association study: GWAS)が行われ6つの疾患感受性領域が発見された。その後の機能解析により、8q23.1の領域に存在する疾患感受性遺伝子 *RSPO2* のOPLLへの関与が示された。OPLLの病因の一端が明らかにされたが、この領域のみではOPLLの病因の一部しか説明できないことから、依然として多くの遺伝的要因がOPLLに関与していると推測されている。

また、OPLLは2型糖尿病 (type 2 diabetes: T2D)、肥満度 (body mass index: BMI) など他の形質との関連が複数報告されている。特にT2Dに関しては多くの報告がなされている。これらの関連はOPLLの病因を紐解く鍵となりうるが、肝心なOPLLとの「因果関係」は示されていない。

本研究は、規模を拡大したGWASを行うことで、OPLLの治療につながる新規疾患感受性領域を同定すること、さらには遺伝統計学的な切り口からOPLLの治療法、予防法につながる新知見を得ることを目的とした。

【方法】

異なる時期に募集した3つのコホートの計2,010人のOPLL患者を含む日本人22,016人を対象として世界最大規模のOPLL GWASメタ解析を行った。末梢血からDNAを抽出し、ジェノタイピング後にデータの処理 (quality control)を行い、各コホートでGWASを行った。その後、メタ解析でコホートデータを統合し、ゲノム上の疾患感受性領域を同定した。さらに、罹患部位によりOPLLを頸椎 (cervical: C)、胸椎 (thoracic: T)-OPLLに分類し、このサブタイプでのGWAS解析 (サブ解析)を行った。さらに、GWAS解析結果を使用し、Gene-based 関連解析、Summary-based Mendelian randomization (SMR)を行い、さらなるOPLL関連遺伝子を検索した。

次に、GWASデータと既報の日本人96形質のGWAS要約統計量を用い、OPLLとこれらの形質との遺伝相関 (genetic correlation: GC)を算出した。その後、4形

質に着目し、メンデルランダム化解析 (Mendelian randomization: MR)を行い、対象形質と OPLL の因果関係の評価した。さらには、MR で有意な因果関係が示された BMI に関して、遺伝的リスクスコア (polygenic risk score: PRS)を作成し、OPLL サブタイプ毎でスコアリングを行い、OPLL 患者における BMI-PRS の効果量を比較した。

【結果】

OPLL 全体 (All-OPLL)の解析で 14 の疾患感受性領域を同定した。うち 8 つは新規領域で、*TMEM135*、*WWP2* など骨代謝と関連する候補感受性遺伝子を含んでいた。サブ解析により、C-OPLL で 3 つ、T-OPLL で 9 つの疾患感受性領域を同定した。うち、C-OPLL の 1 領域、T-OPLL の 9 領域は All-OPLL や他のサブタイプで同定されないものであったが、その領域内の殆どで、最も P 値の低い SNP (リード SNP)は稀な多型であった。

Gene-based 相関解析では 3 つ、SMR では 3 つの関連遺伝子を同定した。特に、Gene-based 相関解析で同定された *EIF3E*、SMR で同定された *PLEC* は過去の研究で骨代謝への関与が報告されている。

GC は T2D、BMI と正の相関を、脳動脈瘤と負の相関を示した。また、骨粗鬆症と負の相関傾向を示した。引き続き行った MR により、高 BMI から OPLL へ正の因果関係が示された。骨粗鬆症の評価に用いられる骨密度 (bone mineral density: BMD)に関しては、高 BMD から OPLL へ正の因果関係が示された。さらに、これらの因果関係は特に T-OPLL で強いことが示された。一方で、過去の研究で最も注目されていた T2D に関しては OPLL への因果関係は認めなかった。OPLL サブタイプ間で BMI-PRS の効果量を比較したところ、その効果量は、C-OPLL に比し T-OPLL で有意に高かった。

【考察】

GWAS で新規 8 領域を含む 14 の OPLL 感受性領域を同定した。これらの領域内には骨代謝と関連する候補感受性遺伝子が含まれており、OPLL への関与が示唆された。Gene based 相関解析、SMR により、疾患との関与が疑われる遺伝子 *EIF3E*、*PLEC* を同定した。今後、これらの遺伝子を標的とした治療法の開発が期待される。GWAS サブ解析ではサブタイプ特有のシグナルを同定したが、その殆どでリード SNP は稀な多型であり、今後の研究で再現性の確認が必要である。

OPLL と BMI、T2D には正の GC、脳動脈瘤には負の GC があり、MR では高 BMI、高 BMD は OPLL と因果関係が示された。既報の T2D と OPLL の関係は OPLL 患者での高 BMI の交絡が疑われた。因果関係が示された高 BMI、則ち肥満と高 BMD への治療介入は OPLL への間接的治療となりうる。高 BMD への治療介入、則ち骨形成を抑制する治療に対しては、骨折危険性増大等の懸念か

ら慎重な検討が必要である。一方、肥満への治療介入は現実的な OPLL 治療選択肢と考えられる。特に肥満を有する T-OPLL 患者は肥満の治療を積極的に検討すべきである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおり。

1KG	1000 Genome Project
BMD	bone mineral density
BMI	body mass index
C-	cervical-
CRP	C-reactive protein
DNA	deoxyribonucleic acid
eQTL	expression Quantitative Trait Locus
FDR	false discovery rate
GC	genetic correlation
GWAS	genome-wide association study
HEIDI	heterogeneity in dependent instruments
HLA	human leukocyte antigen
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IV	instrumental variable
IVW	inverse variance weighted
LD	linkage disequilibrium
LDSC	linkage disequilibrium score regression
MAF	minor allele frequency
MHC	major histocompatibility complex
MR	Mendelian randomization
OPLL	ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine
PRS	polygenic risk score
QC	quality control
QOL	quality of life
RNA	ribonucleic acid
SMR	summary-based Mendelian randomization
SNP	single nucleotide polymorphism
T-	thoracic-
T2D	type 2 diabetes

緒言

1. 脊柱後縦靭帯骨化症は手術以外に有効な治療法の無い難病である

脊柱後縦靭帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine : OPLL)は椎体後面を縦走する後縦靭帯が骨化することにより、脊柱管狭窄を来し脊髄が圧迫されることで、運動障害や感覚障害などの神経障害を引き起こす疾患である (図 1)。OPLL は日本の一般人口の約 3%に見られる。特徴として 50 歳前後での発症が多い、日本を含めた東アジアに発症が多い一方で、欧米での発症は稀で、男性の発症が多いことが報告されている (Matsunaga et al., 2012)。

組織学的な研究では、OPLL は内軟骨骨化により発生すると考えられている (Sato et al., 2007; Sugita et al., 2013)。その他にも現在まで数々の研究が行われているが、依然として多くの原因は不明であり、国の難病に指定されている。

OPLL に対し、現状では根本的な治療方法がなく、予防法すら確立されていない。軽症例に対しては、痺れや痛みに対する鎮痛薬内服や理学療法などの保存療法、症状の重度な進行例に対しては、圧迫された脊髄の除圧目的に手術が行われるが、満足いく結果を得られない場合も多い。また、OPLL による神経障害に対し有用性を示した薬剤については報告が無い。治療薬の開発のためには、OPLL の病因を明らかにする必要がある。



図 1. 頸部 CT 像 (矢状断)。脊柱後縦靭帯の骨化により、脊柱管狭窄を来している。

2. OPLL は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡む多因子遺伝病である

OPLL に遺伝的素因が関与していることは、過去に報告された家系調査、双生児調査、HLA ハプロタイプの解析、病因遺伝子の解析から明らかである (Matsunaga et al., 1999; Sakou et al., 1991; Terayama, 1989)。OPLL は複数の疾患感受性遺伝子による遺伝的要因と食生活・併存症・力学要素などによる環境要因が複雑に組み合わさることで発症する多因子遺伝疾患と推定されている。

3. OPLL の遺伝的要因の一端が明らかになりつつある

OPLL の遺伝的要因の解明のため、理化学研究所・骨関節疾患研究チーム、厚生労働省難治性疾患克服研究事業「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班」遺伝子解析グループにより、世界で初めて OPLL の全ゲノム相関解析 (genome-wide association study : GWAS)が行われた (Nakajima et al., 2014)。この研究では、日本人の OPLL 患者 1,112 人とバイオバンク・ジャパンプロジェクトの非患者 6,810 人のゲノム情報を用い、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP)と疾患との関連が探索され、有意水準を満たす 6 つの疾患感受性領域が同定された。さらに、その後の機能解析により、8q23.1 領域の疾患感受性領域に存在する *RSPO2* は靭帯、軟骨、骨に特異的に発現しており、GWAS で同定された SNP の多型の違いが、OPLL の骨化メカニズムとして考えられている内軟骨骨化に影響することが分かった (Nakajima et al., 2016)。このように、遺伝学的なアプローチにより OPLL の病因の一端が明らかとなりつつある。

4. OPLL は併存症との関連する

過去の疫学研究では、OPLL と併存症との関連が示され、多数報告されている。糖尿病 (Akune et al., 2001)、肥満症 (Kobashi et al., 2004)に関する報告のほか、近年は低リン血症 (Kawaguchi et al. 2019)、ビタミン A 欠乏、ビタミン B6 欠乏 (Endo et al., 2022)に関する報告もある。また、Kawaguchi らは、高感度 C-reactive protein (CRP)と後縦靭帯骨化の正の相関を報告しており、OPLL への慢性炎症の関与も示唆されている (Kawaguchi et al. 2019)。

その中でも、2 型糖尿病 (type 2 diabetes: T2D)との関連は最も注目されてきた。現在までその詳細なメカニズムは解明されていないが、T2D 患者でのインスリン産生の増加が骨形成の強力な同化因子であるインスリン様成長因子-1 (insulin-like growth factor 1: IGF-1)の受容体に作用することで、OPLL を誘発すると考えられている (Akune et al., 2001)。

このように多くの併存症との関連が示されているが、いずれも因果関係は示されていない。もし、OPLL 患者のこれらの併存症との因果関係が示されれば、その併存症への治療介入は間接的に OPLL の治療・予防につながる可能性がある。

5. 本研究の目的

本研究では規模を拡大した GWAS を行い、病因解明につながる可能性のあるゲノム上の新規疾患感受性領域を同定することを目的とした (第一章)。さらに、

GWAS データに対し遺伝統計学的手法を用いて解析することで、OPLL と遺伝的に相関のある形質を同定すること、さらには OPLL との因果関係を明らかにすることで、OPLL の治療・予防につながる形質を同定することを目的とした (第二章)。

第一章

全ゲノム相関解析による疾患感受性領域の同定

緒言

OPLL は現在まで、手術以外に有効な治療法の無い難病である。病因解明を目的として様々な研究がなされてきた。OPLL には遺伝的な要素が関与していることから (Matsunaga et al., 1999; Sakou et al., 1991; Terayama, 1989)、遺伝学的アプローチは治療法の開発への有効な手段と考えられる。

遺伝学的アプローチを用いた OPLL GWAS では 6 つの疾患感受性領域が発見された (Nakajima et al., 2014)。そして、その後の機能解析により、疾患感受性領域の中の一つの 8q23.1 に存在する疾患感受性遺伝子 *RSPO2* の靭帯骨化への関与が示された (Nakajima et al., 2016)。今後、さらなる研究の蓄積により *RSPO2* を標的とした治療法の開発が期待される。しかしながら、8q23.1 の領域のみでは OPLL の病因の一部しか説明できないことから、依然として多くの遺伝的要因が OPLL に関与していると推測される。

OPLL は罹患部位として頸椎が最多であるが、胸椎、腰椎など全脊柱に発生しうる。本研究に先立ち筆者らが行なった疫学研究では、頸椎 (cervical: C)-OPLL 患者と胸椎 (thoracic: T)-OPLL 患者を比較したところ、T-OPLL は C-OPLL と比較し、1. 高度肥満が多い、2. 早期発症が多い、3. 女性が多い、4. 脊椎全体の骨化傾向が強いという特徴があることを発見した (Endo et al., 2020)。従って、サブタイプ毎に遺伝的背景に違いがある可能性も考えられる。

本章では規模を拡大した GWAS を行うことで、病因解明につながる可能性のあるゲノム上の新規疾患感受性領域を発見すること目的とした。そこで、新たなデータを追加し GWAS を行ない、過去の GWAS データとメタ解析を行うことで世界最大規模の OPLL の GWAS メタ解析を実施し、OPLL の遺伝的要因を探索した。また、OPLL 全体 (All-OPLL)での解析のほか、C-、T-OPLL でのサブタイプ毎の解析も行った。

方法

倫理規定

本研究は北海道大学、理化学研究所を含む全国共同研究協力施設における研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

OPLL の定義

本研究では、脊椎外科医が、単純 X 線写真または Computed tomography を慎重に読影し、2 椎体以上に後縦靭帯骨化を有する例を OPLL 患者とした。また、頸椎のみに限局した症例を C-OPLL、胸椎 2 椎体以上に OPLL を有する症例を T-OPLL と定義した。

新規 GWAS 対象サンプル

本研究の GWAS は 3 つの日本人 OPLL 患者データから成り立つ。前回の GWAS 研究 (Nakajima et al., 2014) で使用した OPLL 患者データを再解析し、利用した (OPLL1)。また、前回の GWAS 研究で再現性確認のため使用した OPLL 患者の DNA サンプルを新たにジェノタイピングし、利用した (OPLL2)。

GWAS の検出力を増すためには、患者群のサンプル数の増加が望ましい。そこで、効率よくサンプル数を増すため、特徴的な表現型、すなわち強い遺伝的背景を有する可能性の高い「疾患亜群」に着目した。筆者らは先行研究 (Endo et al., 2020) の結果をもとに、強い遺伝的背景を持つ可能性の高い疾患亜群として T-OPLL 患者に着目し、全国 8 施設より合計 308 例の T-OPLL サンプルを収集した (OPLL3)。OPLL1-3 の対照群としては、バイオバンク・ジャパンプロジェクト (Nagai et al., 2017; Hirata et al., 2017) と国立長寿医療研究センターの日本人ジェノタイピングデータを利用した。

本研究で使用した患者群、対照群の詳細を表 1 に示す。

表1. 全ゲノム相関解析で使用したデータ

	データ	サンプル数*	ジェノタイピング	
Set-1	患者群	OPLL1 (C, T-OPLL混在)	1,102	Illumina OmniExpressExome
	対照群	バイオバンク・ ジャパン	8,191	Illumina OmniExpressExome または Illumina OmniExpress + Illumina HumanExome

Set-2	患者群	OPLL (C, T-OPLL混在)	609	Illumina OmniExpressExome
	対照群	バイオバンク・ ジャパン	6,385	Illumina OmniExpressExome または、 Illumina OmniExpress + Illumina HumanExome
Set-3	患者群	OPLL3 (T-OPLLのみ)	299	Illumina Asian Screening Array
	対照群	国立長寿医療研究 センター	5,430	Illumina Asian Screening Array

OPLL, ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine; C-, Cervical-; T-, Thoracic-.

*Quality control 後のサンプル数

Genotyping、Quality control

末梢静脈血から標準的な方法でゲノム DNA を抽出した (株式会社エスアールエルへの外部委託)。DNA のジェノタイピングには DNA マイクロアレイを用いた。

次に、ジェノタイピングされた SNP の quality control (QC)を行った。データ Set1-3 はいずれも同一の方法で行なった (図 2)。SNP の QC では以下の SNP を除外した。

- (i) SNP call rate < 99%
- (ii) Minor allele の頻度 (minor allele frequency: MAF) < 0.01
- (iii) Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) P-value < 1.00×10^{-6}

また、本研究では 1000 Genomes Project Phase 3 [1KGP 3 (May 2013, n = 2,504)] とバイオバンク・ジャパンから取得した日本人 3,256 例の全ゲノム配列データを用いて、高精度の imputation 用の参照配列データを構築した。そして、対照群と参照配列データ内の東アジア人データとの間でアレル頻度差が 6%を超える SNP を除外した。

引き続き、サンプルの QC を行った。近親度の推定値 (PI_HAT)でサンプル間の血縁関係を評価し、第 2 度近縁 (PI_HAT > 0.25)を示したサンプルを除外した。集団の層別化は、HapMap project のヨーロッパ人、アフリカ人、日本人、中国人の 4 集団のデータを参照し、主成分分析を用いて評価した。主成分分析は、SmartPCA (Patterson et al., 2006)を用いて、上位 2 つの主成分を用いて、東アジア (日本人および中国人)クラスター内のサンプルを選択した。さらに、ジェノタイピングでの call rate が 98%未満のサンプルを除外した。

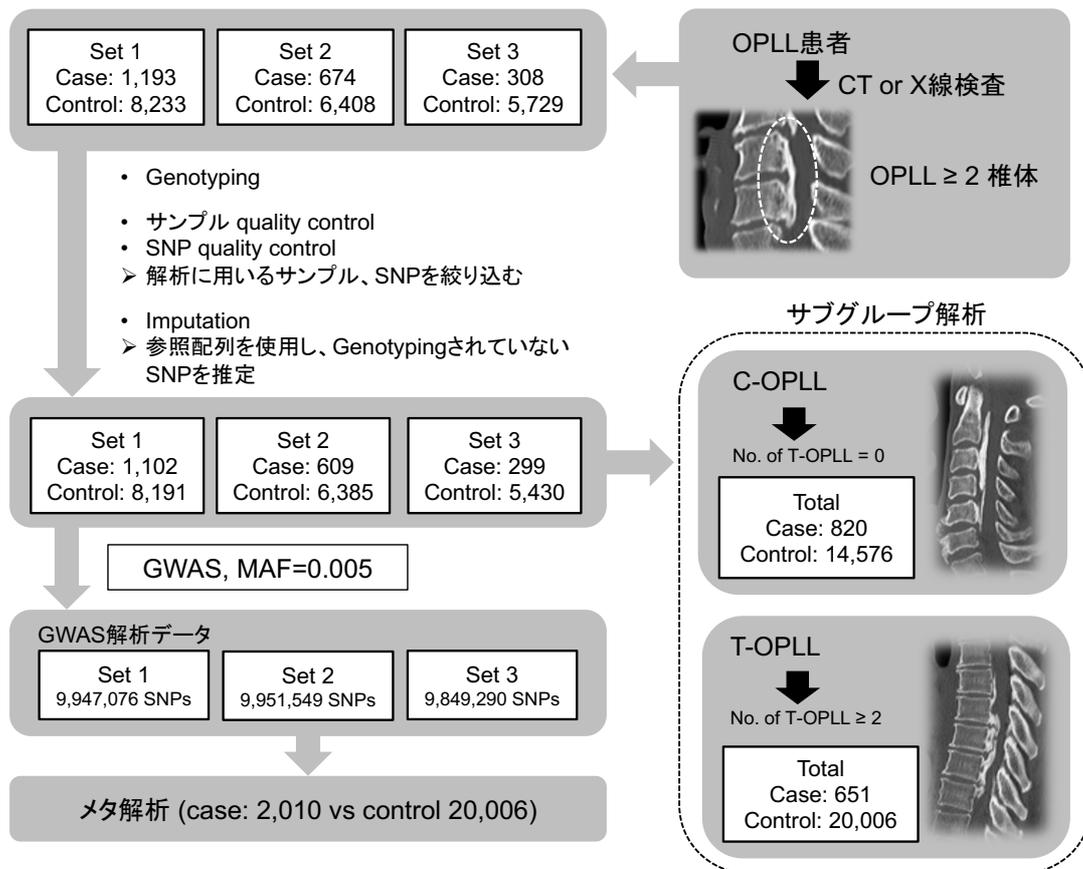


図 2. 本研究の流れ

各データセットで quality control、imputation を行った後、GWAS を行った。GWAS 後に Set1-3 でメタ解析を行なった。さらに、頸椎 (cervical: C)、胸椎 (thoracic: T)-OPLL でのサブ解析も行なった。OPLL, ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine; CT, computed tomography.

Phasing、imputation

EAGLE (v2.4.1) (Loh et al., 2016)を用いて phasing を行なった。その後、上記の imputation 用の参照配列データを用いて、minimac4 (v1.0.0) (Das et al. 2016)を使用し SNP imputation を実施した。imputation 後、 $R_{sq} > 0.3$ 、 $MAF > 0.005$ の SNP をその後の GWAS 解析に使用した (図 2)。

GWAS、メタ解析

常染色体上の SNP について、GWAS Set-1、-2、-3 を独立に解析した。PLINK2.0 (Purcell et al., 2007) を用いて加法モデルのもとロジスティック回帰分析を行い、SNP と OPLL の関連を評価した。共変量は第 1-10 主成分を用いた。その後、

METAL ソフトウェア (Willer et al., 2010)を用いて、固定効果モデルのもと 3 つの GWAS セットを逆分散 (inverse variance weighted : IVW)法でメタ解析した。

X 染色体上の SNP については、PLINK2.0 を用いて、各 GWAS セットについて男女別々に加法モデルのもと、ロジスティック回帰分析を行った。共変量は第 1-10 主成分を用いた。その後、常染色体と同様の方法で、6 つのデータセットをメタ解析した。ゲノムワイド有意水準は 5×10^{-8} とし、水準を満たす SNP を有する領域を疾患感受性領域とした。各領域で最も P 値の低い SNP をリード SNP とした。さらに、リード SNP の存在する遺伝子、またはその近傍の遺伝子を候補疾患感受性遺伝子として注目した。

領域の決定の際、有意水準を満たす SNP から両方向 1 Mb をその SNP の領域と定義した。他の有意な SNP が定義された領域に含まれる場合、それらの領域は同一のものとした。

GWAS サブ解析

C-OPLL と T-OPLL については、Set-1-3 の全サンプル (All-OPLL)を用いた解析と同様の方法でサブタイプ毎の GWAS とメタ解析を実施した。GWAS Set-3 の症例はすべて T-OPLL 症例であったため (表 1)、C-OPLL のサブ解析は Set-1,2 を用いて行われた。

Condition 解析

疾患感受性領域内における独立したシグナルを発見するために、ステップワイズ condition 解析を行った。GWAS Set-1-3 に対し、PLINK2.0 を用いて独立に condition 解析を行った後、IVW 法でメタ解析を行ない、データを統合した。SNP の P 値が 5.0×10^{-6} を下回るまでこの手順を繰り返した。

Linkage disequilibrium score regression

東アジア人種の linkage disequilibrium (LD)スコアを用いた LD スコア回帰 (linkage disequilibrium score regression : LDSC)により、集団の層別化と血縁関係に由来する交絡バイアスを推定した。解析では LDSC ソフトウェアを使用した (Bulik-Sullivan et al. 2015)。さらに本手法を用いて、遺伝で説明できる表現型 (OPLL)の分散が表現型全体の分散に占める割合として定義される「遺伝率」を算出した。

Gene-based 相関解析

OPLL GWAS の要約統計量を用い、MAGMA ソフトウェアを使用して実施した (de Leeuw et al., 2015)。MAGMA では SNP 間の LD を考慮し、遺伝子レベル

で疾患との関連を評価する。LD の計算には 1000 Genomes Project の東アジア人サンプルのデータを使用し、有意水準は P 値 $< 5 \times 10^{-8}$ とした。

Summary-based Mendelian randomization

Summary-based Mendelian randomization (SMR)は GWAS データと expression quantitative trait locus (eQTL)等のデータを統合し、形質に関連する遺伝子を推定する手法である。All-OPLL GWAS の要約統計量と GTEx v7 から取得した cis-eQTL データ (GTEx Consortium, 2015)を使用し、SMR ソフトウェアを用いて解析した (Zhu et al., 2016)。また、cis-eQTL 領域に存在する複数の SNPs を用いてバイアス (heterogeneity in dependent instruments: HEIDI)を評価した。過去の報告と同様、 $P_{\text{HEIDI}} > 0.05$ 、 $P_{\text{SMR}} < 8.4 \times 10^{-6}$ を共に満たす結果を有意とした。

結果

新規疾患感受性領域の発見

OPLL 患者群 2,010 人と対照群 20,016 人を用いて GWAS を行い、All-OPLL でゲノムワイド有意水準($P < 5.0 \times 10^{-8}$)を満たす 12 の疾患感受性領域を同定した(図 3、表 2)。

ゲノムインフレーション因子 (λ_{GC})は 1.11 であり、GWAS における統計量のわずかなインフレーションが観察された。そこで、それがバイアスに起因するものか、多因子遺伝性に起因するものかを判断するため、LDSC を行なった。LDSC における切片は 1.03 であり、統計量のインフレーションはほとんど多因子遺伝性によるもので、バイアスの影響はごく僅かであることがわかった。

次に、独立したシグナルを検出するために、ステップワイズ condition 解析を行った。その結果、condition 解析後に有意水準を示す 2 つの独立したシグナル、rs35281060 (12p12.3、P 値 = 1.39×10^{-12})、rs1038666 (12p11.22、P 値 = 5.09×10^{-10}) を新たに検出した。このように、メタ解析と condition 解析により、8 つの新規領域を含む 14 の疾患感受性領域を同定した。

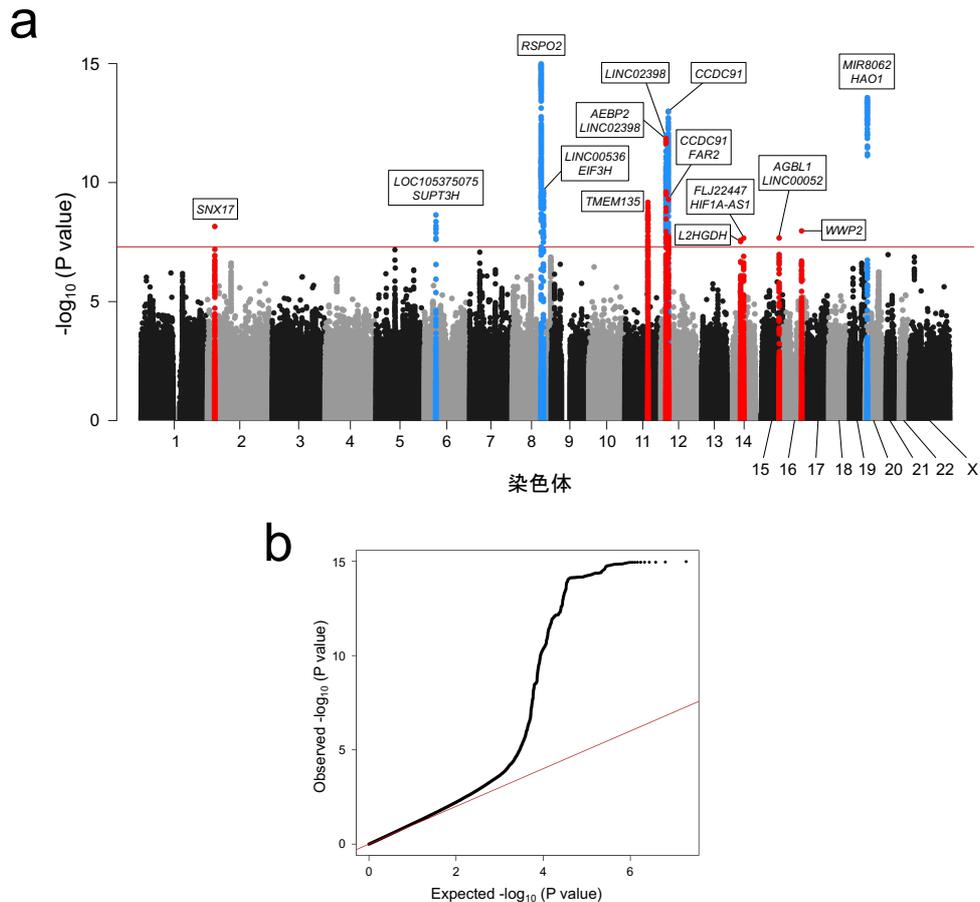


図 3. AII-GWAS のメタ解析により 14 の疾患感受性領域を同定

(a) マンハッタンプロット。縦軸はメタ解析における各 SNP の $-\log_{10} P$ 値を、横軸は染色体番号を示す。赤の水平線はゲノムワイド有意水準 (P 値 = 5.0×10^{-8}) を表す。赤と青の点は、それぞれ新規、既報の疾患感受性領域内の SNP。(b) QQ プロット。統計量のわずかなインフレーションが観察された。

表2. AII-OPLL GWASメタ解析の結果

SNP	染色体	ゲノム上の位置	遺伝子*	新規/既報	REF/ALT	ALT_FRQ	P値	OR (95%CI)
rs4665972	2	27598097	<i>SNX17</i>	新規	T / C	0.433	7.00E-09	1.23 (1.15-1.32)
rs927485	6	44538139	<i>CDC5L</i> , <i>BX647715</i>	既報	G / A	0.862	2.30E-09	0.76 (0.70-0.83)
rs374810	8	109096029	<i>RSPO2</i> , <i>EIF3E</i>	既報	G / A	0.383	1.03E-15	0.75 (0.70-0.81)
rs1898287	8	117579970	<i>LINC00536</i> , <i>EIF3H</i>	既報	A / C	0.661	2.18E-10	0.80 (0.75-0.86)
rs35505248	11	86830927	<i>TMEM135</i>	新規	T / A	0.655	6.75E-10	0.81 (0.75-0.86)
rs35281060	12	19976182	<i>AEBP2</i> , <i>LOC100506393</i>	新規	TG / T	0.498	1.39E-12	0.79 (0.74-0.84)
rs10841442	12	20213600	<i>LOC100506393</i>	既報	T / C	0.472	1.03E-12	0.78 (0.73-0.84)
rs11049529	12	28471504	<i>CCDC91</i>	既報	C / T	0.616	1.01E-13	0.77 (0.72-0.83)
rs1038666	12	29085005	<i>CCDC91</i> , <i>FAR2</i>	新規	G / A	0.604	5.09E-10	0.81 (0.76-0.87)
rs11157733	14	50727523	<i>L2HGDH</i>	新規	G / A	0.427	2.65E-08	1.21 (1.13-1.29)
rs58255598	14	62131805	<i>FLJ22447</i> , <i>HIF1A</i>	新規	C / T	0.318	2.16E-08	0.81 (0.75-0.87)
rs189646742	15	88017055	<i>AGBL1</i> , <i>LINC00052</i>	新規	G / A	0.013	2.13E-08	2.03 (1.59-2.61)
rs376989376	16	69854329	<i>WWP2</i>	新規	T / TAG	0.694	1.08E-08	0.79 (0.73-0.86)
rs6140442	20	7829397	<i>MIR8062</i> , <i>HAO1</i>	既報	C / A	0.153	2.70E-14	1.39 (1.28-1.51)

*リードSNPが存在、または近傍の遺伝子

REF, reference; ALT, alternative; FRQ, frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

既報の 6 つの疾患感受性領域 (Nakajima et al., 2014) の有意なシグナルは本研究でも認められた。本研究で用いたすべての SNP によって説明される遺伝率は

53.1% (95%信頼区間: 40.6 - 65.6%)であり、OPLL が高い遺伝性を有することが示された。

OPLL サブタイプ GWAS

C-OPLL (患者群: 820 例、対照群: 14,576 例) と T-OPLL (患者群 651 例、対照群: 20,007 対照)のサブタイプ毎に GWAS メタ解析を実施した (図 4、表 3,4)。C-OPLL では3つ、T-OPLL では9つの、ゲノムワイド有意水準を満たす疾患感受性領域を発見した。これらの領域のうち、C-OPLL では1つ、T-OPLL では9つが、All-OPLL や他の OPLL サブタイプ解析では同定されていなかった。

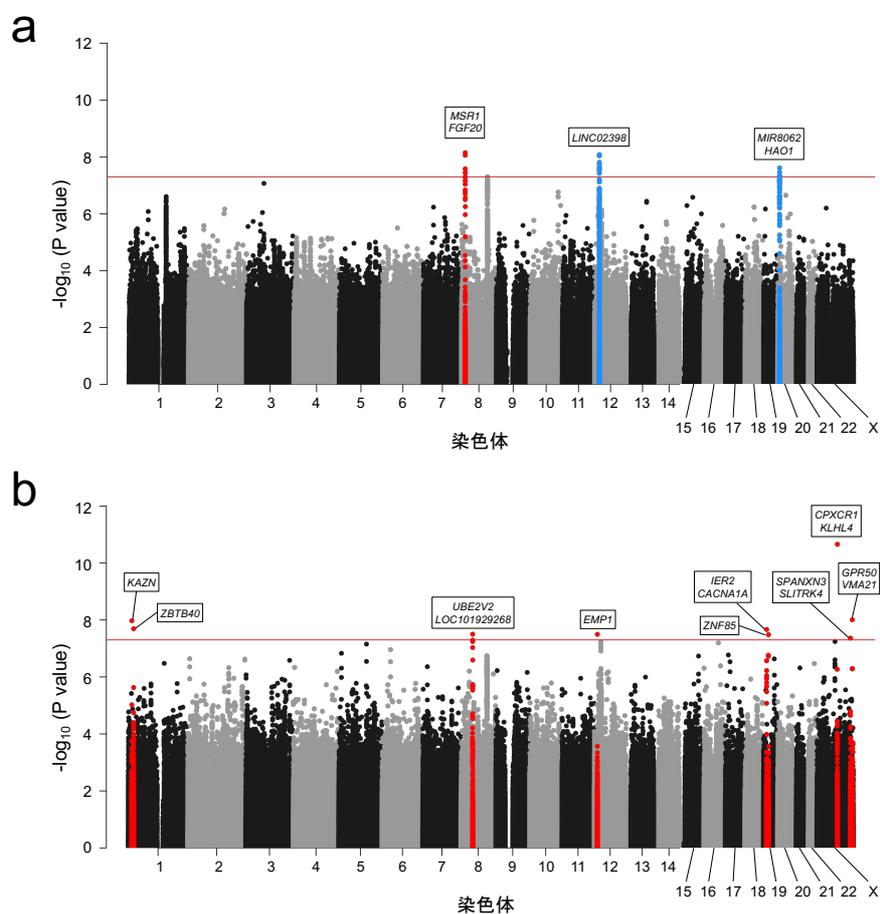


図 4. OPLL サブタイプ毎に異なる疾患感受性領域を同定

マンハッタンプロット。縦軸はメタ解析における各 SNP の $-\log_{10}$ P 値を、横軸は染色体番号を示す。赤の水平線はゲノムワイド有意水準 (P 値 = 5.0×10^{-8}) を表わす。赤と青の点は、それぞれ新規、既報の疾患感受性領域内の SNP。(a) 頸椎 OPLL、(b) 胸椎 OPLL。

表3. C-OPLL GWASメタ解析の結果

SNP	染色体	ゲノム上の位置	遺伝子*	新規 / 既報	REF / ALT	ALT_FRQ	P値	OR (95%CI)
rs191235032	8	16156154	<i>MSRI, FGF20</i>	新規	T / C	0.006	7.11E-09	3.50 (2.29-5.35)
rs10770607	12	20180241	<i>LOC100506393</i>	既報	C / T	0.494	8.33E-09	0.74 (0.67-0.82)
rs201971301	20	7768713	<i>MIR8062, HAO1</i>	既報	T / A	0.167	2.45E-08	1.43 (1.26-1.63)

*リードSNPが存在、または近傍の遺伝子

REF, reference; ALT, alternative; FRQ, frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

表4. T-OPLL GWASメタ解析

SNP	染色体	ゲノム上の位置	遺伝子*	新規 / 既報	REF / ALT	ALT_FRQ	P値	OR (95%CI)
rs570441876	1	15264981	<i>KAZN</i>	新規	T / G	0.006	1.06E-08	6.90 (3.56-13.37)
rs74707424	1	22853414	<i>ZBTB40</i>	新規	G / A	0.014	2.02E-08	2.88 (1.99-4.17)
rs182641792	8	49409078	<i>UBE2V2, EFCAB1</i>	新規	G / A	0.007	3.15E-08	3.48 (2.24-5.42)
rs75660571	12	13356404	<i>EMP1</i>	新規	A / G	0.010	3.19E-08	3.23 (2.13-4.89)
rs569120301	19	13295879	<i>IER2, CACNA1A</i>	新規	A / G	0.067	2.15E-08	1.96 (1.55-2.48)
rs577395034	19	21115881	<i>ZNF85</i>	新規	C / T	0.006	3.27E-08	5.63 (3.05-10.4)
rs149869712	X	87846779	<i>CPXCRI, KLHL4</i>	新規	C / T	0.008	2.20E-11	3.48 (2.42-5.02)
rs138997780	X	142679687	<i>SPANXN3, SLITRK4</i>	新規	C / T	0.008	4.35E-08	2.78 (1.93-4.00)
rs17253481	X	150433004	<i>GPR50, VMA21</i>	新規	T / G	0.014	9.82E-09	2.62 (1.88-3.64)

*リードSNPが存在、または近傍の遺伝子

REF, reference; ALT, alternative; FRQ, frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Gene-based 相関解析

GWAS で発見された疾患感受性領域外に存在する原因遺伝子を同定するために、Gene-based 相関解析を行った。その結果、OPLL と有意に関連する3つの遺伝子を見つけた：*EIF3E*、*EMC2*、*TMEM135* (図5)。C-OPLL, T-OPLL でのサブ解析では有意な遺伝子は認めなかった (結果非表示)。

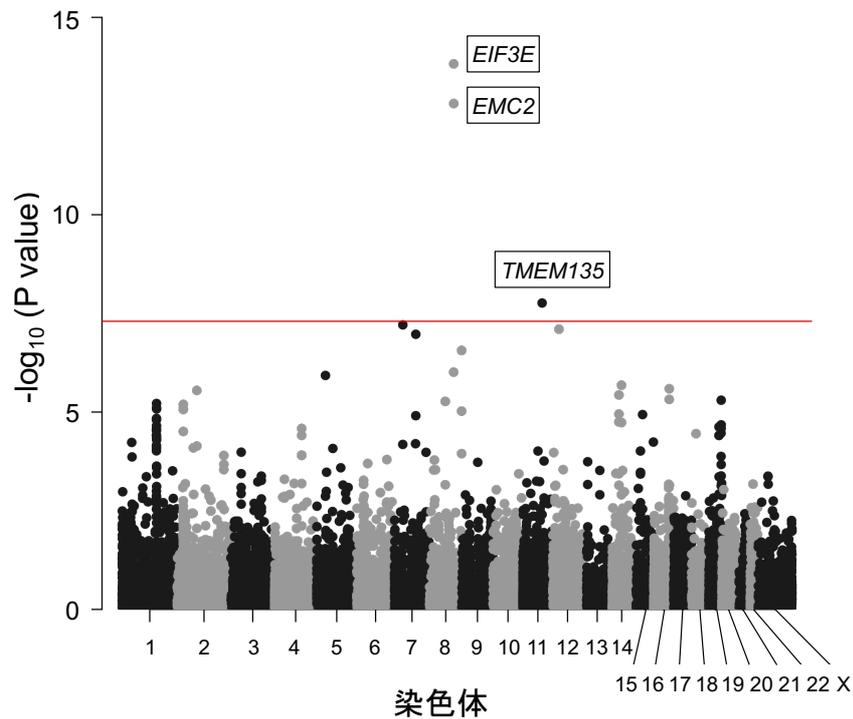


図 5. Gene-based 相関解析により OPLL と有意に関連する 5 つの遺伝子を発見

マンハッタンプロット。縦軸は各遺伝子の $-\log_{10} P$ 値、横軸は染色体番号を示す。赤の水平線は有意水準 (P 値 = 5.0×10^{-8}) を表す。

SMR

SMR では、バイアス無く ($P_{\text{HEIDI}} > 0.05$)、有意水準 ($P_{\text{SMR}} < 8.4 \times 10^{-6}$) を満たす合計 10 個の遺伝子—組織ペアを発見した (表 5)。この中で、Cells transformed fibroblasts-*PLEC* が最も有意なペアとして同定された。

表 5. SMR の結果

染色体	遺伝子	eQTL 組織	Beta	SE	P_SMR	p_HEIDI
8	<i>RSPO2</i>	Esophagus mucosa	1.008	0.213	2.27E-06	3.30E-01
8	<i>PLEC</i>	Adipose visceral omentum	0.652	0.146	8.32E-06	9.83E-01
8	<i>PLEC</i>	Lung	0.444	0.092	1.38E-06	2.23E-01
8	<i>PLEC</i>	Testis	0.556	0.118	2.28E-06	4.44E-01
8	<i>PLEC</i>	Adrenal gland	0.438	0.096	5.01E-06	6.54E-01
8	<i>PLEC</i>	Cells transformed fibroblasts	0.364	0.074	8.96E-07	6.00E-01
8	<i>PLEC</i>	Adipose subcutaneous	0.640	0.141	5.69E-06	6.66E-01
8	<i>PLEC</i>	Nerve tibial	0.468	0.102	4.33E-06	4.59E-01
8	<i>PLEC</i>	Thyroid	0.421	0.090	2.67E-06	5.00E-01
12	<i>RP11-967K21.1</i>	Colon transverse	0.573	0.128	8.02E-06	2.26E-01

SMR, summary data-based Mendelian randomization; expression quantitative trait locus, eQTL; SE, standard error; HEIDI, heterogeneity in dependent instruments.

考察

本研究では、病因解明につながるゲノム上の新規疾患感受性領域を発見すること、さらには C-、T-OPLL のサブタイプの遺伝的背景の違いを明らかにすること目的とした。OPLL 患者群 2,010 例と対照群 20,006 例を用いて GWAS メタ解析を行い、新規 8 領域を含む 14 の疾患感受性領域を同定した。その結果は、過去の GWAS で同定された疾患感受性遺伝子 *RSPO2* の OPLL への関与 (Nakajima et al., 2016) を補強するものであった。また、新規疾患感受性領域のリード SNP に隣接して、骨形成に関連すると報告されているいくつかの疾患感受性遺伝子の候補を発見した。*TMEM135* (transmembrane protein 135) は、新規疾患感受性領域 11q14.2 に存在する遺伝子で、膜貫通型タンパク質である (Scheideler et al., 2008)。過去の報告では、多能性脂肪組織由来幹細胞において、脂肪細胞系よりも骨芽細胞系でより強く発現していると報告されている (Scheideler et al., 2008)。また、16q22.1 に存在する *WWP2* (WW domain-containing E3 ubiquitin-protein ligase 2) は、骨芽細胞分化や軟骨細胞の成熟を制御する *RUNX2* の活性を増強し骨形成のポジティブレギュレーターとして機能していると報告されている (Zhu et al., 2017)。今後のこれらの疾患感受性領域に存在する遺伝子の機能解析による OPLL の病態解明が期待される。

GWAS の OPLL サブタイプ別の解析では、C-OPLL で 3 つ、T-OPLL で 9 つの疾患感受性領域が同定された。これらの遺伝子座のうち、C-OPLL の 1 つ、T-OPLL での 9 つが All-OPLL や他の OPLL サブタイプの解析では同定されないものであった。T-OPLL 疾患感受性領域のうち 19p12 のリード SNP である rs74707424 は *ZBTB40* の 3'-非翻訳領域に位置している。マウスの頭蓋骨から採取した骨芽細胞を用いた研究で、*Zbtb40* は骨芽細胞活性と骨量の調節因子として機能し、骨芽細胞において *Zbtb40* をノックダウンすることにより骨のミネラル化が劇的に減少することが報告されている (Doolittle et al. 2020)。しかし、サブタイプ解析で同定されたこれらの新規領域内のリード SNP はいずれも MAF が小さいものであり (表 3,4)、本 GWAS 研究の規模を考慮すると、結果の解釈には注意を要する。今後、規模を拡大した GWAS でこれらの領域の再現性を確認する必要がある。

Gene-based 相関解析では、OPLL と有意に関連する 3 つの遺伝子を発見した。この中の *EIF3E*、*EMC2* は *RSPO2* と同様に GWAS メタ解析で最も P 値が低い領域に存在する遺伝子である。*EIF3E* (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E) は、翻訳開始因子複合体の構成要素であり、翻訳開始時に必須のタンパク質をコードしている (Lee et al., 2015; Masutani et al., 2007)。異所性骨化モデルラットにおけるプロテオミクス研究では、*Eif3e* が骨化組織で上昇し、骨形成に重要な

役割を持つ hypoxia-inducible factor (HIF) シグナルを制御することで組織の骨化に関与している可能性が報告されており (Wei et al., 2022)、OPLL との関連が示唆される。

SMR では、OPLL との関連が示唆される新規遺伝子として、*PLEC* を同定した。*PLEC* 変異は単純型表皮水疱症の原因遺伝子であるが、表皮水疱症では骨粗鬆症が主な併存疾患の一つと報告されている (J. S.-C. Chen et al., 2019)。SMR の結果は、OPLL が骨代謝と密接に関連し、軟骨内骨化という過程を経て発症するという報告を補強するものである (Sato et al. 2007)。

限界点として、第一に GWAS サンプルサイズが挙げられる。本研究は世界最大規模の OPLL の GWAS ではあるが、疾患の希少性からサンプルの確保が難しく、規模としてはいまだ改善の余地がある。本研究では OPLL の高い遺伝率が示されており、今後さらに規模を拡大することで現在明らかとなっていない疾患感受性領域が発見される可能性が高い。第二に OPLL 患者の靭帯組織での詳細な遺伝子発現データが存在しないことから、疾患の原因となる組織、細胞種まで同定できていない点である。今後、OPLL 患者の手術検体を用いて single cell RNA sequence を行うなど組織での遺伝子発現解析研究も計画している。

本章の結果をまとめると、規模を拡大した GWAS により、新規 8 領域を含む 14 の疾患感受性領域を同定した。今後の機能解析により、OPLL につながる新たな機構が解明されることを期待する。

第二章

脊柱靱帯骨化症と他形質の関連、因果関係の推定

緒言

OPLL では様々な併存症との関連が注目されている。糖尿病 (Akune et al., 2001)、肥満症 (Kobashi et al., 2004)、低リン血症 (Kawaguchi et al., 2019)、高 CRP 血症 (Kawaguchi et al., 2019)、ビタミン A 欠乏 (Endo et al., 2022)、ビタミン B6 欠乏 (Endo et al., 2022) と OPLL の関連が報告されている。このように、OPLL と「関連」のある形質の報告が数多くあるが、いずれも「因果関係」は示されておらず、OPLL 発生の原因となるのか、OPLL の結果発生した表現型なのか、交絡によるものなのかは不明である。

近年、遺伝情報を使用し、形質同士の因果関係を推定する研究が盛んである (Lawlor et al., 2008)。メンデルランダム化解析 (Mendelian randomization: MR) は、配偶子形成時に遺伝情報がランダムに分配されることを利用した解析である。このランダムに分配される過程は、ランダム化対照試験での無作為化の過程と同等である。そして、原因形質と関連する SNP を操作変数 (instrumental variable: IV) とし、アウトカムとの因果関係を推定することが可能である。

本章では、MR を始めとする遺伝統計学的手法を用い、OPLL と遺伝的に関連のある形質を同定すること、さらには因果関係を明らかにすることで OPLL の治療・予防につながる形質を同定することを目的とした。

方法

遺伝相関

我々が行った OPLL GWAS の結果に対して、LDSC を用いて OPLL と他の形質との遺伝相関 (genetic correlation : GC) を推定した (Bulik-Sullivan et al. 2015)。解析には、過去に報告された日本人の 96 の複合形質の要約統計量を使用した (Akiyama et al., 2017; Akiyama et al., 2019; Kanai et al., 2018; Ishigaki et al., 2020)。MHC 領域は LD 構造が複雑なため、同領域に含まれる SNP は解析から除外した。算出した P 値は Benjamini-Hochberg 法を用いて補正を行い、FDR < 0.05 を有意とした。C-OPLL および T-OPLL は LDSC を用いるにはサンプルサイズが小さかったため、All-OPLL についてのみ GC を評価した。

メンデルランダム化解析

MR は GWAS 解析結果を使用し、形質に関連する SNP を IV とし、形質同士の因果関係を判断する方法である (Lawlor et al. 2008) (図 6)。MR を用い、OPLL と GC を認めた形質に関して OPLL との因果関係を評価した。過去に報告された GWAS の要約統計量を使用し、R パッケージ TwoSampleMR を用いて解析した (Hemani et al., 2018) (表 6)。

BMI に関しては、既報と同様の方法で日欧の BMI GWAS 結果を用いてデータを再構築して、使用した (Akiyama et al. 2017; Locke et al., 2015)。T2D、脳動脈瘤に関しては、それぞれ東アジア、欧州の GWAS の結果を使用した (Spracklen et al., 2020; Bakker et al., 2020)。骨粗鬆症に関しては、MR に使用するための適切な要約統計量が無かったため、その診断基準に使用される骨密度 (bone mineral density: BMD) のデータで代用し、欧州の BMD の GWAS 結果を使用した (Kemp et al., 2017)。

MR では原因形質のデータの中から、各疾患感受性領域内のリード SNP を抽出し、IV として用いた。OPLL GWAS データにその対象 SNP が存在しない場合、対象 SNP と LD にある SNP ($r^2 > 0.8$) で代用した。条件を満たす代用 SNP が無い場合は、解析から除外した。

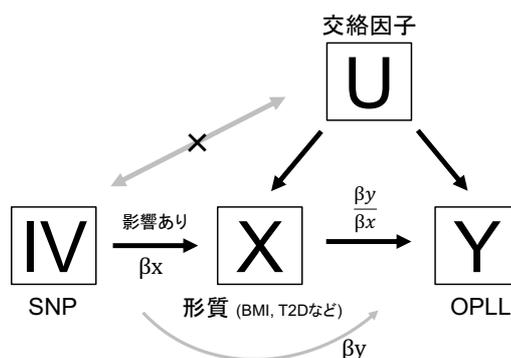


図 6. メンデルランダム化の概念図

原因形質と関連する SNP を操作変数 (IV) として用いる。IV は交絡因子 (U) とは関連がなく、原因形質 (X) を通じて結果形質 (Y) に効果を有する仮定のもと、因果推定を行う。

従来の IVW 法に加え、MR-Egger 法、simple median 法および weighted median 法を実施した。さらに、C-OPLL と T-OPLL の GWAS の要約統計量を用いてサブタイプでの解析も行い、OPLL サブタイプ間の差異を検討した。また、All-OPLL で有意となった SNP を IV として使用し、同様の方法で OPLL から他形質へ逆方法の MR も行なった。

表6. MRで使用したGWASデータ

形質	論文	人種	SNP数*
肥満度	Akiyama <i>et al.</i> Nat Genet 2017	日本、欧州	160
2型糖尿病	Spracklen <i>et al.</i> Nature 2020	東アジア	178
脳動脈瘤	Bakker <i>et al.</i> Nat Genet 2020	東アジア、欧州	15
骨密度	Kemp <i>et al.</i> Nat Genet 2017	欧州	241

*操作変数として使用した SNP の数

MR では因果関係を評価する形質間でのサンプル重複は結果を歪める可能性がある。したがって、重複の無い、異なったサンプルを用いたコホートデータを用いて因果推定を行うことが望ましい。本研究では、OPLL 研究で使用した対照群のサンプルは、BMI 研究で使用したサンプルの最大 2.2%、T2D 研究で使用したサンプルの 3.4%と重複していたが、OPLL 患者群との重複は無かった。MR でのサンプル重複の結果への影響をシミュレーションにより評価した研究によると、本研究のように、重複サンプルが対照群のみに限定されている場合、歪みの無い推定値が得られることが示されている (Burgess *et al.*, 2016)。

高 BMI の OPLL に対する影響の比較

BMI の OPLL への遺伝的影響を調べるために遺伝的リスクスコア (polygenic risk score: PRS)を用いた。BMI PRS は pruning and thresholding 法を用いて作成した (Khera *et al.* 2018)。作成は Discovery 相、Validation 相、Test 相の 3 相で行った (図 7)。

Discovery 相では、日本 BMI GWAS で推定された SNP の効果量で重み付けをしたリスクアレルの総和として PRS を作成した。すなわち、

$$PRS_i = \sum_{k=1}^n \beta_k X_{k,i}$$

上式での、i は各個人、n は閾値を満たした SNP の数、 β_k は k 番目の SNP の効果量、 $X_{k,i}$ は個人 i における k 番目の SNP のリスクアレル数を示す。

PLINK を用いて、9 種類の LD 閾値 ($r^2 = 0.1-0.9$)に基づいて 250 kb の window

幅で SNP を pruning した。さらに、LD 閾値毎に GWAS の P 値でも 20 種類の閾値 (P 値 = $5.0 \times 10^{-8} \sim 1$) で SNP を選別し、合計で $9 \times 20 = 180$ 種類の PRS を作成した。

Validation 相では、Illumina OmniExpressExome チップを用いてジェノタイプピングを行った別のデータセットを用いて、最適な pruning パラメータを決定した。Validation データは OPLL GWAS と同一の方法で QC、Imputation が行なわれた。最も適合性の良いモデルを評価するために BMI と BMI-PRS で Spearman の相関解析を行い、最も相関係数 (ρ) の高いものを最適なパラメータとした。その結果、 $r^2 = 0.9$ 、 P 値 = 0.6 が最適と分った (図 8)。

Test 相では、OPLL GWAS で使用した患者群、対照群に対し、上記で決定した BMI PRS を用いてスコアリングを行った。各 OPLL データセットについて、主成分 1-10 を共変量として用い、ロジスティック回帰分析を用いて BMI-PRS と OPLL の関連性を評価した。次に、固定効果モデルのもと逆分散法を用いてメタ解析し、各 OPLL データセットにおける BMI-PRS を統合した。この解析は、All-OPLL、C-OPLL、T-OPLL について行なった。

最後に、サブタイプ間での比較を行うため、C-OPLL 患者群-T-OPLL 患者群で、主成分 1-10 を共変量とし、ロジスティック回帰分析を行った。

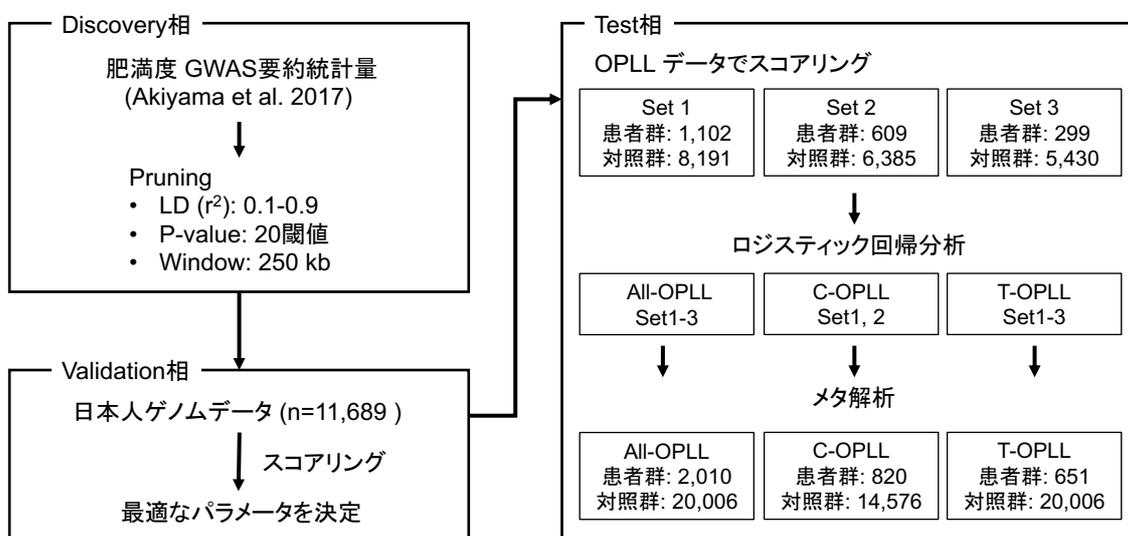


図 7. 肥満度遺伝的リスクスコア解析の流れ

Discovery 相で複数のパラメータ条件の下、遺伝的リスクスコア (PRS) を作成する。Validation 相で最適なパラメータを決定し、Test 相では決定したパラメータを用いて PRS のスコアリングを行う。LD, linkage disequilibrium, OPLL, ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine.

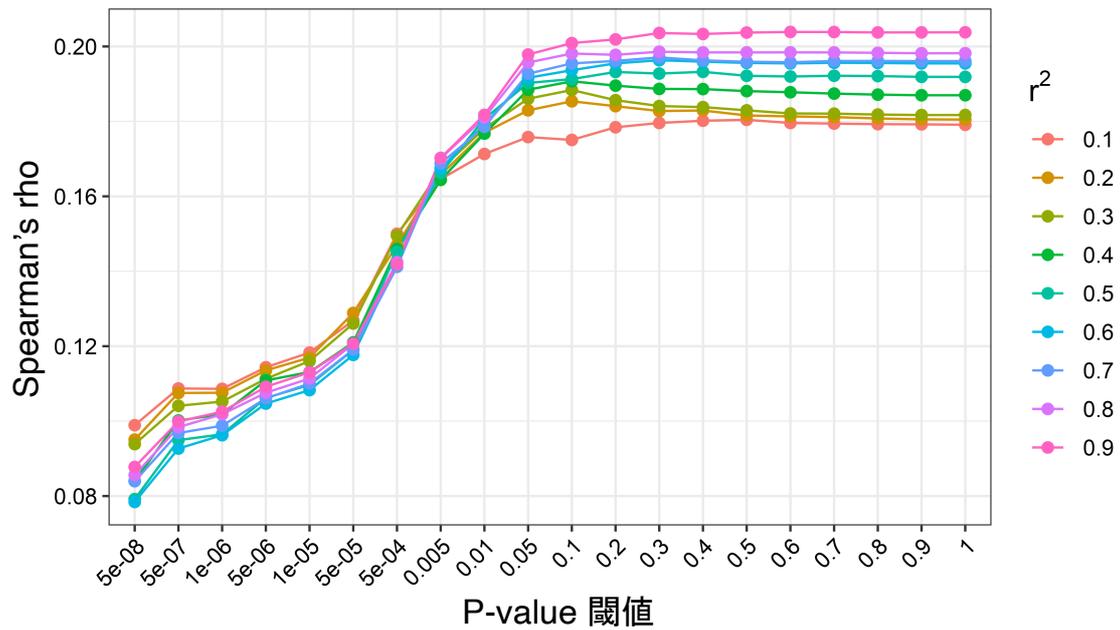


図 8. 遺伝的リスクスコアでの最適なパラメータの決定

縦軸は BMI と BMI-PRS 間の Spearman 相関解析の相関係数 (rho) を、横軸は、pruning における P 値の閾値を表す。各色は、パラメータとして使用した linkage disequilibrium の閾値を表している。r² = 0.9、P 値 = 0.6 が最適であった。

結果

GC

OPLL と 96 の形質の GC の結果を図 9 に示す。OPLL は BMI、T2D との間に正の GC を示した。OPLL との GC (rg) は T2D より BMI で高かった。OPLL は脳動脈瘤に負の GC を示した。また、有意ではないものの、骨粗鬆症とも負の GC の傾向があった。

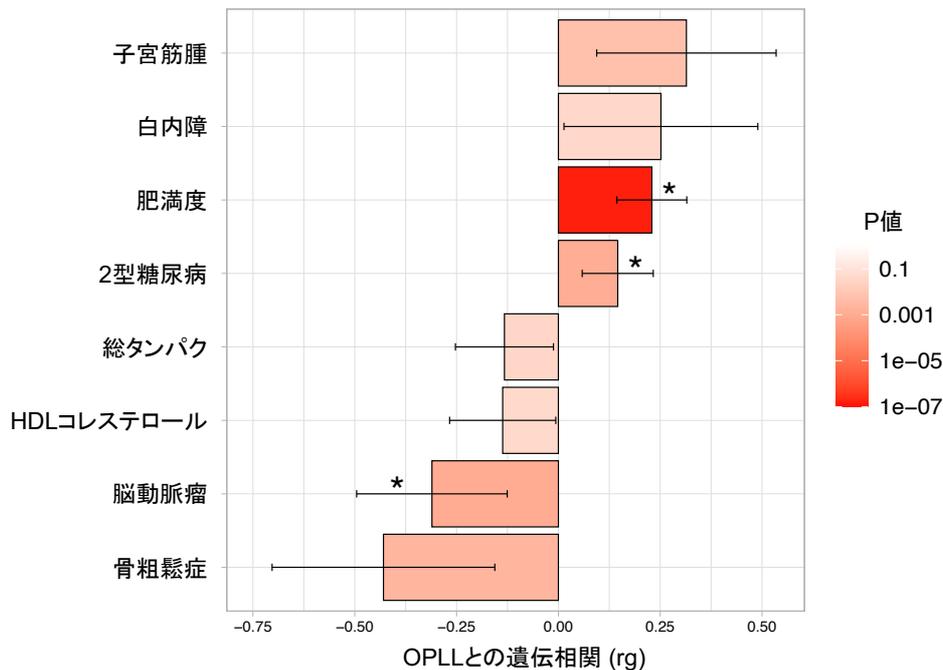


図 9. OPLL と他形質の遺伝相関

肥満度、2 型糖尿病とは正の相関、脳動脈瘤とは負の相関が見られた。エラーバーは 95%信頼区間を、赤色の階調は P 値を、*は有意な相関を示す (FDR < 0.05)。HDL: high density lipoprotein.

MR を用いた因果推定

GC で有意な相関を示した 3 形質、相関傾向のあった骨粗鬆症に対し、MR を行なった。BMI の All-OPLL に対する因果推定では、IVW 法および weighted median 法で有意な因果関係が示された (図 10)。MR-Egger 回帰切片のゼロからの逸脱はバイアスの存在を示唆するが、その推定値は 0.005 (P 値 = 0.580)であり、バイアスの影響は示されなかった。一方、T2D の All-OPLL に対する因果関係は、いずれの MR 手法でも示すことができなかった (図 10)。

骨粗鬆症は BMD の減少を特徴とする。BMD の All-OPLL への因果推定では、

IVW 法および simple median 法で、BMD 増加の All-OPLL との因果関係を見出し、骨形成を促進する因子が OPLL に関与していることが示された (図 10)。

脳動脈瘤については、MR 手法によって β 推定値の方向が異なっていた。これは、IV として用いた SNP の数が少ないことが影響していると推測される (図 10)。

BMI、T2D、脳動脈瘤、BMD に対する OPLL の因果関係を評価するために逆方向 MR (OPLL→他形質)を行ったが、4 つの形質に対する有意な因果関係はいずれも示されなかった (結果非提示)。

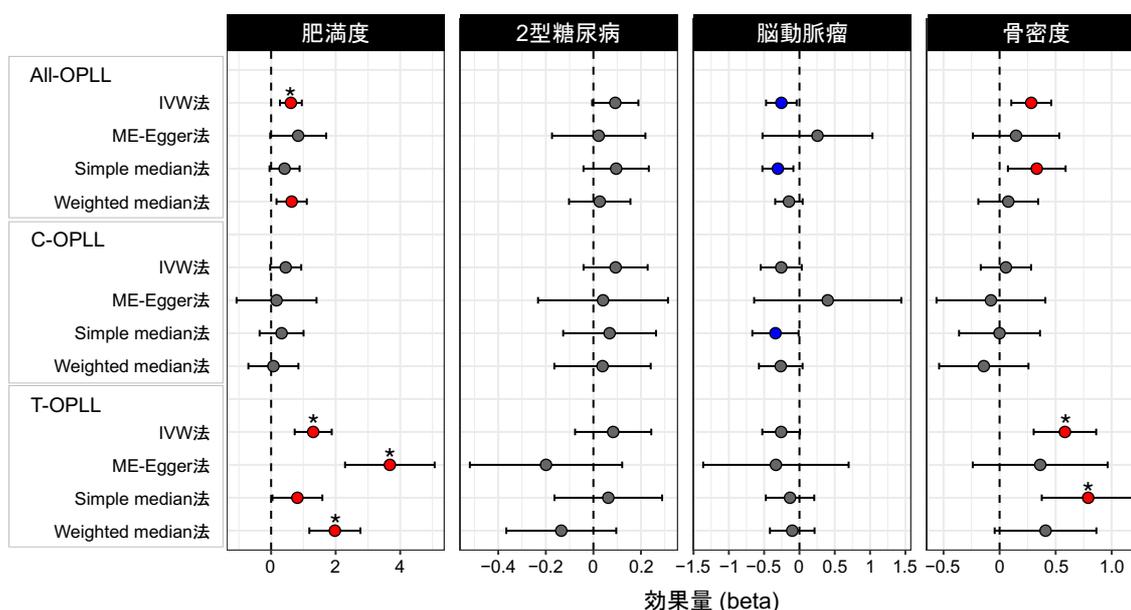


図 10. OPLL のメンデルランダム化解析

有意 (P 値 < 0.05)な結果は、正の因果効果については赤の点で、負の因果効果については青の点で示す。エラーバーは 95%信頼区間を示す。*は多重検定を補正し、より厳しい基準で有意 (P 値 $< 0.05/12 = 4.17 \times 10^{-3}$) なものを示す。IVW, inverse variance weighted.

OPLL サブタイプにおける他形質との因果推定では、C-OPLL と T-OPLL で対照的な結果が得られた (図 10)。BMI は T-OPLL に有意な因果関係を示したが、C-OPLL には因果関係を示さなかった。T-OPLL に関するすべての効果量は All-OPLL に関する解析よりも大きく、T-OPLL 発生には BMI のより強い影響が関与していることが示された。

BMD についても、All-OPLL と比較して T-OPLL では BMD 増加の影響が強いことが示された。T2D や脳動脈瘤については、脳動脈瘤の simple median 法を用いた結果を除き、有意な結果は得られなかった。

高 BMI の OPLL に対する影響の比較

最後に BMI の PRS を作成し、All-、C-、T-OPLL に対し、遺伝的な肥満危険度の OPLL への影響を比較した。BMI-PRS はすべての OPLL 群に対し、正の効果量を示した。特に T-OPLL での効果量が高いことがわかった (図 11)。C-OPLL と T-OPLL を比較すると、本症例での限られた症例数でも BMI PRS の効果は T-OPLL で有意に大きかった (P 値 = 0.016)。

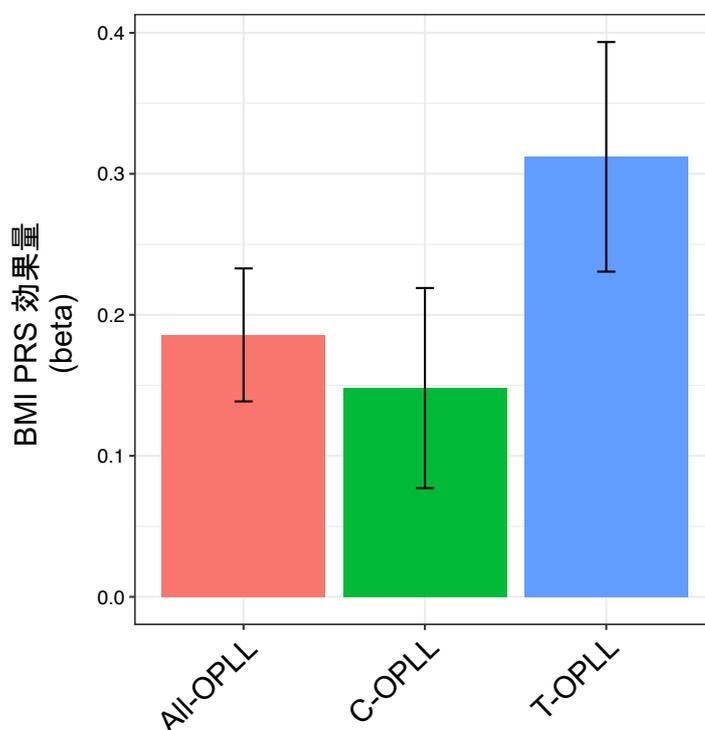


図 11. BMI 遺伝的リスクスコア (PRS)の OPLL に対する効果量の差
横軸は3つのタイプの OPLL に対する BMI PRS の効果量を表す。効果量は特に T-OPLL で大きい。エラーバーは、効果量の 95%信頼区間。

考 察

本章では、遺伝統計学的手法を用い、OPLL と遺伝的に関連のある形質を同定すること、さらには因果関係を明らかにすることを目的とした。その結果、OPLL は BMI、T2D との間に正の GC を、脳動脈瘤との間に負の GC を示すことが明らかとなった。さらに、MR により、高 BMI と OPLL の間に正の因果関係を示した。過去の臨床研究では、OPLL 患者の BMI は非患者に比べて有意に高いことが報告されている (Endo et al., 2020; Kobashi et al., 2004)。肥満は異所性の骨形成を促進すると推測されている。Yamamoto らは、レプチン受容体遺伝子の機能欠失変異を有する肥満モデルラット Zucker fatty rat で OPLL の高発生率を報告した (Yamamoto et al., 2004)。Lv らは、高脂肪食誘発された肥満が骨形成を促進することを報告した。高脂肪食誘発肥満マウスでは、大腿骨における BMD および海綿体厚が正常対照マウスよりも有意に大きく、骨髄由来間葉系幹細胞における *Runx2* の発現は有意に高かったこと、その一方で、骨芽細胞分化を抑制し、破骨細胞分化を促進する *Ppar γ* の発現は、対照マウスよりも有意に低値であったと報告している (Lv et al., 2010)。また、肥満が全身の骨形成と異所性骨化に及ぼす影響は同じではないかもしれないが、本研究と同様に MR を用いて BMI と BMD の因果関係を解析した研究では、BMI の上昇は踵骨 BMD (Ma et al., 2021; Song et al., 2020)、腰椎 BMD (Song et al., 2020) と正の因果関係があったと報告されている。これらの結果は、肥満と OPLL に正の因果関係があるとする我々の結果を支持するものである。今後、肥満と OPLL を繋ぐ詳細なメカニズムの解明が必要である。

T2D と OPLL の間に正の GC を認めた一方で、MR では T2D と OPLL の間に因果関係は示されなかった。過去、OPLL に関する多くの研究が、OPLL と T2D との関係に注目している (Akune et al., 2001, Kobashi et al., 2004)。インスリンは内因性のチロシンキナーゼ受容体や骨形成の強力な同化因子である IGF-1 受容体に作用する (Giustina et al., 2008; Locatelli and Bianchi, 2014)。従って、T2D 患者でのインスリン作用の低下により惹起されたインスリン産生の増加が靭帯の骨形成細胞を刺激し、OPLL を引き起こすと推測されている (Akune et al. 2001)。しかし、本研究では、T2D が OPLL の発症に与える影響は少ないという結果であった。現在までに報告された OPLL 患者の T2D 有病率が高い理由の多くは、OPLL 患者の肥満率の高さに起因すると考えられる。

MR により高 BMD と OPLL の因果関係を明らかにした。この結果は、OPLL 患者は全身の骨化傾向が強く、前縦靭帯 (Nishimura et al., 2018)、棘間靭帯 (Mori et al., 2016)、項靭帯 (Yoshii et al., 2019) など他の脊椎靭帯の異所性骨化をしばしば認めるという過去の報告と一致する。また、OPLL 患者では肩、股関節、膝、

足関節などの脊椎外に骨化病変がみられるといった報告もある (Hukuda et al., 1983)。脳動脈瘤と OPLL の関係については報告が無く、今後さらなる検証が必要と考える。

MR により肥満、高 BMD の OPLL の因果関係が示されたが、その強さには OPLL のサブタイプ間で違いがあった。いずれも T-OPLL に対して、特に因果関係が強かった。BMI PRS においても T-OPLL では特に強い肥満の影響が関与していることが明らかとなった。これは臨床研究において T-OPLL は高度肥満を有する特徴的な疾患亜群であることを見出した我々の先行研究の結果と一致する (Endo et al., 2020)。疾患の研究では、高血圧や糖尿病のように、共通の徴候や症状に基づいて臨床的に定義された疾患が、実は原因においては異質であることがしばしばある。したがって、本研究のように疾患のサブタイプに着目した研究は、疾患を詳細に分類し、原因の違いによって個別化された治療を目指す上で有用である。

現在まで OPLL と関連のある併存症に関する報告は多数存在する一方で、これらへの治療介入の効果を検証した報告は渉猟の範囲では見当たらなかった。このような研究が積極的に行われてこなかった最大の原因は、因果関係が明らかされていないことが大きいと推測する。本研究では肥満と OPLL の因果関係が示されたが、肥満への介入は多くの施設で実現可能な内容と考える。今後、肥満への介入により OPLL 患者の QOL が改善することを期待する。

本研究の限界点として、一部の MR に使用した GWAS の規模がまだ十分でないことが挙げられる。脳動脈瘤で使用したデータは現時点では世界最大規模であるが、より大規模な GWAS により疾患に関連する SNP がさらに検出されれば、それらを使用することでより正確な MR での推定が可能となる。また OPLL に関しても、さらに規模を拡大した GWAS データを使用することで、OPLL から他形質への因果推定がより正確となる。

本章の結果をまとめると、OPLL は BMI と T2D と正の、脳動脈瘤と負の有意な GC があり、骨粗鬆症とも負の GC の傾向があることが発見された。また、OPLL と BMI、骨粗鬆症の評価に用いられる BMD とは正の因果関係があることが示された。これらの因果関係はサブタイプ間で違いがあり、いずれも T-OPLL に対して特に強い因果関係が示された。

結論および総括

- GWAS で新規 8 領域を含む 14 の OPLL 感受性領域を同定した。
- Gene-based 相関解析、SMR で疾患との関与が示唆される遺伝子を複数同定した。
- OPLL と BMI、T2D には正の、脳動脈瘤には負の遺伝相関があった。
- 高 BMI、高 BMD は OPLL に正の因果関係を示した。特に T-OPLL でその因果関係が強かった。

本研究では GWAS の規模を拡大することで、過去に報告された 6 領域から 14 領域へと 2 倍以上の疾患感受性領域を検出することに成功した。これらの領域に含まれる *TMEM135*、*WWP2* は骨代謝への関与が報告されており、疾患への関与が示唆される。今後、後縦靭帯組織やその関連組織において遺伝子発現情報やエピゲノム情報が明らかとなれば、本研究との統合解析により疾患感受性領域に含まれる遺伝子の詳細な調節機構が明らかになることが期待される。

また、本研究では、肥満、高 BMD が OPLL の原因となることを見出した。高 BMD への治療介入、則ち骨形成を抑制する治療の開発には骨折危険性増大等の懸念から、今後の詳細な研究と慎重な検討が必要である。一方で、肥満症への治療介入はより実践的である。実臨床において、肥満症を有する OPLL 患者は多数経験する一方で、肥満への治療介入は殆ど行われていないのが現状である。これは肥満への治療介入の障壁が高いからではなく、肥満と OPLL との関連を実感しつつも因果関係の有無が不明なため、「肥満への治療介入が果たして効果のあるものかどうか」を脊椎外科医が判断できなかつたためである。本研究では肥満と OPLL の因果関係が示され、肥満治療介入への妥当性が示された。また、肥満との因果関係が特に強い T-OPLL 患者は最も適した介入対象であろう。肥満を有する OPLL 患者への肥満治療介入により患者の QOL が改善することを期待するとともに、介入の効果を長期に渡り観察し評価することが今後の課題である。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究院・専門医学系部門機能再生医学分野・整形外科学教室・博士課程在学中に、理化学研究所に出向し行った研究をまとめたものです。本研究に関してご指導ご鞭撻を頂きました理化学研究所・骨関節疾患研究チーム 池川志郎先生、ゲノム解析応用研究チーム 寺尾知可史先生、整形外科学教室教授 岩崎倫政先生、および同准教授 高畑雅彦先生に心より感謝いたします。

本研究の課程において数々のご指導を賜りました理化学研究所・骨関節疾患研究チームの諸先生方、テクニカルスタッフの方々、ゲノム解析応用研究チームの諸先生方、技師の方々、北海道大学大学院医学研究院・専門医学系部門 機能再生医学分野・整形外科学教室の諸先生方に心よりの感謝を申し上げます。

また、本研究の一部は公益財団法人整形災害外科学研究助成財団からの助成 (no. 452)を受けたものである。

利益相反

なし

引用文献

Akiyama, M., Ishigaki, K., Sakaue, S., Momozawa, Y., Horikoshi, M., Hirata, M., Matsuda, K., Ikegawa, S., Takahashi, A., Kanai, M., et al. (2019). Characterizing rare and low-frequency height-associated variants in the Japanese population. *Nat. Commun.* 10, 4393.

Akiyama, M., Okada, Y., Kanai, M., Takahashi, A., Momozawa, Y., Ikeda, M., Iwata, N., Ikegawa, S., Hirata, M., Matsuda, K., et al. (2017). Genome-wide association study identifies 112 new loci for body mass index in the Japanese population. *Nat. Genet.* 49, 1458–1467.

Akune, T., Ogata, N., Seichi, A., Ohnishi, I., Nakamura, K., and Kawaguchi, H. (2001). Insulin secretory response is positively associated with the extent of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83, 1537–1544.

Bakker, M.K., van der Spek, R.A.A., van Rheenen, W., Morel, S., Bourcier, R., Hostettler, I.C., Alg, V.S., van Eijk, K.R., Koido, M., Akiyama, M., et al. (2020). Genome-wide association study of intracranial aneurysms identifies 17 risk loci and genetic overlap with clinical risk factors. *Nat. Genet.* 52, 1303–1313.

Bulik-Sullivan, B.K., Loh, P.-R., Finucane, H.K., Ripke, S., Yang, J., Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Patterson, N., Daly, M.J., Price, A.L., and Neale, B.M. (2015). LD Score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 47, 291–295.

Burgess, S., Davies, N.M., and Thompson, S.G. (2016). Bias due to participant overlap in two-sample Mendelian randomization. *Genet. Epidemiol.* 40, 597–608.

Chen, J.S.-C., Yang, A., and Murrell, D.F. (2019). Prevalence and pathogenesis of osteopenia and osteoporosis in epidermolysis bullosa: An evidence-based review. *Exp. Dermatol.* 28, 1122–1130.

Das, S., Forer, L., Schönherr, S., Sidore, C., Locke, A.E., Kwong, A., Vrieze, S.I., Chew, E.Y., Levy, S., McGue, M., et al. (2016). Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat. Genet.* 48, 1284–1287.

de Leeuw, C.A., Mooij, J.M., Heskes, T., and Posthuma, D. (2015). MAGMA: generalized gene-set analysis of GWAS data. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004219.

Doolittle, M.L., Calabrese, G.M., Mesner, L.D., Godfrey, D.A., Maynard, R.D., Ackert-Bicknell, C.L., and Farber, C.R. (2020). Genetic analysis of osteoblast activity identifies *Zbtb40* as a regulator of osteoblast activity and bone mass. *PLoS Genet.* 16, e1008805.

Endo, T., Imagama, S., Kato, S., Kaito, T., Sakai, H., Ikegawa, S., Kawaguchi, Y., Kanayama, M., Hisada, Y., Koike, Y., et al. (2022). Association Between Vitamin A Intake and Disease Severity in Early-Onset Heterotopic Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine. *Global Spine J.* 12, 1770-1780.

Endo, T., Takahata, M., Koike, Y., and Iwasaki, N. (2020). Clinical characteristics of patients with thoracic myelopathy caused by ossification of the posterior longitudinal ligament. *J. Bone Miner. Metab.* 38, 63–69.

Giustina, A., Mazziotti, G., and Canalis, E. (2008). Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr. Rev.* 29, 535–559.

GTEx Consortium (2015). Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science* 348, 648–660.

Hemani, G., Zheng, J., Elsworth, B., Wade, K.H., Haberland, V., Baird, D., Laurin, C., Burgess, S., Bowden, J., Langdon, R., et al. (2018). The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome. *eLife* 7, e34408.

Hirata, M., Kamatani, Y., Nagai, A., Kiyohara, Y., Ninomiya, T., Tamakoshi, A., Yamagata, Z., Kubo, M., Muto, K., Mushiroda, T., et al. (2017). Cross-sectional analysis of BioBank Japan clinical data: A large cohort of 200,000 patients with 47 common diseases. *J. Epidemiol.* 27, S9–S21.

Hukuda, S., Mochizuki, T., Ogata, M., and Shichikawa, K. (1983). The pattern of spinal and extraspinal hyperostosis in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament and the ligamentum flavum causing myelopathy. *Skeletal Radiol.* 10, 79–85.

Ishigaki, K., Akiyama, M., Kanai, M., Takahashi, A., Kawakami, E., Sugishita, H., Sakaue, S., Matoba, N., Low, S.-K., Okada, Y., et al. (2020). Large-scale genome-wide association study in a Japanese population identifies novel susceptibility loci across different diseases. *Nat. Genet.* 52, 669–679.

Kanai, M., Akiyama, M., Takahashi, A., Matoba, N., Momozawa, Y., Ikeda, M., Iwata, N., Ikegawa, S., Hirata, M., Matsuda, K., et al. (2018). Genetic analysis of quantitative traits in the Japanese population links cell types to complex human diseases. *Nat. Genet.* 50, 390–400.

Kawaguchi, Y., Nakano, M., Yasuda, T., Seki, S., Suzuki, K., Yahara, Y., Makino, H., Kitajima, I., and Kimura, T. (2017). Serum biomarkers in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL): Inflammation in OPLL. *PloS One* 12, e0174881.

Kemp, J.P., Morris, J.A., Medina-Gomez, C., Forgetta, V., Warrington, N.M., Youlten, S.E., Zheng, J., Gregson, C.L., Grundberg, E., Trajanoska, K., et al. (2017). Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat. Genet.* 49, 1468–1475.

Khera, A.V., Chaffin, M., Aragam, K.G., Haas, M.E., Roselli, C., Choi, S.H., Natarajan, P., Lander, E.S., Lubitz, S.A., Ellinor, P.T., et al. (2018). Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat. Genet.* 50, 1219–1224.

Kobashi, G., Washio, M., Okamoto, K., Sasaki, S., Yokoyama, T., Miyake, Y., Sakamoto, N., Ohta, K., Inaba, Y., Tanaka, H., et al. (2004). High body mass index after age 20 and diabetes mellitus are independent risk factors for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine in Japanese subjects: a case-control study in multiple hospitals. *Spine* 29, 1006–1010.

Lawlor, D.A., Harbord, R.M., Sterne, J.A.C., Timpson, N., and Davey Smith, G. (2008). Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat. Med.* 27, 1133–1163

Lee, A.S.Y., Kranzusch, P.J., and Cate, J.H.D. (2015). eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature* 522, 111–114.

Locatelli, V., and Bianchi, V.E. (2014). Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *Int. J. Endocrinol.* 2014, 235060.

Locke, A.E., Kahali, B., Berndt, S.I., Justice, A.E., Pers, T.H., Day, F.R., Powell, C., Vedantam, S., Buchkovich, M.L., Yang, J., et al. (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 518, 197–206.

Loh, P.-R., Danecek, P., Palamara, P.F., Fuchsberger, C., A Reshef, Y., K Finucane, H., Schoenherr, S., Forer, L., McCarthy, S., Abecasis, G.R., et al. (2016). Reference-based phasing using the Haplotype Reference Consortium panel. *Nat. Genet.* 48, 1443–1448.

Ly, S., Wu, L., Cheng, P., Yu, J., Zhang, A., Zha, J., Liu, J., Wang, L., Di, W., Hu, M., et al. (2010). Correlation of obesity and osteoporosis: Effect of free fatty acids on bone marrow-derived mesenchymal stem cell differentiation. *Exp. Ther. Med.* 1, 603–610.

Ma, B., Li, C., Pan, J., Zhang, S., Dong, H., Wu, Y., and Lv, J. (2021). Causal Associations of Anthropometric Measurements With Fracture Risk and Bone Mineral Density: A Mendelian Randomization Study. *J. Bone Miner. Res.* 36, 1281–1287.

Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., and Imataka, H. (2007). Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J* 26, 3373–3383.

Matsunaga, S., and Sakou, T. (2012). Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: etiology and natural history. *Spine* 37, E309-314.

Matsunaga, S., Yamaguchi, M., Hayashi, K., and Sakou, T. (1999). Genetic analysis of ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine* 24, 937–939.

Mori, K., Yoshii, T., Hirai, T., Iwanami, A., Takeuchi, K., Yamada, T., Seki, S., Tsuji, T., Fujiyoshi, K., Furukawa, M., et al. (2016). Prevalence and distribution of ossification of the supra/interspinous ligaments in symptomatic patients with cervical ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine: a CT-based multicenter cross-sectional study. *BMC Musculoskelet. Disord.* 17, 492.

Nagai, A., Hirata, M., Kamatani, Y., Muto, K., Matsuda, K., Kiyohara, Y., Ninomiya, T.,

Tamakoshi, A., Yamagata, Z., Mushiroda, T., et al. (2017). Overview of the BioBank Japan Project: Study design and profile. *J. Epidemiol.* 27, S2–S8.

Nakajima, M., Kou, I., Ohashi, H., Genetic Study Group of the Investigation Committee on the Ossification of Spinal Ligaments, and Ikegawa, S. (2016). Identification and Functional Characterization of RSPO2 as a Susceptibility Gene for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 202–207.

Nakajima, M., Takahashi, A., Tsuji, T., Karasugi, T., Baba, H., Uchida, K., Kawabata, S., Okawa, A., Shindo, S., Takeuchi, K., et al. (2014). A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat. Genet.* 46, 1012–1016.

Nishimura, S., Nagoshi, N., Iwanami, A., Takeuchi, A., Hirai, T., Yoshii, T., Takeuchi, K., Mori, K., Yamada, T., Seki, S., et al. (2018). Prevalence and Distribution of Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis on Whole-spine Computed Tomography in Patients With Cervical Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament: A Multicenter Study. *Clin. Spine Surg.* 31, E460–E465.

Patterson, N., Price, A.L., and Reich, D. (2006). Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet.* 2, e190.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575.

Sakou, T., Taketomi, E., Matsunaga, S., Yamaguchi, M., Sonoda, S., and Yashiki, S. (1991). Genetic study of ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine with human leukocyte antigen haplotype. *Spine* 16, 1249–1252.

Sato, R., Uchida, K., Kobayashi, S., Yayama, T., Kokubo, Y., Nakajima, H., Takamura, T., Bangirana, A., Itoh, H., and Baba, H. (2007). Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: histopathological findings around the calcification and ossification front. *J. Neurosurg. Spine* 7, 174–183.

Scheideler, M., Elabd, C., Zaragosi, L.-E., Chiellini, C., Hackl, H., Sanchez-Cabo, F., Yadav, S., Duszka, K., Friedl, G., Papak, C., et al. (2008). Comparative transcriptomics of human multipotent stem cells during adipogenesis and osteoblastogenesis. *BMC Genomics* 9, 340.

Song, J., Zhang, R., Lv, L., Liang, J., Wang, W., Liu, R., and Dang, X. (2020). The Relationship Between Body Mass Index and Bone Mineral Density: A Mendelian Randomization Study. *Calcif. Tissue Int.* 107, 440–445.

Spracklen, C.N., Horikoshi, M., Kim, Y.J., Lin, K., Bragg, F., Moon, S., Suzuki, K., Tam, C.H.T., Tabara, Y., Kwak, S.-H., et al. (2020). Identification of type 2 diabetes loci in 433,540 East Asian individuals. *Nature* 582, 240–245.

Sugita, D., Yayama, T., Uchida, K., Kokubo, Y., Nakajima, H., Yamagishi, A., Takeura, N., and Baba, H. (2013). Indian hedgehog signaling promotes chondrocyte differentiation in enchondral ossification in human cervical ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine* 38, E1388-1396.

Terayama, K. (1989). Genetic studies on ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Spine* 14, 1184–1191.

Wei, Z., Guo, S., Wang, H., Zhao, Y., Yan, J., Zhang, C., and Zhong, B. (2022). Comparative proteomic analysis identifies differentially expressed proteins and reveals potential mechanisms of traumatic heterotopic ossification progression. *J Orthop Transl* 34, 42–59.

Willer, C.J., Li, Y., and Abecasis, G.R. (2010). METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2190–2191.

Yamamoto, K., Imakiire, A., Shishido, T., and Masaoka, T. (2004). Effects of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate on ossification of the posterior longitudinal ligament in Zucker fatty rats. *J. Orthop. Surg. Hong Kong* 12, 45–54.

Yoshii, T., Hirai, T., Iwanami, A., Nagoshi, N., Takeuchi, K., Mori, K., Yamada, T., Seki, S., Tsuji, T., Fujiyoshi, K., et al. (2019). Co-existence of ossification of the nuchal ligament is associated with severity of ossification in the whole spine in patients with

cervical ossification of the posterior longitudinal ligament -A multi-center CT study. *J. Orthop. Sci. Off. J. Jpn. Orthop. Assoc.* 24, 35–41.

Zhu, W., He, X., Hua, Y., Li, Q., Wang, J., and Gan, X. (2017). The E3 ubiquitin ligase WWP2 facilitates RUNX2 protein transactivation in a mono-ubiquitination manner during osteogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 292, 11178–11188.

Zhu, Z., Zhang, F., Hu, H., Bakshi, A., Robinson, M.R., Powell, J.E., Montgomery, G.W., Goddard, M.E., Wray, N.R., Visscher, P.M., et al. (2016). Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets. *Nat. Genet.* 48, 481–487.