

原著

食道扁平上皮がんにおける Wnt 関連遺伝子の マイクロアレイデータマイニング

地寄悠吾^{1*}, 奥村真由¹, 北風陽菜¹, 岡本章吾¹, 水野翔子¹, 吉澤正人²,
中田 晋³, 芦原英司², 矢野義孝¹

¹ 京都薬科大学 臨床薬学教育研究センター

² 京都薬科大学 病態生理学分野

³ 京都薬科大学 臨床腫瘍学分野

Wingless/int-1 (Wnt) 遺伝子ファミリーは, Wnt シグナル伝達経路に関与し, 様々ながんとの関係性が示唆されているが, 食道扁平上皮がんとの関係性は未だ明らかになっていない. 本研究では, GEO の遺伝子発現データセットを用いて, 食道扁平上皮がんにおける Wnt 遺伝子ファミリーの発現量と食道扁平上皮がんの関係性の評価を行った. 9 種類の実験データと生存期間に関する情報を含む 1 種類の臨床試験データを解析対象とした.

遺伝子の発現量を解析した結果, Wnt2, Wnt7B ががん組織で過剰発現していること, Wnt4, Wnt5B が非がん組織にて過剰発現していることを示した. 本研究は既存データの再解析による遺伝子の探索である. よって, 関係性を決定するためにはさらなる前向き研究が必要であるが, 本研究結果が今後の食道扁平上皮がんにおける Wnt ファミリー遺伝子群の分子機能解明の一助となることが期待される.

キーワード: 食道扁平上皮がん, マクロアレイデータベース, Wnt 遺伝子ファミリー

受付日: 2022 年 1 月 19 日, 受理日: 2022 年 2 月 17 日

緒言

食道扁平上皮がんは, 世界的に罹患者が多いがんのひとつであり, 一般に予後が悪いとされている¹⁾. 食道扁平上皮がんの発生や予後は喫煙, 食生活, 大量のアルコール摂取などが関連しており^{2,3)}. 近年ではマイクロアレイ解析研究により, がん患者の遺伝子発現プロファイルと

治療感受性, 病変転移, 患者の生存率などとの関係性が示唆されている^{4,5)}.

Wingless/int-1 (Wnt) 遺伝子ファミリーは, Wnt シグナル伝達経路に関与する分泌型シグナル伝達タンパク質をコードし⁶⁾, 現在までに脊椎動物から 19 種類の Wnt 遺伝子ファミリーが見つかっている⁷⁾. Wnt シグナルは組織の維持に不可欠であり, Wnt シグナルの活性化はがんの発生との関係性が示唆されている^{8,9)}. 例えば, Wnt2 遺伝子は Wnt シグナル伝達経路を活性化し, 食道扁平上皮がんの不良な予後と相関する可能性が示唆されている¹⁰⁾. また, Wnt3a

* 連絡先:
〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町 5
京都薬科大学 臨床薬学教育研究センター

遺伝子が食道扁平上皮がんの予後規定因子である可能性を示す研究もある¹¹⁾。しかし、多くの Wnt 遺伝子ファミリーと食道扁平上皮がんの関係性は未だ明らかになっていない。

遺伝子発現情報データベース (GEO, Gene Expression Omnibus portal) は、米国国立生物学情報センター (NCBI, National Center for Biotechnology Information) が公開している機能的ゲノミクスデータレポジトリである¹²⁾。GEO データベースには、マイクロアレイ実験のデータが日々蓄積されており、一般に公開されている。近年のマイクロアレイ解析研究では、これらの実験データを再解析することで新たな知見を報告している。

本研究では、GEO の遺伝子発現データセットを用いて、食道扁平上皮がんにおける Wnt 遺伝子ファミリーの発現量と食道扁平上皮がんの関係性の評価を行った。加えて、食道扁平上皮がん患者の予後とこれらの遺伝子の発現プロファイルの関連性を評価した。

方法

マイクロアレイデータの取得

食道扁平上皮がんの患者を対象としたマイクロアレイデータセットを GEO にて検索し、ダウンロードした (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。["Esophageal squamous cell carcinoma" or "ESCC"] を検索ワードとして検索し、食道扁平上皮がん患者のマイクロアレイ分析を行った実験データを取得した。最終的に非がん組織とがん組織を比較した 9 種類の実験データ (GSE17351¹³⁾, GSE20347¹⁴⁾, GSE23400¹⁵⁾, GSE38129¹⁶⁾, GSE45670¹⁷⁾, GSE77861¹⁸⁾, GSE100942¹⁹⁾, GSE161533 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>) と、国際がんゲノム

コンソーシアム (ICGC) 研究プロジェクトで行われた生存期間に関する情報を含む 1 種類の臨床試験データ (GSE54995²⁰⁾) を解析対象とした。

Wnt ファミリー遺伝子の発現量の比較

本研究では、Wnt 関連遺伝子ファミリーとして Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt9A, Wnt9B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11, Wnt16 を対象とした。遺伝子発現量は 2 を底とする対数変換を行ったのち、中央値からの差に変換して標準化した。遺伝子の塩基配列は長いいため、同一遺伝子に複数のマイクロアレイプローブが搭載されており、その発現量が異なることが多々ある。そのため、本研究では遺伝子名とプローブ ID を併記することで同一遺伝子内での異なる発現量として取り扱った。

Wnt ファミリー遺伝子と生存期間の比較

生存期間情報を含む実験データを用いて各 Wnt ファミリー遺伝子の発現量を共変量とし、Cox 比例ハザードモデルを用いて影響因子の評価を行った。

統計解析

遺伝子発現量の比較には対応のある t 検定を行った。生存期間に影響を与える遺伝子を含むシーケンスに関して Cox 比例ハザードモデルを用いて要因解析を行った。データの取得、解析には統計ソフトウェア R Version 3.5.3 を用いた (<https://cran.r-project.org/>)。遺伝統計学では多数の仮説検定を行うため多重性を考慮して有意水準を修正することが多いが、本検討では有意水準は 0.05 とした。統計学的な有意性だけが絶対的な基準ではないが、本稿では一つの基準として統計学的に有意性を示した結果を中心に考察した。

結果

本研究で用いたマイクロアレイのプラットフォームとして GPL570 (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array), GPL571 (Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array), GPL96 (Affymetrix Human Genome U133A Array), GPL97 (Affymetrix Human Genome U133B Array), GPL15436 (NimbleGen Human CGH 3x720K Whole-Genome Tiling v3.0 Array) が用いられていた。各プラットフォームにおいて、Gene Symbol が Wnt ファミリー遺伝子を含む Probe ID の発現量に関して比較した結果を表 1 に示す。GSE20347, GSE23400, GSE38129, GSE17351 の実験データに関しては、一部の遺伝子の発現量において欠損があった。そのため、該当する遺伝子の p 値を算出することができず、空欄としている。

Wnt2 (205648_at) は GSE77861 を除いて統計学的に有意に非がん組織に比べがん組織群で発現量が高かった (図 1)。GSE77861 に関しても統計学的に有意ではなかったが、非がん組織に比べがん組織群で発現量が高い傾向があった。Wnt7B (217681_at) は GSE23400 と GSE77861 を除いて統計学的に有意にがん組織群で発現量が高かった (図 2)。GSE23400 では発現量に顕著な差はなく、GSE77861 は非がん組織に比べがん組織群で発現量が低い傾向があった。また、Wnt4 (208606_s_at) は GSE100942, GSE45670, GSE161533, GSE17351 を除いて統計学的に有意に非がん組織に比べがん組織で遺伝子発現量が有意に低かった (図 3)。GSE100942 に関しては統計学的に有意ではなかったが非がん組織に比べがん組織で遺伝子発現量が低い傾向があった。GSE45670, GSE16533 に関しては遺伝子発現量に顕著な差はなかった。GSE17351 に関しては非がん組織に比べがん組織で遺伝子発現量

が高い傾向があった。Wnt5B (221029_s_at) は GSE100942 を除いて統計学的に有意に非がん組織に比べがん組織で遺伝子発現量が低かった (図 4)。GSE100942 に関しては統計学的に有意ではなかったが非がん組織に比べがん組織で遺伝子発現量が低い傾向があった。これらの結果は Wnt2, Wnt7B, Wnt4, Wnt5B が食道扁平上皮がんと何らかの関係性があることを示唆している。

これらの結果から、Wnt2, Wnt7B, Wnt4, Wnt5B に関して GSE54995 を用いて遺伝子発現量と生存期間の関係性の評価を行った。GSE54995 のマイクロアレイ実験で用いられた GPL15436 では Wnt4 を含むシークエンスが 6 種類、Wnt2 を含むシークエンスが 26 種類、Wnt5B を含むシークエンスが 10 種類、Wnt7B を含むシークエンスが 9 種類存在していた。それぞれの遺伝子毎に Cox 比例ハザードモデルを用いて要因解析を行ったところ、Wnt2 以外の遺伝子に関しては統計学的に有意なハザード比を示さなかった。最終的に Wnt2 を示すプローブ ID CHR07FS116706876 及び CHR07FS116737899 がそれぞれハザード比 0.0271 (95%CI: 0.002-0.329, p=0.0046) と 6.5998 (1.329-32.77, p=0.0210) を示した。この結果は CHR07FS116706876 の発現増加が生存期間の延長、CHR07FS116737899 の発現増加が生存期間の短縮を示しており、一つの遺伝子の中で塩基配列の発現量が異なっている。そのため、今回の結果から Wnt2 が生存期間とどのように関連するかを評価することは困難であった。

考察

本研究では、Wnt 関連遺伝子の発現量と食道扁平上皮がんの関係性を評価するため、マイクロアレイデータベースを用いた解析を行った。複数のマイクロアレイ試験の結果を評価した

表 1 各データセットにおける Wnt ファミリー遺伝子発現量比較における p 値

Probe ID	Gene Symbol	GSE100942	GSE20347	GSE23400	GSE38129	GSE45670	GSE77861	GSE161533	GSE17351
1552973_at	WNT9B	0.7108				0.0010	0.1301	0.0000	
1553045_at	WNT9A	0.3332				0.0007	0.1033	0.0005	
1556689_a_at	WNT4	0.8551				0.0156	0.2419	0.0023	
205648_at	WNT2	0.0078				0.0761	0.3622	0.0000	0.0075
205990_s_at	WNT5A	0.1555				0.3045	0.3357	0.0234	0.7924
206213_at	WNT10B	0.7718				0.2404	0.6399	0.0179	
206458_s_at	WNT2B	0.3979				0.5617	0.6436	0.1944	
206459_s_at	WNT2B	0.3508				0.8357	0.8476	0.7062	
206737_at	WNT11	0.4789				0.0038	0.3067	0.2779	
207612_at	WNT8B	0.1565				0.0135	0.4240	0.3106	
208570_at	WNT1	0.7119				0.3262	0.3314	0.7504	
208606_s_at	WNT4	0.2160				0.0000	0.0010	0.7237	0.2591
210248_at	WNT7A	0.2392				0.2469	0.0057	0.0532	
213425_at	WNT5A	0.0280				0.1074	0.6166	0.0004	0.6386
217681_at	WNT7B	0.0065				0.0305	0.0057	0.0005	
221029_s_at	WNT5B	0.0651				0.0000	0.0001	0.0000	0.0086
221113_s_at	WNT16	0.6722				0.2618	0.0079	0.1198	
221455_s_at	LOC101929777 /// WNT3	0.1665				0.3377	0.5777	0.1225	
221608_at	WNT6	0.3682				0.1192	0.0709	0.5866	
221609_s_at	WNT6	0.9583				0.4899	0.0137	0.9098	
222086_s_at	WNT6	0.9359				0.0013	0.0753	0.7075	
223537_s_at	WNT5B	0.1766				0.0375	0.9927	0.0003	
223709_s_at	WNT10A	0.8113				0.0331	0.8865	0.0000	0.0284
224022_x_at	WNT16	0.2234				0.7925	0.8197	0.3053	0.2775
224259_at	WNT8A	0.1784				0.8224	0.0499	0.2823	
229103_at	LOC101929777 /// WNT3	0.0090				0.0088	0.1056	0.0937	0.8830
229154_at	WNT10A	0.9873				0.8432	0.0243	0.6945	
230299_s_at	WNT5B	0.0892				0.0238	0.1335	0.4693	
230643_at	WNT9A	0.5506				0.0176	0.8869	0.0200	0.5763
230751_at	WNT4	0.2230				0.0992	0.0296	0.7664	
231743_at	LOC101929777 /// WNT3	0.3491				0.1931	0.2267	0.2465	
236123_at	WNT2B	0.7894				0.1630	0.2096	0.4609	0.5886
238105_x_at	WNT7B	0.5783				0.0001	0.1053	0.0000	
238512_at	WNT2B	0.8450				0.1856	0.5584	0.1040	0.2303
71933_at	WNT6	0.9899				0.7591	0.0873	0.0029	

発現量データに欠損があった遺伝子においては、p 値は空欄としている。

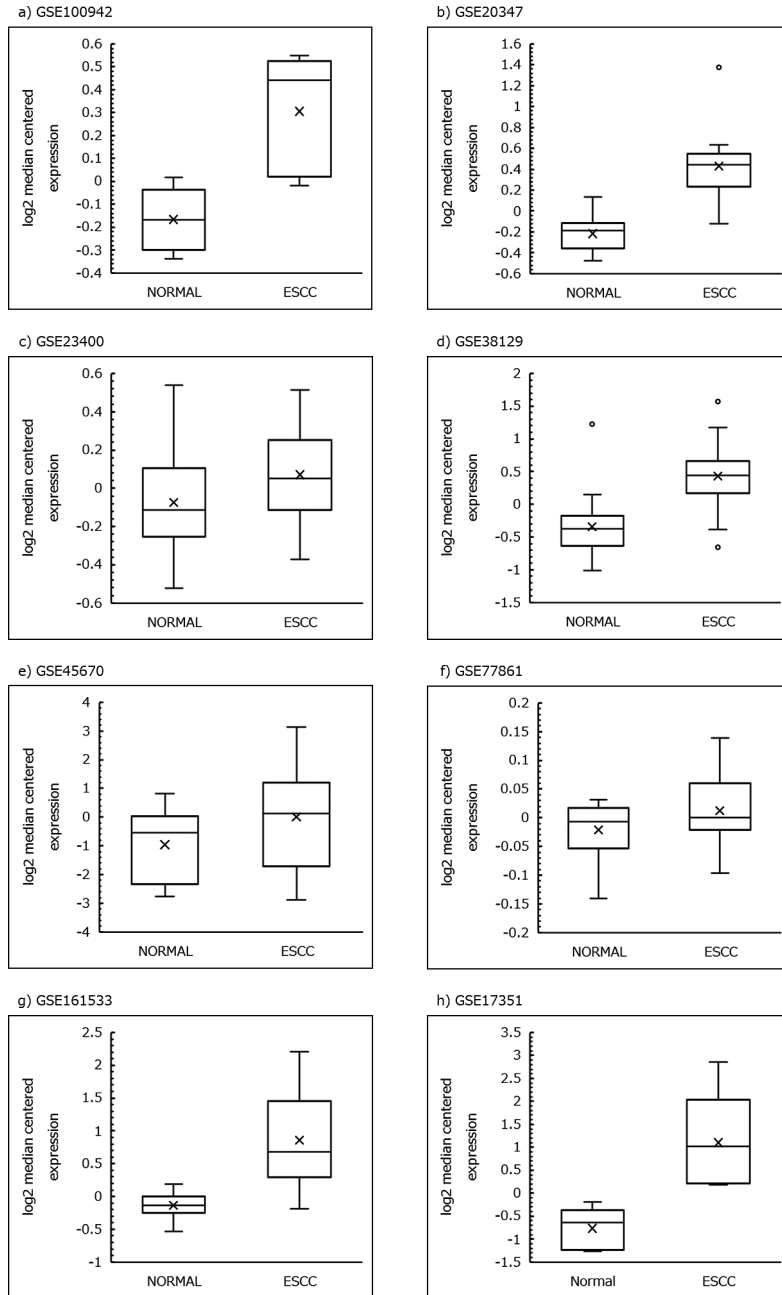


図 1 非がん組織, 食道扁平上皮がん組織における Wnt2 (205648_at) の遺伝子発現量の比較

ところ, 食道扁平上皮がん患者において Wnt2 遺伝子, Wnt7B 遺伝子, Wnt4 遺伝子, Wnt5B 遺伝子の関与が示唆された. Wnt 遺伝子からコードされる Wnt タンパク質は様々なシグナル伝達によってがんの発生と関連している. 先

行研究では, Wnt2 遺伝子の発現は非小細胞肺癌, 乳がん, 大腸がんや子宮がんなどとの関係性が示唆されている²¹⁻²³). 大腸がんでの Wnt2 の発現量増加と乳がんでの低下²¹), 非小細胞がんでは Wnt2 の発現と腫瘍の組織型及びグレー

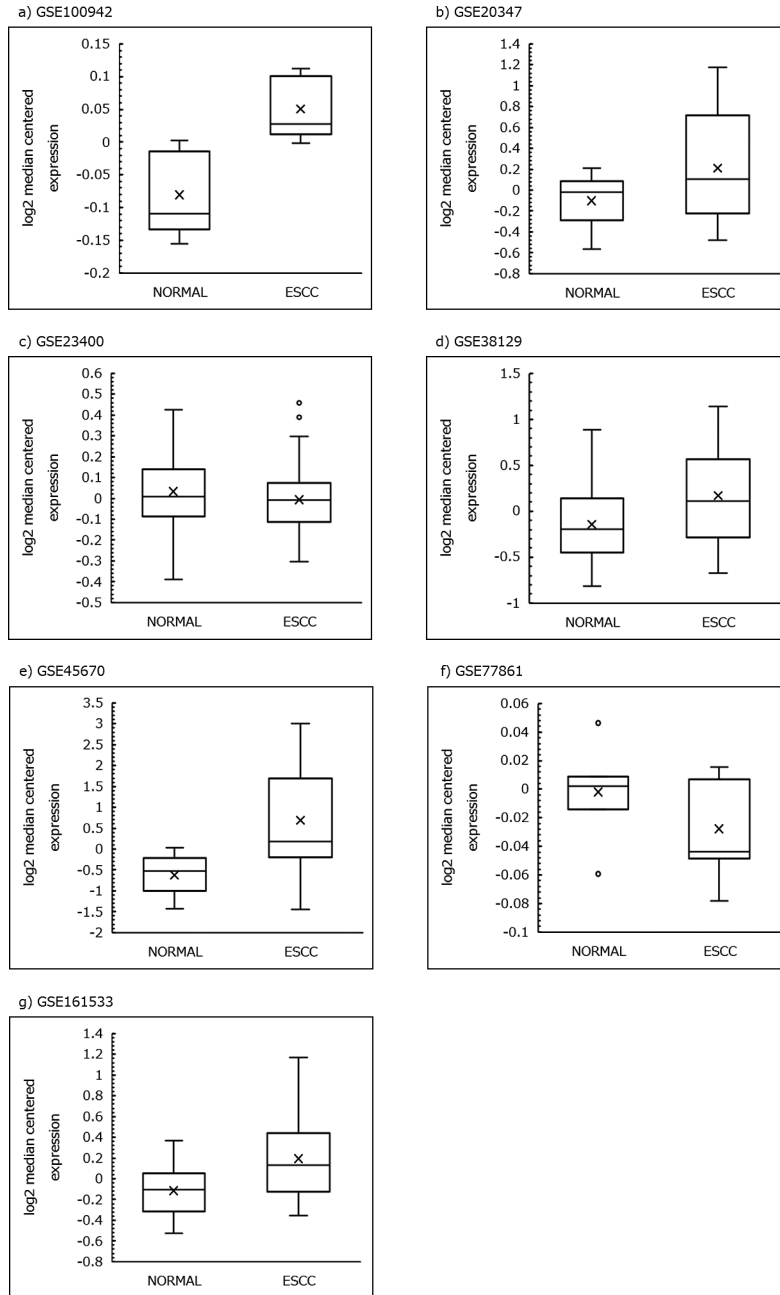


図 2 非がん組織，食道扁平上皮がん組織における Wnt7B (217681_at) の遺伝子発現量の比

ドに関連すること²²⁾，子宮頸がん患者では Wnt2 の発現量が高いと予後が良い²³⁾，などの報告が行われている。Deng らは，食道扁平上皮がん患者の 55.5% (147/265) で Wnt2 が過剰発現していたが生存期間との相関は示さないことを報

告している²⁴⁾。Fu らは Wnt2 の受容体である 7 回膜貫通型受容体 FZD2 受容体の発現が Wnt2 の発現量と正の相関を示すこと，FZD2 受容体の発現の増加が食道扁平上皮がん患者の不良な予後と相関することを示している²⁵⁾。本研究で

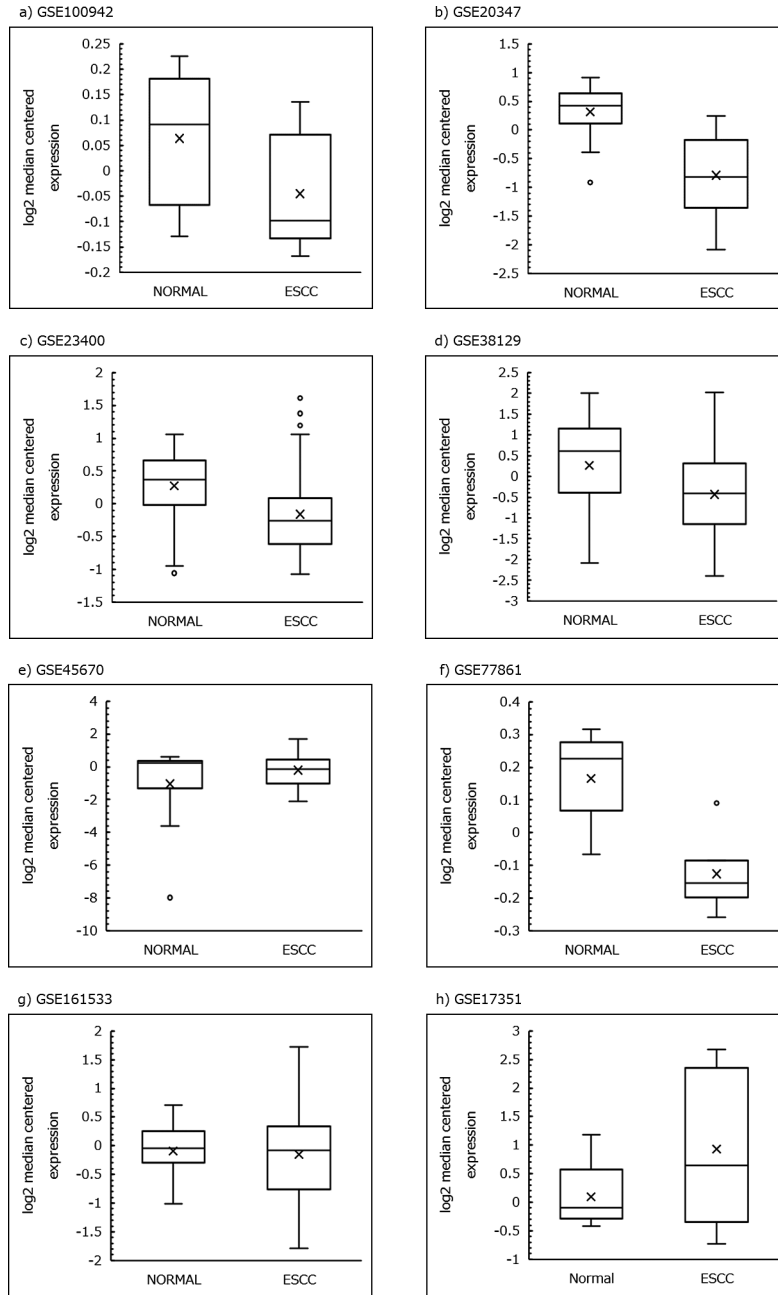


図3 非がん組織, 食道扁平上皮がん組織における Wnt4 (208606_s_at) の遺伝子発現量の比較

は, Wnt2 遺伝子 (205648_at) の発現量の増加が食道扁平上皮がんの発生と関係している可能性を示唆しており, 先行研究と類似の結果を示した. Wnt2 遺伝子と生存期間の関係性に関しては明確な評価を行うことはできなかったが,

これは遺伝子の発現量だけが臨床的影響に関与するわけではなく, 多くの環境的要因や生活習慣ががんの進展や生存期間に影響するためであると考えられる. 例えば, Iwasaki らは年齢, 肥満度, 身体活動度, 飲酒, 喫煙の5つのリスク

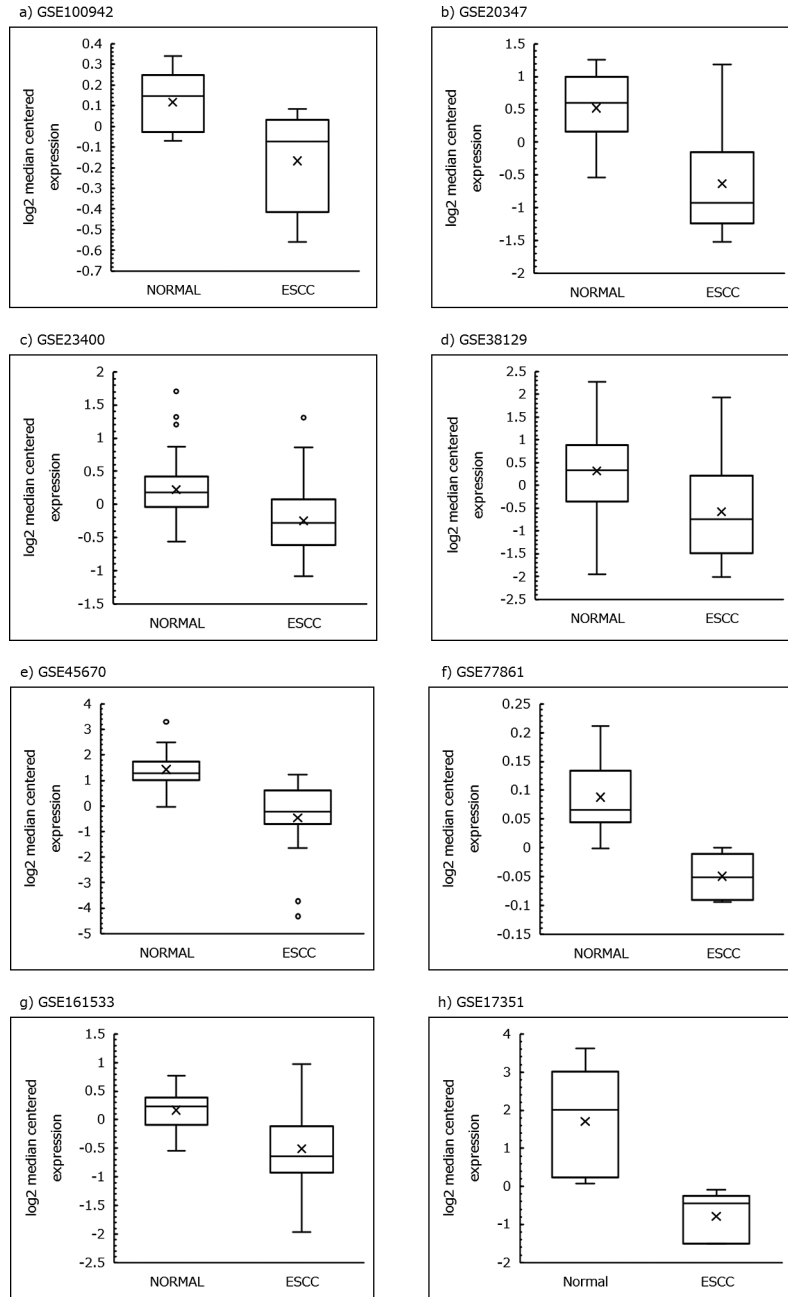


図 4 非がん組織，食道扁平上皮がん組織における Wnt5B (221029_s_at) の遺伝子発現量の比較

要因に遺伝情報を加えた大腸がんの罹患予測モデルを報告している²⁶⁾。また，Andres らは乳がん患者の転帰を予測するうえで特定の遺伝子の発現と喫煙が重要な役割を果たすことを示唆している²⁷⁾。今後，遺伝子的要因と環境要因や生

活習慣を包括したモデルによるがんの予後予測が必要になっていくと考えられる。

Wnt7B 遺伝子は腎細胞がんや大腸がんなどと関係していることが報告されている。Fan らは，腎細胞がん患者で平面内細胞極性に関与する

Wnt/PCP 経路が活性化されており, それに関連する Wnt2, Wnt4, Wnt7B, Wnt5B などの遺伝子発現量が上昇していることを報告している²⁸⁾. Shuai らは Wnt7B が Wnt/ β カテニンシグナル経路を介して大腸がんの転移に寄与していることを報告している²⁹⁾. 本研究では, 食道扁平上皮がん組織において Wnt7B (217681_at) の発現が上昇しており同様の経路と関連している可能性があると考えられる.

Wnt4 は胚の発生や恒常性維持, 多くの細胞型の発生と分化に重要な役割を果たしている³⁰⁾. Yang らは Wnt4 が大腸がん患者の血清中で上昇していること, Wnt4/ β カテニン経路を活性化することで血管新生を促進し大腸がんの進行を促進することを示した³¹⁾. 一方, Miano らは抗ヒストンメチル基転移酵素 (Enhancer of Zeste Homolog 2) の発現増加が paired box 8 (PAX8) のメチル化を促進し, PAX8 の発現を抑制することで Wnt4 の発現を低下させ, 消化管質性腫瘍の発症を促進することを示した³²⁾. 本研究では Wnt4 (208606_s_at) 遺伝子の発現量が食道扁平上皮がん組織で低下していたが, その機序などに関しては不明である.

Wnt5B は WNT5A と類似性が高く, 乳がんや大腸がんなどの関係性が示唆されている³³⁾. Qun らは肺腺がん Wnt5B が高発現し, リンパ節転移と正の相関関係があることを明らかにした³⁴⁾. 本研究では食道扁平上皮がんにおける Wnt5B (221029_s_at) の低発現が示唆されたがこの機序に関しては不明である.

本研究の研究限界として, マイクロアレイデータベースを用いたトランスクリプトーム解析であることが挙げられる. 本研究では食道扁平上皮がんに関連性のある可能性のある遺伝子 (Probe ID) を遺伝統計学に基づき提案したが, 実際の実験性を判断するためには in vitro あるいは in vivo での実験が必要である. 今回のような in silico における検討はあくまでも実験を

行う前段階でターゲットとする遺伝子を探索することを目的としている. また, 本研究ではがん遺伝子との関係性のみに着目したが, 実際の臨床では遺伝子以外の環境要因もがんに大きく影響する. そのため, 今後そのような遺伝子以外の環境要因も含めた解析による関連遺伝子の同定が必要となってくると考えられる.

本研究では, 複数のマイクロアレイ解析データを用いて食道扁平上皮がん Wnt 関連遺伝子との関係性の評価を行い, 複数のマイクロアレイ実験の結果から Wnt2 (205648_at), Wnt7B (217681_at), Wnt4 (208606_s_at), Wnt5B (221029_s_at) と食道扁平上皮がんとの関連性が示唆された. 本研究の結果は今後の食道扁平上皮がんに関する Wnt 関連遺伝子の分子機能解明の一助となると考えられる.

【謝辞】

この研究は, 京都薬科大学共同研究推進事業「本学における遺伝統計学研究プラットフォームの構築」(2018-2019 年度) の助成金交付により研究が遂行されたものです. この場を借りて深く御礼申し上げます.

【利益相反】

本研究において利益相反はない

【引用文献】

- 1) Peter C Enzinger, Robert J Mayer. *Esophageal cancer*. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 349(23), 2241-2252.
- 2) Yunhua Fan, Jian-Min Yuan, Renwei Wang, Yu-Tang Gao, Mimi C Yu. Alcohol, tobacco, and diet in relation to esophageal cancer: the Shanghai Cohort Study. *Nutr. Cancer.* **2008**, 60(3), 354-363.
- 3) Qiao-Li Wang, Shao-Hua Xie, Wen-Tao Li, Jesper Lagergren. Smoking Cessation and Risk of Esophageal Cancer by Histological Type: Systematic Review and Meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, 109(12).
- 4) Matthew Meyerson, Stacey Gabriel, Gad Getz. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, 11(10), 685-696.

- 5) Wei Guo, Yao-Guang Jiang. Current gene expression studies in esophageal carcinoma. *Curr. Genomics*. **2009**, 10(8), 534–539.
- 6) Roel Nusse. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. **2005**, 15(1), 28–32.
- 7) Akira Kikuchi, Hideki Yamamoto, Akira Sato. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol*. **2009**, 19(3), 119–129.
- 8) Hisayuki Yao, Eishi Ashihara, Taira Maekawa. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human cancers. *Expert Opin. Ther. Targets*. **2011**, 15(7), 873–887.
- 9) Eishi Ashihara, Tetsuya Takada, Taira Maekawa. Targeting the canonical Wnt/ β -catenin pathway in hematological malignancies. *Cancer Sci*. **2015**, 106(6), 665–671.
- 10) Li Fu, Chunyu Zhang, Li-Yi Zhang, Sui-Sui Dong, Lu-Hui Lu, Juan Chen, Yongdong Dai, Yan Li, Kar Lok Kong, Dora L Kwong, Xin-Yuan Guan. Wnt2 secreted by tumour fibroblasts promotes tumour progression in oesophageal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Gut*. **2011**, 60(12), 1635–1643.
- 11) Junya Oguma, Soji Ozawa, Akihito Kazuno, Miho Nitta, Yamato Ninomiya, Hiroshi Kajiwara. Wnt3a expression is associated with poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett*. **2018**, 15(3), 3100–3108.
- 12) Ron Edgar, Michael Domrachev, Alex E Lash. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic. Acids Res*. **2002**, 30(1), 207–210.
- 13) James J Lee, Mitsuteru Natsuizaka, Shinya Ohashi, Gabrielle S Wong, Munenori Takaoka, Carmen Z Michaylira, Daniela Budo, John W Tobias, Michiyuki Kanai, Yasuhiro Shirakawa, Yoshio Naomoto, Andres J P Klein-Szanto, Volker H Haase, Hiroshi Nakagawa. Hypoxia activates the cyclooxygenase-2-prostaglandin E synthase axis. *Carcinogenesis*. **2010**, 31(3), 427–434.
- 14) Nan Hu, Robert J Clifford, Howard H Yang, Chaoyu Wang, Alisa M Goldstein, Ti Ding, Philip R Taylor, Maxwell P Lee. Genome wide analysis of DNA copy number neutral loss of heterozygosity (CNNLOH) and its relation to gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Genomics*. **2010**, 11, 576.
- 15) Hua Su, Nan Hu, Howard H Yang, Chaoyu Wang, Mikiko Takikita, Quan-Hong Wang, Carol Giffen, Robert Clifford, Stephen M Hewitt, Jian-Zhong Shou, Alisa M Goldstein, Maxwell P Lee, Philip R Taylor. Global gene expression profiling and validation in esophageal squamous cell carcinoma and its association with clinical phenotypes. *Clin. Cancer Res*. **2011**, 17(9), 2955–2966.
- 16) Nan Hu, Chaoyu Wang, Robert J Clifford, Howard H Yang, Hua Su, Lemin Wang, Yuan Wang, Yi Xu, Ze-Zhong Tang, Ti Ding, Tongwu Zhang, Alisa M Goldstein, Carol Giffen, Maxwell P Lee, Philip R Taylor. Integrative genomics analysis of genes with biallelic loss and its relation to the expression of mRNA and micro-RNA in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Genomics*. **2015**, 16(1), 732.
- 17) J Wen, H Yang, M Z Liu, K J Luo, H Liu, Y Hu, X Zhang, R C Lai, T Lin, H Y Wang, J H Fu. Gene expression analysis of pretreatment biopsies predicts the pathological response of esophageal squamous cell carcinomas to neo-chemoradiotherapy. *Ann Oncol*. **2014**, 25(9), 1769–1774.
- 18) Hayriye Verda Erkizan, Kory Johnson, Svetlana Ghimbovschi, Deepa Karkera, Gregory Trachiotis, Houtan Adib, Eric P Hoffman, Robert G Wadleigh. African-American esophageal squamous cell carcinoma expression profile reveals dysregulation of stress response and detox networks. *BMC Cancer*. **2017**, 17(1), 426.
- 19) Xiao-Yan Ming, Xu Zhang, Ting-Ting Cao, Li-Yi Zhang, Jia-Li Qi, Ngar-Woon Kam, Xu-Ming Tang, Yu-Zhu Cui, Bao-Zhu Zhang, Yan Li, Yan-Ru Qin, Xin-Yuan Guan. RHCG Suppresses Tumorigenicity and Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma via Inhibiting NF- κ B Signaling and MMP1 Expression. *Theranostics*. **2018**, 8(1), 185–198.
- 20) Yongmei Song, Lin Li, Yunwei Ou, Zhibo Gao, Enmin Li, Xiangchun Li, Weimin Zhang, Jiaqian Wang, Liyan Xu, Yong Zhou, Xiaojuan Ma, Lingyan Liu, Zitong Zhao, Xuanlin Huang, Jing Fan, Lijia Dong, Gang Chen, Liying Ma, Jie Yang, Longyun Chen, Minghui He, Miao Li, Xuehan Zhuang, Kai Huang, Kunlong Qiu, Guangliang Yin, Guangwu Guo, Qiang Feng, Peishan Chen, Zhiyong Wu, Jianyi Wu, Ling Ma, Jinyang Zhao, Longhai Luo, Ming Fu, Bainan Xu, Bo Chen, Yingrui Li, Tong Tong, Mingrong Wang, Zhihua Liu, Dongxin Lin, Xiuqing Zhang, Huanming Yang, Jun Wang, Qimin Zhan. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature*. **2014**, 509, 91–95.

- 21) Alexandros Zougos, Maria Michelli, Ilenia Chatziandreou, Afroditi Nonni, Harikleia Gakiopoulou, Nikolaos V Michalopoulos, Andreas C Lazaris, Angelica A Saetta. mRNA coexpression patterns of Wnt pathway components and their clinicopathological associations in breast and colorectal cancer. *Pathol. Res. Pract.* **2021**, 227, 153679.
- 22) Anna Wrona, Aleksandra Sejda, Rafał Dziadziuszko, Jacek Jassem. Prognostic Significance of Wnt1, Wnt2, E-Cadherin, and β -catenin Expression in Operable Non-small Cell Lung Cancer. *J. Histochem. Cytochem.* **2021**, 69(11), 711–722.
- 23) Yuexin Hu, Mingjun Zheng, Dandan Zhang, Rui Gou, Ouxuan Liu, Shuang Wang, Bei Lin. Identification of the prognostic value of a 2-gene signature of the WNT gene family in UCEC using bioinformatics and real-world data. *Cancer Cell Int.* **2021**, 21(1), 516.
- 24) Feiyan Deng, Keming Zhou, Wenli Cui, Dong Liu, Yuqing Ma. Clinicopathological significance of wnt/ β -catenin signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, 8(3), 3045–3053.
- 25) Yufei Fu, Qi Zheng, Yingying Mao, Xiyi Jiang, Xin Chen, Pei Liu, Bin Lv, Tuxiong Huang, Jiao Yang, Yongran Cheng, Xiaoyi Dai, Chunyan Dai, Xi Wang, Yifei Yin, Tengjiao Song, Weiyang Jin, Chang Zou, Tianhui Chen, Li Fu, Zhe Chen. WNT2-Mediated FZD2 Stabilization Regulates Esophageal Cancer Metastasis via STAT3 Signaling. *Front Oncol.* **2020**, 10, 1168.
- 26) Motoki Iwasaki, Sachiko Tanaka-Mizuno, Aya Kuchiba, Taiki Yamaji, Norie Sawada, Atsushi Goto, Taichi Shimazu, Shizuka Sasazuki, Hansong Wang, Loïc Le Marchand, Shoichiro Tsugane, Japan Public Health Center-based Prospective Study (JPHC Study) Group Affiliations, Inclusion of a Genetic Risk Score into a Validated Risk Prediction Model for Colorectal Cancer in Japanese Men Improves Performance. *Cancer Prev. Res. (Phila.)*. **2017**, 10(9), 535–541.
- 27) Sarah A Andres, Katie E Bickett, Mohammad A Alatoum, Theodore S Kalbfleisch, Guy N Brock, James L Wittliff. Interaction between smoking history and gene expression levels impacts survival of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, 152(3), 545–556.
- 28) Wen-Lang Fan, Yuan-Ming Yeh, Tsung-Ta Liu, Wei-Ming Lin, Tse-Yen Yang, Chao-Wei Lee, Tsung-Chieh Lin. Leptin Is Associated with Poor Clinical Outcomes and Promotes Clear Cell Renal Cell Carcinoma Progression. *Biomolecules.* **2021**, 11(3), 431.
- 29) Shuai Jiang, Qiwen Li, Yimin Liu, Huimin Zhang, Qianyu Wang, Yu Chen, Xiaoyang Shi, Jun Li, Hailing Zhang, Yi Zhang, Dongqing Xia, Man Wu, Jiajia Lin, Chenglin Zhang, Suhua Pang, Jiamin Jiang, Yan Wen, Peipei Zhang. Activation of WNT7b autocrine eases metastasis of colorectal cancer via epithelial to mesenchymal transition and predicts poor prognosis. *BMC Cancer.* **2021**, 21.
- 30) Quanlong Zhang, Yan Pan, Jingjing Ji, Yuxin Xu, Qiaoyan Zhang, Luping Qin. Roles and action mechanisms of WNT4 in cell differentiation and human diseases: a review. *Cell Death Discov.* **2021**, 7(1), 287.
- 31) Dongmei Yang, Qing Li, Renduo Shang, Liwen Yao, Lianlian Wu, Mengjiao Zhang, Lihui Zhang, Ming Xu, Zihua Lu, Jie Zhou, Li Huang, Xiaodong Huang, Du Cheng, Yanning Yang, Honggang Yu. WNT4 secreted by tumor tissues promotes tumor progression in colorectal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, 39(1), 251.
- 32) Zhiguo Miao, Fanggeng Wu, Haiyun Wei, Zhipeng Luo, Kun Wu, Jiangnan Zhang. Enhancer of zeste homolog 2-mediated paired box 8 methylation promotes gastrointestinal stromal tumor progression through Wnt4 downregulation. *Cancer Gene Ther.* **2021**, 28(10–11), 1162–1174.
- 33) Sarocha Suthon, Rachel S Perkins, Vitezslav Bryja, Gustavo A Miranda-Carboni, Susan A Krum. WNT5B in Physiology and Disease. *Front Cell Dev. Biol.* **2021**, 9, 667581.
- 34) Qun Zhang, Hang Fan, Hongda Liu, Jiajia Jin, Suhua Zhu, Li Zhou, Hongbin Liu, Fang Zhang, Ping Zhan, Tangfeng Lv, Yong Song. WNT5B exerts oncogenic effects and is negatively regulated by miR-5587-3p in lung adenocarcinoma progression. *Oncogene.* **2020**, 39(7), 1484–1497.

Data mining analysis of the Wnt gene families in esophageal squamous cell carcinoma

Yugo Chisaki¹, Mayu Okumura¹, Haruna Kitakaze¹, Shogo Okamoto¹, Shoko Mizuno¹, Masato Yoshizawa², Susumu Nakata³, Eishi Ashihara², Yoshitaka Yano¹

¹Education and Research Center for Clinical Pharmacy, Kyoto Pharmaceutical University

²Department of Clinical and Translational Physiology, Kyoto Pharmaceutical University

³Department of Clinical Oncology, Kyoto Pharmaceutical University

Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is one of the most common cancers worldwide. The Wingless/int-1 (Wnt) gene family is involved in the Wnt signal pathway and plays an important role in various cancers. However, the relationship between ESCC and the Wnt signal pathway remains unclear. In this study, we evaluated the relationship between the expression levels of the Wnt family genes in ESCC using the Gene Expression Omnibus (GEO) dataset. Nine datasets comparing normal and cancer cell samples and one dataset including information on survival time were included in the analysis. We showed that Wnt2 and Wnt7B were overexpressed in ESCC samples, and Wnt4 and Wnt5B were overexpressed in normal cell samples. In conclusion, the present study suggests a relationship between the Wnt gene families and ESCC. The results of this study would contribute to elucidation of the molecular function for the Wnt gene families in ESCC.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma, microarray database, wnt gene family