

The Usability of p16 Immunohistochemical Staining as a Screening Test of Human Papillomavirus Infection in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Moon Oh Kwon¹, Se-Heon Kim², Jun Yeon Hwang¹ and Sei Young Lee¹

¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul; and

²Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

두경부편평세포암에서 Human Papillomavirus 감염 여부에 대한 선별검사로서의 p16의 유용성

권문오¹ · 김세현² · 황준연¹ · 이세영¹

중앙대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실¹, 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실²

Background and Objectives Although human papillomavirus (HPV) infection has been recognized as having an important role in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), there is no simple and reliable screening test of HPV infection in HNSCC to date. In the present study, we investigated the usability of p16 immunohistochemical staining as a screening test for HPV infection in HNSCC.

Subjects and Method Paraffin blocks were obtained from 45 tonsil SCC patients, who underwent surgery as an initial treatment between 1995 and 2004. Paraffin blocks were also obtained from 20 normal controls. Expression of p16 was investigated immunohistochemically and these results were compared with results of HPV genotyping and the real-time polymerase chain reaction (PCR) assay of viral oncoprotein to validate p16 staining as a reliable diagnostic tool of HPV infection.

Results The expression of p16 was found to be significantly different between tonsil SCC (32/45, 71.1%) and normal control tissues (0/20, 0%)($p < 0.05$). Among the 45 patients, HPV genotyping and real-time PCR assay were performed in 21 of the 32 p16 (+) patients and in 6 patients of the 13 p16 (-) patients. HPV-16 was detected in 18 (85.7%) out of the 21 p16 (+) patients and in 2 (33.3%) out of the 6 p16 (-) patients. The p16 expression and HPV-16 status was significantly correlated ($p < 0.05$). The two patients who had HPV-16 infection but did not have p16 expression showed an episomal infection or very low viral copy number each.

Conclusion The p16 expression may be an useful marker of HPV infection in HNSCC and may be used as a screening test for HPV infection in HNSCC.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2010;53:620-6

Key Words Head and neck squamous cell carcinoma · Human papillomavirus · p16 · Immunohistochemistry · Diagnosis.

Received May 27, 2010

Revised July 22, 2010

Accepted July 26, 2010

Address for correspondence

Sei Young Lee, MD
Department of Otolaryngology-
Head and Neck Surgery,
Chung-Ang University
College of Medicine,
224-1 Heukseok-dong, Dongjak-gu,
Seoul 156-755, Korea
Tel +82-2-6299-1780
Fax +82-2-824-1765
E-mail syleemd@cau.ac.kr

서 론

두경부편평세포암을 유발하는 중요한 원인인자로는 흡연과 음주 등이 알려져 있으나, 최근에는 흡연력이나 음주력이 없는 여성이나 40세 이하의 비교적 젊은 연령층에서의 발생률이 증가하고 있다. SEER(Surveillance, Epidemi-

ology, and End Results) 자료에 따르면 미국의 20세에서 44세의 백인을 대상으로 한 연구 결과 두경부편평세포암 중 다른 부위의 암은 발생률이 감소하였으나 구인두암의 발생률은 1973년 2.1%에서 2001년 3.9%로 증가하였으며 특히 편도암의 경우 발생률이 매년 2~3%씩 증가하고 있다고 보고하였다.¹⁾ 이러한 구인두암의 역학 변화는 상당 부분 인간

유두종 바이러스(human papillomavirus, HPV)와 연관이 있는 것으로 보고되고 있으며 최근 연구에 따르면 구인두암의 50% 이상에서 HPV DNA가 발견된다고 보고하고 있다.²⁾

HPV에 의해 발생한 두경부편평세포암의 경우 그렇지 않은 경우와 확연히 구별되는 특징을 가지고 있다. HPV에 감염된 두경부편평세포암 환자는 HPV에 감염되지 않은 두경부편평세포암 환자에 비해 약 5세 정도 어린 나이에 발병하며, 주로 흡연력이나 음주력이 없는 사람에게서 호발하고, 조직학적으로 분화도가 낮고 'basaloid' 형태를 보이지만 방사선 치료에 대한 반응이 좋아 예후가 좋은 편이다.³⁾ 따라서 HPV에 감염된 두경부편평세포암은 장기 보존(organ preservation)에 성공할 가능성이 좀 더 높기 때문에 치료 전 HPV의 유무를 확인하는 것은 중요하다.

두경부편평세포암의 HPV 감염 여부를 진단하는 방법으로 조직 내의 HPV DNA를 검출하는 방법이 주로 사용되고 있다. 초기에는 southern blot과 *in situ* hybridization(ISH) 방법이 널리 사용되었지만⁴⁾ 이러한 방법들은 일정량 이상의 HPV DNA가 있어야 검출이 가능하다는 단점이 있어, 현재 대부분의 HPV 관련 연구에서는 polymerase chain reaction (PCR)을 주로 사용하고 있다.⁵⁾ 그러나 PCR의 경우 DNA 오염에 의한 위양성의 가능성이 있으며 비용이 많이 든다는 단점이 있어 실제 환자의 진단에 사용하기에는 제약이 있다.⁶⁾ 이에 따라 간편하고 비용이 높지 않으며 정확도가 비교적 우수한 HPV 감염 여부에 대한 진단 방법의 개발이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 초기치료로 수술적 치료를 받은 편도 편평세포암 환자를 대상으로 p16 면역조직화학염색을 시행한 후, 이 결과를 현재 가장 민감도가 높은 HPV genotyping 및 real-time PCR 결과와 비교함으로써 두경부편평세포암에서 p16 면역조직화학염색방법이 HPV의 감염 유무를 진단할 수 있는 선별검사(screening test)로서 사용될 수 있는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

대상

1994년 9월부터 2004년 3월까지 신촌세브란스병원에서 편도의 편평세포암을 진단받고 초치료로 수술적 치료를 받은 환자 중 파라핀 포매의 보존이 양호한 45명을 대상으로 하였다. 환자의 평균 나이는 55세(32~78세)였으며, 남자가 41명(91%)이었고, 여자가 4명(9%)이었다. 대조군으로는 환자들과 나이 및 성별이 유사한 정상 성인 20명을 대상으로 하였으며, 모두 만성 편도염(chronic tonsillitis)으로 편도

절제술(tonsillectomy)을 받은 환자들이었다. 연구재료는 수술 시 적출된 종양에 대해 포르말린 고정과 파라핀 포매가 시행된 것 중에서 먼저 hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 하여 관찰한 후 종양조직이 비교적 양호하게 보존된 것들을 대상으로 하였다.

방법

p16 면역조직화학염색

각 종례의 조직 microarray block을 취한 뒤 4 μm 두께의 연속절편을 코팅되지 않은 유리 슬라이드에 고정하였다. 그 다음 10% xylene에서 탈파라핀화하고 100%, 95%, 70% 알코올에서 차례대로 함수과정을 거친 후 항원 노출을 위해 10 mM citrate buffer 완충용액(pH 6.0)에 담가 전자레인지에서 10분간 가열하였다. 내인성 효소 활성을 억제시키기 위하여 3%의 과산화수소로 처리한 후, 다시 완충 용액으로 10분간 수세하였으며 CINtec[®] Histology Kit(MTM Laboratories, Heidelberg, Germany)을 이용하여 p16에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. 면역조직화학염색 시에 일차 항체로 p16(MTM Laboratories, Heidelberg, Germany, dilution : 1 : 500) 항체를 반응시켰고, 이차 항체와 streptavidin을 순서대로 실온에서 30분간 반응시켰다. 그런 다음 3, 3-diaminobenzidine(DAB)으로 발색한 후 해마톡실린으로 대조 염색하였다. 판독은 병리 전문의 2인이 시행하였으며, 종양세포의 밀도가 비교적 높으면서 주변으로의 침습이 이루어지고 있는 곳 중에서 3군데를 선정하여 200배, 400배 광학현미경으로 관찰하였다. 핵에서의 강한 p16 발현과 더불어 세포질에도 p16이 발현되는 곳 중 전체 종양세포의 25% 이상 염색되는 경우를 양성으로 판독하였다.^{7,8)}

HPV genotyping

26가지 HPV의 L1 sequence에 대한 oligonucleotide probe이 부착된 HPV genotyping DNA chip(Biocore, Seoul, Korea)을 사용하였다. L1에 대한 consensus PCR product를 HPV chip의 probe에 부착시킨 후, 532 nm laser를 이용한 fluorescence scanner(GenPix 4,000 B, Axon Instruments Inc., CA, USA)로 HPV genotype을 구별하였다.

Real-time PCR

TaqMan-based 5'-exonuclease quantitative real-time PCR assay를 이용하여 HPV-16 E2와 E6 open

reading frame(ORF)의 copy number를 측정하였다. E2의 primer와 probe는 HPV-16의 integration 과정 중 가장 흔하게 HPV DNA의 deletion이 일어나는 곳인 E2 ORF의 E2 hinge region을 인식할 수 있게 디자인하였으며, E2와 E6의 copy number의 비교를 통해 검출된 HPV-16의 integration 여부를 확인하였다. 그리고 E2와 E4 ORF가 파괴된, 순수한 integrated HPV-16 gene을 갖는 것으로 알려진 자궁경부암 세포주인 SiHa로부터 DNA를 추출하여 E2(negative)와 E6(positive) amplification의 대조군으로 사용하였으며, 상대적인 바이러스 양은 sample의 E6의 양과 SiHA cell의 E6 양의 비율로 구하였다. PCR amplification은 1×iQ SuperMix(BioRad, Hercules, CA, USA)와 200 nM의 E2와 E6에 특이적인 primer, 100 nM dual-labeled(5'Hex abd 3'BHQ2) E2와(5'FAM and 3' BHQ1) E6 fluorescent hybridization probe, 그리고 genomic DNA template 200 ng을 사용하여 realtime iCycler™ PCR platform(BioRad, Hercules, CA, USA)에서 시행되었다. 증폭 과정은 2개의 hold program, 즉 50도에서 2분간, 95도에서 10분간의 과정을 거쳤고 그 다음 95도에서 15초 동안의 용해과정을 포함하는 두 단계의 PCR 과정이 이어진 후에 60도에서 1분간의 가열내동 과정을 거쳤으며, 총 45회 반복하였다.

통계 분석

통계 분석은 이항분포에 의한 비모수검정을 사용하여 유의성을 분석하였다. 실증분석은 모두 유의수준 p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였으며, 통계 처리는 SPSSWIN 12.0K 프로그램을 사용하여 분석하였다.

결 과

p16 면역조직화학염색

편도의 편평세포암 환자군과 대조군에서 p16에 대한 면역조직화학염색을 실시한 결과, 45명의 편도편평세포암 환자의 경우 32예인 71.1%에서 양성반응을 보였으며, 13예인 29%에서 음성반응을 보였다. 반면 대조군인 편도절제술을 받은 환자군의 경우 p16에 대해 모두 음성반응을 나타내어, 통계적으로 p16 면역조직화학염색이 종양에 대해 특이성이 있음을 보여주었다($p<0.05$)(Table 1).

편도 편평세포암군의 면역조직화학염색에서 p16의 발현은 주로 종양세포의 핵과 세포질에서 관찰되었으며 일부 림프구(lymphocytes)나 분비선(secretory gland)에서도 약하게 관찰되기도 하였지만 주변의 간엽 조직 세포(mesen-

chymal cells)에서는 p16 면역반응이 관찰되지 않았다(Fig. 1). 반면 만성 편도선염으로 편도절제술을 받은 군에서는 편도와 상피(crypt epithelium) 및 배중심(germinal center)에서 p16의 발현이 미약하게 관찰되었으나, 편도의 중층편평상피에서는 p16의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 2).

HPV genotyping

편도 편평세포암 환자 45예 중 무작위로 27예를 선택하여 HPV의 감염 여부를 확인하기 위한 HPV genotyping을 시행하였으며, 27예는 p16이 발현된 32명 중 21예와 p16이 발현되지 않은 13명 중 6예로 구성되었다. HPV 감염 여부를 확인한 결과 p16에 양성반응을 보인 군에서는 21명 중 85.7%인 18명에서 HPV 감염이 확인되었고, p16에 음성 반응을 보인 6명 중에서는 50%인 3명에서 HPV가 확인되어 p16에 양성반응을 보인 군이 음성반응을 보인 군보다 통계적으로 유의하게 HPV 검출비율이 높았다($p=0.019$). HPV 감염이 확인된 21예 중에서 HPV-16인 경우가 20예(95.2%)이었으며, 나머지 1예는 p16에 음성인 환자로 HPV-33(4.8%)이 검출되었으며 모든 예에서 중복 감염인 예는 없었다(Table 2).

Real-time PCR

p16 양성이면서 HPV-16에 감염된 18예와 p16 음성이면서 HPV-16에 감염된 2예를 대상으로 p16의 발현과 viral integration 여부 및 viral copy number의 양상을 비교하기 위해 Taqman-based 5'-exonuclease quantitative real-time PCR을 시행하였다. E2와 E6의 비율로 HPV

Table 1. Expression of p16 in tonsillar squamous cell carcinoma and chronic tonsillitis

| | p16 immunohistochemical staining | |
|-------------------------|----------------------------------|--------------|
| | Positive (+)* | Negative (-) |
| Tonsillar SCC (n=45) | 32 (71%) | 13 (29%) |
| Chr. Tonsillitis (n=20) | 0 (0%) | 20 (100%) |

*more than 25% of the cells were stained. SCC: squamous cell carcinoma

Table 2. Relationship between expression of p16 protein and HPV DNA expression by PCR in tonsillar squamous cell carcinoma

| Method | p16 | | Total |
|--------|----------|---------|-------|
| | + | - | |
| HPV | 18 (86%) | 3 (50%) | 21 |
| | 3 (14%) | 3 (50%) | 6 |
| Total | 21 | 6 | 27 |

*more than 25% of the cells were stained. +: present, -: absent. HPV: human papillomavirus, PCR: polymerase chain reaction

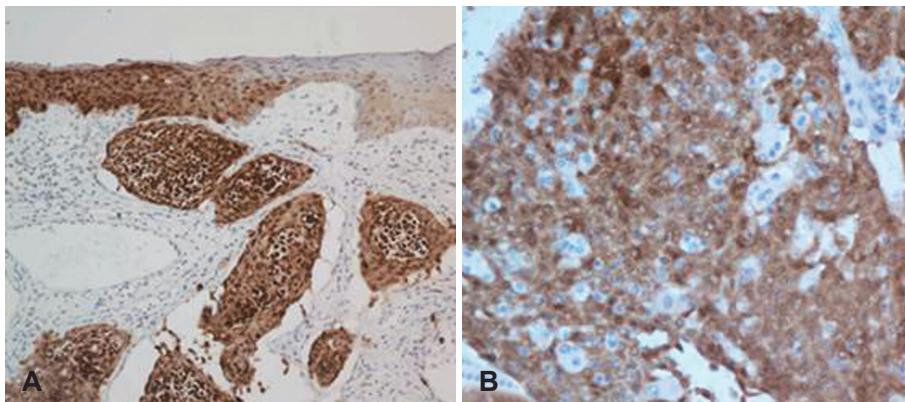


Fig. 1. Up-regulated p16: strong staining is evident in much of this moderately differentiated SCC; in contrast, the staining of the adjacent normal epithelium is weak and mainly confined to the lower layers. Original magnification $\times 200$ (A), $\times 400$ (B). SCC: squamous cell carcinoma.

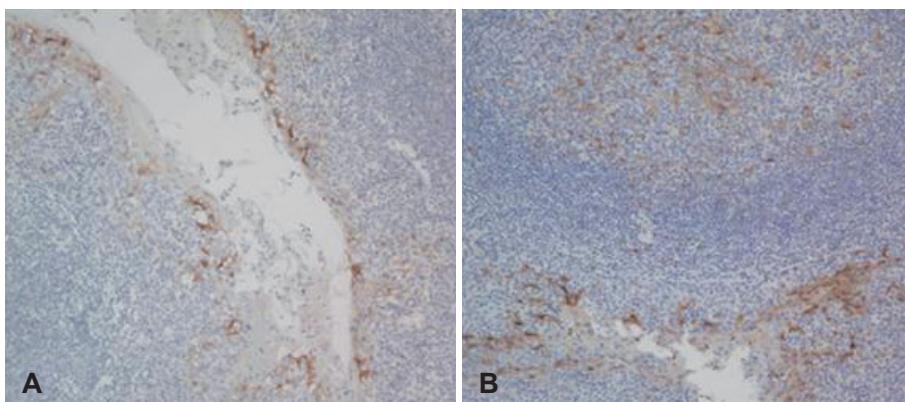


Fig. 2. p16 immunohistochemical staining in a normal tonsil from a patient without carcinoma. Weak p16 staining is noted in the reticulated crypt epithelium and in follicular dendritic cells of germinal centers, but it is not seen in the surface epithelium. Original magnification $\times 100$ (A), $\times 200$ (B).

DNA의 integration 여부를 확인한 결과, p16 양성이면서 HPV-16에 감염된 18예 중 16예에서 HPV DNA의 integration이 관찰되었으며, 이 중 6예는 complete integration으로 확인되었고, 나머지 2예는 episomal type으로 확인되었다. p16 음성이면서 HPV-16에 감염된 2예 중 1예는 episomal type이었고 나머지 1예는 integrated type으로 확인되었다. 하지만 viral copy number를 비교한 결과 p16 양성이면서 HPV-16에 감염되어 있고 HPV DNA가 integration된 16예는 모두 viral copy number(E6/SiHa)가 0.01 이상의 수치를 나타내었으나, p16 음성이면서 HPV-16에 감염된 1예는 viral copy number가 0.0001로 매우 낮게 측정되었으며 두 군 간의 viral copy number는 유의한 차이가 있었다($p<0.05$)(Table 3).

고 찰

최근 두경부암 발생 빈도의 증가가 HPV와 상관관계가 있다는 보고가 있어 두경부암 발생에서 HPV 감염의 중요성이 점차 커지고 있다.^{1,9,10)} International Agency for Research on Cancer(IARC)에 의해 시행된 다국적 연구에 의하면 HPV 감염이 766명의 구강암 중 3.9%에서 확인되었

으며, 142명의 구인두암 중에서는 18.3%에 달하였다.¹¹⁾ Kuo 등²⁾의 연구에 따르면 구인두암의 50% 이상에서 HPV DNA가 검출되었으며, 편도암의 경우 60% 이상을 차지하였다. 특히 두경부암에서 발견되는 HPV 중에서는 HPV-16이 90~95%를 차지한다고 보고되고 있으며,⁷⁾ 본 연구에서도 HPV 감염이 확인된 21명 중에서 HPV-16이 20명인 95%를 차지해 이전 연구와 비슷한 결과를 보여주었다. 이처럼 두경부암의 발생에서 HPV 감염이 중요한 원인 인자로 부각되면서 이를 진단하기 위한 방법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

HPV 바이러스는 hit-and-run mechanism에 따르지 않고 두경부암 발생 과정에 HPV DNA가 지속적인 역할을 하기 때문에 HPV 감염을 진단하기 위해서는 종양의 발생 과정 중 시기에 관계없이 종양세포 내의 HPV DNA 유무를 증명하면 된다.¹⁰⁾ 현재까지 두경부암에서 HPV 바이러스 감염 여부를 확인하기 위해 여러 가지 검사 방법이 사용되어 왔다. 초기에는 southern blot 방법을 많이 사용하였으나, 실제 연구와 진단에 사용되고 있는 조직의 대부분은 파라핀 포매이기 때문에 HPV 감염의 진단에 ISH 방법이 많이 사용되고 있으며, 정확한 진단법 중에 하나로 보고되고 있다. Lee 등⁴⁾이나 Begum 등¹²⁾에 의하면 ISH는 감염된 세

Table 3. Tonsillar squamous cell carcinomas: results of p16 immunohistochemical staining versus Taqman-based 5'-exonuclease quantitative real-time PCR

| Patients | HPV type | Copy No. (E6/SiHa) | Physical status | p16 |
|----------|----------|--------------------|-----------------|-----|
| 1 | 0 | | | - |
| 2 | 16 | 0.03 | Integrated | + |
| 3 | 16 | 0.01 | Integrated | + |
| 4 | 0 | | | - |
| 5 | 0 | | | - |
| 6 | 16 | 1.26 | Episomal | + |
| 7 | 33 | | | - |
| 8 | 16 | 0.01 | Integrated | + |
| 9 | 16 | 0.00003 | Episomal | + |
| 10 | 0 | | | + |
| 11 | 16 | 0.62 | Integrated | + |
| 12 | 0 | | | + |
| 13 | 16 | 0.03 | Integrated | + |
| 14 | 16 | 0.02 | Integrated | + |
| 15 | 16 | 0.34 | Integrated | + |
| 16 | 16 | 2.42 | Integrated | + |
| 17 | 16 | 1.48 | Integrated | + |
| 18 | 16 | 0.005 | Episomal | - |
| 19 | 16 | 0.14 | Integrated | + |
| 20 | 16 | 0.16 | Integrated | + |
| 21 | 16 | 2.58 | Integrated | + |
| 22 | 16 | 0.0001 | Integrated | - |
| 23 | 16 | 0.21 | Integrated | + |
| 24 | 0 | | | + |
| 25 | 16 | 3.41 | Integrated | + |
| 26 | 16 | 0.04 | Integrated | + |
| 27 | 16 | 0.13 | Integrated | + |

HPV: human papillomavirus, PCR: polymerase chain reaction, No: number

포의 조직 내 위치 및 세포 내 감염부위를 알 수 있어 특이성이 높으며, integrated HPV를 확인하는 데도 도움을 준다고 하였다. 심지어 Fakhry와 Gillison³⁾은 “ISH는 HPV를 감염을 진단할 수 있는 임상적으로 가장 유용한 방법이다”라고 언급하였다. 그러나 ISH 방법은 일정량 이상의 HPV DNA가 있어야 검출이 가능하기 때문에 민감도가 떨어지며, 종양유전자의 전사 과정(oncogene transcription)을 보여주지 못한다는 것이 단점으로 지적되고 있다.^{5,13)} 그래서 현재는 PCR에 기초한 방법이 가장 널리 사용되고 있다. PCR은 미량의 virus DNA sequence도 검출할 수 있어 HPV 바이러스 감염을 진단하기 위한 방법 중 가장 민감도가 높은 것으로 알려져 있으나,¹⁴⁾ 몇 가지 단점을 가지고 있다. Lörincz 등¹⁵⁾에 의하면 기존의 PCR 방법은 감염에 매우 취약하기 때문에 이를 방지하기 위한 노력이 필요하다고 하였다. 그래서 최근에는 감염에 비교적 강한 quanti-

tative PCR 방법이 사용되고 있다.¹⁶⁾ Brandstetter 등⁶⁾에 의하면 PCR은 비특이적인 증폭을 하기 때문에 검사 결과에서 위양성이 나올 수 있으며, 바이러스 DNA의 primer binding site가 다양하기 때문에 잘못된 binding site에 결합할 경우 충분히 증폭되지 않아 위음성이 나올 수 있다고 하였다. 이러한 문제점들로 인해 PCR이 모든 HPV genotype를 감별할 수 없기 때문에 경우에 따라서는 sequencing이나 type-specific PCR과 같이 더 복잡한 검사 방법이 추가적으로 필요한 경우가 있으며, 이로 인해 비용이나 노력이 많이 필요하기 때문에 PCR을 선별 검사 방법으로 사용하기에는 부족한 점이 있다.

이러한 문제점들로 인해 가장 널리 사용되고 있는 PCR이나 ISH이 두경부암에서 HPV 감염 여부를 확인하기 위한 선별 검사 방법으로 사용하기에는 어려움이 있다. 따라서 최근에 HPV 감염을 진단하기 위한 간편한 방법으로 p16 면역조직화학염색방법이 보고되고 있다.^{7,12)} p16은 염색체 9q21에 위치하며 세포주기 G1기에 작용하는 중요한 종양억제유전자로서 Cdk4에 cyclin D1과 경쟁적으로 작용하여 pRb 단백의 인산화를 막아 G1기에서 S기로의 이행을 차단하여 세포증식을 억제한다. 여러 종류의 종양에서 9q21 부위의 동형접합성 상실, 이형접합성 상실, 점돌연변이 등에 의해 세포주기 억제자가 소실되어 p16 발현이 감소되는 현상을 보이며 이로 인한 기능의 소실이 암유발에 관여할 것으로 보고되고 있다.¹⁷⁾ 반면, Klussman 등⁷⁾은 HPV 양성 두경부암의 경우에 HPV E7종양단백질에 의해 p16의 발현을 억제하는 pRb 단백질이 비활성화되기 때문에 p16이 과발현된다고 보고하였으며, 이러한 특징 때문에 p16이 두경부암에서 HPV 감염을 확인할 수 있는 대체 표지자(surrogate marker)로 사용할 수 있다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 내원 당시 편도암으로 진단된 후 초치료로 수술적 치료를 받은 45명으로 대상으로 하여 HPV 양성 두경부암에서 p16이 과발현되는 특징을 이용한 p16 면역조직화학염색을 시행하였으며, 현재 민감도가 가장 높다고 알려진 HPV genotyping 및 real-time PCR 결과와 비교함으로써 p16 면역조직화학염색 방법이 두경부암에서 HPV 감염 여부를 진단할 수 있는 선별검사로서의 유용성을 알아보자 하였다. Klaes 등⁸⁾은 자궁경부암(cervical cancer)에서 p16 면역조직화학염색을 시행하였으며 전체 종양세포의 염색 정도가 25% 이상일 경우 양성으로, 이하일 경우 음성으로 판정하였으며 결과적으로 p16과 HPV status와 밀접한 관계가 있음을 밝혔다.

본 연구에서도 전체 종양세포의 25% 이상 염색될 경우를 양성으로, 25% 미만인 경우를 음성으로 판독하였으며, 총

45예의 편도암군 중 32예(71%)에서 전체 종양세포의 25% 이상 염색되어 양성 소견을 보였다. 그러나 대조군인 편도절 제술을 받은 20예에서는 모두 p16 면역염색에 대해서 음성(0%)을 나타내어 p16 면역조직화학염색방법이 종양에 대한 특이성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다($p<0.05$). p16 면역조직화학염색을 시행한 편도암군의 조직을 살펴보면 p16에 대한 면역반응은 주로 종양세포의 핵과 세포질에서 관찰되었으며, 주변의 간엽조직세포에서는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 대조군인 편도절제술을 받은 군에서도 p16 면역반응이 약하지만 주로 편도와의 상피(crypt epithelium)와 배증심(germinal center)에서 관찰되었으며 편도상피인 중충평편상피에서는 면역반응을 보이지 않았다(Fig. 2). 이는 편도와의 상피가 HPV 감염에 취약하다는 보고를 뒷받침해 준다.¹⁸⁾ 그 뒤 p16에 양성반응을 보인 32명에서 21명을, 음성반응을 보인 13명 중에서 6명을 대상으로 HPV genotyping DNA chip(Biocore, Seoul, Korea)을 이용하여 HPV 감염을 확인하였으며 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이($p<0.05$)를 보임으로써 p16 염색이 HPV status와 강한 연관성을 가지고 있음을 알 수 있었다. Kuo 등²⁾은 92명의 편도암 환자를 대상으로 하여 nested PCR-based genechip으로 69명에서 HPV 감염을 확인하였고, 이 중 49명이 p16 양성을 보여 약 70%의 양성 예측률(postitive predictive value)을 보였다. Klussmann 등⁷⁾은 HPV 양성 두 경부암 18명 중 89%인 16명에서 p16에 대해 양성 예측률을 보였으며, 본 연구에서는 HPV 감염이 확인된 21명 중에서 18명이 p16에 대해 양성반응을 보여 양성 예측률 85.7%로 이전 연구들과 비교하여 비교적 높은 수치를 나타내었다. 이 외에도 Gillison 등¹⁷⁾은 PCR을 통해 HPV 감염이 확인된 34명을 대상으로 하여 southern blot과 ISH을 시행하여 각각 50%(17명), 71%(24명)의 양성 예측률을 보고하기도 하였다. ISH 방법을 이용한 Begum 등¹²⁾의 연구에 의하면 HPV-16이 확인된 22명 중에서 21명(95%)에서 p16에 대해 양성반응이 나타났다고 보고한 바 있으나, 이는 ISH방법의 민감도가 다소 떨어지기 때문일 것으로 생각된다.

본 연구에서 HPV 감염이 확인된 편도암 환자에서 p16 면역조직화학염색에 대해 음성반응을 보인 경우는 총 21명 중에서 3명으로 14%에 해당하였다. 3명 중에서 1명은 HPV type 33이었으며, 나머지 2명은 type 16으로 real-time PCR 결과 1명은 episomal type이었으며, 나머지 1명은 integrated type이었지만 p16에 대해 양성반응을 보인 군에 비하여 매우 낮은 viral copy number를 나타내어 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보여주었다($p<0.05$). 이 환자의 경우 편도암의 발병에 HPV 감염보다는 흡연이나 음

주와 같은 다른 원인인자가 관여했을 거라고 생각되며, viral copy number가 낮기 때문에 p16에 대해 음성반응을 보인 것으로 생각된다. Mellin 등¹⁹⁾에 의하면 HPV 양성 편도암 환자 중에서 viral copy number가 많은 군이 적은 군에 비해 생존률이 유의하게 높았다고 보고하였다. 즉, HPV 양성 두경부암 환자의 경우에 viral copy number가 높을수록 p16에 대해 양성반응을 보이기 쉬우며 두경부암 환자가 내원하여 시행한 p16 면역조직화학염색에 대해 양성 반응을 보인 경우 HPV 감염에 의한 것일 가능성이 높기 때문에 예후가 좋을 것으로 예상할 수 있다.

Acknowledgments

This research was supported by the Chung-Ang University Research Grants in 2010.

REFERENCES

- 1) Frisch M, Hjalgrim H, Jaeger AB, Bigger RJ. Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States. *Cancer Causes Control* 2000;11(6):489-95.
- 2) Kuo KT, Hsiao CH, Lin CH, Kuo LT, Huang SH, Lin MC. The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome. *Mod Pathol* 2008;21(4):376-86.
- 3) Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006;24(17):2606-11.
- 4) Lee WT, Tubbs RR, Teker AM. Use of in situ hybridization to detect human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma patients without a history of alcohol or tobacco use. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132(10):1653-6.
- 5) Shibata D, Fu YS, Gupta JW, Shah KV, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papillomavirus in normal and dysplastic tissue by the polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1988;59(4):555-9.
- 6) Brandstetter T, Böhmer S, Prucker O, Bissé E, zur Hausen A, Alt-Mörbe J, et al. A polymer-based DNA biochip platform for human papilloma virus genotyping. *J Virol Methods* 2010;163(1):40-8.
- 7) Klussmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003;162(3):747-53.
- 8) Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92(2):276-84.
- 9) Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005;32 Suppl 1:S59-66.
- 10) Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol* 2001;13(3):183-8.
- 11) Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(23):1772-83.
- 12) Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):5694-9.
- 13) Gillison ML. Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamouscell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006;24(36):5623-5.

- 14) Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999;37(8):2508-17.
- 15) Lörincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996;23(3):707-30.
- 16) Ha PK, Pai SI, Westra WH, Gillison ML, Tong BC, Sidransky D, et al. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 2002;8(5):1203-9.
- 17) Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):709-20.
- 18) Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res* 2003;9(17):6469-75.
- 19) Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, et al. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2002;102(2):152-8.