

Methods for Detection of Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer

Sei Young Lee

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

두경부암에서 Human Papillomavirus의 검출 방법

이 세 영

중앙대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실

Received December 17, 2011

Accepted December 26, 2011

Address for correspondence

Sei Young Lee, MD, PhD

Department of Otolaryngology-

Head and Neck Surgery,

Chung-Ang University

College of Medicine,

102 Heukseok-ro,

Dongjak-gu, Seoul 156-755,

Korea

Tel +82-2-6299-1779

Fax +82-2-825-1765

E-mail syleemd@cau.ac.kr

Ever since human papillomavirus (HPV) has known to be associated with head and neck cancer, there have been many studies investigating the role of HPV as its causative factor. The most important thing among studies for HPV is to obtain HPV from cancer tissue and find out whether the obtained HPV is related to the development of cancer. However, until now, there has been no standardized method in diagnosing HPV infection. The various detecting methods for HPV and difference in sensitivity among experimental methods are one of the reasons for the controversy over the role of HPV. In this review, we present the advantages and disadvantages of HPV detection methods those are currently used and suggest standardized methods that may be used to detect HPV in head and neck cancer in the future.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2012;55:8-13

Key Words HPV · Squamous cell carcinoma · Detection.

서 론

과거 20여 년간 미국 및 유럽에서 두경부암의 발생 빈도는 흡연이 감소함에 따라 조금씩 낮아지고 있지만, 두경부암 중 구인두암은 이와 반대로 그 빈도가 조금씩 늘어나고 있으며 특히 흡연과 음주를 하지 않는 젊은 남자에서 구인두암의 발생 증가가 뚜렷이 관찰되고 있다.^{1,2)} 최근, 이러한 구인두암의 발생빈도 증가가 인간유두종바이러스(human papillomavirus, HPV)의 감염과 관련있음이 확인되었으며, HPV는 술, 담배와 함께 두경부암을 일으키는 중요한 원인인자 중 하나로 인식되고 있다.^{3,4)}

HPV에 의해 발생한 두경부암은 HPV에 의해 발생하지 않은 두경부암과 뚜렷이 구별되는 특징을 가지고 있다. HPV에 의해 발생하는 두경부암은 구인두 특히 편도에 호발하는 경향이 있고, 다른 두경부암에 비해 비교적 젊은 사람에게 발생하며, 흡연이나 음주보다는 특징적인 성생활의 패턴이 위험인자로 인식되고 있으며, 치료에 대한 반응이 좋아 비교적 예후

가 양호하며, 그 빈도가 점점 증가하고 있다는 특징을 가지고 있다. 더불어 HPV에 의해 발생한 두경부암은 그렇지 않은 두경부암에 비해 방사선 치료나 항암방사선동시치료에 효과가 더 좋은 것으로 알려져 있어 HPV의 감염 여부가 두경부암의 치료 방법을 선택하는 데 중요한 기준이 될 가능성이 있다고 알려져 있다.⁵⁻⁸⁾

이와 같이 HPV의 감염 여부는 두경부암에서 치료 방법의 선택이나 치료 결과를 예측하는 데 중요한 정보를 제공할 수 있다고 알려져 있기 때문에 실제 임상에서 이러한 특성을 이용한 두경부암의 진단과 치료가 활발히 이루어져야 하지만, 아직까지는 보편성을 가지고 널리 이용되고 있지는 않다. 그 이유는 여러 가지가 있겠지만 가장 중요한 것은 두경부암에서 HPV의 감염률이 일정하지 않고 보고자마다 매우 상이하여 비교적 일정한 감염률을 확인할 수 없다는 것이며, 감염률이 다양하다는 것은 환자 개개인에서 정확한 HPV의 감염 여부를 확인하기가 어렵다는 것을 의미하기 때문이다. 감염률이 다양한 것은

인종학적, 지역적 특성 때문이기도 하지만, 가장 중요한 것은 두경부암에서 HPV의 역할을 규명한 기존의 연구에서 사용한 HPV 검출 방법이 매우 다양하고, 각각의 방법마다 민감도와 특이도가 다르며, 아직까지 표준화된 HPV 검출 방법이 없기 때문이다.⁹⁻¹²⁾ 따라서, 기존의 연구에서 두경부암에서의 HPV 역할에 대한 전체적인 특성은 확인할 수 있었지만, 이러한 특성을 환자 개개인의 진단과 치료에 적용하기에는 다소 무리가 있었다. 그러므로, 향후 표준화된 HPV 검출 방법을 확립하고 이를 이용하여 환자 개개인에서 HPV 감염 여부를 정확히 판단하여 HPV 감염 여부에 따라 환자의 치료 방법을 결정하고 예후를 예측하는 것이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 현재 많이 사용되고 있는 암 조직에서의 HPV 검출 방법에 대해 각각의 장단점과 의의를 알아보려고 하며, 이를 통하여 향후 두경부암에서 HPV의 감염을 확인하기 위한 표준화된 검출 방법들을 제시하고자 한다.

HPV Genome과 발암(Oncogenesis)

HPV는 papillomaviridae에 속하는 DNA 바이러스로 현재까지 약 100여종 이상이 알려져 있으며, 피부나 점막에 주로 감염을 일으키고, carcinogenesis와의 연관성에 따라 고위험(high risk) HPV와 저위험(low risk) HPV로 구분된다.¹³⁾ HPV의 genome은 원형의 이중 DNA로 구성되어 있으며 그 크기는 약 7.9 kilobase 정도로 알려져 있으며, noncoding long-control region과 6개의 early gene(E1, E2, E4-7), 2개의 late gene(L1, L2)으로 구성되어 있다(Fig. 1).¹⁴⁾ L1과 L2는 viral capsid protein을 encoding하고, E1과 E2는 HPV genome의 복제와 유지를 담당하며, E4는 HPV의 증식기에 역할을 하는 것으로 알려져 있고, E6와 E7은 HPV의 주요한 oncogene으로 알려져 있다. 또한 E2는 episome 상태에서 oncogene인 E6와 E7의 전사(transcription)를 억제하는 것으로 알려져 있다.

HPV의 감염에 의한 종양 발생 과정을 간략히 살펴보면, HPV가 상피세포 내로 감염이 일어나려면 먼저 원형의 HPV DNA

일부가 깨져 선형으로 변한 후 상피세포의 핵 내로 integration이 일어나야 한다. 이 때 원형의 HPV DNA 중 DNA의 disruption이 일어나는 곳이 대개 E2 open reading frame이다. 따라서, integration 과정 중 E2의 중요한 기능 중 하나인 HPV oncogene의 억제작용이 소실되며, 이에 따라 HPV의 oncogene인 E6와 E7의 비정상적인 전사가 일어나게 된다. 이렇게 해서 발현이 증가된 E6와 E7 oncoprotein은 각각 종양 억제 단백질 p53과 Rb를 억제하게 되고, 이에 따라 세포의 과증식과 세포주기의 소실, 세포 분화의 장애 등이 일어나 정상상피세포가 종양세포로 변하게 한다. 또한, E7은 centrosome의 복제를 방해하여 genomic instability와 aneuploidy를 일으키게 된다. 더불어, 이 과정에서 특징적으로 종양조직 내에 p16의 발현 증가가 관찰된다.¹⁵⁻¹⁸⁾ 이와 같이 HPV에 의한 종양 발생은 HPV genome의 host cell 내로의 integration이 필요하며, HPV DNA 중 E6와 E7이 major transforming oncogene으로 여겨지고 있다. 하지만 일부 연구에서 HPV genome의 integration 없이 viral oncogene이 발현될 수 있다는 보고도 있다.¹⁹⁾

HPV Detection

두경부암에서 HPV의 감염을 확인하는 방법은 매우 다양하며 각각의 방법들이 서로 다른 장단점들을 가지고 있다. 다양한 검사 방법 중 어떤 방법을 선택할 것인지 결정하기 위해서는 먼저 알고자 하는 HPV의 정보가 어떤 종류인지, 사용하고자 하는 검체가 무엇인지, 이용 가능한 장비가 어떤 것들이 있는지 확인한 후 가장 적당한 검사 방법을 선택하는 것이 좋다. HPV의 감염을 확인하기 위해 사용하는 표적 물질은 단백질, DNA, mRNA가 있으며, 검체로는 동결조직, 신선조직(fresh tissue), 파라핀포매조직, 세침흡인조직, 타액, 구강세척액 등이 있다. 과거 연구에서는 southern blot이 HPV DNA의 특정 염기 서열을 확인하는 데 가장 유용하고 정확한 방법으로 여겨졌지만, 한 번에 한 가지의 HPV type만 확인할 수 있고, HPV DNA 검출에 많은 양의 DNA가 필요하며, 가장 쉽고 보편적으로 구할 수 있는 파라핀포매조직에서 사용할 수 없다는 단점으로 인해 현재는 거의 사용하고 있지 않다. 현재 HPV 감염 여부를 확인하기 위해 가장 많이 사용되고 있는 방법은 HPV DNA를 검출하는 것으로, 크게 target amplification method(polymerase chain reaction, PCR)와 signal amplification method(*in situ* hybridization, ISH)로 나눌 수 있으며, 그 외에 mRNA를 확인할 수 있는 RT-PCR, 단백질을 확인할 수 있는 면역조직화학염색법(immunohistochemistry, IHC) 등도 함께 사용되고 있다. 이와 더불어 integration 여부 및 viral load를 확인하기 위한 quantitative real time PCR도 널리 사용되고 있다.

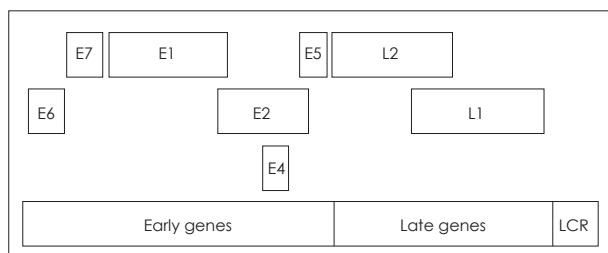


Fig. 1. Linear representation of the HPV genome (cited from Vidal L, Gillison ML. Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a distinct disease type. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008;22(6): 1125-42). HPV: human papillomavirus, LCR: long-control region.

Target amplification method

Target amplification method는 특정한 nucleic acid sequence를 검출이 가능하도록 양적으로 증폭시켜 원하는 sequence의 존재 여부를 확인하는 방법으로 PCR이 가장 대표적인 방법이다. 처음 HPV DNA의 검출에 PCR이 이용되었을 때는 HPV type이 다양하기 때문에 한번의 검사로 다양한 HPV type을 가능한 많이 확인하기 위해 다양한 종류의 HPV DNA에 공통적으로 존재하는 DNA sequence를 찾아 이를 증폭하려는 시도가 이루어졌었다. 이를 위해서 HPV genome 중 highly conserved sequence인 L1 또는 E1 open reading frame에 대한 consensus primer를 만들게 되었고, 최초의 consensus PCR assay가 IU/IWDO, MY09/11, GP5/6-PCR system이다. 이후 이를 발전시킨 2세대 버전으로 PGMY, GP5+/6+-PCR system이 개발되었으며 현재 널리 이용되고 있다.²⁰⁻²⁴⁾ 최근에는 L1이나 E1의 다양한 부위를 target으로 하는 새로운 PCR system들이 속속 개발되고 있으며, 특히 conserved sequence가 아닌 HPV type별로 서로 다른 부위를 target으로 하는 primer를 이용한 multiplex assay도 개발되었다.²⁵⁾ 하지만, 두 경부암의 경우 대부분의 HPV 감염이 type 16에 의해 이루어지고 있기 때문에, type-specific PCR도 합리적이고, 비용-효과 측면에서 우수한 검사 방법으로 여겨지고 있다.

PCR의 결과물을 확인하는 방법(read-out system)도 PCR의 종류만큼이나 다양하지만, 일반적으로 PCR 결과물을 oligonucleotide probes에 hybridization시켜 확인하는 방법을 주로 사용한다. 가장 널리 사용되는 방법은 enzyme immunoassay 염색을 사용하는 방법이지만, 최근 많이 시행되고 있는 genotyping에는 시간이 많이 걸리고 많은 양의 PCR 결과물이 필요하다는 단점으로 인해 적당하지 않아, oligoprobes를 고정하는 방법인 reverse hybridization을 주로 시행하고 있다.

따라서, 현재 주로 사용되고 있는 PCR 방법을 정리하면 암 조직 내의 HPV DNA의 유무를 확인하기 위해 consensus primer를 이용한 PCR을 시행하여 가능한 많은 수와 종류의 HPV DNA를 검출한 후, 이 결과물을 oligonucleotide probes를 이용한 reverse hybridization-based HPV genotyping을 시행하는 것이 일반적이다. 이런 과정을 거쳐 환자의 암 조직 내에 HPV DNA가 존재하는지 여부를 확인할 수 있으며, 만약 존재한다면 HPV의 type이 무엇인지도 확인할 수 있게 되는 것이다(Fig. 2).^{26,27)}

HPV의 감염에 의해 종양이 발생하였다면 앞서 종양 발생 과정에서 확인하였듯이 E6와 E7 oncogene의 transcription이 일어나야 한다. 이는 E6와 E7 mRNA가 존재한다는 의미로 RT-PCR을 이용하여 암 조직 내의 E6, E7 mRNA를 확인하는 것도 종양이 HPV의 감염에 의해 발생하였는지를 확인하는

방법이 될 수 있다. 특히, 이와 같이 mRNA를 확인하는 방법은 암 조직 내에서 확인된 HPV가 암의 발생과는 관계없이 우연히 발견된 것인지, 아니면 암의 발생 과정에 HPV가 주된 역할을 한 것인지를 구별할 수 있는 중요한 정보를 제공할 수 있다. 하지만, 이론적으로 RT-PCR은 신선동결조직이나 liquid-base cytology sample 뿐 아니라 파라핀포매조직에서도 시행이 가능하지만, 파라핀포매조직을 만드는 과정에서 상당수의 RNA가 파괴될 수 있기 때문에, 파라핀포매조직에서 RT-PCR을 시행할 경우에는 검체 내의 mRNA의 integrity를 확인하거나, 너무 길지 않은 amplicon을 사용하는 등의 주의를 기울여야 한다.^{28,29)}

또 하나의 target amplification method는 real time PCR 또는 real time RT-PCR이다. Real time PCR은 end-point로 해석하는 일반적인 PCR 방법과는 달리, PCR 증폭 산물을 실시간으로 모니터링하여 지수함수적인 증폭능력에 대해 정확한 정량이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 이러한 특성을 이용하여 단계적으로 희석한 표준 샘플을 이용해 real time PCR을 실시한 후 검사하고자 하는 샘플에 대해 real time PCR을 시행하면 이 샘플의 초기 주형량(initial DNA dose)을 확인할 수 있는 정량 분석이 이루어지게 된다. 이러한 정량 분석을 이용하여 조직내의 viral load를 측정할 수 있으며, 더불어, E2와 E6 DNA의 양적 차이를 확인하면 HPV DNA가 host cell 내로 얼마나 integration이 되었는지도 확인할 수 있게 된다. 하지만, 이러한 real time PCR은 위와 같은 장점과 함께 PCR에 비해 시간이 적게 걸리고, post-PCR manipulation이 필요 없

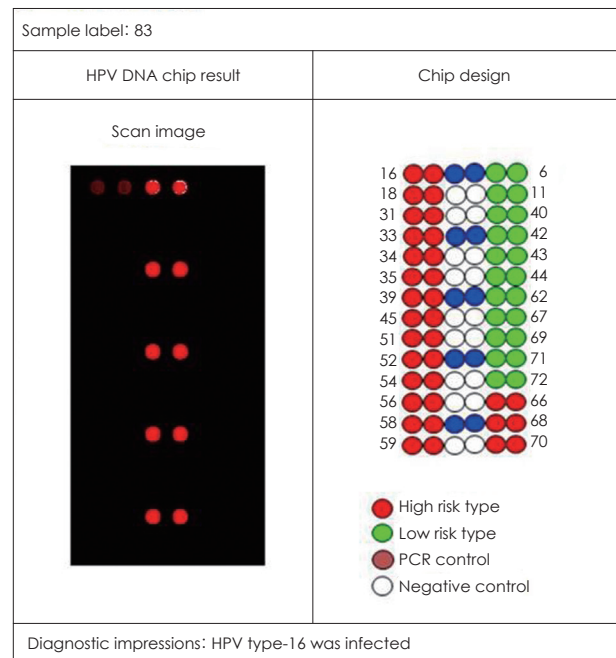


Fig. 2. HPV genotyping for detection of HPV DNA and discrimination of HPV types. This figure shows a detection of HPV type 16 DNA. HPV: human papillomavirus, PCR: polymerase chain reaction.

어 오염의 가능성이 낮다는 장점에도 불구하고, 높은 비용으로 인해 환자를 위한 검사보다는 연구를 위한 검사에 주로 사용되고 있다.

Signal amplification method

Signal amplification method는 조직 내에 있는 nucleic acid를 target specific probe에 hybridization 시킨 후 신호(hybridization event)를 증폭시켜 원하는 nucleic acid가 조직 내에 있는지 확인하는 방법이다. 대표적인 방법으로는 liquid phase method인 hybrid capture와 ISH가 있다. 이 중 hybrid capture는 자궁경부의 세포진 검사에서 널리 사용되는 일종의 선별 검사로서 두경부암 조직 내의 HPV 감염 여부를 확인하기 위해서는 사용하지 않지만 만약, 구강 세척액을 이용하는 선별 검사를 시행한다면 두경부 영역에서도 사용할 수 있다.³⁰⁾

ISH는 두경부영역에서 가장 많이 사용하는 파라핀포매조직뿐 아니라 세포진 검사를 비롯한 대부분의 검체에서 사용이 가능하다는 장점이 있다. HPV DNA ISH의 결과를 확인하는 방법으로는 fluorescent detection, colored substrate deposition 및 bright field microscopy 등이 있다. ISH는 signal을 증폭하는 방법론적인 특성 때문에 한 번에 여러 종류의 HPV DNA를 검사하기에 어려움이 있고, HPV DNA가 일정량 이상이 있어야 검출이 가능하여 위음성의 가능성이 있다는 단점이 있다. 하지만 ISH는 검출된 HPV DNA의 세포 내 위치를 확인할 수 있는 장점이 있는데, 이를 이용하여 종양세포의 핵 내에서 점 모양의 신호(dot-like positivity)가 관찰되면 HPV DNA가 host cell genome 내로 integration 되었다는 것을 확인할 수 있게 된다(Fig. 3).³¹⁻³³⁾

Immunohistochemistry(IHC)

HPV에 의한 종양의 발생 과정에서 p16의 발현이 증가하기 때문에, 이론적으로 transcriptionally active HPV infection에 의해 종양이 발생한 경우에는 모두 p16의 발현 증가가 관

찰되어야 한다. 이를 이용하여 두경부암에서 HPV의 감염 여부를 확인하는 선별 검사로 암 조직에서 p16에 대한 IHC를 시행할 수 있다. 하지만, 실제 환자 조직에서 HPV type 16 감염에 대해서 p16의 발현 증가를 확인하였을 때 민감도가 90~95% 정도이고, 특이도는 80% 정도에 그쳐 HPV의 감염에 대한 확진 방법으로 사용하기에는 무리가 있다. 민감도가 다소 낮은 것은 HPV type 16 이외에 다른 종류의 HPV에 의해 암이 발생할 수도 있기 때문이며, 특이도가 낮은 것은 p16 발현의 증가가 HPV와 관계 없이도 일어날 수 있기 때문이다. 그럼에도 불구하고 p16에 대한 IHC는 파라핀포매조직에서 쉽게 시행할 수 있고, 비용이 많이 들지 않기 때문에 환자를 대상으로 하는 선별 검사로 알맞은 검사 방법이다(Fig. 4).^{28,34,35)}

Detection Method Comparison and Clinically Relevant Infections

조직에서 HPV 감염 여부를 확인하는 방법은 매우 다양하

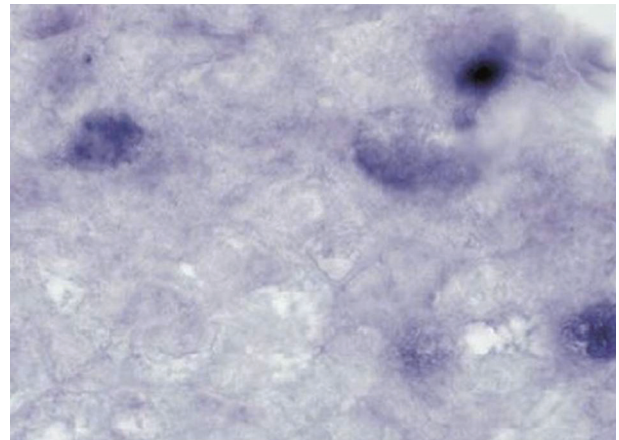


Fig. 3. Positive in situ hybridization for HPV type 16 using bright field microscopy. Dot-like positivity was observed in nucleus of tumor cell (cited from Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Anat Pathol* 2010;17(6):394-403). HPV: human papillomavirus.

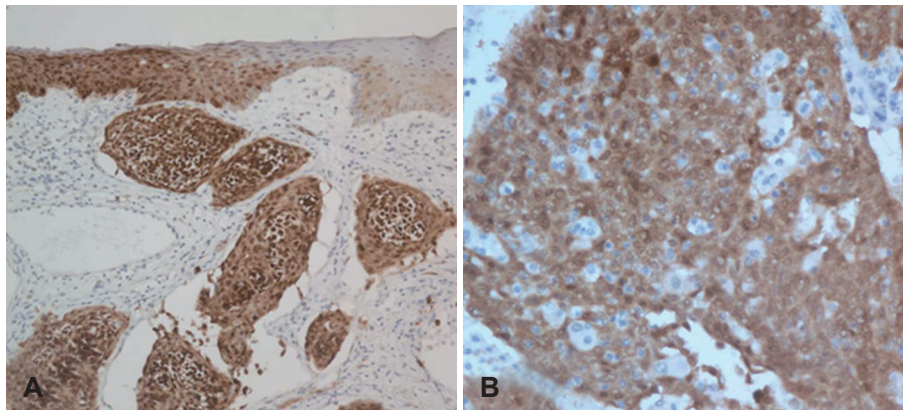


Fig. 4. Up-regulated p16: strong staining is evident in much of this moderately differentiated SCC; in contrast, the staining of the adjacent normal epithelium is weak and mainly confined to the lower layers. Original magnification $\times 200$ (A), $\times 400$ (B). SCC: squamous cell carcinoma.

Table 1. HPV detection method comparison

	PCR	ISH	p16	Real time (RT)-PCR
Integration	—	+++	++	++++
Sensitivity & specificity	High	Moderate	Moderate	High
Cost	High	Moderate	Low	High
Screening	++	+++	++++	+

PCR: polymerase chain reaction, ISH: *in situ* hybridization, RT: real time

며 현재까지 표준화된 검사 방법으로 결정된 검사 방법은 없다. PCR 검사 방법은 1개의 세포에 HPV genome이 한 개만 있더라도 확인이 가능한 매우 민감한 검사 방법인 반면, ISH나 IHC는 민감도가 다소 떨어지기는 하지만 HPV DNA의 integration 여부를 확인할 수 있고, 비용 대비 효과가 우수한 장점이 있다. 또한, real time PCR은 비용이 고가이고 real time RT-PCR의 경우 파라핀포매조직에서 정확도가 떨어진다는 단점이 있지만, HPV genome의 transcription이 일어났는지 확인할 수 있으며, viral load를 정량적으로 분석할 수 있어 발견된 HPV DNA가 종양 발생에 어떠한 영향을 주었는지 좀더 명확하게 확인할 수 있는 장점이 있다(Table 1).

암 조직 내에서 HPV의 감염을 확인할 때 가장 중요한 것은 확인된 HPV가 clinically relevant infection인지를 확인하는 것이다. 즉, 종양 조직 내에서 PCR을 통해 HPV DNA를 발견하였을 때 그 종양이 발견된 HPV에 의해 발생한 것인지를 확인하여야 한다. 자궁경부암은 대부분이 HPV에 의해 발생하기 때문에 자궁경부암 조직에서 발견된 HPV DNA가 integration 또는 transcription이 되었는지 확인하는 것이 크게 중요하지 않고, 오히려 발견되는 HPV의 종류가 다양하기 때문에 발견된 HPV가 고위험 HPV인지, 저위험 HPV인지를 확인하는 것이 더 중요하다. 하지만 두경부암의 경우 암의 원인인자가 다양하기 때문에 단지 조직 내에서 HPV DNA가 발견되었다고 해서 그 암이 HPV에 의해 발생한 암이라고는 할 수 없다. 따라서 두경부암에서는 반드시 integration이나 transcription이 일어났는지 확인하는 검사법을 이용하는 것이 필요하며, 과거의 연구에서 연구자마다 매우 다양한 HPV prevalence rate이 관찰된 것은 HPV 검출 방법이 다양하기 때문이기도 하지만, 이 과정을 거치지 않은 연구와 이 과정을 거친 연구가 혼재되어 있다는 것도 주된 요인 중 하나로 작용하였다. 또한, HPV genome의 integration이나 transcription을 확인하였다 하더라도, p16의 발현이 매우 낮거나 viral load가 낮은 경우 환자의 임상 양상은 HPV와 관계 없는 두경부암과 유사하게 진행되며, p16의 발현이 높거나 viral load가 높은 경우에는 HPV에 의해 발생한 두경부암의 특징인 예후가 좋고 방사선 치료에 반응을 잘하는 현상 등이 관찰된다.^{19,36-39)} 이러한 점들이 HPV

prevalence에 대한 연구나, 두경부암에서 원인인자로서의 HPV 역할에 대한 연구를 진행할 때 결과 해석의 혼선을 초래하게 된다. 현재 사용하고 있는 검사 방법 중 clinically relevant infection 여부를 확인할 수 있는 검사 방법은 선별 검사인 경우 p16 IHC가 적당하며, 연구 목적의 검사인 경우 real time PCR이 가장 적합하다고 알려져 있지만 아직까지 표준화된 검사법은 없는 실정이며, 현재까지 clinical relevant infection에 해당하기 위해 p16의 발현이 어느 정도 이상이어야 하는지, viral load가 얼마 이상이어야 하는지에 대한 표준화된 수치도 정해져 있지 않은 상태이다.

결 론

이상에서 확인한 바와 같이 조직 내의 HPV 감염 여부를 확인하는 방법은 매우 다양하고 현재까지 표준화된 방법이 없는 실정이다. 또한, 단순히 종양 조직 내의 HPV DNA를 확인하는 것만으로는, HPV 감염과 암의 발생 사이에 명확한 인과관계에 있다고 할 수 없으며, integration이나 transcription의 여부를 확인하여 clinically relevant infection을 구별하는 것이 필요하다. 이러한 점들을 고려할 때, 다음과 같이 임상에서 적용할 수 있는 검사법과 연구에 적용할 수 있는 검사법을 추천할 수 있다. 임상 상황에서는 먼저 p16에 대한 IHC를 시행하고 p16이 과발현된 환자에서 HPV DNA에 대한 PCR이나 ISH를 시행하는 것이 가장 적당하다. 이는 처음에 비용이 적게 들고 transcription 여부를 확인할 수 있는 p16 IHC를 선별 검사로 시행하여 p16의 발현 증가를 확인한 후, p16의 증가가 HPV 이외에 다른 요인으로도 증가할 수도 있기 때문에 PCR이나 ISH를 시행하여 HPV DNA의 존재 여부를 확인하는 것이다. 연구 상황에서는 민감도가 높은 검사법을 사용하는 것이 좋기 때문에 먼저 HPV DNA에 대한 PCR을 시행하여 HPV의 존재 여부를 확인한 후, real time(RT)-PCR을 통해 transcription 여부 및 viral load를 확인하는 것이 적당하다. 이는 임상에서 사용하는 방법보다 종양 조직 내의 HPV에 대한 정보를 좀더 정확히 제공할 수 있지만 비용이 많이 든다는 단점이 있다.

REFERENCES

- Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer* 2005;103(9):1843-9.
- Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol* 2002;38(6):610-7.
- 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.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal

- cancer. *N Engl J Med* 2007;356(19):1944-56.
- 5) Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 2000;89(3):300-4.
 - 6) Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, et al. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* 2002;8(4):1093-100.
 - 7) Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3187-92.
 - 8) Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104(3):336-44.
 - 9) Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowsky J, Kee F, Balam 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.
 - 10) Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kühndel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* 2004;30(4):302-8.
 - 11) Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2):467-75.
 - 12) Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006;31(4):259-66.
 - 13) de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324(1):17-27.
 - 14) zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-50.
 - 15) Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 1994;68(7):4262-73.
 - 16) Münger K, Werner BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989;8(13):4099-105.
 - 17) Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78(21):11451-60.
 - 18) Duensing S, Münger K. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta* 2001;1471(2):M81-8.
 - 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.
 - 20) Gregoire L, Arella M, Campione-Piccardo J, Lancaster WD. Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. *J Clin Microbiol* 1989;27(12):2660-5.
 - 21) Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-14.
 - 22) Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990;71(Pt 1):173-81.
 - 23) Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):357-61.
 - 24) de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76(Pt 4):1057-62.
 - 25) Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders PJ, Vaccarella S, Franceschi S, et al. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol* 2006;44(6):2025-31.
 - 26) Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006;44(2):504-12.
 - 27) Geraets DT, Heideman DA, de Koning MN, Snijders PJ, van Alewijk DC, Meijer CJ, et al. High-throughput genotyping of high-risk HPV by the digene HPV Genotyping LQ Test using GP5+/6+-PCR and xMAP technology. *J Clin Virol* 2009;46 Suppl 3:S21-6.
 - 28) Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 2007;121(11):2465-72.
 - 29) Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, et al. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27(36):6213-21.
 - 30) Remmerbach TW, Meyer-Ebrecht D, Aach T, Würflinger T, Bell AA, Schneider TE, et al. Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer. *Cancer* 2009;117(3):228-35.
 - 31) Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, Biscotti CV, Layfield LJ. Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn Cytopathol* 2003;29(3):149-55.
 - 32) Hesselink AT, van den Brule AJ, Brink AA, Berkhof J, van Kemenade FJ, Verheijen RH, et al. Comparison of hybrid capture 2 with in situ hybridization for the detection of high-risk human papillomavirus in liquid-based cervical samples. *Cancer* 2004;102(1):11-8.
 - 33) Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 2004;202(1):23-33.
 - 34) Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 2010;116(9):2166-73.
 - 35) Begum S, Gillison ML, Nicol TL, Westra WH. Detection of human papillomavirus-16 in fine-needle aspirates to determine tumor origin in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2007;13(4):1186-91.
 - 36) Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(4):261-9.
 - 37) Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandtma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24(5):736-47.
 - 38) Cohen MA, Basha SR, Reichenbach DK, Robertson E, Sewell DA. Increased viral load correlates with improved survival in HPV-16-associated tonsil carcinoma patients. *Acta Otolaryngol* 2008;128(5):583-9.
 - 39) Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009;27(12):1992-8.