

두경부암에서 인간유두종바이러스 : 진단

국립암센터 두경부종양클리닉, 갑상선암센터, 특수암센터, 이비인후과
정 유 석

HPV in Head and Neck Cancer : Diagnosis

Yuh-S. Jung, MD

Head and Neck Oncology Clinic, Center for Thyroid Cancer, Center for Specific Organs Cancer,
Department of Otolaryngology, Research Institute & Hospital, National Cancer Center, Goyang, Korea

서 론

두경부암의 고전적인 병인은 흡연과 심한 음주 등의 환경적 요인으로 알려져 왔으나, 최근 10여년간의 집중적 연구를 통해 인유두종바이러스(HPV) 감염 및 이와 관련된 발암 과정이 두경부암의 가장 확실한 단일 병인으로 대두되었고,¹⁾ 이러한 병인과 관련된 특정부위의 두경부암, 특히 구인두암이 지속적으로 증가하고 있음이 미국과 유럽 각국의 역학 연구를 통해 알려졌다.²⁻⁴⁾ 전세계적으로 미국, 유럽 국가 대부분은 공통적으로 흡연율이 감소하는 추세임에도 불구하고, 특정 두경부암, 특히 구인두암의 빈도가 증가하고 있고, 이는 남성, 그리고 50대 이상의 비교적 젊은 연령 환자에서 두드러지는 양상을 보인다.^{2,5)} 아울러 구인두암 조직에서 HPV 양성 빈도도 점차 증가하고 있다.³⁾

HPV 양성 두경부암 HPV음성 두경부암과 발암기전에서 뚜렷한 차이가 있고, 상이한 분자생물학적 profile을 가진다. 또한 임상 경과와 방사선치료 혹은 항암방사선치료 등 각종 치료에 대한 반응이 HPV 음성 두경부암보다 양호하여 예후가 일관되게 좋다.^{2,6,7)} 이러한 측면에

교신저자 : 정유석, 410-769 경기도 고양시 일산동구 일산로 323 국립암센터 두경부종양클리닉, 갑상선암센터, 특수암센터, 이비인후과

전화 : (031) 920-1685 · 전송 : (031) 031-920-1275
E-mail : jysorl@ncc.re.kr

서 두경부암에서 이미 HPV 관련 여부는 병인을 설명하고, 종양의 양상을 예측, 진단하고 향후 예후를 추정할 수 있는 가장 중요한 바이오마커가 되었다. 치료방침의 결정 측면에서도, HPV 관련 여부에 따라 다른 표적치료 전략을 적용하거나, 두경부암이 HPV 양성일 경우는 치료의 강도를 적절히 조절하여(de-escalation), 동일한 생존율을 보장하면서도 치료에 의한 독성을 줄이려는 3상 다기관 연구가 최근 시작되었다. 따라서, 생물학적으로 적절하면서 일관된 방법으로 HPV를 검사하고, 환자군을 정확히 stratification하는 것은 두경부암 영역의 기초 및 임상 모든 측면에서 이미 중요한 과제이고, 향후에도 점점 더 중요해질 것이다.

두경부암에서 HPV를 진단할 수 있는 기법은 여러 가지가 있다. 중요 검사들은 상이한 장단점을 가지고 있는데, 민감도, 특이도, 혹은 검사 용이성 등을 복합적으로 고려할 때, 완벽한 표준검사는 아직 없어서, 의료 기관마다 각자 처한 실정에 맞는 검사방법을 적절히 선택하는 것이 중요할 것이다. 아울러, 과거 여러 연구에서 사용했던 검사 방법이 다양했기 때문에, 기존 연구 결과를 비교하고 해석할 때 혼란의 소지도 있다. 이러한 측면에서, 본 리뷰에서는 HPV 관련 두경부암의 발생기전 및 분자생물학적 특성을 살펴 보고, 두경부암에서 HPV를 진단하는 여러 기법, 그리고 각각의 의의를 고찰하여, 이후 HPV 검사를 위한 적절한 전략을 수립하는데 도움이 되고자 한다.

HPV 관련 두경부암의 발생기전 및 분자생물학적 특성

130개 이상의 다른 type의 HPV가 발견되었는데, 다른 HPV type이라고 하더라도 대부분의 염기서열은 비슷하여, 서열의 71%에서 89%는 동일하다. 그러나 어떤 조직에 더 잘 감염되는지, 즉 조직특이성이나 발암성 정도는 type에 따라 다르다.⁸⁾ Alpha-papillomaviruses는 점막, 성기부 감염과 관련이 있고, beta- 혹은 gamma-papillomaviruses는 피부감염 및 사마귀 등의 양성 병변을 초래한다. 고전적으로 HPV는 자궁경부암의 역학 연구 데이터에 기반, 저위험형 혹은 고위험형 바이러스로 분류되어 왔다. 이 중, 저위험형인 HPV 6, 11과 고위험형인 HPV 16, 18, 31, 33이 구강 및 구인두 조직에서 가장 빈번히 발견된다.⁹⁾ 두경부암의 발생에는 고위험형 중 주로 HPV 16, 31, 33형이, 그 중에서도 16형이 90% 이상 관여하는데, 자궁경부암에서는 16/18형이 70%만 관여하는 것과는 차이가 있다.^{10,11)}

약 8,000 bp의 바이러스 DNA는 원형이고, capsid protein으로 구성된 캡슐로 둘러싸여 있다. HPV genome은 보통 여덟 개의 유전자(gene)로 구성되어 있다. 이 유전자는 감염 후 세포 내 발현 시점에 따라 early(E)와 late(L)로 분류된다.¹²⁾ Early gene인 E1, E2, E4, E5, E6, E7의 발현은 HPV16의 경우, early promotor인 p97로부터 시작된다. 이는 세포의 분화 정도와 상관없이 발현되고, 대부분 상피조직 중 왕성히 증식하는 미분화 기저세포 시점부터 발현하기 시작한다. Early gene은 대부분 바이러스의 복제나 각 gene의 상호 발현조절에 관여한다.^{9,13)} 한편, HPV16에서 late promotor인 p670이 작동하면 L1, L2 capsid 단백질이 발현되는데, 이는 기저층(basal layer)의 상층부의 분화 상피 세포에서만 발현된다.

Early gene 중 E1, E2, E4, E5는 주로 바이러스 자체의 복제와 유전자의 발현 과정에 관여한다. 특히 E2는 integrated stage의 초기에 E6, E7의 발현을 저해하고, E4, E5는 HPV 관련 세포 주기의 마지막 단계에 발현하여 viral virion을 궁극적으로 완성하게 된다.

Early gene 중 E6, E7이 세포 내 발암기전과 직접적으로 관련되어 있다. 고위험형과 저위험형 HPV 모두, E6,

E7 종양단백을 발현하나, HPV 16 등의 고위험형 HPV의 E6와 E7이 저위험형보다 훨씬 강한 결합력으로 숙주세포의 p53, Rb 등, 종양억제단백에 결합, 작용하여 결과적으로 발암 기전을 촉발한다.¹⁴⁾ 특히 E6, E7의 발현은 in vitro에서 상피세포를 immortalized cell로 전환시키는데 필수적이다. 역으로 이러한 immortalized cell line에서 E6, E7을 siRNA 등으로 knock-down 시키면 immortalized cell로서의 성격을 잃고 apoptosis에 빠지게 된다.¹⁵⁾ HNSCC mouse 모델에서는 E7이 E6에 비해 더 중요 역할을 한다고 보고되었다.¹⁶⁾

E6는 p53과 결합, E6AP(cellular ubiquitin ligase E6-associated protein)의 작용을 통해 이를 분해한다.¹⁷⁾ 또한 E6는 telomerase의 활성화에도 관여한다.¹⁸⁾ 한편, E7은 retinoblastoma gene family의 종양 억제 단백질인 Rb, p130, p107 등에 결합, 이들을 비활성화한다.¹⁹⁾ 저인산화 Rb는 정상적으로 cell cycle progression에 관여하는 전사인자인 E2F에 결합, 작용을 억제시켜서 cell cycle progression을 억제하는 기능을 하는데, E7은 이 기능을 억제하여 E2F의 기능을 활성화시키고, 결과적으로 세포 주기를 활성화시킨다.¹⁹⁾ Rb는 다른 종양억제단백인 cyclin-dependent kinase inhibitor인 p16 발현의 negative regulator이기도 하다.²⁰⁾

HPV DNA는 두경부암 세포 내에서 episome이나 integrated 형태, 혹은 두 상태가 혼합된 형태로 존재한다.²¹⁾ 그리고 virus의 세포 내 종양형성 기전을 활성화시키는 E6/E7 mRNA는 episomal이나 integrated HPV DNA 모두로부터 전사되어,²²⁾ 생물학적 작용을 한다.

p16의 발현은 E7의 Rb 비활성화에 의한 downstream activity를 반영하는데, 두경부암에서 HPV 유무를 시사하는 바이오마커로 널리 측정되고 있다. 이는 거의 대부분의 HPV 음성 구인두암에서 p16이 거의 발현되지 않기 때문에, HPV 존재를 높은 정확성으로 반영하게 된다.²³⁾ p16의 과발현은 고전적으로 E7의 Rb에 대한 작용 때문이라고 알려져 있지만, 최근에는 E6도 부분적으로 이를 촉발하는데 일조함이 알려져 있다.²⁴⁾

HPV양성 두경부암의 특이성을 잘 보여주는 증거로서, biologically-active HPV DNA를 가지는 두경부암은 HPV 음성 두경부암과는 다른 gene expression profile을 보임이 보고되었다.²⁵⁾ HPV 음성 두경부암은 cyclin

D나 EGFR 처럼 종양 발생과 진행에 관련된 인자가 더 심하게 발현되는 경향이 있다.²⁶⁾ HPV 양성 암과 HPV 음성 암 간의 일련의 genome-wide association study에서도 global epigenetic change나 genome instability 양상이 명백히 차이가 있음이 알려지고 있다.²⁷⁾ 특히 HPV 음성 두경부암에서 microsatellite instability나 chromosomal aberration이 더 빈번하다.²⁸⁾ 즉, HPV 양성 암과 HPV 음성 암은 분자 수준에서 이미 다른 질환이고, 각각 특이한 발암 및 진행 기전이 작동하고 있음을 시사하고, 실제 치료 전략 수립 시 이러한 사항을 중요하게 고려해야 한다. 따라서 두경부암의 HPV관련성 여부를 적절하게 예측하는 것은 현재 매우 중요한 과제이다.

HPV의 검사 기법

두경부암에서 HPV의 감염여부를 진단하는 기법은 어떤 마커를 어떻게 검출할 것이냐에 따라 여러 다양한 방법들이 임상에 적용되고 있다. 각각의 방법들이 다양한 장단점을 가지고 있기 때문에, 진단기법의 선택은 원하는 생물학적 정보, 이용 가능한 두경부암 조직의 상태, 의료 기관의 상황, 임상과의 선호도에 따라 달라진다. 대략 신선조직, 동결조직, 파라핀포매조직 등의 방법으로 보관된 두경부암 조직에서 단백질, 바이러스 DNA, 바이러스 mRNA를 검출하는 방법으로 분류된다. 혹은 타액이나 구강내 가글을 통해 얻어진 구강점막세포도 역시 분석에 이용될 수 있다.

Southern blot은 과거 오랫동안 특정한 DNA의 검사를 위해서나 현재 이용되고 있는 검사기법의 유효성을 검증하기 위하는 등의 목적을 위해 전통적으로 사용되어 왔던 방법이나, 많은 양의 DNA가 필요하고, 이후 고안된 기법에 비해 잇점이 없어서 최근에는 사용되지 않는다.

최근 두경부암에서 p16 immunohistochemistry(ISH)가 HPV 관련 여부의 대체 마커로서의 의미가 있음이 알려지면서 여러 두경부암 관련 임상연구에서 stratification을 위해 광범위하게 쓰이게 되었다. 그러나, 아직 HPV 관련 임상 및 기초 연구시의 표준 검사는 PCR, amplification technique이라고 할 수 있고, 현재도 가장 빈번히 사용되고 있는 것이 사실이다.²⁹⁾ PCR 기법이 발전하면서 보다 효율적인 방법이 개발되어 임상적으로 적용되어 왔다.

어떤 염기 서열을 검출할 것인지, 어떤 시약을 써서 어느 정도 온도에서 PCR을 시행할지, single 혹은 multiplex reaction 시킬 것인지, 형성된 PCR product를 어떻게 검출할 것인지에 따라 다양한 PCR protocol과 제품이 개발되어 왔다.

Amplification Technique

여러 amplification 기법이 HPV 존재를 진단하기 위해 고안, 사용되어 왔다. 필요시 typing도 연결시켜 시행할 수 있다. 가장 기본적인 형태의 amplification assay는 특정한 primer set를 이용, 단일한 HPV형을 대상으로 PCR을 시행하는 방법이다.^{30,31)} PCR후 합성된 amplification product는 ethidium bromide를 반응시켜 UV를 이용 검경을 하는 것이 가장 고전적이지만, 현재까지도 가장 확실한 방법이다. 현재도 각종 검사 기법의 유용성 비교 연구 등에 전기영동을 이용한 검출법을 사용하고 있다.

효율적인 검사를 위해서는 primer의 선택이 중요하다. Primer로 특정 sequence pair를 여러 개 동시에 사용하거나, consensus primer를 선택하는 방법이 있는데, 후자가 현재 일반적이다. 최초로 개발된 consensus primer set(MY09/11, GP5/6 등)은 L1 gene의 highly conserved portion를 표적으로 한다.³²⁾ GP 5/6는 최초 HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33를 표적으로 고안됐으나, 이후 최소 27종류 이상의 HPV type을 증폭할 수 있는 것으로 알려지고 있다.^{33,34)} 비특이적 증폭을 최소화하기 위해 이후 GP5+/6+이 개발되었다.³⁴⁾ 다른 primer set인 MY09/11은 최소 30여 HPV type을 증폭한다.³⁵⁾

HPV DNA PCR은 대부분 종양조직이 보관된 방법인 파라핀포매조직에서 분절화(fragmented)된 DNA라도 검출할 수 있다는 중요한 장점이 있다. 만약 증폭이 충분하지 않다면, nested PCR을 이용, 민감도를 개선하기도 한다. 이는 1차 증폭과정을 통해 만들어진 PCR product에 대해 이차 증폭을 시행하는 것이다. 특이도의 개선을 위해 이차 증폭은 처음 primer보다 내부에 위치한 염기 서열을 이용하게 된다. 일례로 일차 primer로 L1 유전자의 441 base pair를 증폭한 후, 이차 primer로 335 base pair를 증폭하는 등의 예를 들 수 있겠다.³⁶⁾ 그러나 최근까지의 HPV관련 대부분 연구는 single-step PCR이 보

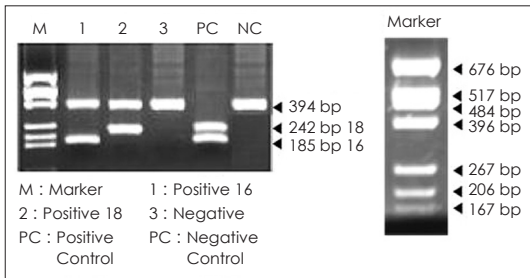


Fig. 1. Human papillomavirus (HPV) detection by end-point PCR. Detection of PCR products using gel electrophoresis was done after the amplification with HPV16/18 primer mixture, to perform detection and crude typing simultaneously. β -globin (394 bp) was also amplified as an internal control.

편적으로 사용되었고, 극단적인 nested PCR은 위양성의 위험을 증가시킬 수도 있는 문제가 있다.

HPV DNA PCR 후 HPV type을 규명하는 과정이 뒤따르게 된다. 두경부암과 주로 관련된 HPV type에 해당하는 multiplex primer set를 이용한 경우는 typing이 필요 없을 수도 있지만, HPV 6, 11 같은 저위험형에 공통적으로 포함한 서열을 사용하는 경우, 이후 typing은 HPV 감염의 위험성을 판단하기 위해 필수적이다. 처음부터 HPV16과 HPV18을 같이 포함하는 primer set을 써서 증폭시키는 방법도 있는데 이는 detection과 대략적인 typing을 동시에 할 수 있는 장점이 있어서 널리 사용되는 방법이기도 하다(Fig. 1).

Restriction fragment length polymorphism(RFLP)는 consensus primer를 이용한 PCR product에 사용할 수 있는 high throughput typing 방법이다. 다른 방법으로 reverse hybridization, DNA enzyme immunoassay, dot blot 등이 있는데, 모두 증폭된 DNA를 HPV type-specific probe에 포함(hybridize)시키는 방법들이다. 일반적으로, probe나 target에 붙은 표식자에 대한 효소 반응을 통해 신호를 발생, 검출한다(Fig. 2).³²⁾

Real-time PCR이나 real-time RT-PCR은 end-point PCR 방법에 비해 여러 실용적, 임상적 장점이 있다. Real-time PCR은 검사 기법이 더 간편하고, PCR 후 전기영동을 시행하지 않는 등, 조작 과정을 최소화 할 수 있어서, 오염의 위험성을 줄이고, 일관된 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 반면 고가의 기계가 필요하다. 이 검사로 조직 내 viral load를 알 수 있다. Viral load가 크다

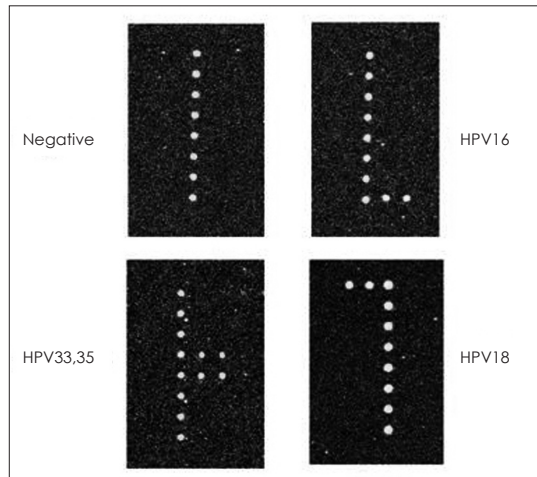


Fig. 2. Human papillomavirus (HPV) typing using reverse hybridization. Amplified DNA binds to type-specific probe, showing type-specific signal on the typing chip. Pattern of type-specific signal might vary depending on the original design of the chip.

는 것은 좀 더 임상적인 의미가 있는 HPV 감염 상태에 있을 가능성이 크다는 것을 의미한다.

전술된 모든 PCR 그리고 typing 기법은 자궁경부암을 비롯한 생식기부위 암에서 유용성이 검증되어 표준검사로 사용되고 있다. 모두 L1의 highly conserved portion을 표적으로 하여 일관된 결과를 얻을 수 있지만, L1만을 표적으로 하는 검사법의 실제 유용성에 대해선 여러 비판도 있다. L1 부위의 HPV 게놈은 숙주 게놈 내로 integration 될 때, 소멸되기 때문에, 위음성이 초래될 수 있다.³⁷⁾ L1 부위를 primer로 하는 PCR은 위음성이 7%로 보고되었는데,³⁸⁾ E6/E7을 증폭함으로써 이러한 위음성을 줄일 수 있다.

E6/E7 모두 integrated, episomal 상태 모두에서 세포 내에 보존되고, 발암과정에서 핵심적 역할을 하는 점에서 생물학적 의미가 크다.^{37,39,40)} L1이나 E6/E7 모두 적절한 표적으로 인정되고, 널리 사용되고 있으나, 생물학적으로는 L1 DNA PCR이 양성이어도 E6/ E7 mRNA가 발현되지 않는 경우는 분자적, 임상적으로 HPV DNA 음성과 흡사한 특징을 가진다는 것이 알려져 있으므로 본 검사는 두경부암의 종양생물학적 분류 시 중요한 의미를 가진다.⁴¹⁾ E6/E7 mRNA RT-PCR 역시 mRNA의 발현에 대한 양적정보를 제공하고, 이를 통하여 유전자 전사 정도를 정

량하고, 유전자 활성화 정도를 규명할 수 있다. E6/ E7 mRNA의 발현은 높은 viral load와 연관되어 있다.⁴²⁾

PCR을 이용하여 HPV virus의 감염된 종양조직 내에서 어떤 상태, 즉 episomal 혹은 integrated 상태로 존재하는지를 규명하는 방법도 있다.^{21,43)} HPV E2 gene은 바이러스가 숙주 게놈으로 integration 되기 전 원형 DNA가 선형 DNA로 준비되는 단계에서 주로 깨지는 부위이다. 만약 이 부위가 깨지면, 전체 E2를 증폭하는 primer를 사용하는 PCR을 시행해도 증폭되지 않게 된다. E6는 바이러스의 상태에 거의 영향받지 않으므로, E2 : E6 비율은 HPV가 episomal 혹은 integrated 중 어떤 상태로 존재하는지를 나타내게 된다. 이는 HPV의 세포 내 존재형태를 규명할 수 있는, 비교적 간편한 방법이지만, HPV DNA가 선형 DNA로 깨지는 위치가 일관되게 E2 부위일 것이라는 가정을 전제로 한다. 그러나 선형 DNA로 되는 과정에서는 E2 부위뿐 아니라, 다른 유전자 부위도 다양하게 깨질 수 있음이 보고되었다.⁴⁴⁻⁴⁷⁾ 또한 episomal DNA라도 E2가 존재하지 않는 경우도 있음이 알려져 있다.⁴⁸⁾ 이러한 오차를 개선하기 위해 역방향(inverse) PCR을 사용할 수도 있다. 이는 원형의 episomal DNA는 역방향 primer를 이용하여 long-running template PCR을 시행해도 온전히 증폭될 것이지만, 선형의 integrated DNA는 역방향 primer로 증폭되지 않을 것이라는 가정에 기초한다. 역방향 PCR 후 제한 효소로 DNA를 잘라서 예측된 크기의 DNA가 존재하는지를 검증할 수 있다(restriction cleavage, self-ligation, inverse polymerase chain reaction ; rliPCR). 그러나 이러한 viral integration 여부를 virus의 활성도를 설명하는 마커로 기계적으로 활용하는 것은 E6/E7 mRNA가 episomal 혹은 integrated 어느 바이러스 DNA로부터도 전사될 수 있다는 사실이나,^{22,44,46,49)} viral integration이 종양유전자 발현과 항상 동일, 일치하는 것은 아니라는 점⁵⁰⁾ 등을 고려하면 오류의 여지가 있다. Viral integration만 기계적으로 분석하는 것은 'silent integrants'라고 불리는, episomal DNA의 E2에 의해 전사가 억제되고 있는 integrated viral DNA도 반영하지 못하는 문제가 있다.⁵¹⁾ 아울러 viral integration은 oncogenesis의 결과로 나타나는 현상일 뿐, 필수적인 원인이전은 아니라는 연구결과도 있다.^{21,48)}

mRNA 검사는 virus의 생물학적 상태를 보다 정확하게 시사하는 유용한 검사법이나, 이를 위해선 검체를 적절하게 채취, 보관하는 것이 필수적이다. 대부분의 연구에서 동결조직을 사용해서 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음이 보고되었으나, 실제 임상적으로는 동결 조직이 항상 보관되어 있는 것이 아니고, 보관하기도 어렵다는 문제가 있다. 파라핀포매조직을 이용하는 경우, RNA 검사 결과의 재현성 문제가 아직 남아 있어 아직 보편적으로 사용되지는 않지만, 이 조직을 이용하여 RNA를 재현성 있게 분석할 수 있다면, 여러 후향적 연구가 가능해질 것이다.

몇몇 연구에서 동결조직과 파라핀포매조직 각각에서 추출된 RNA를 비교한 바 있는데, RNA의 상태는 고정(fixation) 과정 직후에 가장 나빠지는 것으로 알려져 있다. 신선 조직, formalin 고정, 그리고 파라핀포매된 후의 조직에 대해 real-time RT-PCR을 시행했을 때, 신선조직의 RNA 양이 10배 많고, 그 이후 단계는 대부분 분절화되었다는 연구 결과도 있다.⁵²⁾ 파라핀포매조직 RNA가 더 많이 깨져 있는 점을 고려하면, 이 경우 PCR의 성공율을 높이기 위해서는 amplicon target length를 좁혀서 중합반응을 시키는 것이 중요하다. Amplicon size를 291 bp에서 99 bp로 줄인 경우 파라핀포매조직의 RNA가 90배 더 증폭될 수 있다는 연구 결과도 있는데, 이 보고에서는 175 bp 이상의 서열을 표적으로 하는 약 135 bp의 amplicon length가 가장 위음성 가능성을 낮추면서도 민감도를 높일 수 있는 조합이라고 하였다.⁵²⁾ 아울러, 조직 고정 과정에서의 RNA의 분절화가 무작위로 발생하는 것이 아니라, 일정한 부위에서 일정한 양상으로 발생하는 경우가 많기 때문에 E6/E7 mRNA에서 파라핀포매 시에도 보존되는 부위, 염기서열에 대한 향후 연구가 필요할 것이다. 또한 적절한 RNA 추출 기법의 개발 역시 파라핀포매조직을 이용한 mRNA의 분석 기법 개발을 위해 중요할 것이다. 그러나 아직까지는 mRNA의 재현성 높은 분석을 위해선 적절한 보관 상태의 동결조직이 대부분 요구되는 상황이다.

In Situ Hybridization

Chromogen이나 fluorophore가 결합된 탐침자를 이용한 in situ hybridization(ISH)은 파라핀포매조직에서

여러 type의 HPV를 검출할 수 있는 재현성이 높은 방법이다. 형광현미경 없이 직접 검경하여 판독한다. ISH를 이용해, 바이러스 게놈이 세포 내의 어느 부위에 episomal 상태 혹은 integrated 상태 중 어떤 상태로 존재하는지를 시각적으로 확인할 수 있다. Episomal DNA는 세포핵 내의 미만성 신호를 보이는데 반하여 integrated DNA는 세포핵 내의 점상 양성 반응(dot-like positivity)을 보이는 특징이 있다.

ISH를 이용하여 episomal 상태 혹은 integrated 상태 중 어떤 상태로 바이러스가 존재하는지를 알 수 있으나, integration이 암 발생의 후기에 나타나는 현상이긴 하지만, 실제 생물학적 활성을 직접 반영하는 증거를 얻기는 어렵다. Episomal DNA 역시 암의 발생에 중요한 역할을 담당함이 보고된 바 있다.^{21,45)}

탐침자는 특정 부위에 호발하는 바이러스 DNA에 공통적으로 분포하는 염기서열을 감지하도록 디자인하게 된다. 저위험군과 고위험군 type을 감별하는 탐침자 pool를 사용하여 이후 typing을 위한 조직 작업 과정을 생략하거나 간략화할 수 있다.

ISH의 단점은 PCR에 비해 민감도가 낮다는 점이다. 일반적으로 세포당 10 copy number 이상 바이러스가 존재할 때만 ISH로 HPV를 증명할 수 있었다. 그러나 최근 민감도를 향상하기 위한 여러 기법이 개발되고 있는 상황이다. Tyramide signal amplification 등을 이용한 신호 증강 기법을 이용하고 여기에 다른 amplification 과정을 첨가하거나 chromogen 이나 fluorophore를 첨가하여 민감도를 증가시킬 수도 있다.^{53,54)} 최근 최근 ISH의 민감도가 10배에서 100배까지 향상되어 최근에는 1~2

copy number만 있어도 검출 가능한 kit도 소개되어 있다.⁵⁵⁾ 향후, 이러한 방법이 일반화된다면, 본 방법의 임상적 이용이 더욱 활발해 질 것으로 기대된다.

p16 Immunohistochemistry

두경부암에서는 p16 면역조직화학염색(immunohistochemistry, IHC)이 HPV 관련 여부의 대체 마커로 사용되고 있다. HPV 양성 두경부암 조직에서 p16이 과발현되어 있는 것이 많은 연구에서 IHC를 이용하여 확인되었다(Fig. 3).⁵⁶⁻⁵⁸⁾ 또한 p16과 PCR이나 ISH를 이용해 검출된 HPV DNA 간에 연관성이 있음도 보고되었다.^{43,57,59,60)} 그러나 E6/E7 mRNA를 발현하는 biologically active HPV를 가지는 종양의 경우에도 p16이 발현하지 않을 수도 있다.⁴⁴⁾ 역으로, E6/E7 mRNA가 없거나 심지어는 HPV DNA가 없는 경우에도 p16이 발현하는 경우도 있다.⁴¹⁾ 대부분의 HPV 양성 암은 p16을 발현하기 때문에 p16의 HPV 존재에 대한 민감도는 높지만, HPV DNA나 E6/E7 전사체가 없는 두경부암에서도 p16이 발현하는 경우가 있기 때문에 특이도는 낮은 편이다.^{41,43)}

p16 발현과 HPV DNA PCR 간에는 93%의 correlation이 있다는 결과도 있는데,⁶¹⁾ 두 검사결과가 일치하지 않는 일부의 증례에서는 HPV 16형 이외의 HPV가 관련한 부분도 있을 것으로 생각된다. 비슷한 연관성이 HPV16 ISH와의 비교 연구를 통해서도 밝혀졌는데,⁶²⁾ HPV16 ISH가 양성인 종양의 92%에서 p16 양성 소견을 보인 반면, HPV16 ISH 음성 환자는 6%에서만 p16양성 소

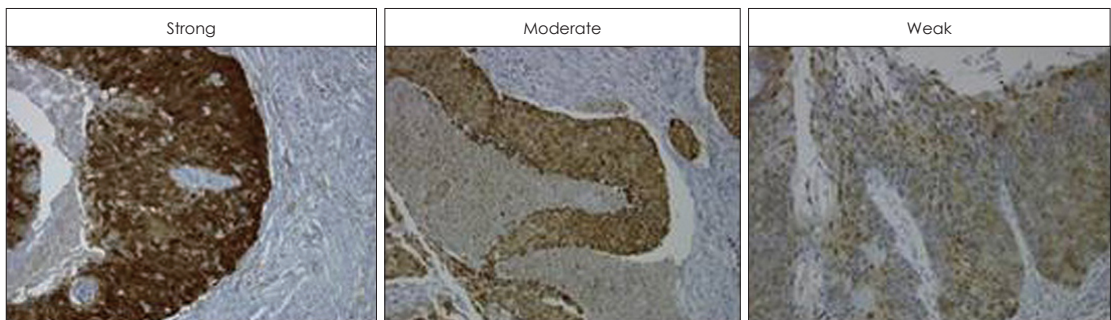


Fig. 3. Immunohistochemical expression of p16. Staining is usually observed in the nucleus, and focally cytoplasm. Intensity of signals might vary between cases. Semiquantitative scoring system could be adopted to describe the interpretation. Original magnification $\times 100$.

Table 1. Methods of HPV detection

Technique	Sensitivity*	Specificity*	Comment
PCR for L1	High	Low	Widely available, cumbersome, high cost
DNA ISH	Low	High	
E6/E7 mRNA	High	High	May require fresh frozen tissue, cumbersome, high cost
p16 IHC	Very high	Questionable	Widely available

* : Sensitivity and specificity refer to detection of biologically active HPV. PCR : polymerase chain reaction, ISH : in situ hybridization, IHC : immunohistochemistry

견을 보였다고 하였다.

특이도가 상대적으로 낮은 문제가 있지만, 파라핀포매조직에서 보편적인 병리 조직 검사를 통해 검사를 시행할 수 있는 것은 본 검사법의 큰 장점이라고 할 수 있다. p16 IHC는 HPV 유무를 판단하기 위한 대체 마커로 이미 널리 사용되고, 임상적으로도 치료 방침의 결정 및 예후 예측 등을 위한 stratification tool로 사용되는 등, 그 적용 범위가 확대되고 있다.

결론

전술한 점을 모두 고려할 때, 현재까지 HPV의 검사 방법으로 여러 효과적인 방법이 고안되고 연구되어 왔지만, 민감도와 특이도가 완벽하고, 정확하게 생물학적 활성 여부를 반영하면서, 임상적으로도 용이하게 이용할 수 있는 이상적인 검사 방법은 아직 없는 것이 현실이다 (Table 1).^{57,63,64)}

과거 보고에서 가장 이상적인 검사라고 알려진 E6/E7 mRNA 검사 조차 기법이 복잡하고, 일반적으로 신선 혹은 동결 조직이 필요하다는 문제가 있다. 이러한 문제 때문에 파라핀포매조직에서 용이하게 시행할 수 있는 p16 IHC나 HPV ISH 등이 일반적인 표준 검사로 인정, 임상적으로 널리 시행되고 있다.⁵⁷⁾

한편, 파라핀포매조직에서도 E6/E7 mRNA 발현 정도를 측정할 수 있는 방법이 최근에 개발되는 추세임을 고려한다면, 향후 E6/E7 mRNA나 단백질을 직접 간편하게 검출할 수 있으면서 정확한 검사 기법이 개발, 대중화될 것으로 기대된다. 이는 HPV 양성 두경부암의 조직 분석시 생물학적 특성을 보다 정확히 이해하고 이에 기반한 치료 기법을 개발하는데 큰 도움이 될 것이다.

Transcriptionally active HPV를 조직에서 증명하는

것이 중요한가 하는 점은 현재도 논란이 되고 있는 주제이다. 한 전향 연구에서는 ISH와 multiplex PCR만을 사용해서 검사한 경우도 일관되게 예후를 예측할 수 있었다고 보고하였는데, 이는 예후 예측을 위해 mRNA를 반드시 측정할 필요가 없을 수도 있다는 점을 시사한다. 또한 두 검사기법을 복합적으로 적용하는 방법도 연구되고 있다. p16 IHC를 선별검사로 먼저 시행한 후 PCR이나 ISH로 확진하는 방법이 생물학적 특성을 더 정확하게 예측할 수 있을 것이라는 가정에서 출발하는데, 이에 대해선 여러 연구가 시행되고 있는 상황이다. 저자는 p16 IHC와 HPV DNA PCR을 같이 시행하여 HPV 관련성 여부를 결정하는 전략을 쓰고 있다.⁶⁾

전술한 여러 검사 기법 중 어떤 기법을 선택할지는 검사자의 선호도, 의료기관의 상황, 검체의 상태, 비용, 민감도, 특이도 등의 제반 사항을 고려하여 결정하는 것이 중요할 것이다.

중심 단어 : 인간유두종바이러스 · 구인두암 · 중합효소 연쇄반응 · 제자리부합법 · p16 · 면역조직화학.

REFERENCES

- 1) Gillison ML. *Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. Semin Oncol 2004;31(6):744-54.*
- 2) Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. *Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. J Clin Oncol 2011;29(32):4294-301.*
- 3) Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, et al. *Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? Int J Cancer 2009; 125(2):362-6.*
- 4) Hocking JS, Stein A, Conway EL, Regan D, Grulich A, Law M, et al. *Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-*

- associated oropharyngeal cancers. *Br J Cancer* 2011;104(5):886-91.
- 5) 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.
 - 6) Park WS, Ryu J, Cho KH, Choi MK, Moon SH, Yun T, et al. *Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas in Korea: Use of G1 cycle markers as new prognosticators.* *Head Neck* 2011. DOI: 10.1002/hed.21939.
 - 7) Allen CT, Lewis JS, Jr., El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. *Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications.* *Laryngoscope* 2010;120(9):1756-72.
 - 8) de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. *Classification of papillomaviruses.* *Virology* 2004;324(1):17-27.
 - 9) Conway MJ, Meyers C. *Replication and assembly of human papillomaviruses.* *J Dent Res* 2009;88(4):307-17.
 - 10) Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. *Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications.* *J Dent Res* 2009;88(4):300-6.
 - 11) Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis JS Jr. *HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome.* *Head Neck Pathol* 2009;3(3):186-94.
 - 12) Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. *Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression.* *PLoS Pathog* 2009;5(2):e1000318.
 - 13) zur Hausen H. *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.* *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-50.
 - 14) Uversky VN, Roman A, Oldfield CJ, Dunker AK. *Protein intrinsic disorder and human papillomaviruses: increased amount of disorder in E6 and E7 oncoproteins from high risk HPVs.* *J Proteome Res* 2006;5(8):1829-42.
 - 15) Munger K, Howley PM. *Human papillomavirus immortalization and transformation functions.* *Virus Res* 2002;89(2):213-28.
 - 16) Strati K, Lambert PF. *Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer.* *Cancer Res* 2007;67(24):11585-93.
 - 17) Rolfé M, Beer-Romero P, Glass S, Eckstein J, Berdo I, Theodoras A, et al. *Reconstitution of p53-ubiquitinylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP).* *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(8):3264-8.
 - 18) Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. *Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16.* *Nature* 1996;380(6569):79-82.
 - 19) Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.* *Science* 1989;243(4893):934-7.
 - 20) Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. *Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb.* *Cancer Res* 1994;54(23):6078-82.
 - 21) Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Mäkitie A, Bäck L, Kontio R, et al. *Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck.* *Int J Cancer* 2003;107(3):401-6.
 - 22) Snijders PJ, Meijer CJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow GB, Walboomers JM. *Human papillomavirus (HPV) type 16 and 33 E6/E7 region transcripts in tonsillar carcinomas can originate from integrated and episomal HPV DNA.* *J Gen Virol* 1992;73 (Pt 8):2059-66.
 - 23) Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. *Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck.* *J Clin Pathol* 2006;59(5):445-53.
 - 24) Merkley MA, Hildebrandt E, Podolsky RH, Arnouk H, Ferris DG, Dynan WS, et al. *Large-scale analysis of protein expression changes in human keratinocytes immortalized by human papilloma virus type 16 E6 and E7 oncogenes.* *Proteome Sci* 2009;7:29.
 - 25) Schlecht NF, Burk RD, Adrien L, Dunne A, Kawachi N, Sarta C, et al. *Gene expression profiles in HPV-infected head and neck cancer.* *J Pathol* 2007;213(3):283-93.
 - 26) Vu HL, Sikora AG, Fu S, Kao J. *HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy.* *Cancer Lett* 2010;288(2):149-55.
 - 27) Richards KL, Zhang B, Baggerly KA, Colella S, Lang JC, Schuller DE, et al. *Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability.* *PLoS One* 2009;4(3):e4941.
 - 28) Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, Snijders PJ, Ylstra B, van de Wiel MA, et al. *Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus.* *Oncogene* 2006;25(17):2558-64.
 - 29) Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al. *HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007).* *Ann Oncol* 2008;19(10):1681-90.
 - 30) Fontaine V, Mascaux C, Weyn C, Bernis A, Celio N, Lefèvre P, et al. *Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens.* *J Clin Microbiol* 2007;45(3):928-34.
 - 31) Weyn C, Boulenouar S, Mathys V, Vanhooland J, Bernis A, Fontaine V, et al. *Detection of human papillomavirus types 45 and 51 by type-specific polymerase chain reaction.* *J Virol Methods* 2007;146(1-2):405-8.
 - 32) Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. *Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method.* *J Clin Microbiol* 1998;36(10):3020-7.
 - 33) Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. *Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV).* *Int J Biol Markers* 2009;24(4):215-22.

- 34) 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.*
- 35) Williamson AL, Rybicki EP. *Detection of genital human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with degenerate nested primers. J Med Virol 1991;33 (3):165-71.*
- 36) Kay P, Meehan K, Williamson AL. *The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. J Virol Methods 2002;105(1):159-70.*
- 37) Chen CM, Shyu MP, Au LC, Chu HW, Cheng WT, Choo KB. *Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. J Med Virol 1994;44 (2):206-11.*
- 38) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999;189(1):12-9.*
- 39) Morris BJ. *Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. Clin Chem Lab Med 2005;43(11):1171-7.*
- 40) Theelen W, Reijans M, Simons G, Ramaekers FC, Speel EJ, Hopman AH, et al. *A new multiparameter assay to assess HPV 16/18, viral load and physical status together with gain of telomerase genes in HPV-related cancers. Int J Cancer 2010;126(4):959-75.*
- 41) 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.*
- 42) Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reyniès A, Rickman D, Thomas E, et al. *Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. Int J Cancer 2010;126(8):1882-94.*
- 43) Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, et al. *High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol 2006;24(36):5630-6.*
- 44) Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. *Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. Oncogene 2002;21(10):1510-7.*
- 45) Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. *Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. Cancer Res 2004;64(11):3878-84.*
- 46) Ragin CC, Reshmi SC, Gollin SM. *Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. Int J Cancer 2004;110(5):701-9.*
- 47) Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. *Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. Int J Gynecol Pathol 1998;17(2):146-53.*
- 48) 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.*
- 49) Bechtold V, Beard P, Raj K. *Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. J Virol 2003;77(3):2021-8.*
- 50) Hafner N, Driesch C, Gajda M, Jansen L, Kirchmayr R, Runnebaum IB, et al. *Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. Oncogene 2008;27(11):1610-7.*
- 51) Pett M, Coleman N. *Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? J Pathol 2007;212(4):356-67.*
- 52) Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW, et al. *Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. J Mol Diagn 2000;2(2):84-91.*
- 53) Umudum H, Rezanko T, Dag F, Dogan M. *Human papillomavirus genome detection by in situ hybridization in fine-needle aspirates of metastatic lesions from head and neck squamous cell carcinomas. Cancer 2005;105(3):171-7.*
- 54) Mirzamani N, Salehian P, Farhadi M, Tehran EA. *Detection of EBV and HPV in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization. Exp Mol Pathol 2006;81(3):231-4.*
- 55) Lizard G, Demares-Poulet MJ, Roignot P, Gambert P. *In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using a catalyzed signal amplification system: GenPoint. Diagn Cytopathol 2001;24(2):112-6.*
- 56) O'Regan EM, Toner ME, Finn SP, Fan CY, Ring M, Hagmar B, et al. *p16(INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. Hum Pathol 2008;39(3):452-8.*
- 57) 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.*
- 58) Klussmann JP, Gultekin 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.*
- 59) Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WN, Ramaekers FC, et al. *A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. Int J Cancer 2003;107*

- (3):394-400.
- 60) 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.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) Franceschi S, Munoz N, Snijders PJ. How strong and how wide is the link between HPV and oropharyngeal cancer? *Lancet* 2000;356(9233):871-2.
- 64) Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Meijer CJ, Snijders PJ, Leemans CR. Human papilloma virus in head and neck cancer: the need for a standardised assay to assess the full clinical importance. *Eur J Cancer* 2009;45(17):2935-9.