

<붙임 4>

기관고유연구사업 최종보고서							
연구분야(코드)	I-3	과제번호	NCC1210220		지원 프로그램	ex)창의 (일반연구)과제	
과제성격(기초,응용,개발)		실용화 대상여부	실용화/비실용화	공개가능여부 (공개,비공개)		공개	
연구과제명	(국문)Human papillomavirus 관련 및 비관련 구인두암의 예후 예측을 위한 risk grading system의 개발 (영문)Risk grading system to predict prognosis in HPV+ & HPV- oropharyngeal cancers						
과제책임자	소 속		특수암연구과	직 위	선임연구원		
	성 명		정 유 석	전 공	이비인후과-두경부외과학		
세부과제	구분	세부과제명		세부과제책임자			
				성명	소속(직위)	전 공	
	1						
	2						
	3						
총 연구기간	2012년 1월~2014년 12월(총 3년)		참여연구원수 (단위: 명, MY)				
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립 암센터	기업부담금		
	계	2012.1~2014.12	150,000	150,000	소계	현금	현물
	제1차	2012.1~2012.12	50,000	50,000			
	제2차	2013.1~2013.12	50,000	50,000			
	제3차	2014.1~2014.12	50,000	50,000			
참여기업	명칭		전화		FAX		
<p>기관고유연구사업관리규칙에 따라 본 연구개발사업을 성실히 수행하였으며 아래와 같이 최종보고서를 제출합니다.</p> <p style="text-align: center;">2014년 10월 27일</p> <p style="text-align: center;">과제책임자 정 유 석 (서명)</p>							
국립 암 센터 원 장 귀 하							
(첨부서류)							

작성요령

- 반드시 편집순서에 따라 작성하여야 함
- 전년도 연차실적을 포함하여 전체 사업기간에 대한 연구결과와 성과를 중심으로 기술함
- 필요한 경우 소제목을 설정하여 체계적인 형식을 갖추도록 함
- 요약문은 연구목표, 연구내용 및 방법, 연구성과 등을 중심으로 작성함
- 요약문중 중심단어(key words)는 5개 이내로 반드시 기재해야 함
- 번호나 기호를 사용한 보고서 형태로 작성하고 표나 그림을 이용할 수 있음. 단, 동 보고서와 함께 제출하는 전산파일에도 같은 표와 그림이 첨부되어 있어야 함

목 차

< 요약 문 >

(한글) Human papillomavirus 관련 및 비관련 구인두암의 예후 예측을 위한 risk grading system의 개발

(영문) Risk grading system to predict prognosis in HPV+ & HPV- oropharyngeal cancers

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

< 요약 문 >

연구목표 (200자 이내)	<최종목표> -HPV 관련 구인두암과 HPV 비관련 구인두암에서 향후 예후를 보다 정확하게 예측, 맞춤치료 전략을 결정할 수 있는 분자생물학적 바이오마커 시스템을 개발함. <당해연도목표> -기 구성된 TMA에서 여러 관련 마커의 발현을 확인, 이 expression profile과 HPV 연관성 등을 결합, 임상정보와의 연관 모델 고안 과정을 심화함. (이차년도 100명). -HPV+와 HPV- 김체에서 CNV 등의 genomic marker 분석.														
연구내용 및 방법 (500자 이내)	-TMA를 이용, 면역조직화학검사를 통해 여러 관련 마커의 발현을 확인하고, HPV 연관성, 임상정보 등과의 관계를 분석함 (이차년도 100명). -다기관연구를 통하여 대규모 한국인 연구군에서 HPV관련 두경부암 현황에 대한 공신력 있는 데이터를 취득함. HPV 관련, 비관련 두경부암에서 이차암 발생 양상과 예후의 차이를 분석하기 위하여, 관련 증례를 모집함. -genomic copy number variation 연구를 심화, genomic biomarker, prognosticator로서의 의미를 규명, 더 효과적인 예후 예측 시스템을 개발함. HPV+ 및 HPV- 두경부암 각각 40여례를 fill up하여 분석하고, 본 결과와 IHC pattern을 결합, risk stratification indicator로서의 가능성을 조사함.														
연구개발에 따른 기대성과	<정량적 성과 ¹⁾ > <table border="1" style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">구분</th> <th style="width: 33%;">달성치/목표치¹⁾</th> <th style="width: 33%;">달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>3/2</td> <td>150%</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>7.828/5</td> <td>157%</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> 1) 총연구기간 내 목표연구성과로 기 제출한 값 <정성적 성과> -두경부암의 분자생물학적 risk grading을 위한 바이오마커의 해석 시스템을 고안하여, 향후 환자의 risk-based stratification을 통하여 생존률 및 삶의 질의 동시 향상을 목적으로 한 맞춤 치료 방침의 개발을 위한 배경 지식을 습득함.			구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	3/2	150%	IF 합	7.828/5	157%	기타 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)													
SCI 논문 편수	3/2	150%													
IF 합	7.828/5	157%													
기타 성과															
색인어	국문	두경부 편평상피세포암 면역조직화학	인간유두종바이러스 비교유전체보합법	편도암											
색인어	영문	Head and Neck Cancer Immunohistochemistry	Human papillomavirus Array comparative genomic hybridization	Tonsil cancer											

Project Summary

Title of Project	Risk grading system to predict prognosis in HPV+ & HPV- oropharyngeal cancers
Key Words	Head and Neck Cancer; Human papillomavirus; Tonsil cancer Immunohistochemistry; Array comparative genomic hybridization
Project Leader	Yuh-S. Jung
Associated Company	

The incidence of human papillomavirus (HPV)-positive head and neck cancers (HNCs) is increasing sharply worldwide, while their HPV-negative counterparts are showing a decreased frequency. Developing better prognostic marker and customized treatment based on this marker is emerging as an important research task for this increasing disease entity. The aim of this project was to probe better molecular biologic biomarkers, to better predict the prognosis and develop a reasonable customized treatment strategy for HPV+ and HPV- oropharyngeal carcinomas. We had several publications through this project.

1. To identify the prognostic implications of human papillomavirus (HPV) related cell cycle marker profiles in patients who have received a transoral lateral oropharyngectomy (TLO) as a primary treatment for tonsillar squamous cell carcinoma (TSCC). Immunohistochemical profiles of HPV related cell cycle markers, including p16, pRb, cyclin D1, p53, and the HPV DNA status of 42 consecutive TSCC patients who underwent TLO based treatments were analyzed. The prognostic value of each marker was evaluated. Univariate analysis indicated that high p16, low pRb, and low p53 expression levels are significantly associated with a good disease free and overall survival outcome. Clinicopathological parameters and the HPV DNA status did not show prognostic significance. When adjusted for age, overall stage and treatment strategy, a high p16 and low pRb level remained an effective prognostic marker for good survival outcomes. A high p16/low pRb combination showed superior survival prediction ability over high p16 or low pRb alone. HPV related cell cycle markers may also be good indicators for predicting survival after TLO for TSCC. The de-escalation TLO surgery approach would be more effective if performed under the stringent guidance of these markers.

2. While epidemiologic data related to these changes are sparse in Korea, which is rapidly adopting more westernized lifestyles. Data from the Korea Central Cancer Registry, a nationwide population-based cancer registry, from 1999 to 2009 were retrieved. Age-standardized rates (ASRs), their annual percent changes (APC) and male-to-female incidence rate ratios (IRRs) were analyzed and compared between HPV-related and HPV-unrelated primary sites. HPV-related sites (oropharynx) had increased significantly over the period 1999 to 2009 (APC52.35%, P50.017), particularly in young men (30 - 59 years, APC52.65%, P50.031), whereas HPV-unrelated sites such as larynx and hypopharynx decreased markedly in both sexes. Interestingly, tongue cancer was found to have increased gradually (APC52.35%, P50.003) in both sexes. The male-to-female IRRs and the median age of occurrence remained stable. Although the cultural and ethnic background differs from the United States, cancers of HPV-related sites are increasing in Korea, whereas cancers of HPV-unrelated sites are decreasing, which is similar to the trends observed in the United States. Greater public awareness in Korea of HPV-related HNCs is therefore warranted.

3. The purpose of this study was to characterize the expression of CD200, a membrane protein that functions in immune evasion, to examine its correlations with cancer stem cell (CSC)-like features and analyze its response to chemotherapy and radiation in human papillomavirus (HPV)-positive (1) and negative (2) head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs). CD200 expression was analyzed in several HNSCC cell lines. CD200 was overexpressed in HPV(1) murine tonsil epithelial cells, its effects on Shh and Bmi-1 were examined in vitro, and tumor growth and response to chemoradiation were analyzed in vitro and in vivo. CD200 was diversely expressed and consistently associated with expression of Bmi-1 and Shh. Overexpression of CD200 induced Bmi-1 and Shh. Tumors grew similarly between C57BL/6 and Rag1-/- C57BL/6 mice. CD200 expression enhanced the resistance to chemoradiation only in vivo. CD200 was related to CSC features and modulates response to chemoradiation in vivo. Attenuating this might be a potential therapeutic strategy.

The novel Knowledges developed here is valuable both for prognostication and customized treatment. Larger scale analyses, especially using next gene sequencing technology is another attractive following work. Continuing project is planning regarding this.

1. 연구의 최종목표

<연구의 최종 목표>

- 두경부 편평상피세포암(두경부암)의 새로운 발암원인으로 밝혀진 인간유두종바이러스 (HPV) 관련 두경부암과 HPV 비관련 두경부암에서 향후 예후를 보다 정확하게 예측, 맞춤치료 전략을 결정할 수 있는 분자생물학적 바이오마커 시스템을 개발함.
- 국내 우수 기관과 다기관연구를 통하여 대규모 한국인 연구군에서 HPV관련 두경부암 현황에 대한 공신력 있는 데이터를 취득함. 개개 기관의 데이터에만 머물러 왔던 HPV관련 연구에 대한 일관된 대규모 자료와 임상적 의미를 규명함.
- gene level study인 copy number variation 연구를 심화하여 genomic biomarker, prognosticator로서의 의미를 제반 인자의 expression profile과 결합, 규명하여 potent risk prediction model을 개발함.

<2013년도 목표>

- 구성된 TMA를 이용, 면역조직화학검사를 통해 여러 관련 마커의 발현을 확인, 이 expression profile과 HPV 연관성 등을 결합하여 임상정보와의 연관 모델 고안 과정을 심화함. (이차년도 100명).
- 다기관연구 방향을 확립. 기관별 수술 검체에 대한 HPV 관련 검사기법 결정 후 시행. 아울러 normal population에서 HPV oral persistent infection 여부를 검진할 수 있는 방법을 확립하고, 이에 대한 pilot study 시행.
- HPV+와 HPV- 검체에서 CNV 등의 genomic marker 분석 및 보고.

2. 연구의 내용 및 결과

1. 수술 (경구강측인두 절제술, transoral lateral oropharyngectomy, TLO)을 초치료로 받은 구인두암 환자의 예후인자에 대한 분석

-편도암, 특히 HPV 관련 편도암은 전세계적으로 빈도가 증가하고 있어서, 최근 주목받고 있는 질환임. 특히, 분자생물학적, 임상적 양상이, 흡연 등과 관계된 HPV 비관련 두경부암과는 상이하기 때문에, 많은 이행 연구의 대상이 되고 있음.

-Transoral lateral oropharyngectomy (TLO)는 특정 병기의 편도암에 대한 효과적인 치료로 소개되었고, 최소침습적인 접근을 통하여 회복을 빠르게 하고 이환을 줄일 수 있다는 장점이 있음.

이 분석에서는 TLO를 초치료로 시행받은 편도암 환자군의 치료결과를 분석하고, 복합적 역학적, 병리적, 분자생물학적 마커와 예후와의 연관성을 분석하여 향후 치료 시,

효과적인 지표를 갖고자 하였음.

-2002년부터 2007년까지 편도암으로 진단받고, 국립암센터에서 초치료로 수술 (transoral lateral oropharyngectomy, TLO)를 시행받은 42명의 연속적 환자를 대상으로, overall survival (OS), disease specific survival (DSS), disease free survival (DFS)를 후향적으로 산출하였음. HPV 관련 여부를 DNA PCR과 p16 IHC로 조사하였고, ERCC1 p53, EGFR, cyclinD1, pRb, p21, cdk4, laminin5, 그리고 PTEN 등 여러 분자생물학적 마커의 발현을 semiquantitative IHC로 조사하였음.

아울러, 환자의 연령, 성별, 흡연, 음주력, TNM staging, 수술 절제연의 상태, 전이 림프절의 피막외침범 (ECS), 병리학적 아형, 방사선치료 유무 등과 예후와의 연관성도 분석하였음.

-단변량분석에선 pRb의 발현이 적고, p16의 발현이 강한 것이 가장 예후와 관련이 있었고, 다른 임상인자나 세포주기 관련 마커들은 예후와 관련이 없었음. 다변량분석에서도 비슷한 결과를 얻을 수 있었고, 이는 Kaplan-Meier test에서도 확인됨.

-따라서 HPV 관련 세포 주기 관련 마커가 HPV 단독보다도 수술적 치료 후의 예후를 효과적으로 예측할 수 있는 risk-grading marker라고 결론을 내림. 이는 향후 이러한 치료 시 더 정확한 guide가 될 수 있는 molecular grading marker라고 생각하였음. 비수술적 치료, 특히 항암방사선치료에도 비슷한 결과를 기대할 수 있을 것으로 추론함.

-향후 대규모그룹의 한국인을 대상으로 한 전향 연구에서 이러한 molecular grading system과 관련 마커의 치료적 의미나 이를 이용한 de-escalation strategy의 가능성에 대한 모색을 확장 적용할 것을 계획 중임.

-이상의 데이터는 2014년 J Surg Oncol (IF 2.843)에 publish 되었음.

Ryu CH, Ryu J, Kang SM, Cho KH, Moon SH, Yun T, Lee SH, Lee GK, Park WS, Jung YS, Human papillomavirus-related cell cycle markers predict survival, after transoral lateral oropharyngectomy for tonsillar carcinoma.

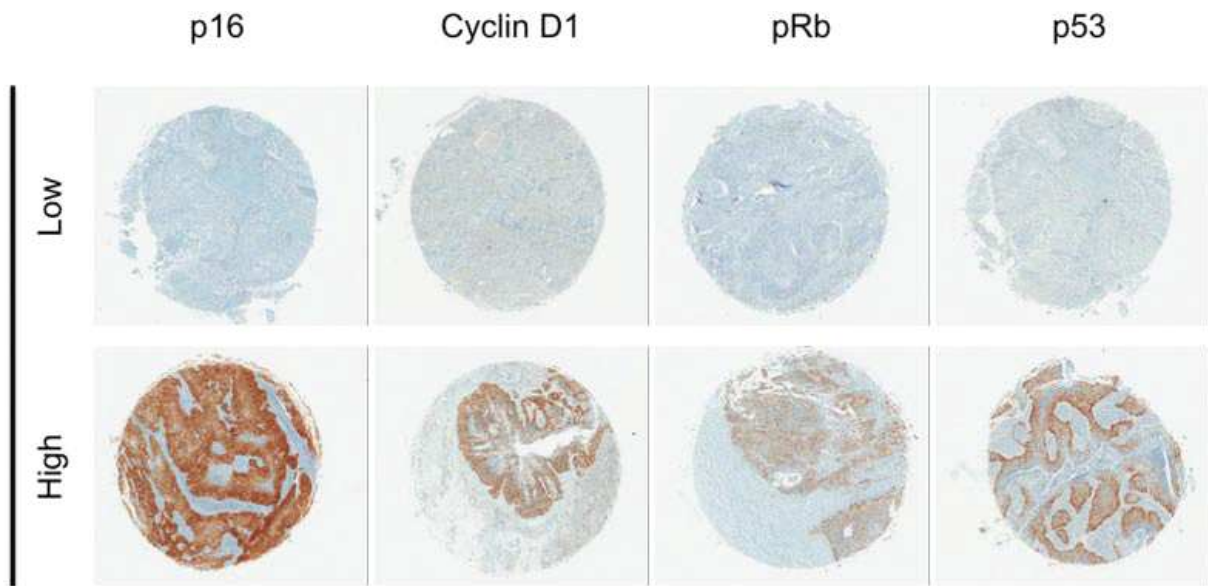


Table 1. Representative images of the typical protein expression patterns of HPV related cell cycle markers following immunohistochemical analysis of TSCC tumor specimens. Original magnification, 100X.

TABLE V. Multivariate Analyses of the Relationship Between HPV-Related Cell Cycle Markers and Their Combinations and Disease-Free and Overall Survival in Patients With TSCC Treated by the TLO

Variables	Disease-free survival		Overall survival	
	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value
p16 high	0.18 (0.05–0.66)	0.010	0.17 (0.04–0.66)	0.011
pRb low	0.16 (0.04–0.68)	0.013	0.21 (0.05–0.95)	0.042
p53 low	0.85 (0.22–3.26)	0.809	0.30 (0.08–1.14)	0.076
HPV DNA (+)/p16 high	0.55 (0.19–1.66)	0.289	0.27 (0.07–1.06)	0.060
HPV DNA (+)/pRb low	0.72 (0.24–2.15)	0.551	0.47 (0.12–1.80)	0.272
HPV DNA (+)/p53 low	1.14 (0.38–3.45)	0.814	0.43 (0.13–1.45)	0.432
p16 high/pRb low	0.08 (0.02–0.35)	0.001	0.14 (0.03–0.70)	0.017
p16 high/p53 low	0.31 (0.10–0.98)	0.046	0.16 (0.04–0.65)	0.011
pRb low/p53 low	0.29 (0.04–1.00)	0.050	0.18 (0.04–0.80)	0.025

HR, hazard ratio adjusted for age, overall stage, and treatment strategy; CI, confidence interval. Cox proportional hazard models were used for the multivariate analysis.

Table 2. Multivariate Analyses of the Relationship Between HPV Related Cell Cycle Markers and Their Combinations and Disease Free and Overall Survival in Patients With TSCC Treated by the TLO

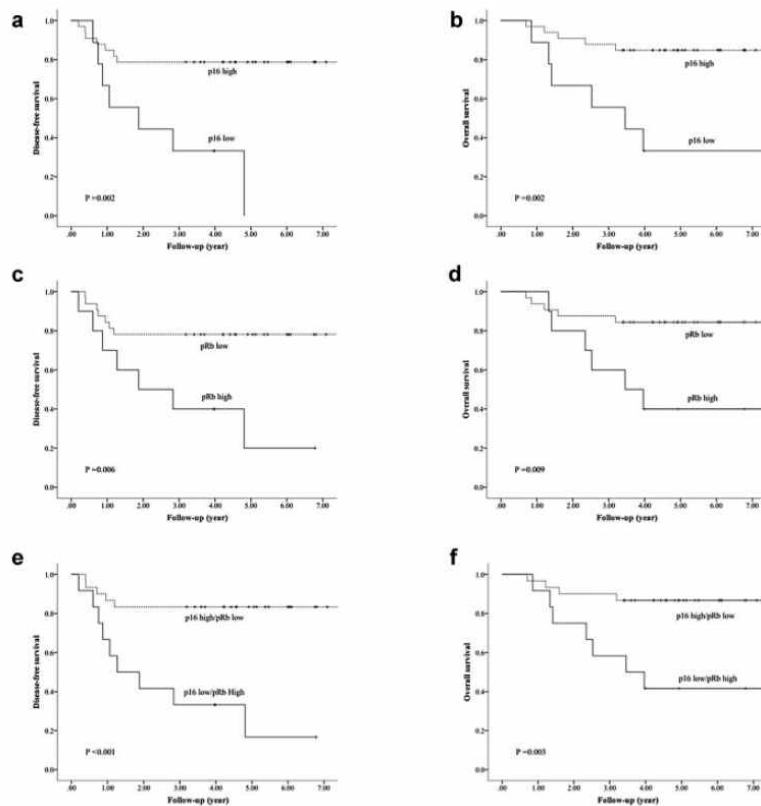


Figure 1. Disease free survival (DFS) (a,c,e) and overall survival (OS) (b,d,f) outcomes in relation to the p16 and pRb expression level in TSCC patients treated by TLO. Both p16 and pRb were found to be significantly associated with these survival parameters. Survival curves were generated using the Kaplan - Meier test with log rank test comparisons.

2. 한국에서 HPV 관련 두경부암을 포함한 두경부암의 추이에 대한 역학적인 분석: 선행 연구

- 국내 유수 기관과 다기관연구를 통하여 대규모 한국인 연구군에서 HPV관련 두경부암 현황에 대한 공신력 있는 데이터를 취득하기 위한 선행연구로, 현재 한국의 두경부암의 역학적 현황을 분석하여, 여기서 관련 단서를 찾아내고자 시도하였음.
- 한국에서 HPV 관련 두경부암의 현황을 파악하기 위한 선행 연구로서 두경부암의 전체 발생을 및 양상의 추이를 지난 10년간 분석함(국가암등록본부와 공동연구).
- 전세계적으로 두경부암의 빈도 및 발생양상은 최근 변하고 있음. 유럽, 미국의 역학 연구에 의하면 HPV+ 두경부암은 급격히 증가하고 있으나, HPV- (흡연 관련) 두경부암은 흡연율의 감소와 맞물려 감소하고 있음. 미국의 SEER data를 이용한 최근 연구에서는 개개 대상 환자들에게 HPV 검사를 시행하여 이러한 암이 증가하고 있음에 대한 분자적 증거를 제시한 바 있음.
- 그러나 이러한 부분에 대한 아시아 국가 및 국내의 연구는 현재까지도 없는 상황임.

따라서 지역적, 인종적 차이 설명에 대한 근거자료가 아직 없음. HPV 관련성에 대한 조직연구 데이터를 구비하기 위한 다기관 연구는 현재 조직 중임. 이에 앞선 선행연구로 암등록 자료에 대한 분석을 먼저 시행함.

-1999년부터 2009년까지 국가암등록사업 자료를 분석함. 각 원발병소간 연도별 유병율, 이를 통한 age-standardized rates (ASRs), annual percent changes (APC) for the incidence rates, male-to-female incidence rate ratios, and 5 year overall survival 등을 분석함.

-원발병소를 HPV 관련성이 높은 부위(구인두), 관련성이 없는 부위 (후두, 하인두), 중등도로 관련된 부위 (구강)로 분류하여 각각의 추이를 분석함.

-HPV 관련성이 높은 부위(구인두)의 암은 지난 10년간 유의하게 증가하였고 (APC=2.35, $p=0.017$), 이는 30-59세까지 젊은 남자에서 현저하게 나타났음 (30-59 years, APC=2.65, $p=0.031$). 반면, 흡연과 관계된 부위(후두)의 암은 모든 연령대와 성별에서 현저히 감소하는 양상을 보였음 (APC=2.35, $p=0.003$). 남녀비(male-to-female IRRs)의 변화 추세는 관찰되지 않았음.

-본 분석에서 최초로 우리나라도 미국-유럽국가의 사례와 비슷하게 다른 문화적, 지리적 배경임에도 불구하고, HPV관련 두경부암이 증가하고 있다는 점을 간접적으로 확인할 수 있었음. 이는 국내의 총체적인 두경부암 역학을 규명한 최초 보고이며, 이에 대한 관련 연구 및 사회적 관심이 향후 필요할 것임.

-본 연구의 결과는 실제 HPV 관련성에 대한 분자생물학적 연구를 분석한 것은 아니고, site-specific assumption에서 출발한 분석이라는 한계가 있음.

-따라서, 향후 관련 질환에 대한 다기관, large-scale data의 분석의 필요성을 제기하는 결과라고 판단됨.

-이상의 데이터는 2013년 Laryngoscope (IF 1.979)에 publish됨.

Shin A, Jung YS, Jung KW, Kim K, Ryu J, Won YJ. Trends of human papillomavirus-related head and neck cancers in Korea: National cancer registry data. Laryngoscope (IF 1.979). 2013 Jun 11. doi: 10.1002/lary.24243. [Epub ahead of print]

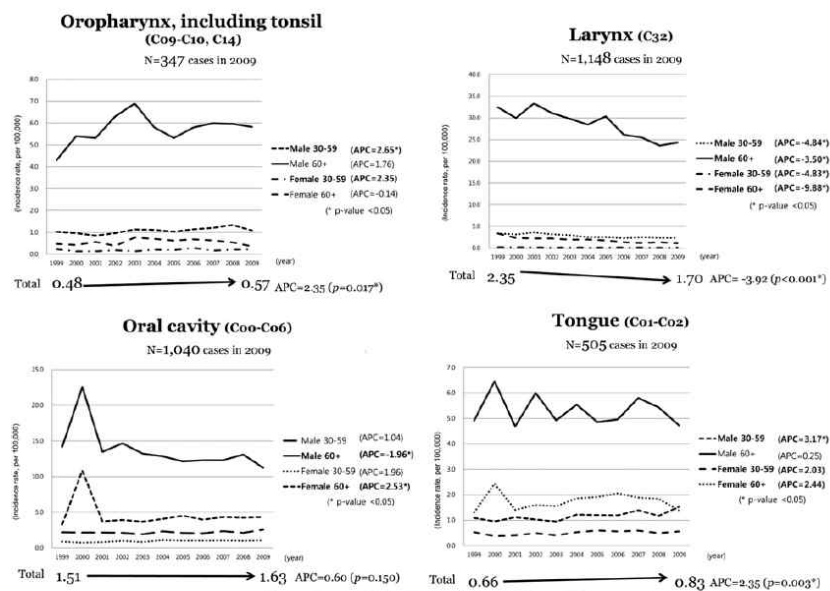


Fig. 1. Age-standardized incidence rates* per 100,000 and annual percent change (APC) for head and neck cancer by subsites.

Figure 2. Age-standardized rates per 100,000 and annual percent change (APC) for head and neck cancer by subsites.

3. 두경부암에서 CD200의 cancer stem cell feature와의 관련성과 항암방사선치료에 대한 저항성과의 관련성에 대한 연구

-두경부 편평상피세포암(두경부암)의 새로운 발암원인으로 밝혀진 인간유두종바이러스 (HPV) 관련 두경부암과 HPV 비관련 두경부암에서 향후 예후를 보다 정확하게 예측, 맞춤치료 전략을 결정할 수 있는 분자생물학적 바이오마커 시스템을 개발하고자 하는 시도로, 주로 myeloid system의 조절에 관련된 immune checkpoint surface protein인 CD200의 의미에 대해 연구함.

-CD200의 여러 두경부암 세포주에서의 발현을 보았고, CD200의 발현과 cell proliferative marker인 Shh와 Bmi-1의 발현의 연관성을 확인하고, CD200 과발현 세포에서 발생하는 분자생물학적 변화와 항암방사선치료에 대한 반응성의 변화를 봄.

-CD200은 western blot에서 여러 두경부암 세포주에서 다양하게 발현됨을 확인. 그러나 이러한 발현 양상이 HPV 관련 여부와 직접적인 관계는 없었음. CD200의 발현양과 Shh, Bmi-1의 발현양이 비례 양상을 보임을 확인함. 특히 CD200을 과발현시킨 경우 Shh나 Bmi-1의 발현이 따라서 증가하는 양상을 보였음. 특히 CD200을 과발현시킨 경우 in vivo mouse에서 항암방사선치료에 대한 저항성이 증가하는 소견을 확인함.

-따라서 CD200은 두경부암 세포에서 다양하게 발현한다는 점, 그리고 항암방사선치료에 대한 저항성을 증가시킨다는 점을 확인하고, 잠재적인 치료 타겟의 가능성도 있을 것으로 해석함.

-또한, 이러한 마커의 임상적인 진단 기법을 개발하고 환자에게 적용하여 더 정확한 예후 예측 마커로서 활용될 수 있을 가능성도 있으니, 이에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 결론을 지음.

-이상의 데이터는 2013년 Head Neck (IF 3.006)에 publish됨.

Jung YS, Vermeer PD, Vermeer DW, Lee SJ, Goh AR, Ahn HJ, Lee JH. CCD200: Association with cancer stem cell features and response to chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck 2014 Jan 13. doi: 10.1002/hed.23608. [Epub ahead of print]

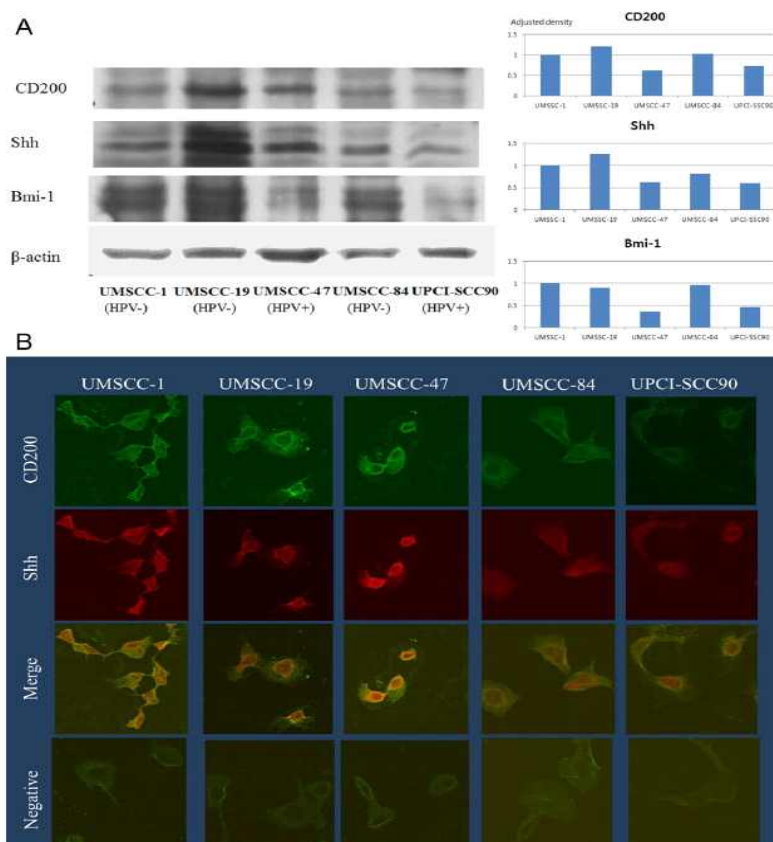


Figure 3. CD200 expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines and association with the expressions of sonic hedgehog (Shh) and Bmi-1. (A) Western blot analyses of CD200, Shh, Bmi-1, and actin controls are shown for multiple HNSCC cell lines with various human papillomavirus (HPV) status. Adjusted densities of each blot were graphed, with those of UMSCC-1 as a reference. (B) Immunofluorescence of the same cancer cells.

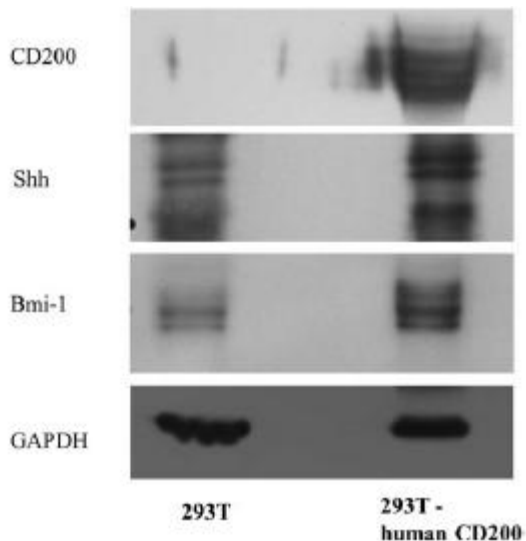


Figure 4. Ectopic expression of CD200 correlates with increased expression of sonic hedgehog (Shh) and Bmi-1. After transfection of 293T cells, expression of CD200, Shh, and Bmi-1 were compared using Western blot analysis.

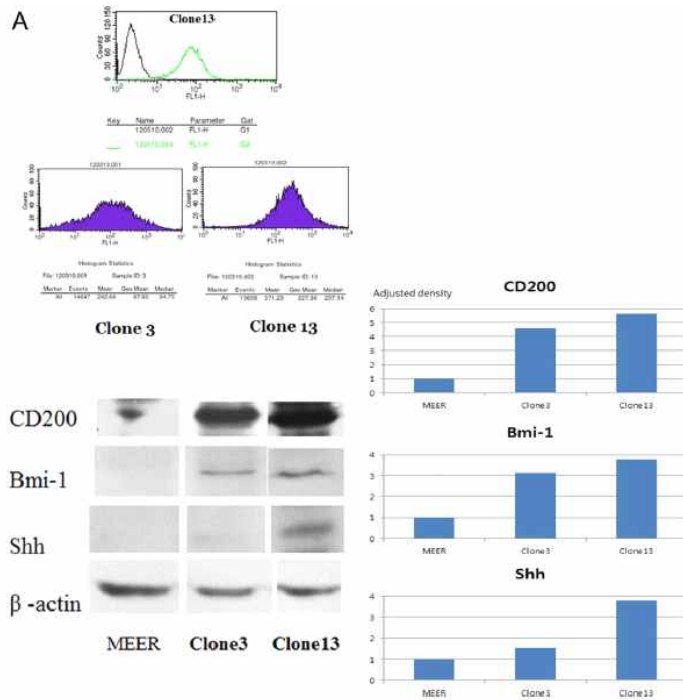


Figure 5. Transfection of CD200 to mouse human papillomavirus (HPV)-positive cell lines. (A) Surface and total CD200 was quantified in 2 stable clones 3,13 using flow cytometry and Western blot analysis. Western blots of these clones were examined to correlate CD200 expression to the expression of sonic hedgehog (Shh) and Bmi-1. Adjusted densities of each blot were graphed, with those of UMSCC-1 as a reference. (B) (i) Cell proliferation, (ii) colony formation, and clonogenic assay at varying doses of (iii) radiation and (iv) cisplatin compare growth characteristics of these cells.

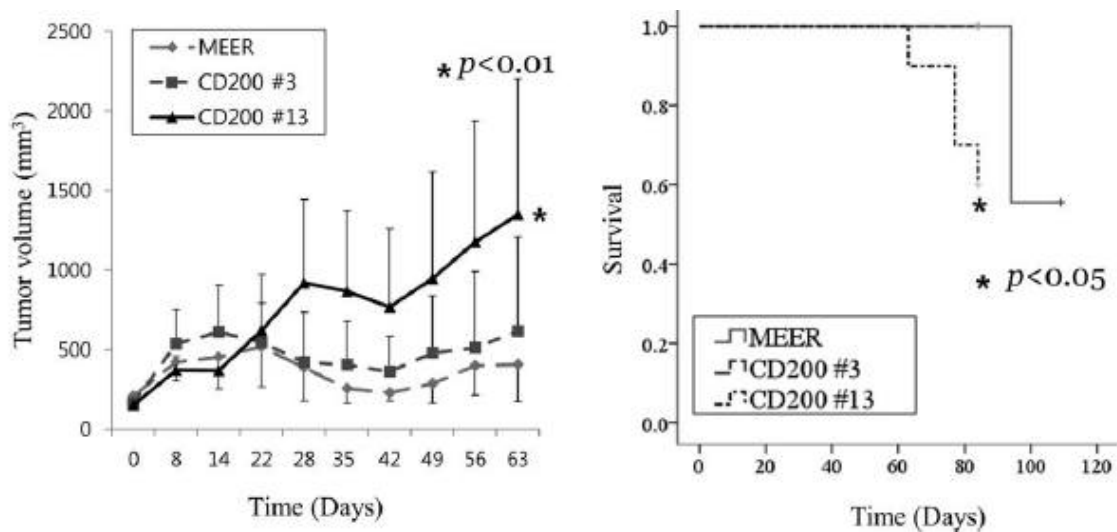
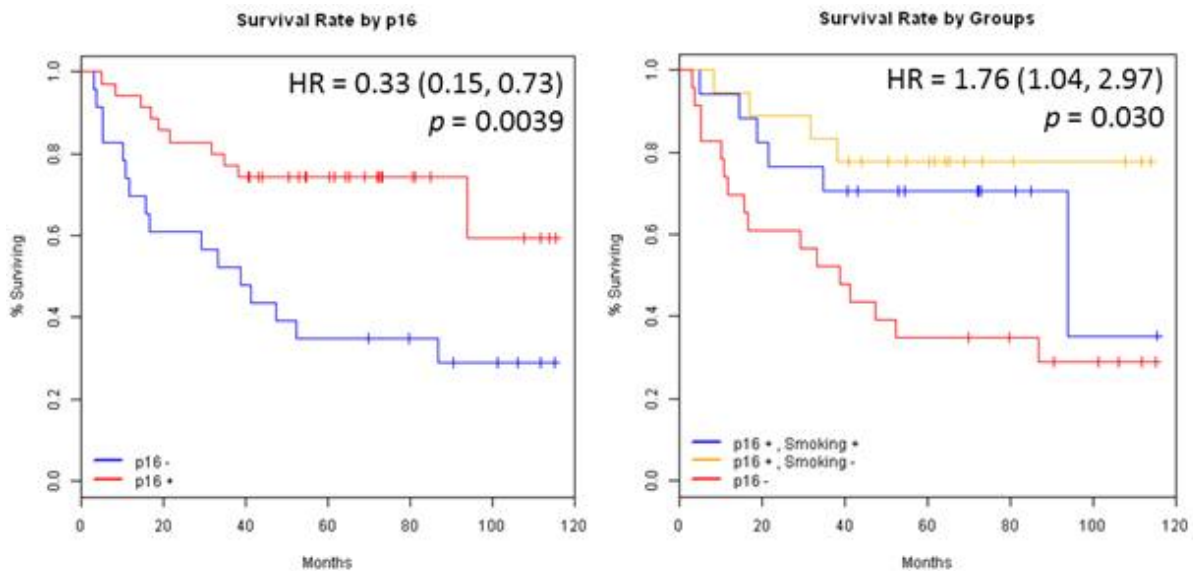


Figure 6. Tumor growth and survival in C57BL/6 mice of CD200 clones and MEER cell after treatment with chemoradiation (3 weekly treatments with radiation)

4. 수술적 치료를 받은 HPV (p16) (+)와 (-) 구인두암 환자 간의 genomic copy number variation의 차이와 예후 인자로서의 의미

-Gene level study인 copy number variation 연구를 심화하여 genomic biomarker, prognosticator로서의 의미를 제반 인자의 expression profile과 결합, 규명하여 potent risk prediction model을 개발하고자 본 연구를 수행하였음.

-수술적 치료를 받은 구인두암 환자의 예후에 가장 강력한 영향을 미치는 인자를 흡연, 여러 demographic background 등을 포함하여 일차 분석 했을 때, 여러 인자 중, HPV-p16 관련 여부가 가장 강력한 예후 인자임을 확인함. 그리고 p16+ 환자군 내부에서도 흡연 여부에 따라 비흡연자가 흡연자보다 좋은 예후를 보였음.



-HPV p16+ 인 환자군과 p16- 인 환자군의 유전자 복제수 변이(CNV, Copy Number Variation) 를 비교한 결과, 전반적인 CNV 수는 HPV p16+에서 더 많을 것이라는 예상과는 달리 양쪽 환자군 간에 유의하지 않았음.

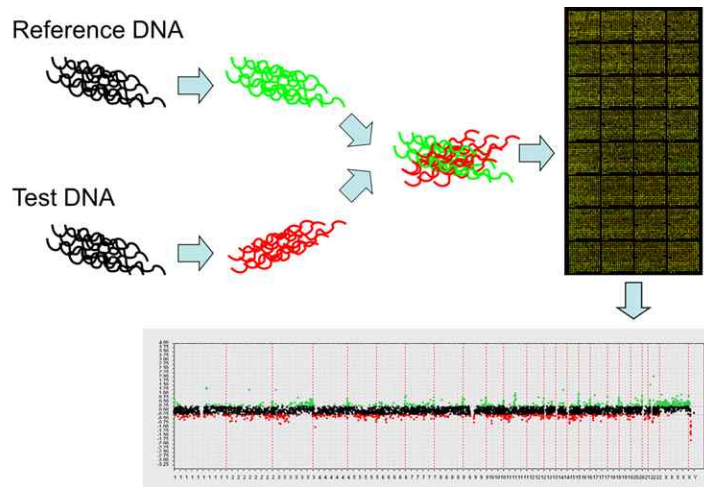


Figure 7. Synopsis of array CGH for the evaluation of genome-wide copy number variation profile.

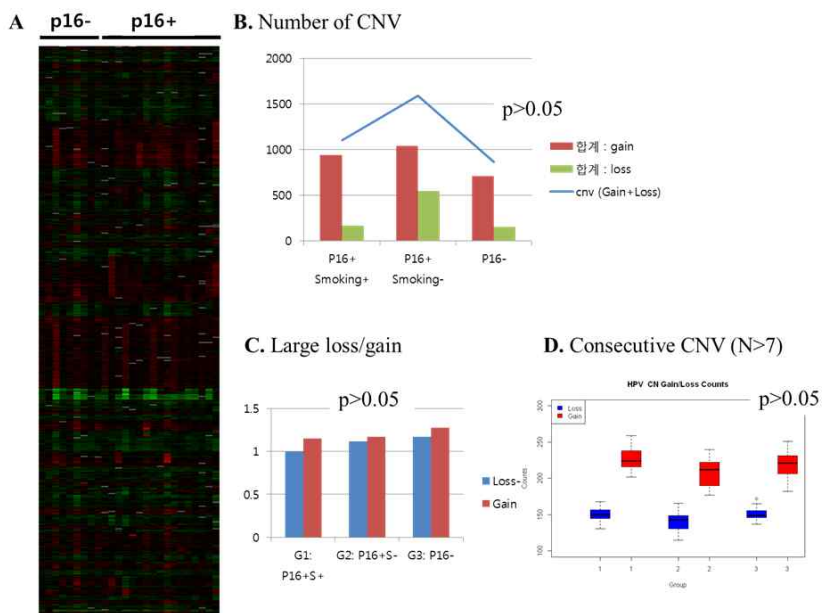


Figure 8. General pattern of CNV between p16- and p16+ oropharyngeal cancers.

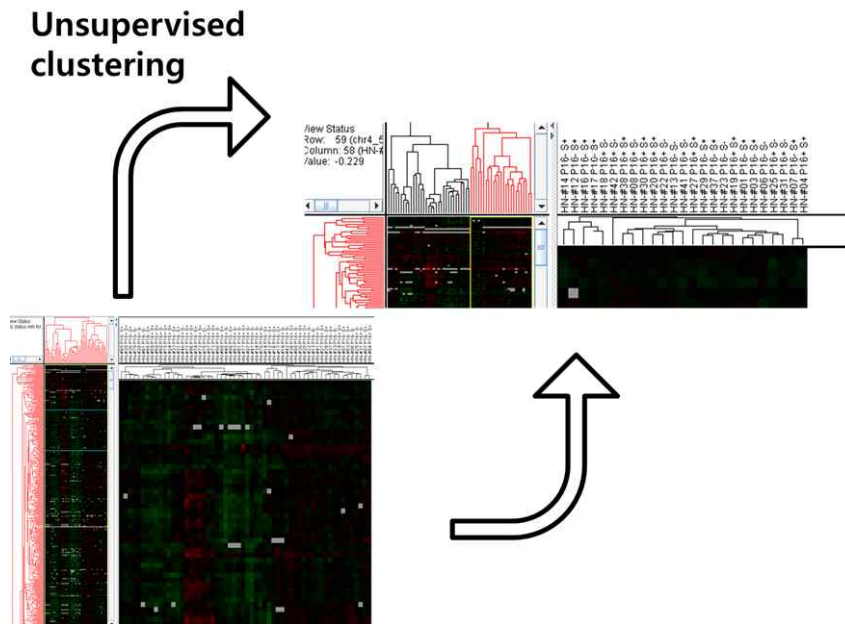


Figure 9. Unsupervised clustering, focusing on the status of p16 expression.

-그러나 복제수 차이가 많이 나는 유전자 순으로 정렬해본 결과, p16⁻ 에서 11q13.3에서 p16⁺ 보다 유전자 수가 더 많은 것을 확인할 수 있었음. 이 지역에 포함된 유전자로는 CCND1, PPFA1, CTTN, SHANK2 등이 있는데, 이들은 HNSCC에서 예후가 좋지 않은 환자군의 marker로 이미 보고된 바 있음. 그러나 p16⁻ 환자군에서 더 많은 유전자 변이 수가 존재한다는 것에 관한 보고는 없었고, 이는 본 연구에서 새롭게 발견한 결과라고 할 수 있음.

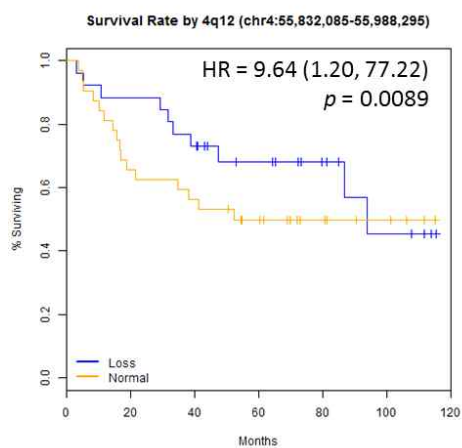
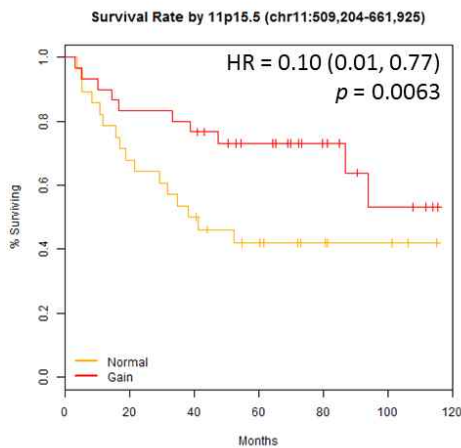
-7p11.2에 위치하는 EGFR 역시 p16⁻ 에서만 copy 수가 더 많은 경향을 보였음. CCND1이 코딩하는 Cyclin D1의 경우, p53가 작동하지 않는 경우 무한으로 자가복제를 하는 세포들에서 더 많이 발현되는 것이 보고된 바 있음. EGFR의 증폭 역시 세포 분열 주기를 가속화 하는 데에 영향을 미치는데, p16⁻ 환자들에게서만 EGFR의 증폭이 나타났고, p16⁺ 환자군에서는 IHC로 검출했을 때 한 명도 EGFR이 검출되지 않았음.

-반면, 3q26.3에 위치하는 CNTN4의 경우 염색체 삭제 현상을 발견할 수 있었는데, 특이하게 p16⁻ 환자군에서만 이러한 양상을 보였음. 이는 HNSCC에서 염색체 보수에 관련된 p53의 변이와 3p 삭제가 동반될 때가 p53 변이만 있을 때 보다 생존율이 좋지 않기로 (1.9년 vs. >5년) 보고되어 있었는데, 이와 관련이 있는 것으로 생각됨.

-표. HPV p16^{+/-} 의 유전자 복제수 변이의 차이에 따른 패턴. +와 - 는 각각 복제수 증가와 감소를 나타냄.

Cytoband	Genome	Position	p-value	Amplification		Gene
				p16-	p16+	
11q13.3	chr11:69676758-69821680		0.001	++		CCND1, ORAOV1
	chr11:69270767-69348669		0.023	++	+	
	chr11:69409452-69486388		0.047	+++	+	
	chr11:70210728-70323500		0.008	++		
7p11.2	chr7:55034549-55134541		0.013	+		EGFR
22q11.21	chr22:18778480-18853217		0.003		-	GGT3P
20p12.2	chr20:10459148-10554536		0.005	+		C20orf94
5p15.33	chr5:666822-845125		0.003	+		TPPP, ZDHHC11B, ZDHHC11
17q21.33	chr17:48306415-48393952		0.028	+		TMEM92
3p26.3	chr3:2683471-2795777		0.001	-		CNTN4
	chr3:2208810-2350009		0.001	-		
	chr3:2380920-2507360		0.010	-		
	chr3:64027-175431		0.014	-		
3p12.2	chr3:80191288-80303942		0.004	-		
3p26.2	chr3:3302261-3421487		0.033	-		

-또한, p16+ 환자군의 생존율에 긍정적인 영향을 미치는 CNV가 있는지를 살펴보았음. 그 결과, HRAS가 위치하는 11p15.5의 복제수가 증가할수록(HR 0.01, CI 0.01-0.77, p=0.006), 그리고 반대로 4q12의 KDR이 감소할수록 (HR 9.64, CI 1.20-77.22, p=0.009) 생존율에 유리하다는 결과를 얻을 수 있었음.



-즉, 구인두암 내에서도 HPV-p16 관련 여부와 Gene level study인 copy number variation 의 패턴은 의미 있는 바이오마커, 예후 인자가 될 수 있음을 본원에서 치료받은 환자에 대한 분석을 통해 확인할 수 있었음. 이는 향후 potent risk prediction model의 근간이 될 것으로 결론지음.

-이상의 데이터는 Ann Surg Oncol (IF 3.943) 에 투고 준비 중임.

3. 연구결과 고찰 및 결론

1. 수술 (경구강측인두 절제술, transoral lateral oropharyngectomy, TLO)을 초치료로 받은 구인두암 환자의 예후인자에 대한 분석에서는 HPV 관련 세포 주기 관련 마커가 HPV 단독보다도 수술적 치료 후의 예후를 효과적으로 예측할 수 있는 risk-grading marker라고 결론을 내림. 이는 향후 이러한 치료 시 더 정확한 guide가 될 수 있는 molecular grading marker라고 생각하였음. 비수술적 치료, 특히 항암방사선치료에도 비슷한 결과를 기대할 수 있을 것으로 추론함.

수술 후 HPV 관련 세포 주기 마커의 임상적 유용성에 대한 보고는 전세계적으로 거의 없는 상황이고, 우리나라에도 선행 연구가 없었음. 향후, 대규모그룹의 한국인을 대상으로 한 전향 연구에서 이러한 molecular grading system과 관련 마커의 치료적 의미나 이를 이용한 de-escalation strategy시의 중요한 guide가 될 수 있는 가능성이 있어서 앞으로 대규모 연구를 계획할 예정임.

2. 한국에서 HPV 관련 두경부암을 포함한 두경부암의 추이에 대한 역학적인 분석: 선행 연구에서는 우리나라에서 최초로 우리나라도 미국-유럽국가의 사례와 비슷하게 다른 문화적, 지리적 배경임에도 불구하고, HPV관련 두경부암이 증가하고 있다는 점을 간접적으로 확인하여 보고한 자료라는 의미가 있음. 이는 국내의 총체적인 두경부암 역학을 규명한 최초 보고여서 이후 후속연구에 중요한 참고문헌이 될 것이며, 이에 대한 관련 연구 및 사회적 관심이 향후 필요할 것임을 시사하고 있음. 비록 연구의 결과는 실제 HPV 관련성에 대한 분자생물학적 연구를 분석한 것은 아니고, site-specific assumption에서 출발한 분석이라는 한계가 있지만, 향후 HPV 관련 두경부암의 실태에 대한 대기관, large-scale data와 검체에 대한 직접 분석의 필요성을 제기하는 결과라고 판단됨.

3. 두경부암에서 CD200의 cancer stem cell feature와의 관련성과 항암방사선치료에 대한 저항성과의 관련성에 대한 연구에서는 HPV 관련, 비관련 두경부암에서 향후 예후를 보다 정확하게 예측, 맞춤치료 전략을 결정할 수 있는 분자생물학적 바이오마커 시스템을 개발하고자 하는 시도로, 주로 myeloid system의 조절에 관련된 immune checkpoint surface protein인 CD200의 의미에 대해 연구하였고, CD200은 두경부암 세포에서 다양하게 발현한다는 점, 그리고 항암방사선치료에 대한 저항성을 증가시킨다는 점을 확인하고, 잠재적인 치료 타겟의 가능성도 있을 것으로 해석함.

이러한 마커의 임상적인 진단 기법을 개발하고 환자에게 적용하여 더 정확한 예후 예측 마커로서 활용될 수 있을 가능성도 있으니, 이에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 결론을 지음.

4. 수술적 치료를 받은 HPV (p16) (+)와 (-) 구인두암 환자 간의 genomic copy number variation의 차이와 예후 인자로서의 의미에서는 구인두암 내에서도 HPV-p16 관련 여부와 Gene level study인 copy number variation 의 패턴은 의미 있는 바이오마커, 예후 인자가 될 수 있음을 본원에서 치료받은 환자에 대한 분석을 통해 확인할 수 있었음. 이는 향후 potent risk prediction model의 근간이 될 것으로 결론지음.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(IF.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Human papillomavirus-related cell cycle markers can predict survival outcomes following a transoral lateral oropharyngectomy for tonsillar squamous cell carcinoma.	Shin A, Jung YS , Jung KW, Kim K, Ryu J, Won YJ. (교신)	J Surg Oncol. (2.843)	2014 Jun 5. doi: 10.1002/jso.23672.	국외 SCI	NCC1210220
Trends of human papillomavirus-related head and neck cancers in Korea: National Cancer Registry data.	Shin A, Jung YS , Jung KW, Kim K, Ryu J, Won YJ. (교신)	Laryngoscope (1.979)	2013 Nov;123(11):E30-7. doi: 10.1002/lary.24243.	국외 SCI	NCC1210220
CD200: Association with cancer stem cell features and response to chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma.	Jung YS , Vermeer PD, Vermeer DW, Lee SJ, Goh AR, Ahn HJ, Lee JH.(제1)	Head Neck (3.006)	2014 Jan 13. doi: 10.1002/head.23608.	국외 SCI	NCC1210220
Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate.	Miskimins WK, Ahn HJ, Kim JY, Ryu S, Jung YS , Choi JY. (공동)	PLoS One (3.534)	2014 Jan 21;9(1):e85576. doi: 10.1371/journal.pone.0085576.	국외 SCIE	없음
HPV+ cancer cell lactate production attenuates immune response during treatment: lactate production inhibition leads to improved long-term cures	Zhuang C, Vermeer D, Jung YS , Haugrud A, Lee JH, Miskimins K (공동)	Infectious Agents and Cancer	2012 7(Suppl 1) 35-35	국외 SCI	없음

Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer: Several Questions	Jung YS (교신+제1)	Korean J Otolaryngol	2014 57(3) 143-150	국내	NCC1210220
HPV in head and neck cancer: Diagnosis	정유석(교신, 제1)	J Clinical Otolaryngol	2012;23:17-26	국내	없음

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
Human papillomavirus-related cell cycle markers can predict survival outcomes following a transoral lateral oropharyngectomy for tonsillar squamous cell carcinoma.	Shin A, Jung YS , Jung KW, Kim K, Ryu J, Won YJ.	대한이비인후과학회 학술대회	국내	NCC1210220
Trends of human papillomavirus-related head and neck cancers in Korea: National Cancer Registry data.	Shin A, Jung YS , Jung KW, Kim K, Ryu J, Won YJ.	대한이비인후과학회 학술대회	국내	NCC1210220
CD200: Association with cancer stem cell features and response to chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma.	Jung YS , Vermeer PD, Vermeer DW, Lee SJ, Goh AR, Ahn HJ, Lee JH.	8 th International Conference on Head and Neck Cancer	국외	NCC1210220
Genomic copy number variations characterize prognosis of oropharyngeal carcinoma, including p16 positive subset, after surgery-based treatment	Arang Rhie MS ¹ , Jong-II Kim, MD, PhD ¹ , MoonK yung Choi, MS ² , ChangHwan Ryu, MD ³ , Junsun Ryu, MD, PhD ³ , Weon Seo Park, MD, PhD ² , Yuh-S. Jung, MD, PhD ³	대한이비인후과학회 학술대회	국내	NCC1210220
Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer: Situations in Korea	Jung YS ,	대한이비인후과학회 학술대회	국내	NCC1210220
CD200: Association with cancer stem cell features and response to chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma.	Jung YS , Vermeer PD, Vermeer DW, Lee SJ, Goh AR, Ahn HJ, Lee JH.	대한이비인후과학회 학술대회	국내	NCC1210220
Genomic copy number variations characterize prognosis of oropharyngeal carcinoma, including p16 positive subset, after surgery-based treatment	Arang Rhie MS ¹ , Jong-II Kim, MD, PhD ¹ , MoonK yung Choi, MS ² , ChangHwan Ryu, MD ³ , Junsun Ryu, MD, PhD ³ , Weon Seo Park, MD, PhD ² , Yuh-S. Jung, MD, PhD ³	International Federation on Head and Neck Oncologic Societies	국외	NCC1210220

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)	
			연차	최종
-두경부 편평상피세포암(두경부암)의 새로운 발암원인으로 밝혀진 인간유두종바이러스(HPV) 관련 두경부암과 HPV 비관련 두경부암에서 향후 예후를 보다 정확하게 예측, 맞춤치료 전략을 결정할 수 있는 분자생물학적 바이오마커 시스템을 개발함. -국내 우수 기관과 다기관연구를 통하여 대규모 한국인 연구군에서 HPV관련	기존 construct한 253명의 tissue microarray에 2009년 이후 초치료받은 두경부암 환자 119명을 추가하고, 임상 DB를 확충, 본원에서 Archive library를 확대함 (319명 목표).	320명의 clinicopathologic archival library를 구축하여, 향후 연구에 이용할 수 있는 기반을 만들었음.	80	95
	국내 우수 기관과의 다기관 연구를 조직하고, 대상 환자 조직에 대한 PCR, p16을 조사하여 HPV 관련 현황에 대한 다기관 자료를 얻기 시작함.	다기관연구를 시행할 기반 데이터 구축을 위해, 한국의 HPV관련 및 비관련 두경부암의 최근 10년간 발생양상의 변화에 대한 분석을 완료하고 보고하였음 (published). 이를 토대로 여러 기관과 향후 연구의 방법론을 논의 중임.		
	구성된 TMA를 이용, 면역조직화학검사를 통해 Bmi-1, Shh, Gli-1,2, HIF-1a, PDK-1, LDHa의 발현을 확인, 이 expression profile과 HPV 연관성 등을 결합하여 임상정보와의 연관 모델을 고안함 (일차년도 100명).	상기 인자의 발현 데이터를 기 구축된 TMA library에서 얻고, 데이터 구축을 완료함. 현재 분석중. 관련 분석으로 세포막 단백질 CD200이 두경부암의 novel prognostic and therapeutic target이 될 수 있음을 밝혔고, 이를 보고하였음 (published).		

<p>두경부암 현황에 대한 공신력 있는 데이터를 취득함. 개개 기관의 데이터에만 머물러 왔던 HPV관련 연구에 대한 일관된 대규모 자료와 임상적 의미를 규명함.</p> <p>-gene level study인 copy number variation 연구를 심화하여 genomic biomarker, prognosticator로서의 의미를 제반 인자의 expression profile과 결합, 규명하여 potent risk prediction model을 개발함.</p>		Copy number variation pattern을 규명하기 위한 array CGH를 HPV+ 및 HPV- 두경부암에 대해서 추가 시행하고, HPV 관련성에 따른 CNV 차이를 분석함 (각 40여명의 환자군 완성).	HPV+ vs. HPV- 비교군에 대한 CNV data acquisition 후 manuscript submission 중임.		
	2차년도	다기관연구 방향을 확립. 기관별 수술 검체에 대한 HPV 관련 검사기법 결정 후 시행. 아울러 normal population에서 HPV oral persistent infection 여부를 검진할 수 있는 방법을 결정.	기관별 paraffin-embedded tissue의 HPV test method 논의, 정립. 아울러 normal population에서 oral HPV testing 기법 표준화 및 이를 이용한 정상인에서의 pilot study		
		구성된 TMA를 이용, 면역조직화학검사를 통해 여러 관련 마커의 발현을 확인, 이 expression profile과 HPV 연관성 등을 결합하여 임상 정보와의 연관 모델 고안 과정을 심화함. (이차년도 100명).	ArchiveTMA의 확충, Biomarker에 대한 IHC, CNV study, 상관관계 분석 및 예측 모델의 설명력 심화.	85	95
		HPV+와 HPV- 검체에서 CNV 등의 genomic marker 분석 및 보고.	CNV, sequencing 등의 분석을 통해 HPV-related head and neck carcinogenesis의 model을 정립하기 위한 지식 축적하고 manuscript submission 중임. .		
	3차년도	구성된 TMA를 이용, 면역조직화학검사를 4년 이상 임상 관찰을 한 환자 320명 전체에 대하여 10여 개의 항체를 추가하여 총 30여 개의 항체에 대한 자료를 완성, 분석하여 보고함.	ArchiveTMA의 확충, Biomarker에 대한 IHC, CNV study, 상관관계 분석 및 예측 모델의 설명력 심화. 현재 분석 중임.	85	85
		다기관연구 방향을 확립. 기관별 수술 검체에 대한 HPV 관련 검사기법 결정 후 시행. 아울러 normal population에서 HPV oral persistent infection 여부를 검진할 수 있는 방법을 확립.	HPV 관련 암종과 비관련 암종에서의 이차암 발생 양상 및 HPV 관련성 및 예후에 대한 다기관 연구 자료를 분석하고 이를 분석 중임.		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
기관별 paraffin-embedded tissue의 HPV test method 논의, 정립. 아울러 normal population에서 oral HPV testing 기법 표준화 및 이를 이용한 정상인에서의 pilot study	HPV 관련 암종과 비관련 암종에서의 이차암 발생 양상 및 HPV 관련성 및 예후에 대한 다기관 연구를 launching하여 data collection을 마침. 이에 대한 분석 및 보고 중.
ArchiveTMA의 확충, Biomarker에 대한 IHC, CNV study, 상관관계 분석 및 예측	250여 명의 4년 이상 추적관찰된 두경부암 환자에 대해 14 종류의 항체에 대한 IHC를 시행하고, 판독

모델의 설명력 심화.	을 종결하고 분석함. 일부 분석 결과에 대해 2편의 SCI publish를 하였고, 향후 추가 분석 및 보고 (2편 예정) 계획.
CNV, sequencing 등의 분석을 통해 HPV-related head and neck carcinogenesis의 model을 정립하기	HPV+, HPV- 편도암에 대한 CNV 분석을 끝냄. manuscript submission 과정에 있음.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2건	-Genomic copy number variations characterize prognosis of oropharyngeal carcinoma, including p16 positive subset, after surgery-based treatment: Ann Surg Oncol (IF 3.943) -Profiles of immunohistochemical markers on HPV+ oropharyngeal carcinoma and its prognostic implications Head Neck (IF 3.006)
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

-두경부 편평상피세포암(두경부암)의 새로운 발암원인으로 밝혀진 HPV 관련 및 비관련 두경부암의 향후 예후를 보다 정확하게 예측, 맞춤치료 전략을 결정할 수 있는 related marker인 cell cycle regulator, immune checkpoint marker의 임상적 의미를 두경부암에서 최초 보고함.

- 수술 후 HPV 관련 세포 주기 마커의 임상적 유용성에 대한 보고는 전세계적으로 거의 없는 상황이고, 우리나라에도 선행 연구가 없었음. 향후, 대규모그룹의 한국인을 대상으로 한 전향 연구에서 이러한 molecular grading system과 관련 마커의 치료적 의미나 이를 이용한 de-escalation strategy시의 중요한 guide가 될 수 있는 가능성이 있어서 앞으로 대규모 연구를 계획할 예정임.

-정확한 예후 예측에 기반한 환자별 맞춤 치료 전략을 수립하는데 기초 지식을 제공할 것으로 기대되고, 이에 대한 large scale data 분석이 될 예정임.

-또한, HPV+ 두경부암 현황에 대한 중앙암등록 자료를 이용하여, 역학적 양상을 국내

최초로 보고하였는데 이는 인용할 수 있는 최초의 공신력 있는 데이터라는 의미가 있음.

-이 결과는 향후, 전세계적으로 증가하고 있는 HPV+ 두경부암의 국내에서의 현황 및 임상적 의미를 파악하기 위한 다기관연구를 지속적으로 진행하고, 결과를 내는데 기반이 될 것임.

-향후 HPV 관련 두경부암의 실태에 대한 다기관, large-scale data와 검체에 대한 직접 분석의 필요하고, 이를 후속과제를 통해 지속적으로 시행해 나갈 것임.

-본 과제에서 검증된 CD200은 두경부암 세포에서 다양하게 발현한다는 점, 그리고 항암 방사선치료에 대한 저항성을 증가시킨다는 점을 확인하고, 잠재적인 치료 타겟의 가능성도 있을 것으로 해석함. CD200과 관련된 임상적인 진단 기법을 개발하고 환자에게 적용하여 더 정확한 예후 예측 마커로서 활용될 수 있을 가능성도 있으니, 이에 대한 추후 연구를 진행할 예정임.

- 본 과제를 통하여 구인두암 내에서도 HPV-p16 관련 여부와 Gene level study인 copy number variation 의 패턴은 의미 있는 바이오마커, 예후 인자가 될 수 있음을 본원에서 치료받은 환자에 대한 분석을 통해 확인할 수 있었음. publishable data를 얻었으나, 이는 선행연구로서 여러 분석상의 한계도 존재함.

-보다 대규모, 다기관 샘플을 대상으로 본 과제에서의 CNV 결과를 공고히 확인할 필요성이 있는 상황임.

-또한, next-generation genome sequencing 기법을 이용한 분석에서 한국인의 HPV+ 두경부암은 어떤 패턴을 보이고, 임상적 의미가 있는 마커를 찾아낼 수 있을지에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있는 상황임. 이는 다음 후속연구를 통해 진행하는 것이 필요함.

6. 참고문헌

1. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, et al.: Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high risk squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2004;350:1937 - 1944.
2. Bernier J, Dommenege C, Ozsahin M, et al.: Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1945 - 1952.
3. Lim YC, Lee SY, Lim J Y, et al.: Management of contralateral N0 neck in tonsillar squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2005;115:1672 - 1675.
4. O'Sullivan B, Warde P, Grice B, et al.: The benefits and pitfalls of ipsilateral radiotherapy in carcinoma of the tonsillar region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:332 - 343.
5. Holsinger FC, McWhorter AJ, et al.: Transoral lateral oropharyngectomy for squamous cell carcinoma of the tonsillar region: I. Technique, complications, and functional results. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131:583 - 591.
6. Laccourreye O, Hans S, et al.: Transoral lateral oropharyngectomy for squamous cell carcinoma of the tonsillar region: II. An analysis of the incidence, related variables, and consequences of local recurrence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131:592 - 599.
7. Park WS, Ryu J, Cho KH, et al.: Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas in Korea: Use of G1 cycle markers as new prognosticators. *Head Neck* 2012;34:1408 - 1417.
8. El Naggar AK, Westra WH: p16 expression as a surrogate marker for HPV related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck* 2012;34:459 - 461.
9. Holzinger D, Schmitt M, Dyckhoff G, et al.: Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. *Cancer Res* 2012;72:4993 - 5003.
10. Holzinger D, Flechtenmacher C, Henfling N, et al.: Identification of oropharyngeal squamous cell carcinomas with active HPV16 involvement by immunohistochemical analysis of the retinoblastoma protein pathway. *Int J Cancer* 2013;133:1389 - 1399.
11. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E JM, et al.: A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 2007;121:2465 - 2472.
12. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al.: Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus - associated oropharyngeal cancers with favorable

- prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24: 736 - 747.
13. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, et al.: Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16 associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer* 2008;122:2656 - 2664.
 14. Johnson-Obaseki S, McDonald JT, Corsten M, Rourke R. Head and neck cancer in Canada: trends 1992 to 2007. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;147:74 - 78.
 15. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772 - 1783.
 16. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:449 - 455.
 17. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1626 - 1636.
 18. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006;24:2606 - 2611.
 19. Ang KK, Chen A, Curran WJ Jr, et al. Head and neck carcinoma in the United States: first comprehensive report of the Longitudinal Oncology Registry of Head and Neck Carcinoma (LORHAN). *Cancer* 2012;118:5783 - 5792. doi: 10.1002:/cncr.27609. Epub 2012.
 20. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944 - 1956.
 21. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, et al. Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *Laryngoscope* 2007;117:2115 - 2128.
 22. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 2007;110:1429 - 1435.
 23. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011;29:4294 - 4301.
 24. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 2008;26:612 - 619.
 25. Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist* 2010;15: 994 - 1001.

26. Shin HR, Won YJ, Jung KW, et al. Nationwide cancer incidence in Korea, 1999 - 2001; first result using the national cancer incidence database. *Cancer Res Treat* 2005;37:325 - 331.
27. Ryerson AB, Peters ES, Coughlin SS, et al. Burden of potentially human papillomavirus-associated cancers of the oropharynx and oral cavity in the US, 1998 - 2003. *Cancer* 2008; 113:2901 - 2909.
28. Shibuya K, Mathers CD, Boschi - Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2002;2:37.
29. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a metaanalysis (1988 - 2007). *Ann Oncol* 2008;19:1681 - 1690.
30. N€asman A, Attner P, Hammarstedt L, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 2009;125:362 - 366.
31. Licitra L, Perrone F, Bossi P, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:5630 - 5636.
32. Kawasaki BT, Farrar WL. Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion. *Trends Immunol* 2008;29:464 - 468.
33. Barclay AN, Clark MJ, McCaughan GW. Neuronal/lymphoid membrane glycoprotein MRC OX-2 is a member of the immunoglobulin superfamily with a light-chain-like structure. *Biochem Soc Symp* 1986;51:149 - 157.
34. Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN. The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology* 2001;102:173 - 179.
35. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, et al. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 2000;290:1768 - 1771.
36. Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP, Phillips JH, Sedgwick JD. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J Immunol* 2006;176:191 - 199.
37. Gorczynski RM. CD200 and its receptors as targets for immunoregulation. *Curr Opin Investig Drugs* 2005;6:483 - 488.
38. Gorczynski L, Chen Z, Hu J, et al. Evidence that an OX-2-positive cell can inhibit the stimulation of type 1 cytokine production by bone marrow-derived B7-1 (and B7-2)-positive dendritic cells. *J Immunol* 1999;162:774 - 781.
39. Gorczynski RM, Cohen Z, Fu XM, Lei J. Anti-rat OX-2 blocks increased small intestinal transplant survival after portal vein immunization. *Transplant Proc*

1999;31:577 - 578.

40. Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B. CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:117 - 122.
41. Tonks A, Hills R, White P, et al. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2007;21:566 - 568.
42. Moreaux J, Hose D, Reme T, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2006;108:4194 - 4197.
43. Kawasaki BT, Mistree T, Hurt EM, Kalathur M, Farrar WL. Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364:778 - 782.

Human Papillomavirus-Related Cell Cycle Markers can Predict Survival Outcomes Following a Transoral Lateral Oropharyngectomy for Tonsillar Squamous Cell Carcinoma

CHANG HWAN RYU, MD,¹ JUNSUN RYU, MD, PhD,¹ KWAN HO CHO, MD, PhD,²
SUNG HO MOON, MD, PhD,² TAK YUN, MD, PhD,³ SANG-HYUN LEE, MD, PhD,⁴ MOON KYUNG CHOI, MS,⁵
WEON SEO PARK, MD, PhD,^{5*} AND YUH-S. JUNG, MD, PhD^{1**}

¹Specific Organs Cancer Branch, Department of Otolaryngology, Center for Thyroid Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Korea

²Center for Proton Therapy, Center for Specific Organs Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Korea

³Hematologic Oncology Clinic, Center for Specific Organs Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Korea

⁴Department of Radiology, Center for Specific Organs Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Korea

⁵Hematologic Malignancy Branch, Department of Pathology, Center for Specific Organs Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Korea

Objectives: To identify the prognostic implications of human papillomavirus (HPV)-related cell cycle marker profiles in patients who have received a transoral lateral oropharyngectomy (TLO) as a primary treatment for tonsillar squamous cell carcinoma (TSCC).

Patients and Methods: Immunohistochemical profiles of HPV-related cell cycle markers, including p16, pRb, cyclin D1, p53, and the HPV DNA status of 42 consecutive TSCC patients who underwent TLO-based treatments were analyzed. The prognostic value of each marker was evaluated.

Results: Univariate analysis indicated that high p16, low pRb, and low p53 expression levels are significantly associated with a good disease-free and overall survival outcome. Clinicopathological parameters and the HPV DNA status did not show prognostic significance. When adjusted for age, overall stage and treatment strategy, a high p16 and low pRb level remained an effective prognostic marker for good survival outcomes. A high p16/low pRb combination showed superior survival prediction ability over high p16 or low pRb alone.

Conclusion: HPV-related cell cycle markers may also be good indicators for predicting survival after TLO for TSCC. The de-escalation TLO surgery approach would be more effective if performed under the stringent guidance of these markers.

J. Surg. Oncol. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: tonsil; squamous cell carcinoma; human papillomavirus; p16; pRb; survival

INTRODUCTION

Over the past decades, the treatments for head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) have gradually advanced and can better enhance the functionality and quality of life, as well as survival. Generally, early stage HNSCCs are treated with a single modality, surgery, or radiation, whereas advanced cancers are treated with combined modalities, such as chemoradiotherapy (CRTx) or surgery followed by postoperative radiation with or without cisplatin-based chemotherapy [1,2]. However, more aggressive treatments inevitably cause more severe treatment-related toxicities and thus worsen the quality of life. In particular, tonsillar squamous cell carcinomas (TSCCs) usually present with cervical lymphatic metastases at the time of diagnosis, and thus have been traditionally treated with these potentially morbid combination modalities [3,4].

Intriguingly, the past 15 years has seen dramatic changes in the global trends for HNSCCs in terms of incidence, etiology, and demographic patterns. Human papillomavirus (HPV) has been recently found to cause an epidemiologically and clinically distinct form of HNSCC that arises from the oropharynx, especially the tonsillar fossa. HPV positive (+) HNSCC is increasing in incidence in the US-European region and in Asian countries, including Korea, whereas its HPV negative (−) counterpart is decreasing in frequency or has remained stationary, usually reflecting the changing patterns of smoking [5–7]. HPV (+)

HNSCCs are molecularly distinct, and respond better to contemporary treatments than their HPV (−) counterparts [5,6]. Based on this phenomenon, “de-escalation” strategies have been considered HPV (+) HNSCCs in the main. The aim of de-escalation is to minimize the morbidity outcomes of traditional combination CRTx [7]. Transoral

Grant sponsor: National Cancer Center Grant, Korea; Grant number: NCC-1210230.

The authors have no conflicts of interest to declare.

* Correspondence to: Weon Seo Park, MD, PhD, Hematologic Malignancy Branch, Department of Pathology, Center for Specific Organs Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang, Gyeonggi 410-769, Korea. Fax: +82-31-920-1275. E-mail: thynus@ncc.re.kr

**Correspondence to: Yuh-S. Jung, MD, PhD, Specific Organs Cancer Branch, Department of Otolaryngology, Center for Thyroid Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang, Gyeonggi 410-769, Korea. Fax: +82-31-920-1275. E-mail: jysori@ncc.re.kr

Received 17 January 2014; Accepted 13 May 2014

DOI 10.1002/jsr.23672

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Trends of Human Papillomavirus-Related Head and Neck Cancers in Korea: National Cancer Registry Data

Aesun Shin, MD, PhD; Yuh-S. Jung, MD, PhD; Kyu-Won Jung, MS; Kyeezu Kim, MPH;
Junsun Ryu, MD, PhD; Young-Joo Won, PhD

Objectives/Hypothesis: The incidence of human papillomavirus (HPV)-positive head and neck cancers (HNCs) is increasing sharply worldwide, while their HPV-negative counterparts are showing a decreased frequency. However, epidemiologic data related to these changes are sparse in Korea, which is rapidly adopting more westernized lifestyles.

Study Design: Data from the Korea Central Cancer Registry, a nationwide population-based cancer registry, from 1999 to 2009 were retrieved.

Methods: Age-standardized rates (ASRs), their annual percent changes (APC) and male-to-female incidence rate ratios (IRRs) were analyzed and compared between HPV-related and HPV-unrelated primary sites.

Results: HPV-related sites (oropharynx) had increased significantly over the period 1999 to 2009 (APC = 2.35%, $P = 0.017$), particularly in young men (30–59 years, APC = 2.65%, $P = 0.031$), whereas HPV-unrelated sites such as larynx and hypopharynx decreased markedly in both sexes. Interestingly, tongue cancer was found to have increased gradually (APC = 2.35%, $P = 0.003$) in both sexes. The male-to-female IRRs and the median age of occurrence remained stable.

Conclusions: Although the cultural and ethnic background differs from the United States, cancers of HPV-related sites are increasing in Korea, whereas cancers of HPV-unrelated sites are decreasing, which is similar to the trends observed in the United States. Greater public awareness in Korea of HPV-related HNCs is therefore warranted.

Key Words: Head and neck neoplasms, human papillomavirus, smoking, Korea, cancer registry, incidence, oropharyngeal neoplasms, oral cancer

Level of Evidence: 2b

Laryngoscope, 123:E30–E37, 2013

INTRODUCTION

The past 15 years has seen changes in the global trends for head and neck cancers (HNCs) in terms of incidence, etiologic, and demographic patterns.¹ Although heavy smoking and alcohol consumption has been classically regarded as the major etiological factors in this disease, human papillomavirus (HPV) has been recently found to cause an epidemiologically and

clinically distinct form of HNC that arises most often from the oropharynx, including the tonsillar fossa.^{2–5} HPV positive (+) cancers have significantly better survival outcomes and responses to contemporary chemoradiation and surgical interventions than HPV negative (–) counterparts.^{6,7} The route of transmission for HPV+ lesions is still under debate, however, although it has been suggested that oropharyngeal HPV infection is mainly acquired sexually,^{8,9} and therefore may be affected by lifestyle and cultural background.

The epidemiologic patterns of HNCs are intriguing as they have contrasting etiologies, classical heavy smoking and now newly emerging HPV+ cancers. In the United States, for example, whereas the past two decades have demonstrated a decrease in tobacco-related HNCs by 20%, concomitant with a lower level of tobacco use, oropharyngeal squamous cell carcinomas (OPSCCs) have increased by 11% in this same period, and this is mostly associated with HPV.¹⁰ Further, data from developed Western countries, including U.S. and European countries, shows that the proportion of HPV+ OPSCCs has steadily increased 60% to 85%.^{9,11} This contrasts with the declining incidence of smoking-related subsets of HNC-like laryngeal cancers that parallels a decrease in tobacco use due to public health efforts in many countries.^{1,12} This striking increase has made HPV+ OPSCC in men eventually exceed uterine cervical cancer in the United States by year 2010, to become the heavier burden to public health.¹³

From the Molecular Epidemiology Branch, Division of Cancer Epidemiology and Prevention (A.S., K.K.); the Cancer Registration and Statistics Branch, Division of Cancer Registration and Surveillance (A.S., K.W.J., Y.J.W.); and the Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Head & Neck Oncology Clinic, Center for Thyroid Cancer (Y.S.J., J.R.), Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Republic of South Korea

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication May 18, 2013.

This work was supported by National Cancer Center Grants, Republic of South Korea (NCC-1210220-1, 1010160). The authors have no other funding, financial relationships, or conflicts of interest to disclose.

Contract grant sponsor: National Cancer Center Grants, Korea; contract grant numbers: NCC-1210220-1; 1010160.

Send correspondence to Yuh-S. Jung, MD, PhD, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Head and Neck Oncology Clinic, Center for Thyroid Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, 809, Madul-dong, Ilan-gu, Goyang, Gyeonggi-do, 411-764, Republic of South Korea. E-mail: jyauri@ncc.re.kr

DOI: 10.1002/lary.24243

CD200: Association with cancer stem cell features and response to chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma

Yuh-Seog Jung, MD, PhD,¹ Paola D. Vermeer, PhD,² Daniel W. Vermeer, MS,² Sang-Jin Lee, PhD,³ Ah Ra Goh, MS,³ Hyun-Joo Ahn, MD, PhD,⁴ John H. Lee, MD^{*}

¹Head and Neck Oncology Clinic, Center for Thyroid Cancer, Department of Otolaryngology, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Korea, ²Sanford Cancer Research Center, Sanford ENT – Head and Neck Surgery, University of South Dakota, Sioux Falls, South Dakota, ³Genitourinary Cancer Branch, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Korea, ⁴Department of Anesthesiology, Sungkyunkwan University, Samsung Medical Center, Seoul, Korea.

Accepted 8 January 2014

Published online 00 Month 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/hed.23608

ABSTRACT: *Background.* The purpose of this study was to characterize the expression of CD200, a membrane protein that functions in immune evasion, to examine its correlations with cancer stem cell (CSC)-like features and analyze its response to chemotherapy and radiation in human papillomavirus (HPV)-positive (+) and negative (–) head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs).

Methods. CD200 expression was analyzed in several HNSCC cell lines. CD200 was overexpressed in HPV(+) murine tonsil epithelial cells, its effects on Shh and Bmi-1 were examined in vitro, and tumor growth and response to chemoradiation were analyzed in vitro and in vivo.

Results. CD200 was diversely expressed and consistently associated with expression of Bmi-1 and Shh. Overexpression of CD200 induced Bmi-1 and Shh. Tumors grew similarly between C57BL/6 and Rag1^{−/−} C57BL/6 mice. CD200 expression enhanced the resistance to chemoradiation only in vivo.

Conclusion. CD200 was related to CSC features and modulates response to chemoradiation in vivo. Attenuating this might be a potential therapeutic strategy. © 2014 Wiley Periodicals, Inc. *Head Neck* 00: 000–000, 2014

KEY WORDS: oropharyngeal cancer, human papillomavirus, CD200, immune tolerance, neoplastic stem cells

INTRODUCTION

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the eighth most common cause of cancer death worldwide.¹ This cancer is caused by both human papilloma viral and non-viral changes, each with their own epidemiologic risks. Recent studies indicate that the incidence of human papillomavirus (HPV)-positive (+) HNSCCs is on the rise, increasing 60% to 85% in recent years.^{2,3} HPV(+) HNSCCs respond better to ionizing radiation, with and without the addition of chemotherapy, and are, thus, more curable than their HPV-negative (–) counterparts.⁴ However, treatment failures still occur in this group and the failure rate is increasing because of increased incidence. Twenty percent to 40% of HPV(+) and 40% to 60% of HPV(–) HNSCCs exhibit poor response to treatment and

patients experience disease recurrence. Thus, a greater understanding of the mechanisms driving these disease processes are necessary to provide better treatment options and improve patient outcomes for this expanding disease population.⁴

Cancer stem cells (CSCs) or cells possessing CSC properties may explain some aspects of treatment resistance phenotypes encountered during therapy. Recent evidence indicates intratumoral CSC subsets are preferentially resistant to the effects of both radiation⁵ and chemotherapy.⁶ Moreover, CSCs may aid in immune evasion during immune-related tumor clearance.⁷ It is possible that similar CSC subsets in HPV(+) or HPV(–) HNSCCs may drive poor prognosis and therapeutic response. However, the expression and distribution of this subset of CSCs within HNSCC tumors and their relationship to HPV infection are yet to be fully elucidated.

One marker associated with stem cell properties is CD200. Formerly known as OX-2, CD200 is a highly conserved type I transmembrane glycoprotein with 2 extracellular immunoglobulin superfamily domains, a single transmembrane domain and a short cytoplasmic tail with no defined function.⁸ CD200 is normally expressed by neurons, hair follicle epithelial cells, kidney glomeruli, syncytiotrophoblast, endothelial cells, some T and B lymphocytes, and thymocytes.⁹ CD200 is a ligand that binds to its receptor (CD200R1), which is expressed on cells of the monocyte/macrophage lineage, on T lymphocytes, and

*Corresponding author: J. H. Lee, Sanford Cancer Research Center, Sanford ENT – Head and Neck Surgery, University of South Dakota, 2301 East 60th Street North, Sioux Falls, SD 57104-0589. E-mail: John.Lee@sanfordhealth.org

Contract grant sponsor: This work was supported by NIH/NIHCR Grant (7R01DE018386-03 to Dr. Lee) and by National Cancer Center Grant, Korea (NCC-1210220, 1310381 to Dr. Jung).

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

This work was presented at the 8th International Conference on Head and Neck Cancer, Toronto, Ontario, Canada, July 23, 2012.

Genomic copy number variations characterize prognosis of oropharyngeal carcinoma, including p16 positive subset, after surgery-based treatment

Arang Rhee MS¹, Jong-Il Kim, MD, PhD¹, Moon Kyung Choi, MS², Chang Hwan Ryu, MD²,
Junsun Ryu, MD, PhD², Weon Seo Park, MD, PhD², Yuh-S. Jung, MD, PhD²

¹Genomic Medicine Institute, Medical Research Center, Seoul National University College of Medicine, 101 Daehang-ro, Jongno-gu, Seoul 110-799, South Korea. ²Hematologic Malignancy Branch, Dept. of Pathology, Center for Specific Organs Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang, Gyeonggi, 410-769 ³Specific Organs Cancer Branch, Dept. of Otolaryngology, Center for Thyroid Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang, Gyeonggi, 410-769, Korea,

Acknowledgements This work was supported by National Cancer Center Grant, Korea (NCC-1210220, to Y.-S. Jung).

Running title: CNV of p16+ and p16- oropharyngeal cancer

Disclosure: The authors have no conflicts of interest to declare.