

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 겉표지 (앞면)

(과제번호: NCC-0910590)

한국의 두경부편평상피세포암에서 인유두종바이러스(HPV) 관련  
실태의 분자역학적 규명

Molecular epidemiologic study on the role of human  
papillomavirus in head and neck cancer in Korean population

과제책임자 : 정 유 석

국 립 암 셴 터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

↑  
5cm  
↓

과  
제  
명

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구  
사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시  
국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야  
합니다.

(14 pont, 고딕체)

국  
립  
암  
셴  
터

↑  
3cm  
↓

↑  
6cm  
↓

# 제 출 문

## 국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “한국의 두경부편평상피세포암에서 인유두종바이러스(HPV) 관련 실태의 분자역학적 규명” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 1. 31

국립암센터

- 과 제 책 임 자 : 정 유 석
- 연 구 원 : 박 원 서
- "      : 류 준 신
- "      : 이 건 국
- "      : 조 관 호
- "      : 윤 탁
- "      : 최 문 경

# 목 차

## < 요약 문 >

- (한글) 한국의 두경부편평상피세포암에서 인유두종바이러스(HPV) 관련 실태의 분자역학적 규명
- (영문) Molecular epidemiologic study on the role of human papillomavirus in head and neck cancer in Korean population

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

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함  
 (I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

편집순서 4 : 요약문 (한글)

< 요약 문 >

연구분야(코드)				과제번호	NCC-0910590	
과제명	한국의 두경부편평상피세포암에서 인유두종바이러스(HPV) 관련 실태의 분자역학적 규명					
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년	3월 ~	2011년	12월	168,000
	1차년도	2009년	3월 ~	2009년	12월	60,000
	2차년도	2010년	1월 ~	2010년	12월	54,000
	3차년도	2011년	1월 ~	2011년	12월	54,000
과제책임자	성명	정유석	소속	특수암센터 두경부종양클리닉		
	전화번호	031-920-1685	전자우편	jysorl@ncc.re.kr		
색인단어	국문	두경부 편평상피세포암, 인간유두종바이러스, 편도암, 구인두암, 염색체 이상				
	영문	Head and Neck Cancer; Human papillomavirus; Tonsil cancer; Oropharynx cancer; Chromosome aberration.				
<p>◆ 연구목표</p> <p>-흡연, 과음이 주된 발암원인으로 알려져 왔던 두경부 편평상피세포암의 새로운 발암원인으로 점차 부각, 증가하고 있는 인간유두종바이러스 (HPV)의 관련에 대한 분자역학적 현황을 한국에서 발생한 두경부암 조직을 대상으로 규명하고 임상적 의미를 분석함.</p> <p>-HPV에 의한 두경부암의 발암기전을 흡연 등, HPV 비관련 두경부암과 비교, 특이성을 규명하고, 두경부암의 잠재적 진단 및 치료 표적자를 개발하기 위한 선행연구로서 whole genome-wide copy number variation study와 microarray-based immunocytochemistry를 시행하고, 분자생물학, 임상적 의미를 분석함.</p> <p>-규명된 genome-wide CNV profile, immunohistochemical profile등 바이오마커에 대한 validation을 시행, 궁극적으로 novel marker를 개발함.</p>						
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>다음과 같은 연구방법을 이용한다.</p> <p><b>대상환자</b> 국립암센터의 두경부종양클리닉의 환자중 환자 또는 보호자의 동의를 얻은 경우 본 연구를 시행함. 생검 또는 절제술로 진단되고 24개월 이상 추적관찰된 두경부암 263례를 대상으로 함. (구인두암, 후두암, 하인두암, 원발불명암, 구강암 등의 검체를 대상으로 함)</p> <p><b>HPV detection and typing</b> Paraffin embedded tissue, oral mucosal swab, saliva, oral rinsing, peripheral blood에서 DNA를 추출, 정제함. 각 검체에서 DNA를 정제하는 기법 개발, 조건화, 대상검체에 대한 시행. HPV-PCR을 이용하여 HPV genome의 유무를 규명하고 필요시 typing(type 16,18) 시행.</p>						

## Project Summary

### Immunohistochemistry

HPV의 발암과정에서 최종적으로 작용하는 cell cycle modulator (p53, pRb, p16, cyclin D1, EGFR 등)에 대한 IHC 후 발현 양상을 확인.

### SCCHN에서 HPV의 관련성에 대한 역학적, 임상적 의미 연구

두경부암의 각 원발병소에서 HPV의 관련 양상과 임상상과의 관계에 대한 통계분석, 여러 임상 정보와의 연관성, 인과성 분석.

### Array comparative genomic hybridization (aCGH)

일차연도에 규명된 HPV 관련 두경부암의 특이 발암기전을 genomic study를 이용하여 규명함. 역시 일차연도에 규명된 HPV 비관련 두경부암과 비교하여 특이 chromosomal aberration을 보고, specific signature를 파악하기 위해 시행함. possible novel target을 발굴, 임상적 의미를 분석함. 약 150례에서 시행할 예정임.

### Validation of possible specific target elucidated on chromosomal level

mRNA, protein 수준에서 실제 세포내 발현, 작용 여부를 확인함. 임상적 의미를 분석.

### 환자의 database구축

국립암센터에서 지금까지 수술한 환자의 각종 임상적 자료를 database화하여 이 database와 상기 유전체분석 결과의 연관성을 분석함.

### 통계적 분석

- 우리나라의 두경부 편평상피세포암에서 HPV 관련 빈도 및 양상을 규명, 분석, 이에 대한 지식 습득.
- 두경부암 환자의 원발병소, TNM 병기, 치료반응성, 생존율 등의 임상정보와 HPV와의 관련성 분석
- HPV 관련 두경부 편평상피세포암의 특이 임상양상을 규명하고 분석함.
- HPV 관련암의 특이 염색체 변이 양상 분석.
- 염색체 변이 양상의 실제 작용 여부를 확인하고, 이러한 target의 정보와 임상정보와의 관련성에 대한 분석을 통하여, 두경부암의 발생기전이나 예후에 관련된 novel target이 될 수 있는지를 규명함.

### ◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)
SCI 논문 편수	2/2	100%
IF 합	4.364/6	72.7%
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

### ◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)

성명	정유석, 박원서, 류준선, 이건국, 조관호, 윤탁, 최문경
----	----------------------------------

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

<b>Title of Project</b>	Molecular epidemiologic study on the role of human papillomavirus in head and neck cancer in Korean population
<b>Key Words</b>	Head and Neck Cancer; Human papillomavirus; Tonsil cancer; Oropharynx cancer; Chromosome aberration.
<b>Project Leader</b>	Yuh-S. Jung
<b>Associated Company</b>	
<p>Human papillomavirus (HPV) related oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) has been reported to be distinct from smoking-related OSCCs in many subsets of races worldwide. The presence of HPV DNA predicts improved survival, yet E7 oncogene mediated abnormal cell cycle control and its clinical meaning remain undescribed for HPV related OSCCs. However little has been known about the related situations in Korea.</p> <p>In a Korean cohort of head and neck squamous cell carcinomas, including OSCC, mainly treated with surgery based modalities in National Cancer Center, we investigated epidemiological indicators, HPV status, immunohistochemical markers, like G1 cycle markers, stemness markers using semi-quantitative measurement. Moreover, we evaluated the pattern of copy number variations (CNVs) using genome-wide array comparative genomic hybridization (aCGH) and analyzed its clinical relations and role for prognostication.</p> <p>Among 93 previously untreated patients with surgically-resectable OSCCs, 46 (49.5%) were HPV+ (HPV PCR+/p16+). HPV+ cases were significantly younger, predominantly non-smoking and non-drinking. These patients demonstrated better survival than their HPV- counterparts (3 year overall survival: 94% HPV+ vs 60% HPV-). Moreover, HPV+ OSCCs expressed higher p16, cdk4 and lower CCND1 and pRb as compared to HPV- OSCCs. Single markers like p16 (HR 2.39, p=0.016), pRb (HR 2.13, p=0.032) and CCND1 (HR 2.09, p=0.038) correlated with survival. Notably, combined markers like p16/cdk4 ratio (HR 2.47, p=0.011) and cdk4+CCND1 sum (HR 2.65, p=0.009) showed even more significant correlations.</p> <p>CNV study revealed less gain (88.3 vs.77.1 probes on average) and loss spot (74.3 vs. 58.2) in the HPV(+) group. Patterns like multiple large CNV segments and deep CNV gain or loss were detected significantly less in HPV(+) group. Our data suggest HPV(+) OSCCs exhibits more stable genomic integrity compared to exclusively smoking-related HPV(-) group.</p> <p>HPV presence in Korean OSCCs correlated with improved survival. Expression ratios of G1 cell cycle markers may predict survival of HPV+ as well as HPV- cancers better than expression of each marker alone. For CNV, Locus-targeted profile analyses would be followed afterwards.</p>	

**편집순서 6 : 연구결과**

**1. 연구의 최종목표**

- 흡연, 과음이 주된 발암원인으로 알려져 왔던 두경부 편평상피세포암의 새로운 발암원인으로 점차 부각, 증가하고 있는 인간유두종바이러스 (HPV)의 관련에 대한 분자역학적 현황을 한국에서 발생한 두경부암 조직을 대상으로 규명하고 임상적 의미를 분석함.
- HPV에 의한 두경부암의 발암기전을 흡연 등, HPV 비관련 두경부암과 비교, 특이성을 규명하고, 두경부암의 잠재적 진단 및 치료 표적자를 개발하기 위한 선행연구로서 whole genome-wide copy number variation study와 microarray-based immunochemistry를 시행하고, 분자생물학, 임상적 의미를 분석함.
- 규명된 genome-wide CNV profile, immunohistochemical profile에 대한 validation을 시행, 궁극적으로 novel marker를 개발함.

**2. 연구의 내용 및 결과**

연구의 내용

- 두경부암은 전 세계적으로, 다섯 번째로 호발하는 암임. 최근 30년간 진단 및 치료에 있어서 여러 진보가 있었음에도 불구하고, 사망률과 생존율 측면에서는 획기적 변화가 없는 상태임.
- 대부분의 두경부암은 편평상피세포암의 형태로 상부호흡소화관(upper aerodigestive tract, UADT)의 상피세포에서 발생. (후두암, 인두암, 구강암 등) 두경부 편평상피세포암(SCCHN)의 발생원인은 과거부터 흡연, 지속적 과음이 전적으로 작용한다고 전통적으로 알려져 왔음.
- 즉, 지속적 흡연은 두경부암의 위험성을 10배 증가시키고, 거의 90% 이상의 두경부암에서 흡연이 관여한다는 것이 기존의 지식이었음.
- 그러나 미국 및 유럽 역학연구에서 최근 30여 년간 지속적으로 성인흡연율이 감소하는 추세임에도 불구하고, 구인두암 혹은 편도암에 해당하는 두경부암이 반대로 계속 증가하는 추세를 보인다는 것을 알게 되었음.
- 여러 case-control study를 통하여 이러한 흡연율의 추세에 맞지 않는 두경부암 발생률 변화의 추이가 인간유두종바이러스 (human papillomavirus; HPV) 감염 및 이에 의한 장기적 발암 기전과 관련 있다는 점이 밝혀짐.
- IARC에서 5000 여명의 두경부암 환자를 대상으로 한 intergroup metaanalysis에서는 전체 두경부암의 25.9%, 편도암의 35.6%에서 HPV가 관련이 있다고 함. 몇 가지 중요한 메타분석에서도 비슷한 비율의 관련성을 보였음.

-최근 스웨덴, 핀란드, 호주 등 여러 국가로부터의 자료는 이러한 HPV 관련 암이 최근 급격히 증가하는 추세임을 보고하였고, 심지어는 이를 'HPV pandemics'라고 지칭하는 술자도 있을 정도임.

-따라서 이러한 사실에 대한 규명이 현재 전 세계적으로 두경부암의 이행연구에 있어서 점차 핵심적인 쟁점이 되고 있음.

-특히, HPV 관련 두경부암과 HPV 비관련 두경부암은 임상적, 생물학적 특성이 다른 별개의 질환이라는 보고도 있음. 두 질환의 상이성에 대한 역학적, 생화학적 연구는 아직 부족한 상황임. 그러나 이에 대한 연구를 통해, 두경부암에 대한 기초적, 임상적 이해가 심화될 수 있고, 이는 향후 효율적 맞춤형 치료 전략의 개발의 초석이 될 것으로 기대되어, 본 연구를 수행하였음.

-우리나라에서는, 흡연율이 2000년도를 정점으로 이후 서서히 감소하고 있는 추세여서, 향후 약 10년 정도 후에는 HPV가 두경부암의 주 원인인자로 부각되고, 아울러 이와 관련된 암종의 예방 및 치료가 점차로 국가보건상 주요 고려대상이 될 것으로 봄.

-그러나 진술한 자료는 모두 외국의 연구결과이고, 우리나라의 두경부암 현황에 대한 총체적인 연구결과는 아직 없었는데 이에 대한 우리나라 실태의 규명을 본 연구사업을 통하여 수행하여 국내의 데이터를 확립하였음.

## 연구의 결과

-국립암센터에서 초진으로 진단받고 치료를 시행한 264명의 두경부편평세포암 환자 (oropharynx cancer 78명, hypopharynx cancer 37명, larynx cancer 79명, cancers locating laryngopharynx 13명, cervical metastatic carcinoma of unknown primary 22명, others 35명) 등 총 264명의 clinicopathologic registry를 setup함.

-상기 환자들에 대한 FFPE dataset 및 tissue array를 구성하여 향후 HPV study 및 molecular- pathologic analysis의 기초 작업을 완료함.

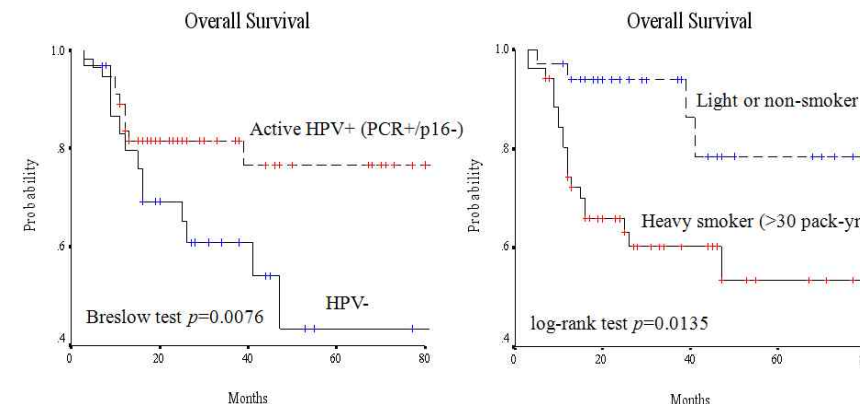
-FFPE를 이용한 HPV detection method를 확립함 (combined HPV PCR + p16 immunohistochemistry).

-확립된 환자군과 방법론을 이용, 93례의 HPV+ and - 구인두암(oropharyngeal cancer treated with primary surgery with or without radiation)에 대한 HPV 관련 여부를 확인하고, 복합적 임상정보, 예후와의 연관성 분석을 완료함. 이 중 49.5%가 HPV+였음.

-HPV+ 구인두암 환자는 HPV-에 비해, 젊고, 비흡연자의 비율이 높았으며, 전신상태가 양호한 특징이 있었음. 3년 전체 생존률은 약 30% 양호하였음 (94% vs. 60%).

-본 환자군의 치료에 대한 E7 관련 G1 cell cycle marker의 expression study를 시행하였음. HPV+ 군은 높은 p16, cdk4 발현과 낮은 pRb 발현이라는 분자생물학적 특성을 보였음. 그리고 본 환자군에서 p16 (HR 2.39), pRb (HR 2.13), CCND1 (HR 2.09) 등은 생존 여부와 유의한 연관성이 있음을 발견하였음. 특히, 두 마커를 같이 환자의 생존과 연

관하여 분석하면, 즉p16/cdk4 ratio (HR 2.47) and cdk4+CCND1 sum (HR 2.65) 등의 마커는 HPV 관련 여부만을 단독으로 봤을 때보다 환자 예후를 더욱 강력하게 예측할 수 있는 마커임을 알 수 있었음 (Head Neck 2011).



**Figure1.** Overall Kaplan-Meier survival curves show significant difference in survival between active HPV+ vs. HPV- cases; and non-smoker vs. heavy smokers ( $p=0.0135$ ).

-CNV 연구는 HPV+ 그룹에서 less gain (88.3 vs.77.1 probes on average), 그리고 loss spot (74.3 vs. 58.2)의 양상을 보였음. Multiple large CNV segments 이나 and deep CNV gain or loss 등의 전체적인 염색체의 불안정성을 시사하는 소견도 HPV+에서 적게 관찰이 되었음.

-이 데이터는 HPV+ 관련암이 염색체 안정성 측면에서는 HPV- 암에 비해 안정적인 양상을 보임을 시사함. 이에 대한 locus specific evaluation 역시 시도되고 있음.

## 3. 연구결과 고찰 및 결론

- 국내·외 관련분야의 기술개발 현황과 연구결과가 국내·외 기술개발 분야에서 차지하는 위치 등을 기술
- 연구결과 해석 및 다른 결과와의 비교분석 등에 대해 고찰하고 결론을 서술함

-본 과제의 연구결과는 서양인이 아닌 한국인 두경부암에서 HPV 관련성을 총괄적으로 규명한, 국내에서는 최대의 환자군을 대상으로 한 임상자료로서 출판됨.

-저자들은 한국인 두경부 편평세포암, 특히 편도암을 포함한 구인두암에서 HPV의 관련 현황을 조사, 역학 자료를 획득했음.

-또한 consistent, reliable HPV detection method를 두경부암 치료에 대한 분석을 통해

확립했음.

- 이렇게 규명된 HPV 감염과 임상 지표, 생존과의 관련성을 환자 database를 이용, 분석하여 HPV 관련성에 대한 현황 및 생존 데이터를 게재하였음.
- 상기 환자군을 이용, 기본적 molecular marker에 대한 expression study (immunohistochemistry)를 시행하고 clinical correlation study를 시행하였음.
- 아울러, Genome-wide copy number variation (CNV) 분석을 시행하고, 이에 대한 임상 연관성 분석도 수행함.
- 총, 264례의 환자군에서 HPV 관련성, molecular profile, 임상정보, 그리고 일부 환자에서 copy number variation의 genomic profile을 얻어, DB를 확립하였음. 이는 추가연구에 광범위하게 적용, 시행할 수 있는 material로서의 의미가 있다고 생각됨.
- HPV+ 두경부암은 따라서 기존 치료(항암 방사선 병합 치료)에 대해 양호한 반응을 보임. 이는 여러 기관의 연구에서 일관되게 보고된 바 있고, 선형기관고유사업을 통해 저자들이 본 기관에서 치료받은 환자의 임상자료와 조직을 분석한 연구에서도 이를 뒷받침하는 결과를 얻을 수 있었음.
- 지난 수년간의 선행 연구 및 이 분야의 국내외 연구의 대다수는 두경부암, 구인두암, 편도암 조직 내에서 HPV의 존재 여부, 기전, 생물학적, 임상적 의미에 관심을 한정하여 이루어졌고, 보고되었음.
- HPV+ 두경부암은 HPV- 두경부암과는 다른 genotype과 phenotype을 가짐이 지난 10여년간 미국-유럽의 연구에서 밝혀진 바 있음.
- 그러나 HPV+ 두경부암이라고 하더라도 80-85%의 5년 생존율을 보임을 고려할 때, 여전히 20%의 non-responder가 있는 상황임. 그리고 두경부암은 생물학적으로 상이한 여러 질환의 집합체임.
- HPV+ 두경부암 환자군조차도 heterogeneous biologic activity를 보이는 질환의 집합체이지만, 이러한 이를 고려한 보다 섬세한 risk stratification을 위한 기본 지식 및 적용은 아직 많이 부족한 상황이어서 이에 대한 연구도 필요할 것임.
- HPV 양성 두경부암이 양호한 예후를 보이는 점을 고려하여, 최근에는 이러한 환자군에 대한 치료를 de-escalation하여, 치료 관련 독성을 줄이는 것이 가능한지에 대한 임상적 시도가 많은 관심을 끌고 있고, 앞으로 본 분야의 핵심 발전 방향도 이러한 부분이 될 것으로 생각됨.
- 선행연구의 지식을 기반으로, 두경부암에서 분자생물학적 특성에 기반을 둔 포괄적인 예후 예측 시스템을 구축, 이를 통해 개별 환자의 적절한 targeted treatment strategy 확립의 근간이 될 수 있을 것임.
- 아울러 HPV 관련성을 포함한 biomarker study 및 분석기법의 개발은 두경부암에 있어서 종양생물학적 이해를 심화시키고, 궁극적으로 더 효과적이고 우수한 치료법의 개발로 연결될 수 있을 것임.
- CNV 연구는 HPV+ 그룹에서 less gain (88.3 vs.77.1 probes on average), 그리고 loss spot (74.3 vs. 58.2)의 양상을 보였음. Multiple large CNV segments 이나 and deep CNV gain or

loss 등의 전체적인 염색체의 불안정성을 시사하는 소견도 HPV+에서 적게 관찰이 되었음.

-이 데이터를 통해, 전반적인 HPV 관련암의 염색체 변이 양상에 대한 지식을 얻게 되었고, 이에 대한 심화 연구 역시 지속적으로 수행될 예정임.

#### 4. 연구성과 및 목표달성도

##### (1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 <sup>1)</sup> )	저널명(IF.)	Year: Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
Human Papillomavirus in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas in Korea: Use of G1 Cycle Markers as new prognosticators	교신	Head Neck (2.182)	2011, Nov2. Epub	SCI	0910590
Human papillomavirus in nasopharyngeal carcinoma and its clinical implications	교신	Head Neck (2.182)	2012, On precessing	SCI	0910590
Outcomes of transoral lateral oropharyngectomy: single-institute experience with emphasis on human papillomavirus status	교신	Laryngoscope (2.096)	2012, On precessing	SCI	0910590
Copy number variation profile of human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma and its relevance	교신	Int J Cancer (4.926)	2012, On processing	SCI	0910590

- 1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
- 2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
- 3) 지원과제번호(Acknowledgement)
  - 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호
HPV incidence and chromosomal changes in Korean Oropharyngeal Carcinoma	Yuh-Seog Jung1,Weon Seo Park1,Junsun Ryu1, Jong-II Kim2,,Moon Kyung Choi1, John H. Lee3	Molecular Biology of DNA Tumor Virus Conference	Madison, WI, USA	0910590

HPV incidence and chromosomal changes in Korean Oropharyngeal Carcinoma	Yuh-Seog Jung1, Weon Seo Park1, Junsun Ryu1, Jong-II Kim2, Moon Kyung Choi1, John H .Lee3	AHNS 2010 Research Workshop	Arlington, VA	0910590
Human papillomavirus relations in Korean Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma & Related Chromosomal Instabilities: Preliminary Report	정유석, 박원서, 김종일, 류준선, 최문경, 진병삼, 이건국, 조관호, 윤탁	대한이비인후과학회 제 14차 종합학술대회	국내	0910590
Human papillomavirus relations in Korean Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma	정유석	대한두경부종양학회	국내	0910590
Human papillomavirus in Oropharyngeal Carcinoma in Korea	정유석	대한두경부외과학회 연구 심포지움	국내	0910590
HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma and associated chromosomal changes	정유석	대한이비인후과학회 제 14차 종합학술대회	국내	0910590

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 <sup>1)</sup>	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

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

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

대한이비인후과학회 제 14차 종합학술대회 최우수 연재상 수상:  
 "HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma and associated chromosomal changes"

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사업목표에 대한 달성내용 및 관련분야 기술발전예의 공헌도 등을 기술</li> <li>○ 달성도(%)는 연차별목표대비 당해연도 달성도 및 최종목표대비 당해연도까지의 누적 달성도를 반드시 기입</li> </ul>
---

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)	
			연차	최종
-흡연, 과음이 주된 발암 원인으로 알려져 왔던 두경부 편평상피세포암의 새로운 발암원인으로 점차 부각, 증가하고 있는 인간유두종바이러스(HPV)의 관련에 대한 분자역학적 현황을 한국에서 발생한 두경부암 조직을 대상으로 규명하고 임상적 의미를 분석함. -HPV에 의한 두경부암의 발암기전을 흡연 등, HPV 비관련 두경부암과 비교, 특이성을 규명하고, 두경부암의 잠재적 진단 및 치료 표적자를 개발하기 위한 선행 연구로서 whole genome-wide copy number variation study 와 microarray-based immunochemistry를 시행하고, 분자생물학, 임상적 의미를 분석함. -규명된 genome-wide CNV profile,	1차년도	우리나라의 두경부 편평상피세포암, 특히 편도, 구인두암 51례에서 HPV 관련 빈도 및 양상을 규명하여 이에 대한 선행연구적 지식을 습득. HPV가 두경부암의 임상상에 어떤 영향을 미치는지에 관련된 지식을 습득함. Paraffin embedded tissue에서 HPV 검출을 위한 protocol 개발 및 sensitive detection method를 조건화함. 효과적인 HPV 진단 기법 확립.	90	
	2차년도, 3차년도 연구를 위한 환자군 구성.	향후 HPV 관련 및 유전체 연구를 위한 300여례의 clinicopathologic registry 획득. 2차년도에 계속 분석을 진행하고, 3차년도 초까지 molecular work를 수행할 예정. 그 이후는 data 분석 작업을 집중적으로 진행할 예정.		
	2차년도	1차년도의 HPV-detection을 larger group에 대해 추가적으로 시행.	86례의 HPV+ and - 구인두암(oropharyngeal cancer)에 대한 HPV 관련 여부를 확인하고, 복합적 임상정보, 예후와의 연관성 분석을 완료.	90



immunohistochemical profile에 대한 validation을 시행, 궁극적으로 novel marker를 개발함.	3차년도	HPV 관련 두경부암 carcinogenetic mechanism에 관한 genetic study.	86례의 구인두암 환자군에서 multiple molecular marker에 대한 expression study (immunohistochemistry)를 시행하고 correlation study를 완료.		
		HPV관련 두경부암과 HPV 비관련 두경부암의 염색체변이의 양상차이를 분석하고 임상적 의미 고찰.	Genome-wide CNV analyses를 시행 (58례)하고 지속적으로 진행하고 있음. (향후 100례 이상 진행 후, 분석을 완료할 예정).		
	HPV 관련 두경부암의 distinct genetic feature를 규명하기 위해, genomic copy number variation (CNV) profile를 array CGH를 이용하여 규명하고 이를 HPV 비관련 두경부암의 양상과 비교하여 차이를 분석함.	HPV 관련 두경부암의 CNV는 38례에서 결과를 성공적으로 얻었으나, HPV비관련 두경부암 조직에서는 relevant result를 얻지 못했음. (조직 보관의 충실도에 따른 문제로 생각). HPV 비관련 두경부암 조직을 좀더 광범위하게 확보하여 심화 분석을 시도하고 있음.	70		
	HPV관련 두경부암과 HPV비관련 두경부암의 염색체변화 양상차이와 임상적 연관성, 의미 분석.	HPV 비관련 두경부암의 증례 수가 충분히 확보되지 않아서, HPV관련 두경부암에서 흡연력 등 임상상을 포함하여 subgrouping을 우선적으로 시도하고 있음.			

hybridization 시행.	것으로 판단되어 시행하지 않았음.
paraffin embedded tissue, oral mucosal swab, saliva, oral rinsing, peripheral blood 등의 여러 검체를 이용한 HPV DNA-PCR의 조건 확립 및 적용, 시행.	Paraffin embedded tissue에서 HPV 검출을 위한 protocol 개발 및 sensitive detection method를 조건화함. HPV-PCR과 HPV chip의 sensitivity, specificity를 고려하여 효과적인 HPV 진단 기법 확립하여 시행함.
진행적인 HPV 관련암과 비관련암	107례에서 array CGH를 시도, 이 중 58례에서만 statistically valid result를 얻고 분석 중임. 목표 증례수만큼 analysis를 하고, publishable data를 얻으려고 했으나, 연구비가 낮게 책정되어 불가능했음. 당초 목표 달성을 위해선 연구비 증액이 불가피함.
각 소견의 연관성을 분석하고, 주로 발견되는 aberrated locus를 규명. 이의 임상적 의미에 대한 통계적 분석을 시행함.	58례의 preliminary data에 대한 선행연구의 publish는 현재 진행 중임. Molecular expression profile에 대한 Clinicopathologic archival immunohistochemical study를 시행, 의미를 분석함. 86례의 HPV+ and - 구인두암(oro-pharyngeal cancer)에 대한 HPV 관련 여부를 확인하고, 복합적 임상정보, 예후와의 연관성 분석을 완료함. 구인두암 이외 두경부암 (후두암, 하인두암, 원발불명암, 총 173례)에 대한 HPV 관련 여부도 지속적으로 시행하고 있음.
진행된 58례의 CNV 분석을 향후 120례 이상으로 확대하고 이를 이용해 분석을 심화, 최종화해서 궁극적으로 Publishable data를 얻어냄.	HPV 비관련 두경부암의 증례수가 충분히 확보되지 않아서, HPV관련 두경부암에서 흡연력 등 임상상을 포함하여 subgrouping을 우선적으로 시도하고 있음.
Clinicopathologic archival tissue microarray-based immunohistochemical expression profic study를 진행. (264명)에서 검증된 HPV-detection method를 이용하여 HPV relation을 추가적으로 규명	nasopharyngeal cancer의 HPV관련성을 EBV와 같이 결합, 분석하였음. article review processing 중임.

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
한국인 두경부암 환자에서 HPV의 감염 빈도 및 양상을 규명, 200 여명의 두경부암 환자를 대상으로 함. E6/E7에 대한 RT-PCR, cell cycle regulator에 대한 in situ	우리나라의 두경부 편평상피세포암, 특히 편도, 구인두암 51례에서 HPV 관련 빈도 및 양상을 HPV-PCR 및 DNA chip을 이용하여 규명하여 선행연구적 지식을 습득. 향후 본 방법으로 잔여 250례의 환자에 대한 HPV 관련성을 규명할 예정임. RT-PCR이나 ISH는 과제의 성격상, 지식 추가적 의미가 적음

5. 연구결과의 활용계획

- (1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구분	건수	비고
학술지 논문 게재	2 (2,182, 2,096)	개재 예상 전문학술지명, SCI급 학술지인 경우 Impact Factor 기록
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기타		

## (2) 연구성과의 활용계획

- 후속 연구에서는 단순히 HPV 관련성 여부뿐만이 아닌, biologically, clinically relevant biomarker를 통합 분석하여 궁극적으로 두경부암의 reliable risk-based stratification method를 정립할 것임.
- 선행 연구에서 establish 된 두경부암의 clinicopathologic cohort를 이용, 임상변수와 molecular expression study를 심화시켜, 더욱 믿을 만한 예후예측 시스템을 고안할 예정임.
- 이렇게 고안된 변수를 이용, 치료 후 임상적 재발 예측인자, 생존율 등을 예측하는 예후 인자로서의 가치를 확인할 것임.
- 국내 우수 기관과 다기관연구를 조직, 대규모 한국인 연구군에서 HPV관련 두경부암 현황에 대한 공신력 있는 데이터를 취득하고, 개개 기관의 data에만 머물러 왔던 HPV관련 연구에 대한 일관된 대규모 자료와 임상적 의미를 규명할 예정임.
- HPV의 연관성이 비교적 잘 알려진 구인두암, 편도암 외에도 비인두, 후두, 하인두, 구강 등에서 발생한 암 및, 전이성 두경부암과 원발장기 이차암으로 대상을 확대하여 치료의 반응성과의 연관성을 분석할 것임.

## 6. 참고문헌

- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 2000;92:709 - 720.
- 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.
- 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 - 128.

- Termine N, Panzarella V, Falaschini S, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988 - 007). Ann Oncol 2008;19:1681 - 1690.
- Nasman 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 - 66.
- de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis 2007;7:453 - 59.
- Settle K, Posner MR, Schumaker LM, et al. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. Cancer Prev Res (Phila Pa) 2009;2:776 - 81.
- Zhang HS, Postigo AA, Dean DC. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. Cell 1999;97:53 - 1.
- Zou X, Ray D, Aziyu A, et al. Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. Genes Dev 2002;16:2923 - 934.
- 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; 54:6078 - 082.
- Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ, Look AT. Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. Cancer Res 1993;53:5535 - 541.
- Ghazizadeh M, Jin E, Shimizu H, et al. Role of cdk4, p16INK4, and Rb expression in the prognosis of bronchioloalveolar carcinomas. Respiration 2005;72:68 - 3.
- Greene FL, Balsh CM, Haller DG, Morrow M. AJCC Cancer Staging Manual. In: Greene FL, editor. 6th ed: Springer; 2002.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours (IARC WHO Classification of Tumours). Lyon: IARC Press; 2005.
- Buccheri G, Ferrigno D, Tamburini M. Karnofsky and ECOG performance status scoring in lung cancer: a prospective, longitudinal study of 536 patients from a single institution. Eur J Cancer 1996;32A:1135 - 141.
- Choi YD, Jung WW, Nam JH, Choi HS, Park CS. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA chip and sequencing. Gynecol Oncol 2005;98:369 - 75.
- Obermann EC, Marienhagen J, Stoehr R, Wuensch PH, Hofstaedter F. Tissue microarray construction from bone marrow biopsies. Biotechniques 2005;39:822, 824, 826.
- 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 - 47.
- Caldeira S, de Villiers EM, Tommasino M. Human papillomavirus E7 proteins stimulate

proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein. *Oncogene* 2000;19:821 - 26.

20. Collins AS, Nakahara T, Do A, Lambert PF. Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. *J Virol* 2005;79:14769 - 4780.

21. Li W, Thompson CH, Cossart YE, et al. The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head Neck* 2004;26:1 -

22. Almadori G, Galli J, Cadoni G, Bussu F, Maurizi M. Human papillomavirus infection and cyclin D1 gene amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: biologic function and clinical significance. *Head Neck* 2002;24:597 - 04.

## 7. 첨부서류

### ORIGINAL ARTICLE

## HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS IN KOREA: USE OF G1 CYCLE MARKERS AS NEW PROGNOSTICATORS

Weon Seo Park, MD, PhD,<sup>1</sup> Junsun Ryu, MD, PhD,<sup>2</sup> Kwan Ho Cho, MD, PhD,<sup>3</sup> Moon Kyung Choi, MS,<sup>1</sup> Sung Ho Moon, MD, PhD,<sup>3</sup> Tak Yun, MD, PhD,<sup>4</sup> Byung-Sam Chun, RN,<sup>2</sup> Geon Kook Lee, MD, PhD,<sup>1</sup> Hyun-Joo Ahn, MD, PhD,<sup>5</sup> John H. Lee, MD, FACS,<sup>5</sup> Paola Vermeer, PhD,<sup>5</sup> Yuh-Seog Jung, MD, PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Division of Specific Organ Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang-si, Gyeonggi-do, 410-769, Korea

<sup>2</sup>Head and Neck Oncology Clinic, Center for Specific Organs Cancer, Center for Thyroid Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang-si, Gyeonggi-do, 410-769, Korea

<sup>3</sup>Center for Proton Therapy, Center for Specific Organs Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang-si, Gyeonggi-do, 410-769, Korea

<sup>4</sup>Hematologic Oncology Clinic, Center for Specific Organs Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang-si, Gyeonggi-do, 410-769, Korea

<sup>5</sup>Sanford Cancer Research Center, Sanford ENT-Head and Neck Surgery, University of South Dakota, Sioux Falls, South Dakota

Accepted 3 August 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/hed.21939

**Abstract:** *Background.* Human papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal squamous cell carcinoma (SCC) exhibits distinct patterns worldwide, but its prevalence has not been extensively evaluated in Korea. The E7 oncogene-mediated carcinogenesis and its meaning are yet to be uncovered for oropharyngeal SCCs.

*Methods.* In a Korean oropharyngeal SCC cohort, epidemiological indicators, HPV, and G1 cell cycle marker expressions were correlated with survival.

*Results.* Among 93 surgically treated patients with oropharyngeal SCCs, 49.5% were HPV+, which were significantly younger, and predominantly nonsmoking. They demonstrated better survival than HPV- (94% vs 60%). Patients who were HPV+ with oropharyngeal SCCs expressed higher p16, cyclin-dependent kinase 4 (cdk4), and lower pRb. The p16 (hazard ratio [HR] 2.39), pRb (HR 2.13), and CCND1 (HR 2.09) correlated with survival. Notably, combined markers like p16/cdk4 ratio (HR 2.47) and cdk4+CCND1 sum (HR 2.65) were more significantly correlated.

*Conclusion.* Incidence of HPV-related oropharyngeal SCC in Korea is similar to U.S.-European data. HPV presence correlates with improved survival. Expression ratios of G1 markers may predict survival of oropharyngeal SCCs better than each marker alone. © 2011 Wiley Periodicals, Inc. *Head Neck* 00:000-000, 2011

**Keywords:** human papillomavirus; oropharyngeal cancer; p16 protein; cdk4 protein; CCND1 protein

Correspondence to: Y.-S. Jung

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

High-risk human papillomaviruses (HPVs) are regarded as the most identifiable cause of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Recent U.S.-European data suggest that HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma (SCC) exhibits unique biological and epidemiological characteristics, compared to their HPV-negative (HPV-) counterparts, which are predominantly caused by smoking.<sup>1,2</sup> While the past 2 decades demonstrate decreased tobacco use, especially in the United States, and a concomitant 20% decreased incidence of other HNSCCs, the incidence of oropharyngeal SCC has increased by 11% in this same period.<sup>3</sup> The proportion of HPV-positive (HPV+) oropharyngeal SCC has steadily increased 60% to 85% in western countries.<sup>4,5</sup> The majority of these data were generated in U.S.-European countries with populations consisting predominantly of white people. Globally, HPV prevalence patterns vary in numerous studies examining uterine cervix involvement. For example, African and Asian countries exhibit higher HPV-related cervical/uterine cancer than European regions.<sup>6</sup> Eastern Asia, including Korea, is known for higher epidemics of several oncogenic viral infections, such as Epstein-Barr virus and hepatitis B virus. Moreover, recent studies show racial differences in HNSCC-associated mortality with African Americans demonstrating a higher mortality than Europeans which correlated with a lower prevalence of HPV+ oropharyngeal SCCs.<sup>7</sup> It is possible then that geographic and racial differences exist