

(과제번호 : 0810270 )

**연구과제명 (국문)**

인 유두 종 관련 고형종양에서 E6 종양유전자가 방사선감수성에  
미치는 영향연구

**연구과제명 (영문)**

The effect of human papilloma virus (HPV) E6 oncogene on  
the radiosensitivity of HPV-related tumors

과제책임자 : 김 주 영

국 립 암 셴 터

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

# 제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “인 유두 종 관련 고형종양에서 E6 종양 유전자가 방사선감수성에 미치는 영향연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009. 12 . 31

국립암센터

과 제 책 임 자 : 김 주 영

연 구 원 : 신 혜 진

:

# 목 차

## I. 연구사업결과 요약문

(한글)	-----	page	1-2
(영문)	-----	page	3

## II. 연구사업결과

1. 연구의 최종목표	-----	page	4
2. 연구의 내용 및 결과	-----	page	4-20
3. 연구결과 고찰 및 결론	-----	page	21
4. 연구성과 및 목표달성도	-----	page	22-24
5. 연구결과의 활용계획	-----	page	24
6. 참고문헌			
7. 첨부서류			

연구분야(코드)	B-4	과제번호	0810270
과제명	인유두종관련 고형종양에서 E6 종양유전자가 방사선감수성에 미치는 영향 연구		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2008년 1월1일 ~2009년 12월 31일	120,000
	1차년도	2008년 1월 1 일 ~2008 년 12월 31 일	60,000
	2차년도	2009년 1월 1 일 ~2009 년 12월 31 일	60,000
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	
과제책임자	성명	김주영	주민등록번호
	전화번호	031 920 1724	전자우편
색인단어	국문	인유두종바이러스, 고형종양, 방사선 감수성, 종양유전자 E6	
	영문	HPV-related tumours, Radiosensitivity, HPV E6,	
<p><b>◆ 연구목표</b></p> <p>&lt;최종목표&gt;  인유두종 관련 암에서 특이한 방사선 반응성의 기전과 관련하여 고위험군 viral oncogene E6의 방사선민감성에 끼치는 영향을 종양의 다양한 미세 환경 상태에서 연구하고 유사분열기 관련 단백질을 중심으로 이들 암의 방사선치료효과를 향상시킬 수 있는 분자생물학적 타겟을 밝힘.</p> <p>&lt;2008년도 목표&gt;  1. 고위험군 인유두종 바이러스(HPV) 종양유전자 E6가 자궁경부암세포의 방사선민감성 및 유전자 손상에 미치는 영향연구.  2. 인유두종 바이러스 관련 종양의 방사선 조사 후 관찰된 mitotic cell death 에서 유사분열기 조절단백질의 하나인 Aurora-A 역할을 연구하여 이들 단백질의 조절이 방사선치료효과에 미치는 영향을 규명</p>			
<p><b>◆ 연구내용 및 방법</b></p> <p>1. 고위험군 인유두종바이러스16형 E6 종양유전자와 방사선민감성연구</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) HPV16 E6 transfected C33a(C33aE6) 및 vector control C33a(C33aV) 세포 주를 대상으로 방사선 민감성 조사 : Clonogenic assay</li> <li>2) 방사선에 의한 DNA 손상 및 복구: Comet Assay, <math>\gamma</math>-H2AX Assay</li> <li>3) 방사선 조사 후 cell cycle pattern에서의 변화 확인을 위해 Flowcytometry analysis수행</li> <li>4) 이러한 세포주기변화 차이의 원인을 찾기 위해 G2/M phase 관련 molecules의 protein 및 phosphorylation level 변화를 western blot으로 확인</li> <li>5) Immunofluorescent microscopy, Confocal microscopy를 통한 aurora 와 다른 단백질간의 상호작용연구 - Western immunoblot 및 protein co-immunoprecipitation</li> <li>6) Immunohistochemistry를 통한 HPV 관련 종양조직에서의 aurora, P53, P21 등의 발현관찰 및 clinical outcome 과의 관계연구.</li> </ol>			

**2. 자궁경부암에서 종양 바이러스 DNA 와 방사선치료 성적과의 관계**

- Hybrid Capture II technique 을 이용한 자궁경부종양내 바이러스 DNA 의 양적 측정
- Line blot assay 를 이용한 인유두종바이러스의 유전자형 (genotype) 탐색
- 방사선치료를 받은 자궁경부암 환자의 치료성적에 대한 데이터베이스 완성 및 통계분석

**3. Fanconi Anemia (FA) 유전자와 Radiation Hypersensitivity syndrome 과의 관계연구**

- monoubiquitylated FANCD2 foci 면역형광염색 및 scoring

**◆ 연구성과**

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)
SCI 논문 편수	2/2	100
IF 합	21.227/10	212%
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

- 자궁경부암의 방사선민감성을 예측할 수 있는 요인중 과거에는 환자의 유전적 요인이나 환경적 요인이 주로 연구되었으나 바이러스측의 영향이 방사선민감성에 매우 중요한 역할을 함을 처음으로 밝힘.

**◆ 참여연구원  
(최종연도 참여인원)**

성 명 김주영, 신혜진

주민등록번호

<b>Title of Project</b>	The effect of human papilloma virus (HPV) E6 oncogene on the radiosensitivity of HPV-related tumors
<b>Key Words</b>	HPV-related tumours, Radiosensitivity, HPV E6,
<b>Project Leader</b>	Joo-Young Kim
<b>Associated Company</b>	
<p>Human papillomavirus (HPV) is responsible for about 5% of human cancer and 25% of the infection-related cancer. In this project, we investigated the role of HPV mainly in the uterine cervical cancer where HPV is a necessary cause of the disease. Almost all HPV-related cancer is highly radiosensitive and in many occasions, treated by radiotherapy without surgery. In this respect, exploring the mechanism of the underlying radiosensitivity is considered important because it might reveal the possible new target in cancer treatment. In the first part of this project, we explored the effect of human papillomavirus type 16 E6 on radiosensitivity. As almost all cervical cancers are HPV-positive, we selected a rare HPV-negative cancer cell line, which is C33a, and examined the effect by transfection of the cells with HPV16E6. Standard clonogenic assay was used for examining radiosensitivity of the E6-transfected C33a (C33aE6) along with the vector control cell line (C33aV) under oxic and hypoxic conditions. In both conditions, E6 cells showed higher radiosensitivity. It was observed that the G2 cell cycle phase was bypassed in E6 cells compared to the V cells with a strong drive to proceed to M phase despite of higher portion of unrepaired DNA damage caused by ionizing radiation. Aurora-A was overexpressed up to 48hrs after irradiation in E6 cells with all the mitotic proteins elevated in E6 cells. E6 cells showed large amount of polyploidy which proceed to mitotic catastrophe and cell death. We concluded that the genetic instability caused by E6 integration upregulated aurora-A expression in this p53-mutated cell line and resulted in accentuated response to ionizing radiation, giving rise to mitotic cell deaths. Aurora-A inhibition was suggested as a possible therapeutic target in such cell line where p53 is non-functional, however, this conclusion should be validated through examining other cell line (or tumor tissues) where various types of p53 mutation is present. This finding is under preparation for submission. While we pursue this project, the present investigators performed several other interesting studies about HPV and radiosensitivity. The results can be found in the attached paper which includes subjects about "HPV virla load and radiotherapy outcomes" and "Fanconi Anemia and Radiosensitivity". The research that the present investigator is pursuing is considered to have a great implication in that the viral factors, not only the host factors are important prognostic factors in HPV-related cancer, and alto the two factors are very interactive.</p>	

## 1. 연구의 최종목표

### <최종목표>

인유두종관련암에 특이한 방사선반응성의 기전을 밝혀내기 위하여 고위험군 viral oncogene E6가 방사선민감성에 끼치는 영향을 종양의 다양한 미세환경상태에서 연구하고 유사분열기 관련 단백질을 중심으로 이들 암의 방사선치료효과를 향상시킬 수 있는 분자생물학적 타겟을 밝힘.

### <1차년도>

고위험군 인유두종바이러스 (HPV) 종양유전자 E6가 자궁경부암세포의 방사선민감성 및 유전자 손상에 미치는 영향연구

### <2차년도>

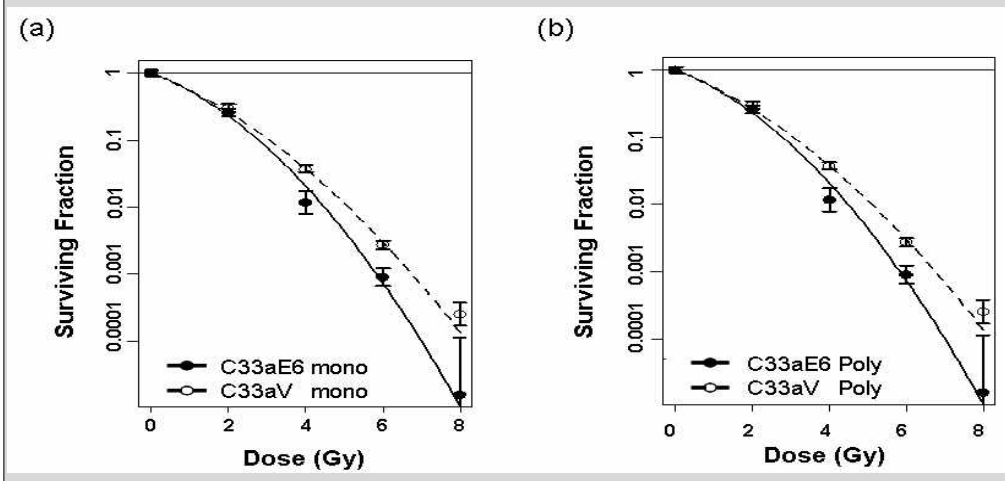
인유두종바이러스관련 종양의 방사선조사후 관찰된 mitotic cell death 에서 유사분열기 조절 단백질의 하나인 Aurora-A 역할을 연구하여 이들 단백질의 조절이 방사선치료효과에 미치는 영향을 규명

## 2. 연구의 내용 및 결과

### ◆ 방사선민감성 비교 C33a E6 vs. C33V (Figure 1)

HPV16 E6 transfected C33a(C33aE6) 및 vector control C33a(C33aV) 세포 주를 대상으로 방사선 민감성 조사해본 결과 radiation survival curve에서의 mean lethal dose( $D_{bar}$ )가 C33aV와 C33aE6에서 각각  $1.42 \pm 0.05$ 와  $1.32 \pm 0.05$ Gy로 나타났음. 즉 C33aE6이 방사선에 대한 민감도가 더 높음 (a). 이 같은 결과는 original polyclonal 세포 주인 C33aVpoly와 C33aE6poly에서도 각각의  $D$  values가  $1.55 \pm 0.05$ 와  $1.48 \pm 0.04$ 로 유사하게 나타나 (b) 이러한 민감성의 차이가 단순히 clonal selection 에 의해 우연히 나타난 결과가 아님을 확인함.

Figure 1. Radiation survival curve





◆ 방사선으로 인한 DNA 손상측정 (Single cell electrophoresis : Comet assay)

방사선으로 인한 DNA 손상 중 single strand break를 측정하는 alkaline comet assay (a)와 double strand break 를 측정하는 neutral comet assay(b) 실험을 통해 comet tail moment를 측정함으로써 방사선에 대한 DNA 손상 정도를 알아본 실험에서 C33aE6의 DNA 손상 정도가 양쪽에서 모두 크게 나타나고 있음을 확인함.

Figure 2 (a)

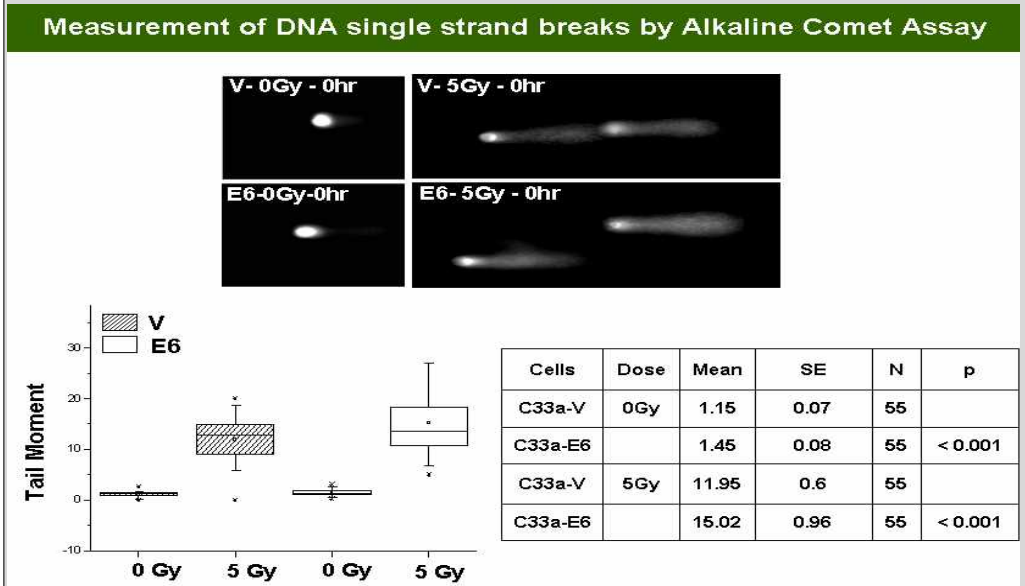
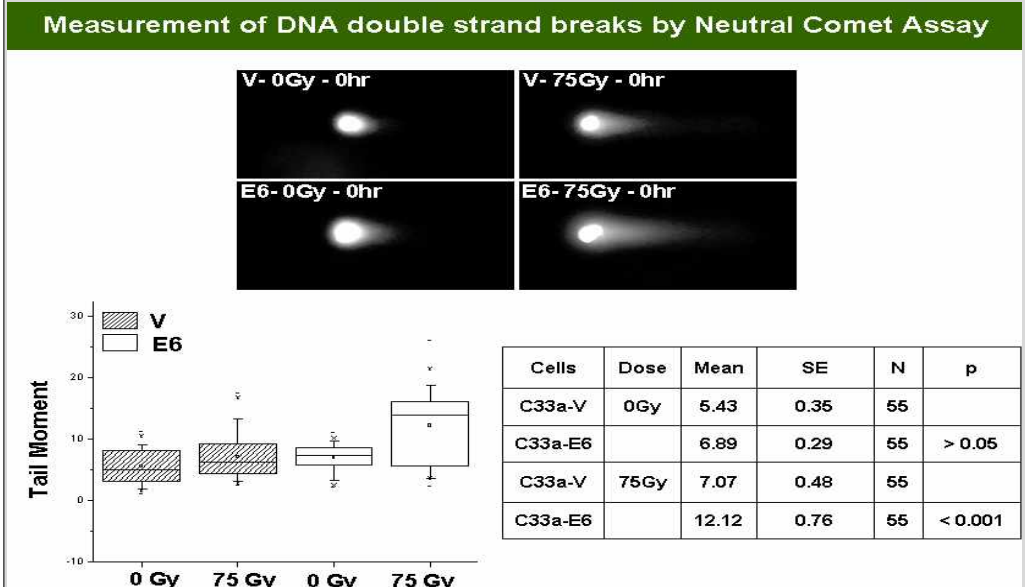


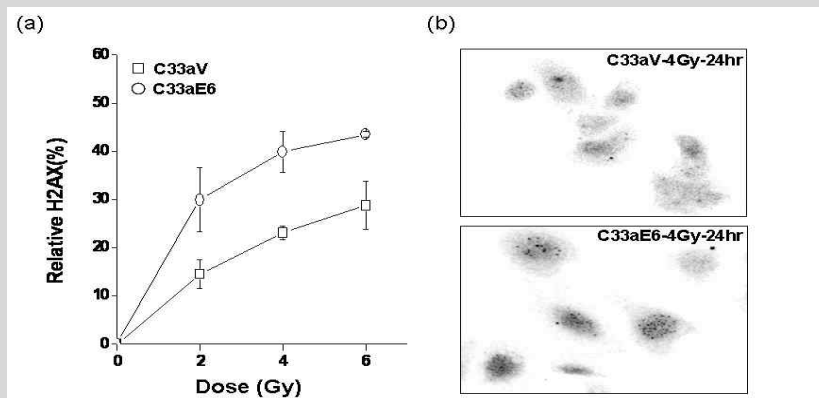
Figure 2 (b)



◆ 방사선으로 인한 DNA 손상측정 ( $\gamma$ -H2AX Assay)

방사선에 의한 DNA 손상 복구 정도를 알아보고자 했던  $\gamma$ -H2AX Assay 실험에서는 방사선 조사 후 24시간 동안 복구되지 못하고 남아있는 foci를 지니고 있는 (residual  $\gamma$ -H2AX foci) cell 수 역시 C33aE6에서 더 많아 double strand break DNA damage 가 방사선조사 후 E6 세포주에서 더 큼을 확인함 (Figure 3). 이는 상대적으로 민감도가 낮아 고용량의 방사선을 사용하여야 하는 comet assay 결과를 일반적으로 임상에서 환자의 치료에 사용하는 범위의 방사선량인 2~8Gy 정도에서 다시 한 번 확인하기 위한 것임.

Figure 3.



◆ 방사선 조사 후 세포주기변화 측정

방사선 조사 후 cell cycle pattern에서의 변화 확인을 위해 Flowcytometry analysis 수행하였고 G2/M phase 관련 molecules의 protein 및 phosphorylation level 변화를 western blot으로 확인함. 그 결과 basal level에서부터 C33aE6가 C33aV 보다 polyploidy가 많았고 C33aV에서는 방사선에 의한 G2/M arrest 후 정상 pattern으로 회복되어지는데 반해 C33aE6는 G2/M arrest의 지속 시간의 연장 및 많은 양의 polyploidy cell의 존재가 확인됨 (Figure 4 (a)).

◆ Western blot analysis를 통한 세포주기 관련 단백질의 변화

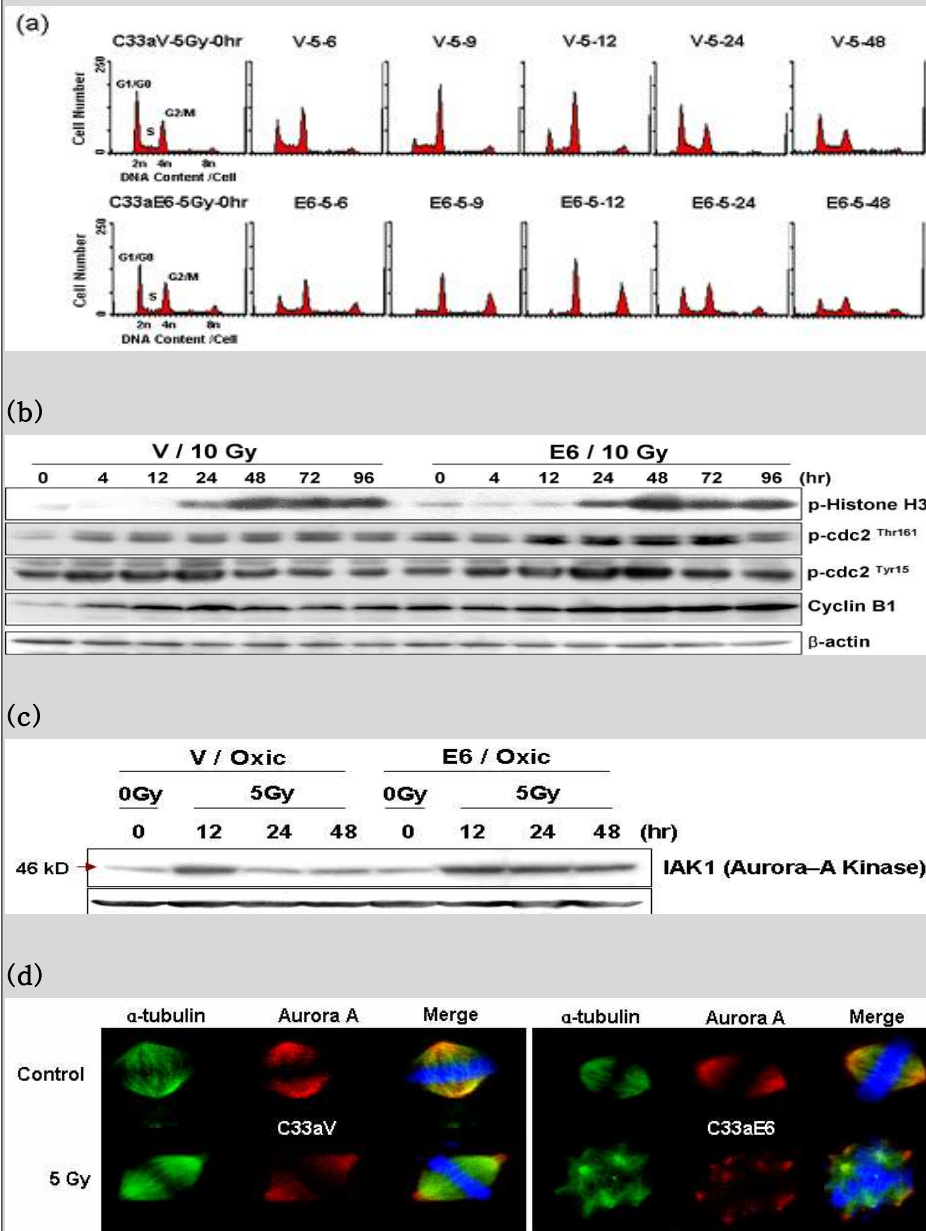
- Western blot data에서는 G2/M phase 관련 molecules 들이 전반적으로 C33aE6에서 V세포에 비해 조기에 발현하고 또한 양적으로 증가되어 있음을 발견하였고 이는 두 세포의 세포주기차이와 일치함 (Figure 4 (b)).

- 세포주기 관련 단백질중 두 세포에서의 두드러진 발현양상의 차이를 보였던 점은 mitotic kinase 중의 하나인 aurora-A 의 발현이며 방사선조사후 두 세포에서 모두 12시간째 증가되었으나 이러한 증가는 E6 세포에서만 48시간까지 유지됨을 발견함 (Figure 4 (c)).

◆ 세포 면역형광 염색을 통한 Aurora-A 와 Polyploidy 관찰

분열 중에 있는 세포들의 모습에서 특징적 변화를 살펴보기 위해 aurora A와 alpha-tubulin 그리고 chromosome을 target으로 immuno-fluorescence staining을 해본 결과 위 4번의 (c)번 figure에서 보여 지다시피 C33aE6에서 두드러지게 multi-centrosome이 관찰되었고, 세포분열이 정상적으로 이뤄지지 못함으로써 생긴 chromosome의 양적 증가를 보이는 비대 세포들이 눈에 띄게 증가되어 있었으며 비정상적으로 생겨난 mitotic spindle 관찰할 수 있었음 (Figure 4 (d)).

Figure 4. 방사선 조사 후 세포주기 변화 및 관련 단백질의 Western blot analysis

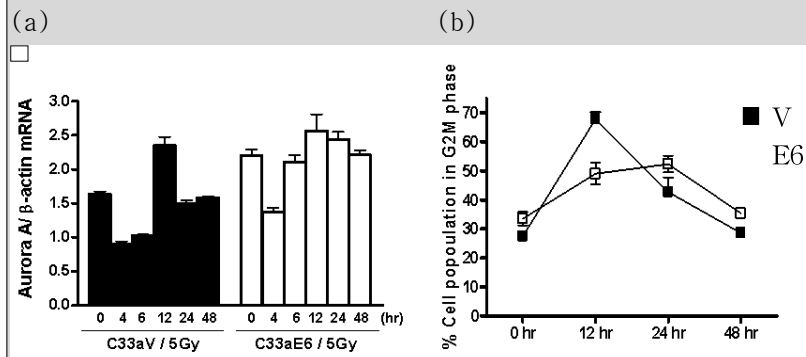


◆ Aurora-A 발현과 세포주기 관계조사

: aurora-A 의 과발현은 세포주기의 원인이 아니고 결과임

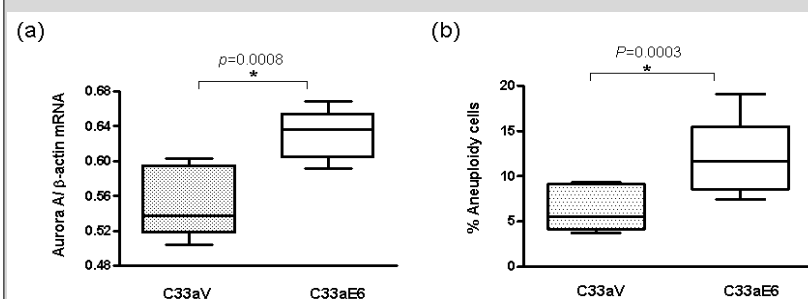
방사선조사 후 Aurora-A의 지속적 과발현이 E6 세포에 특이적이고 polyploidy 및 세포사의 원인이 되는 지를 조사하기 위해 real-time PCR 로 방사선조사후 time line 에 따라 aurora-A RNA 의 양적 측정을 한 결과 (Figure 5 (a)) E6 세포는 basal level부터 V 세포에 비해 aurora-A 발현 정도가 높고 이것은 basal G2M 세포주기에 있는 세포집단이 E6 세포주에서 더 높고 방사선 조사 후에도 G2M 세포주기의 분획과 aurora-A 의 양이 비례적으로 증가함을 관찰하여 aurora-A 의 과발현은 세포주기의 원인이 아니고 결과임을 알게됨 (Figure 5 (b)).

Figure 5. Quantitative measurement of aurora-A by real-time PCR (a) in comparison with the cell population in G2/M cell cycle phase



◆ 방사선조사 전의 basal aurora-A 발현 및 polyploidy 역시 일치함.

Figure 6. (a) Real-time PCR 로 측정된 aurora-A 의 양적 비교 및 (b) Basal aneuploidy level



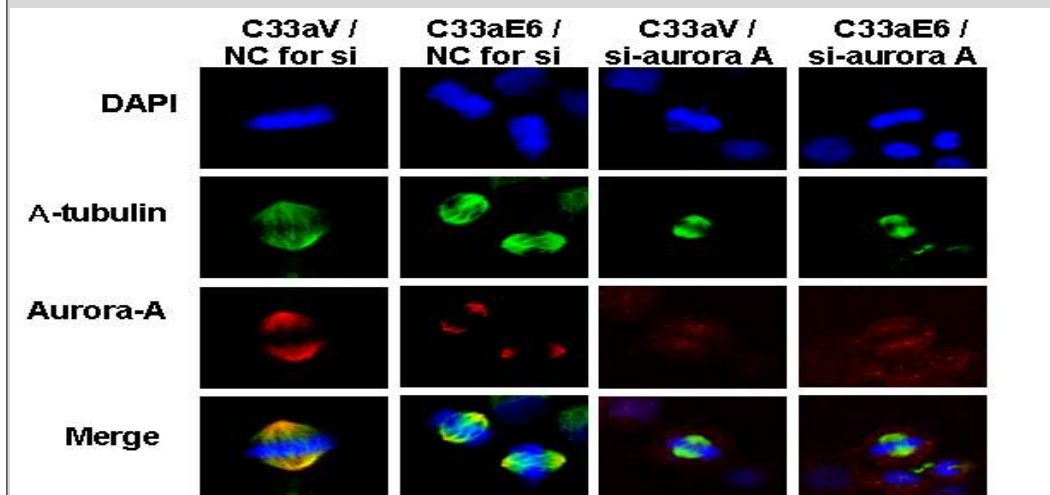
◆ si-aurora A 의 효과

위에서 보인 결과들을 일으키는데 있어서 aurora A가 미치는 직접적 영향을 살펴보고자 siRNA transfection에 의한 aurora A silencing 후 앞 실험들과 마찬가지로 방사선 민감성 조사, 방사선 조사에 의한 DNA 손상 복구 능력 및 cell cycle pattern에서의 변화들을 같은 방법으로 살펴보았음. 제작한 aurora A siRNA의 silencing efficiency는 RT-PCR과 Western blot 및 Immunofluorescent staining data에서 보여 지는 바와 같이 24시간의 transfection을 거쳐 방사선 조사 후 48시간 까지 유지되어지고 있었음 (Figure 7 (a)(b)(c)).

Figure 7. (a) Western blot (upper) and (b) RT-PCR (lower) of aurora-A after 24hr si-aurora A transfection



Figure 7 (b) Immunofluorescent observation of si-aurora A effect

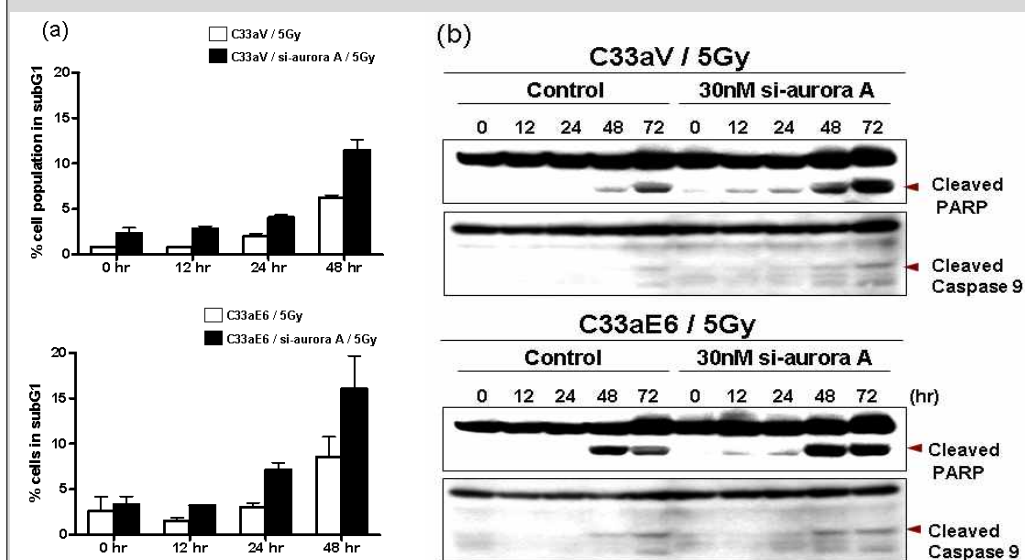


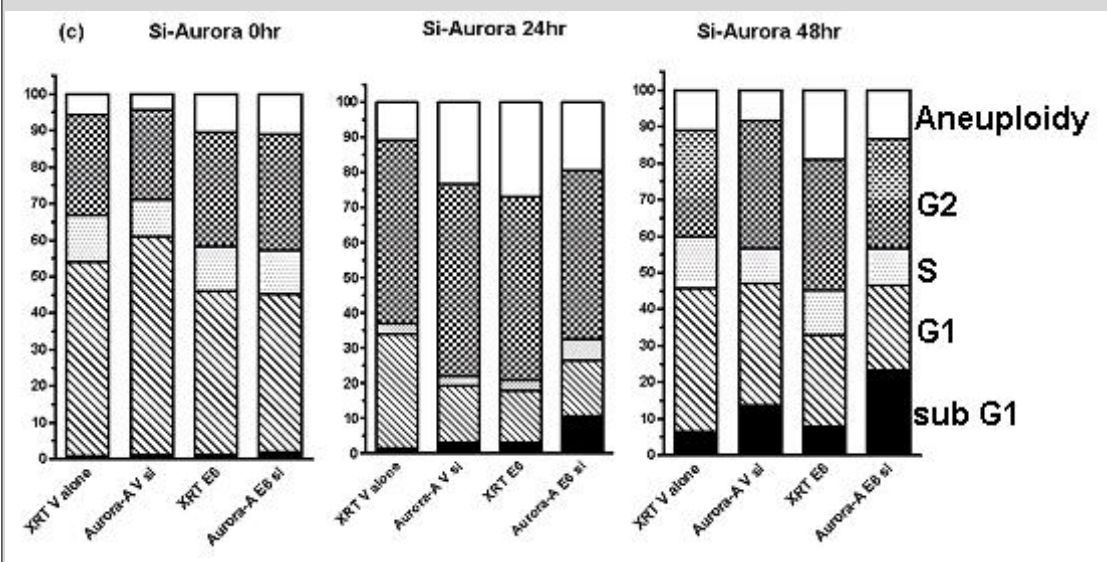
◆ 세포주기와 aneuploidy 에 대한 si-aurora A 의 효과

: Aurora-A 발현의 차단은 E6 세포의 방사선세포주기변화를 가져오지 않음

Aurora A의 silencing 결과V 세포에서는 12시간째 보였던 G2M cell population 이 감소하였으나 C33aE6에서는 세포주기에 대한 변화가 거의 관찰되지 않았음 (Figure 8 (c)). 또한 si-aurora A의 사용은 apoptosis를 나타내는 세포주기의 subG1 분획을 증가시켰으며 (Figure 8 (a)) 이는 cleaved poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP) 및 cleaved caspase9 등 apoptosis 관련단백질의 증가에 의해 확인됨 (Figure 8 (b)). 그러나 이러한 현상은 두 세포주에서 동일하게 나타나 두 세포에서의 방사선민감성차이를 설명할 수 없었음.

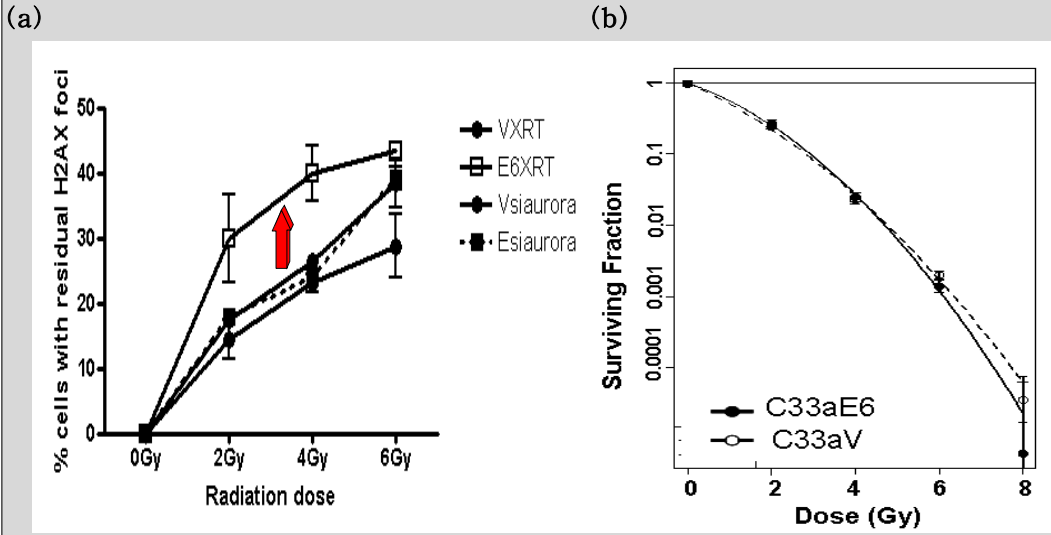
Figure 8. Increase in subG1 proportion after using si-aurora A (a) and increased apoptotic proteins in both cell lines (b)





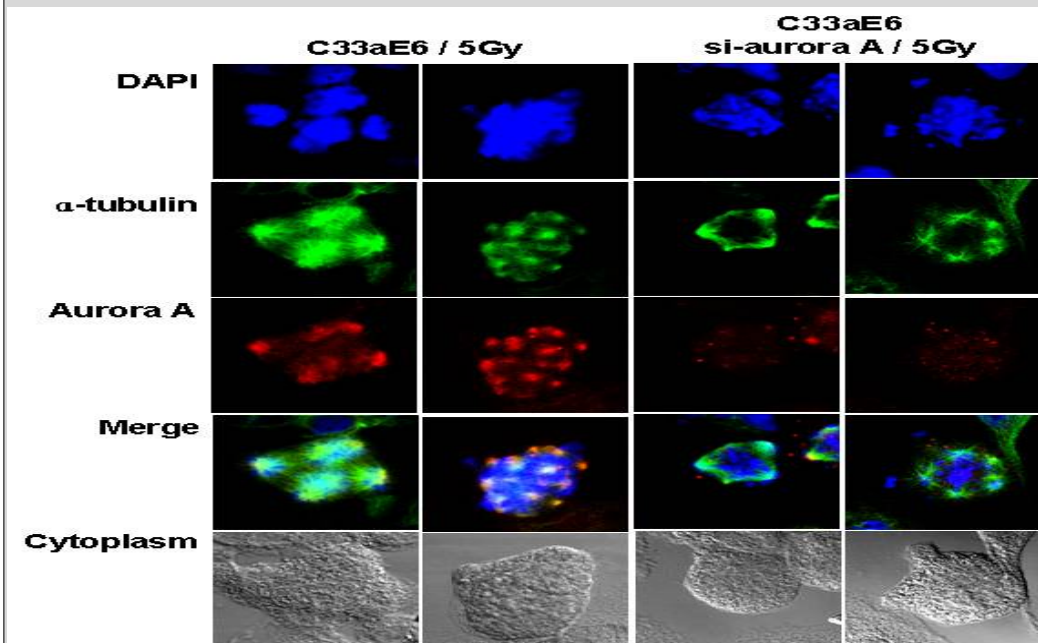
◆ DNA 손상과 방사선민감성에 대한 si-aurora A 의 효과  
 : Aurora-A 발현의 차단은 E6 세포의 DNA 손상을 감소시키고 두 세포간의 방사선민감성의 차이를 감소시킴.

Figure 9. si-aurora A 사용 후 residual gamma H2AX foci 는 E6 세포주에서 증가되며 (a, red arrow) 이는 clonogenic radiation survival 실험에서 E6 세포주방사선민감성의 감소로 나타남 (b). 결국 두 세포간에 보였던 방사선민감성의 차이 (Figure 1) 은 si-aurora A 의 사용으로 소실됨.



◆ si-aurora A 처리 후 E6 세포주의 면역형광염색촬영 -염색체의 misalignment 와 함께 fragmented chromosome 사이에  $\alpha$ -tubulin 이 섞여 있으며 cytoplasm 은 여전히 giant cell 형태를 띄우고 있음.

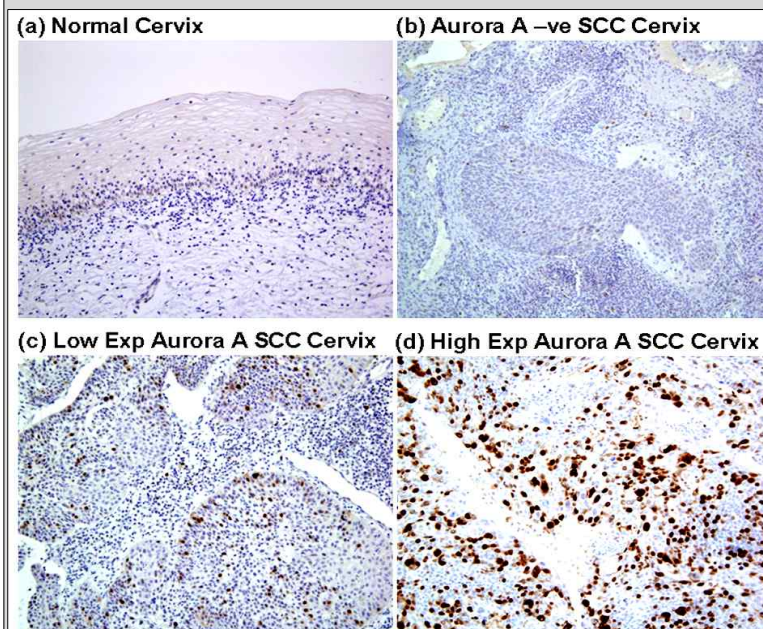
Figure 10.



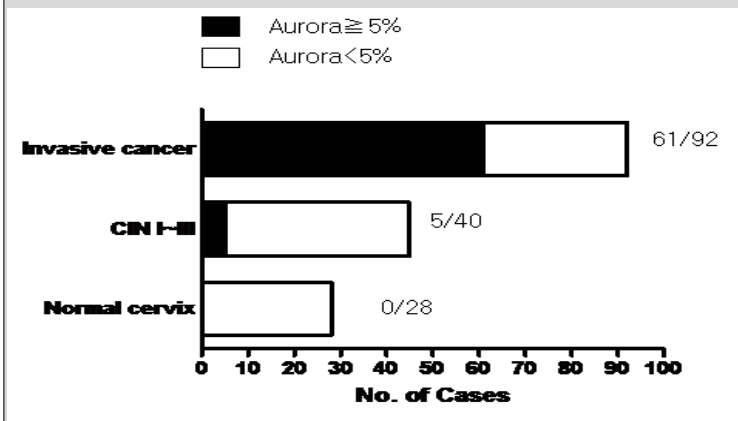
**Aurora-A**

1. 자궁경부암환자와 기타 인유두종바이러스 감염이 존재하는 종양샘플을 사용하여 aurora A의 발현 양상과 치료 예후의 관련성을 알아봄
  - pre-invasive stage의 상피세포내 암 (intraepithelial neoplasm) 이나 정상 cervical tissue에 비하여 침윤성 종양에서 aurora A의 과발현이 다수 나타남을 확인(그림 a)
  - 92명의 진행성 자궁경부암환자 대상으로 63.3%가 aurora A positive로 확인 (그림b)

(그림 a)

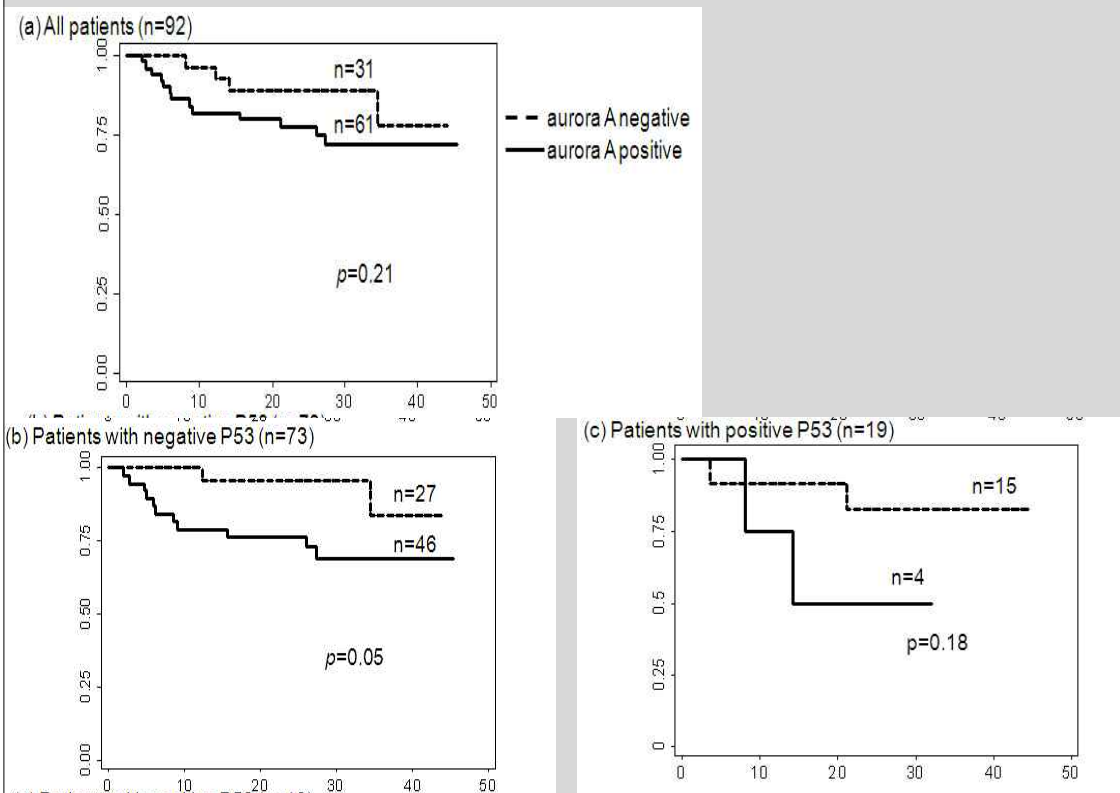


(그림 b)



그림(c) 에서와 같이 자궁경부종양에서 aurora-A 의 과발현은 p53 변이상태에 따라 그 예후적 의미가 달라짐을 알 수 있었음. 즉, p53 변이가 없는 종양에서 (면역염색상 P53 발현이 음성인 그룹) aurora-A 가 과발현되면 예후가 나빠지나 P53 이 양성이며 변이가 있는 종양에서는 aurora-A 현의 임상적 의미가 소실됨.

(그림 c)





2. 종양샘플을 이용한 위의 결과를 바탕으로 본 연구의 in vitro 결과인 HPV 감염 C33a 세포주가 parent cell 에 비해 방사선에 더 민감함이 실제 종양에서도 같은 결과를 보이는 지 증명할 것임. 특히 본 실험에서 사용한 세포주가 p53 변이가 있는 세포주이므로 종양샘플 또한 p53 변이가 있는 종양과 그렇지 않은 종양의 그룹으로 나누고 각 그룹에서 aurora-A 발현이 방사선민감성에 비슷한 영향을 주는 지를 조사할 것임. 이러한 연구의 결과는 인유두종감염 종양에서 aurora-A 가 치료의 표적으로 사용될 수 있는 지를 알 수 있게 하여주는 기초자료가 될 것임.

3. 상기 in vitro data 는 현재 International Journal of Radiation Biology 에 manuscript submission 준비중임.

### HPV DNA 와 방사선반응성

1. 종양내 HPV DNA 의 양을 median 값을 기준으로 low initial HPV load (점선) 과 high initial HPV load (실선) 으로 구분하였을 때 initial viral load 가 낮은 쪽이 방사선치료 후 예후가 나쁘다는 예비결과를 얻었고 (Table 1a, 그림 1a and 1c) 40세 이하의 젊은 나이, 4cm 이상의 큰 종양, 그리고 선암 조직학적 분류가 low HPV titer 와 관련이 있음을 발견하였음. 이러한 경향은 방사선치료 후 국소적인 재발과도 비슷한 결과를 보여 DNA viral load 가 방사선저항성과도 관계가 있음을 알 수 있었음 (table 1b).

2. 또한 HPV 유전자형 (genotype) 18번이 나쁜 예후와 관계됨을 알 수 있었으나 18번 형 바이러스의 수가 적어서 multivariate analysis 상에서는 borderline significance 의 통계적 유의성만 얻을 수 있었음 (Table 1a , b, 그림 1b and 1d).

Table 1a. Univariate and multivariate analyses for disease-free survival with clinicopathologic prognostic factors

	Univariate hazard ratio (95% CI)	p-value	Multivariate hazard ratio (95% CI)	p-value
Age*	0.90 (0.81, 0.99)	0.04	0.93 (0.83, 1.05)	0.24
HPV type18				
negative	1.00		1.00	
positive	2.65 (1.36, 5.17)	0.004	0.88 (0.39, 1.95)	0.75
HPV viral load				
> median	1.00		1.00	
≤ median	2.51 (1.39, 4.55)	0.002	2.79 (1.45, 5.38)	0.002
Stage group				
I	1.00		1.00	
II	2.15 (0.73, 6.28)	0.16	2.24 (0.75, 6.70)	0.15
III / IVA	7.11 (2.39, 21.18)	< 0.001	11.16 (3.58, 24.79)	<0.001

IVB	20.32 (6.17, 66.88)	< 0.001	22.41 (6.09, 82.52)	<0.001
Histologic Grade				
well/moderate	1.00		1.00	
poor	2.25 (1.23, 4.12)	0.01	2.24 (1.17, 4.29)	0.15
Histology type				
AD/ASC	1.00		1.00	
SCC	0.41 (0.19, 0.88)	0.02	0.38 (0.16, 0.92)	0.03
Tumor size				
< 4 cm	1.00			
≥ 4 cm	2.07 (0.13, 3.79)	0.02		
Smoking				
never	1.00			
ever	0.83 (0.37, 1.84)	0.64		

Abbreviations:AD/ASC, adenocarcinoma/adenosquamous carcinoma; SCC, squamous cell carcinoma; IQR, interquartile range

\* 5-year increase in age

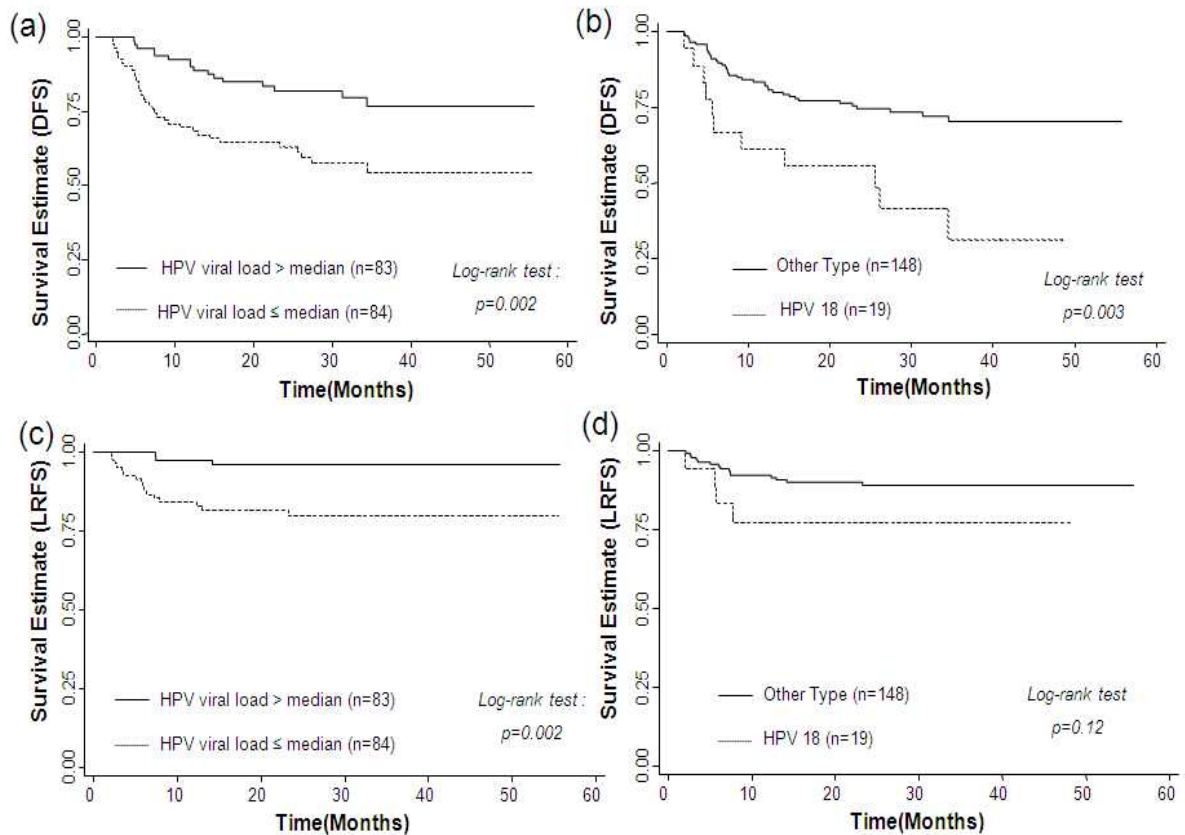
Table 2b. Univariate and multivariate analyses local recurrence-free survival with clinicopathologic prognostic factors

	Univariate hazard ratio (95% CI)	p-value	Multivariate hazard ratio (95% CI)	p-value
Age*	0.91 (0.77, 1.07)	0.24	0.02 (0.00, 11.89)	0.24
HPV type18				
negative	1.00		1.00	
positive	2.32 (0.77, 6.99)	0.14	1.23 (0.34, 4.51)	0.76
HPV viral load				
> median	1.00		1.00	
≤ median	5.82 (1.70, 19.99)	0.005	6.03 (1.65, 21.96)	0.007
Stage group				
I	1.00		1.00	
II	0.96 (0.25, 3.72)	0.96	0.93 (0.23, 3.79)	0.91
III / IVA	3.33 (0.86, 12.90)	0.08	5.04 (1.25, 20.35)	0.02
IVB	3.02 (0.50, 18.08)	0.23	1.56 (0.21, 11.64)	0.66
Histologic Grade				
well/moderate	1.00		1.00	
poor	3.38 (1.36, 8.41)	0.01	3.77 (1.37, 10.32)	0.01
Histology type				

AD/ASC	1.00		1.00	
SCC	0.34 (0.11, 1.02)	0.05	0.67 (0.18, 2.46)	0.55
Tumor size				
< 4 cm	1.00			
≥ 4 cm	4.49 (1.31, 15.41)	0.02		
Smoking				
never	1.00			
ever	1.44 (0.48, 4.35)	0.51		

Fig. 1. Disease-free survival by (a) HPV DNA titer (b) HPV genotype 18

Local recurrence-free survival (c) HPV DNA titer (d) HPV genotype 18



3. 그런데 이러한 결과는 18번 유전자형에서 특히 viral load 가 평균적으로 매우 적기 때문에 이러한 유전형에 의해 영향 받을 수 있으므로 18번을 제외한 16번 그룹에서만 재 분석하였을 때도 역시 같은 결과를 보여 (HPV viral load 가 낮은 군에서 예후가 나쁨) HPV viral load 가 매우 중요한 예후인자임을 다시 보여줌 (supplementary table 1a and 1b).

Supplementary Table 1a. Univariate and multivariate analyses for disease-free survival with clinicopathologic prognostic factors in patients with HPV type 16 tumors

	Univariate hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> -value	Multivariate hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> -value
Age*	0.89 (0.77, 1.02)	0.09	0.92 (0.75, 1.07)	0.10
HPV viral load				
> median 382.3 (IQR, 24-1120)	1.00			
≤ median	2.56 (1.11, 5.89)	0.03	3.17 (1.31, 7.71)	0.01
Stage group				
I	1.00			
II	2.54 (0.56, 11.48)	0.23	5.77 (1.02, 32.59)	0.05
III / IVA	8.80 (1.93, 40.20)	0.01	29.86 (4.94, 180.52)	< 0.001
IVB	25.42 (4.18, 154.56)	<0.001	35.06 (3.63, 338.60)	0.002
Histologic Grade				
well/moderate	1.00			
poor	2.97 (1.25, 7.08)	0.01	2.37 (0.84, 6.88)	0.11
Histology type				
AD/ASC	1.00			
SCC	0.33 (0.11, 0.97)	0.04	0.20 (0.06, 0.69)	0.01
Tumor size				
< 4cm	1.00			
≥ 4cm	1.48 (0.67, 3.27)	0.33		
Smoking				
never	1.00			
ever	0.93 (0.32, 2.71)	0.90		

Supplementary Table 1b. Univariate and multivariate analyses for local recurrence-free survival with clinicopathologic prognostic factors in patients with HPV type 16 tumors

	Univariate hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> -value	Multivariate hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> -value
Age*	0.74 (0.56, 0.96)	0.03	0.75 (0.49, 1.13)	0.17
HPV viral load				
> median 382.3 (IQR, 24-1120)	1.00		1.00	
≤ median	7.44 (0.92, 60.51)	0.06	26.82 (1.85, 388.48)	0.02
Stage group				
I	1.00		1.00	

II	1.32 (0.14, 12.65)	0.81	0.59 (0.03, 11.42)	0.73
III / IVA	6.01 (0.67, 53.84)	0.11	8.00 (0.37, 172.58)	0.18
IVB	NA	NA	NA	NA
Histologic Grade				
well/moderate	1.00		1.00	
poor	2.25 (0.45, 11.13)	0.32	12.93 (1.57, 106.78)	0.02
Histology type				
AD/ASC	1.00		1.00	
SCC	0.51 (0.06, 4.16)	0.53	0.22 ( 0.02, 2.99)	0.25
Tumor size				
< 4 cm	1.00		1.00	
≥ 4 cm	6.47 (0.80, 52.59)	0.08	7.68 (0.54, 108.93)	0.13
Smoking				
never	1.00		1.00	
ever	3.36 (0.80, 14.07)	0.10	16.40 (1.90, 141.78)	0.01

4. 또한 조기병소와 진행된 병소가 각기 같은 결과를 보이는 지를 알기 위해 Stage I/II 와 stage III/IV 군을 다시 나누어 subgroup analysis 를 시행하여 같은 결과를 얻음 (HPVviral load 가 낮은 군에서 예후가 나쁨) (supplementary table 2a and 2b).

Supplementary Table 2a. Univariate and multivariate analyses for disease-free survival with clinicopathologic prognostic factors in patients with FIGO stage group I/II

	Univariate hazard ratio (95% CI)	p-value	Multivariate hazard ratio (95% CI)	p-value
Age*	0.89 (0.77, 1.03)	0.11	0.90 (0.77, 1.05)	0.19
HPV type18				
negative	1.00		1.00	
positive	2.56 (0.95, 6.85)	0.06	0.91 (0.28, 2.96)	0.87
HPV viral load				
> median 238.8 (IQR, 18.4-1120)	1.00		1.00	
≤ median	3.39 (1.35, 8.55)	0.01	3.39 (1.22, 9.43)	0.02
Stage group				
I	1.00		1.00	
II	2.16 (0.74, 6.32)	0.16	2.226 (0.73, 6.80)	0.16
Histologic Grade				
well/moderate	1.00		1.00	

poor	2.97 (1.30, 6.80)	0.01	2.87 (1.14, 7.19)	0.02
Histology type				
AD/ASC	1.00		1.00	
SCC	0.36 (0.13, 0.96)	0.04	0.60 (0.20, 1.82)	0.37
Tumor size				
< 4 cm	1.00			
≥ 4 cm	1.30 (0.58, 2.91)	0.52		
Smoking				
never	1.00			
ever	1.56 (0.62, 3.93)	0.35		
Supplementary Table 2b. Univariate and multivariate analyses for local recurrence-free survival with clinicopathologic prognostic factors in patients with FIGO stage group I/II				
	Univariate hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> -value	Multivariate hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> -value
Age*	0.86 (0.69, 1.08)	0.19	0.86 (0.67, 1.12)	0.26
HPV type 18				
negative	1.00		1.00	
positive	2.48 (0.53, 11.68)	0.25	1.00 (0.15, 6.72)	1.00
HPV viral load				
> median 238.8 (IQR, 18.4–1120)	1.00		1.00	
≤ median	4.31 (0.92, 20.30)	0.07	3.20 (0.65, 15.89)	0.15
Stage group				
I	1.00		1.00	
II	0.97 (0.25, 3.75)	0.96	0.96 (0.23, 4.06)	0.96
Histologic Grade				
well/mod	1.00		1.00	
poor	4.52 (1.31, 15.63)	0.02	4.54 (1.17, 17.65)	0.03
Histology type				
AD/ASC	1.00		1.00	
SCC	0.41 (0.09, 1.94)	0.26	0.93 (0.15, 5.55)	0.93
Tumor size				
< 4 cm	1.00			
≥ 4 cm	2.52 (0.65, 9.76)	0.18		
Smoking				
never	1.00			
ever	3.14 (0.89, 11.13)	0.08		

5. Multivariate Cox analysis에서 얻은 변수를 바탕으로 모든 환자들을 재발이 높은 순서로 나열한 뒤 세등분하여 high, intermediate, low risk 의 세 군으로 나누어 survival analysis 를 하였을 때 세 그룹이 순서대로 생존율의 차이를 보여 본 연구의 결과가 매우 적합함을 internal validation 하였다 (Table 3a, 3b, Figure 2)

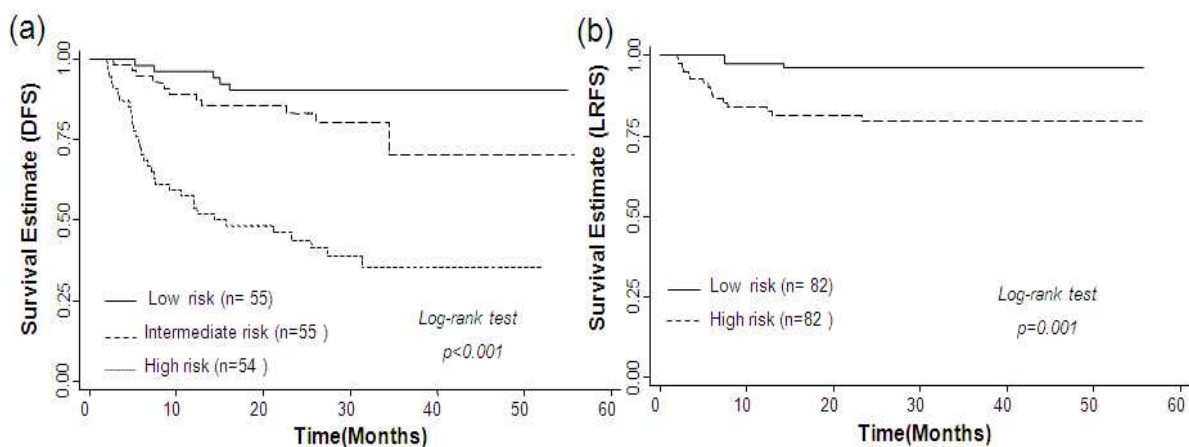
Table 3a. Hazard ratios (HR) of disease-free survival according to risk probability

Risk group	Range of risk probability	No. of Patients (%)	Event (%)	Disease-free survival		
				HR	95% CI	p-value
Low	< 0.096	55 (33.5)	5 (9)	1.00		
Intermediate	0.096–0.3	55 (33.5)	12 (22)	2.53	(0.89, 7.19)	0.08
High	0.3 <	54 (33)	33 (61)	10.05	(3.91, 25.82)	< 0.00

Table 3b. Hazard ratios (HR) of local recurrence-free survival according to risk probability

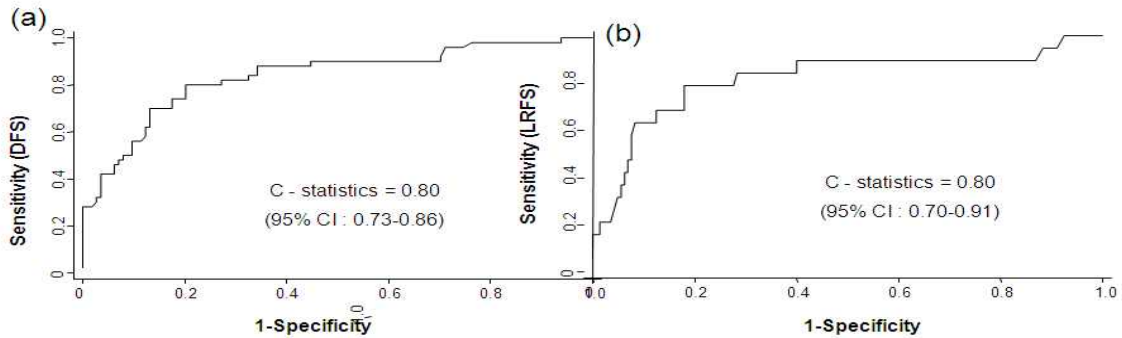
Risk group	Range of risk probability.	No. of Patients (%)	Event (%)	Disease-free survival		
				HR	95% CI	p-value
Low	< 0.076431	82 (50)	3 (7)	1.00		
High	0.076431 ≤	82 (50)	16 (20)	5.97	(1.74, 20.48)	0.005

Fig. 2. Disease-free survival (a) and Local recurrence-free survival (b) by risk group



6. Receiver Operating Curve에서 본 연구의 모델이 좋은 예측도를 가지고 있음을 증명함.

Fig. 3. Receiver operating characteristic(ROC) curves for (a) Disease-free survival and (b) Local recurrence-free survival

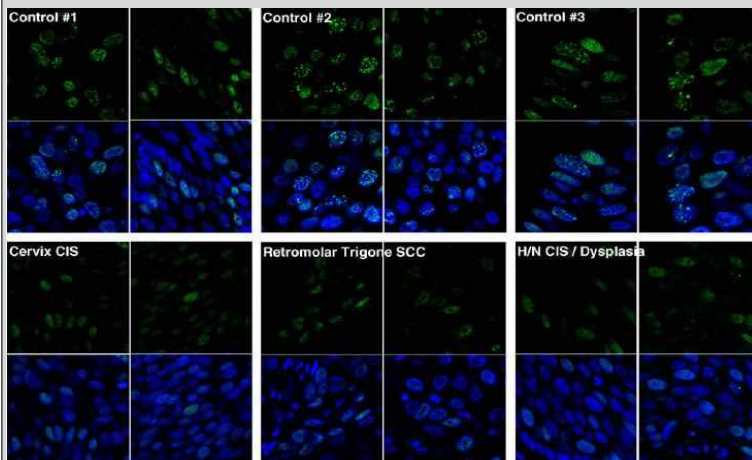


7. 상기결과는 2009.10 Journal of Clinical Oncology 에 출판됨.

### Fanconi Anemia 유전자와 방사선반응성

1. Fanconi Anemia (FA) 유전자변이를 가진 FA 환자들은 anemia 의 증상뿐 아니라 다양한 신체적인 이상을 가지며 20대를 지나 생존할 경우 급성 백혈병을 비롯한 고형암에 걸릴 확률이 매우 높아짐은 이미 알려져 있으며 특히 여러 가지 항암제에 대한 민감성도 매우 높다는 것이 최근 알려졌다. 이것은 특히 Mitomycin C 같은 cross-linking agent 로 분류되는 항암제가 FANCD2 gene 에 의존하는 DNA 복구체계에 의해 그 독성이 좌우되기 때문이다. 최근 특히 BRCA1 이 FANCD2 와 같은 기능을 하는 유전자이라는 것이 알려지면서 FA 유전자가 DNA double strand break 와도 관계가 있음이 알려졌는데 따라서 ionizing radiation 의 경우에도 FA 환자들은 매우 높은 민감성을 가질 것이라는 것은 예측되고 있으나 아직 이를 뒷받침할 만한 방사선관련 데이터는 별로 없다.

2. 본 연구에서는 모두 다섯 군데에서 발생한 편평상피암을 진단받은 35세 여자환자를 대상으로 이 환자의 종양에서 monoubiquitylated FANCD2 foci 를 조사하여 이 단백질의 발현부재로 Fanconi Anemia 의 진단을 내릴 수 있었던 case 를 report 하였다. 이 환자의 모든 종양에서 HPV 16번 type 의 viral DNA 가 검출되었고 이는 FA 환자에서 특히 HPV infection 이 carcinogenesis 에 중요한 역할을 함을 시사하는 또 하나의 문헌이 되었다.



> 사진은 monoubiquitylated FANCD2 foci를 전혀 찾을 수 없는 FA 환자의 자궁경부암, 두경부암조직(하단 세 사진)을 보통의 자궁경부암조직에서 FANCD2 foci를 볼 수 있는 조직들과 비교함. 즉, FA 환자의 종양에서는 DNA damage repair pathway 중 FA-BRCA pathway 의 기능이 소실되어있음을 알 수 있음.



### 3. 연구결과 고찰 및 결론

- ◆ Aurora-A 의 basal level 이 C33a 세포주에서 E6 의 존재하에 증가되어 있다는 우리의 관찰은 C33a 세포주의 변이된 p53 은 E6 단백질에 의해 분해될 수 있다는 사실을 고려할 때 (Crook T. et al. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* 1991;6:873) 변이된 p53 기능을 보충하여 세포의 유전적 안정성을 유지하기 위해 E6 세포에서 constitutional 하게 증가되어 있을 가능성이 있다고 생각됨 (Mao J-H et al. Crosstalk between Aurora-A and p53: Frequent deletion or downregulation of aurora-A in tumors from p53 null mice. *Cancer Cell* 2007;11:161).
- ◆ 한편 aurora-A 는 p53 변이가 있는 C33a 세포주에서 HPV16E6 바이러스 유전자에서 유전적 불안정성을 일으키는 중요인자로 작용하고 이러한 배경은 방사선조사 후 나타나는 polyploidy cell population을 증가시키고 mitotic catastrophe 에 의한 세포사를 조장하기는 하지만 si-aurora A 의 사용이 E6 세포의 세포주기양상에는 거의 영향을 미치지 않고 오히려 DNA 손상에 큰 변화를 일으키는 것으로 보임. 따라서 aurora-A 는 E6 세포주에서 double strand DNA damage pathway 에 작용하여 E6 의 방사선민감성을 향상시키는 것으로 보임.
- ◆ 따라서 임상시험에서 시도되고 있는 aurora-A 차단제는 P53 변이의 빈도가 많은 여러 가지 고형종양에서 차별적으로 사용되어야 할 필요가 있을 것으로 생각되며 인유두종바이러스의 감염이 있는 자궁경부암환자에서 방사선민감성을 향상시키기 위하여 사용될 수 있는 방법이 될 가능성이 있음을 시사함.
- ◆ 이러한 잠정적 결론을 악성 고형종양에 일반적으로 적용시킬 수 있을 것인가를 연구하기 위하여 p53 변이와 aurora-A 의 발현정도를 HPV infection 이 있고 없는 두경부종양에서 연구해 볼 것이며 또한 자궁경부암의 p53 변이를 면역염색 외에도 유전자의 full sequencing을 통하여 조사할 것임.
- ◆ 또한 본 연구자는 Journal of Clinical Oncology 에 발표된 결과의 기전적인 문제를 연구하기 위하여 (HPV DNA viral load 와 자궁경부암의 예후) 이것이 viral E6 의 양과 같은 관계를 가지는 지 밝히기 위하여 E6 유전자의 real-time PCR 을 시행하기로 함.
- ◆ HPV DNA viral load 와 유전형이 방사선치료 결과에 미치는 영향에 대한 연구는 바이러스관련 예후인자로 과거에 연구되어 왔었던 종양의 예후인자가 주로 환자관련 요소 였던 것을 생각하면 매우 획기적인 발견으로 생가고디며 자궁경부암의 예후인자로서 그 인용도가 매우 높아지리라 여겨짐.
- ◆ Fanconi Anemia 관련 연구 또한 FA 유전자 질환이 radiation hypersensitivity syndrome 으로 분류되어야함을 증명하는 논문으로써 중요성이 매우 높다고 생각됨.

#### 4. 연구성과 및 목표달성도

##### (1) 연구성과

###### 가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 <sup>1)</sup> )	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
Low initial HPV viral load implicates worse prognosis in patients with uterine cervical cancer treated with radiotherapy.	제1저자및 교신저자	Journal of Clinical Oncology (17.157)	2009 Oct 20;27(30):5088 -93	국외 SCI	0810270
Synchronous multifocal HPV-related neoplasm involving both the genital tract and the head-and-neck area: A case report of Fanconi anemia.	교신저자	Radiotherapy and Oncology (4.07)	2006; 53(3):339-45	국외 SCI	0810270
Endogenous and radiation-induced expression of gammaH2AX in biopsies from patients treated for carcinoma of the uterine cervix.	공동저자	Radiotherapy and Oncology (4.07)	2009 Nov 9. [Epub ahead of print]	국외 SCI	없음
GammaH2AX expression in tumors exposed to cisplatin and fractionated irradiation.	공동저자	Clinical Cancer Research (6.25)	15(10), 3344-3353	국외 SCI	없음
Cyclooxygenase-2 Up-Regulates Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related through Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation.	공동저자	Molecular Cancer Research (4.317)	Vol:7(7)/1158-68	국외 SCI	없음

###### 나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호

1) 지역 : 국내, 국외

###### 다. 산업재산권

구분 <sup>1)</sup>	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
고위험군 viral oncogene E6의 방사선민감성에 끼치는 영향을 연구하여 방사선치료 효과를 향상시킬 수 있는 분자생물학적 타겟을 밝힘.	1차년도	HPV16E6-transfected C33a cervical cancer cell line의 radiosensitivity를 control cell line과 비교	In vitro Radiosensitivity of E6-transfected cervical cell line	100	50
		In vitro radiosensitivity 차이의 기전연구	Molecular mechanism of the underlying radiosensitivity of E6-transfected cells	100	50
	2차년도	HPV viral DNA load 와 genotype이 자궁경부암의 예후에 미치는 영향연구	Viral DNA 가 양적으로 적을 수록 방사선치료 후 자궁경부암의 예후가 나빠지며 또한 특정 바이러스 유전자형이 (HPV 18) 나쁜 예후와 관계됨을 제시함.		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
고위험군 인유두종바이러스16번의 E6 유전자가 방사선민감성에 미치는 영향을 in vitro에서 밝힐 수 있었는가.	In vitro radiosensitivity 를 측정하였고 이 결과 E6 종양유전자의 존재가 오히려 방사선민감성을 증가시킴을 알 수 있었고
애초에 세운 여러 가지 p53 변이형에 따른 E6의 효과에 대한 연구	임상적으로 쉽게 측정할 수 있는 바이러스의 성상을 이용하여 자궁경부암의 방사선치료 성적을 예측할 수 있는 방

는 수행하지 못하였으나 바이러스 DNA 의 양과 유전자형이 자궁경부암 치료에 어떠한 영향을 주는 지에 대한 영향을 연구하여 성과를 냄.	법을 제시하였으며 이는 매우 독창적인 결과로 high impact journal 에 실릴 수 있었음.
---	--

## 5. 연구결과의 활용계획

### (1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

- ◆ 이러한 잠정적 결론을 악성 고형종양에 일반적으로 적용시킬 수 있을 것인가를 연구하기 위해 p53 변이와 aurora-A 의 발현정도를 HPV infection 이 있고 없는 두경부종양에서 연구해 볼 것이며 한 자궁경부암의 p53 변이를 면역염색 외에도 유전자의 full sequencing을 통하여 조사할 것임.
- ◆ 또한 본 연구자는 Journal of Clinical Oncology 에 발표된 결과의 기전적인 문제를 연구하기 위하여 (HPV DNA viral load 와 자궁경부암의 예후) 이것이 viral E6 의 양과 같은 관계를 가지는 지 밝히기 위하여 E6 유전자의 real-time PCR 을 시행하기로 함.
- ◆ 이러한 연구의 결과는 HPV 관련 암이 바이러스관련암의 25% 정도를 차지함을 고려할 때에 과학적 측면에서의 기여도가 매우 높을 뿐 아니라 논문성과에 있어서도 2년 내에 high impact factor journal 에 출판될 수 있는 소지가 매우 높다고 예측됨.

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	Journal of Clinical Oncology Cancer Research
산업재산권 등록		
기 타		

### (2) 연구성과의 활용계획

- ◆ 임상시험에서 시도되고 있는 aurora-A 차단제는 P53 변이의 빈도가 많은 여러 가지 고형종양에서 차별적으로 사용되어야 할 필요가 있을 것으로 생각되며 인유두종바이러스의 감염이 있는 자궁경부암환자에서 방사선민감성을 향상시키기 위하여 사용될 수 있는 방법이 될 가능성이 있음.
- ◆ 따라서 본 연구자는 자궁경부암의 p53 변이를 연구하여 aurora-A 의 과발현과 p53 과의 관계를 조사하고 또한 in vitro에서 조사되었던 E6 유전자를 임상종양에서 정량화하여 aurora-A, p53, 그리고 viral E6 와의 관계를 밝히고자 계획하고 있으며 이는 이제까지 잘 알려지지 않았던 고위험군 인유두종 바이러스와 관련된 질환의 지극히 높은 방사선민감성의 기전을 규명할 수 있는 매우 중요한 연구가 되리라고 생각됨.

## 6. 참고문헌

○ 본문에 기재 되어 있음.

## 7. 첨부서류

논문 파일 첨부.