

두경부 편평세포암종의 발암 원인으로 인간유두종 바이러스(Human Papilloma Virus)의 역할 및 이와 관련된 발암 기전에 관한 연구*

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹ 중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실,²
충남대학교 의과대학 이비인후과학교실,³
신동현¹ · 이세영² · 구분석³ · 김세현¹

= Abstract =

The Etiologic Roles and Carcinogenic Mechanisms of Human Papilloma Virus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*

Dong Hyun Shin, MD¹, Sei Young Lee, MD², Bon Seok Koo, MD³, Se-Heon Kim, MD¹

Department of Otorhinolaryngology,¹ Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

Department of Otorhinolaryngology,² Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Department of Otorhinolaryngology,³ Chungnam National University College of Medicine, Daejeon, Korea

Background : The most frequently reported risk factors for head and neck squamous cell carcinoma are smoking and alcohol. But in a recent overview, human papilloma virus (HPV) infection was revealed the important carcinogenic factor in oropharyngeal cancer. We aimed to clarify whether HPV directly effects on the oncogenesis and biologic behavior of head and neck squamous cell carcinoma by comparison with infection prevalence, and physical status of virus.

Material and Method : We used HPV genotyping DNA chip (Biocore, Korea, Seoul) arrayed by multiple oligonucleotide probes of L1 sequence of 26 types of HPV and HPV genotypes are identified by fluorescence scanner. The copy numbers of HPV E2 and E6 open reading frames (ORF) were assessed using a TaqMan-based 5'-exonuclease quantitative real-time PCR assay. The ratio of E2 to E6 copy numbers was calculated to determine the physical status of HPV-16 viral gene.

Results : We observed a significant difference in HPV prevalence between tonsillar cancer group and control group (73.1% vs. 11.6%), and most of the HPVs were type 16 (87.2%) and integrated (94.1%) state. In terms of oral tongue cancer, we demonstrate that 30.5% has integrated HPV-16 in cancer tissue. But Glottic cancer only 1% is related to HPV-16 integration.

Conclusion : This study revealed significant relationship of HPV prevalence with oropharyngeal and oral tongue squamous cell carcinoma. Most of HPV were 16 type and integrated or mixed, HPV-16 integration could be directly related to the carcinogenesis.

KEY WORDS : Human papillomavirus · Integration · Head and neck squamous cell carcinoma.

*본 연구는 2007학년도 연세대학교 의과대학 교수연구비로 이루어졌음.

교신저자 : 김세현, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 2228-3600 · 전송 : (02) 393-0580 · E-mail : shkimmd@yuhs.ac

서 론

두경부 편평세포암은 전체암 발병의 6% 정도의 빈도를 보이며, 이로 인한 사망률은 전체 암에 의한 사망률의 5%를 차지한다. 그러나 진행된 두경부암의 경우 5년 생존률은 20년 전과 비교해 의미 있는 진전을 보이지 못하였다. 수술법과 방사선 및 약물치료의 개발에도 불구하고 이런 결과를 보이는 이유는 두경부 편평세포암의 병인론적 기전이 아직 밝혀지지 않은 부분이 중요한 이유 중 하나라고 생각된다. 따라서 정확한 암형성과정의 원인 기전을 밝히는 것이 새로운 치료법 개발의 필수요소이고 환자의 생존률을 높이는데 꼭 필요한 부분이다. 두경부 편평세포암의 발생 위험인자로서 가장 흔한 것으로 밝혀진 것은 흡연과 음주 구강 위생 및 위식도 역류 등이 있으며, 자궁경부암 환자의 배우자 또한 고위험군인이라는 보고가 있다. 인간유두종바이러스(Human Papilloma Virus(HPV))와 편도암에 관한 최근 보고에 의하면, 전체 환자의 51%에서 HPV DNA를 가지고 있었고, 이 중 가장 흔하게 동정된 유형은 고위험군인 HPV-16라는 보고가 있다.¹⁾ 따라서 편도암의 발병기전에 있어 HPV가 관여한다고 추정할 수 있는데, 이는 바이러스 감염에 쉽게 노출 되기 때문이라고 생각 한다. 연구자 등은 선행 연구를 통하여 편도암의 발암 기전에 HPV가 유의한 역할을 함을 밝힌 바 있다.²⁾ 하지만, 편도 주변 기관에 대한 종양의 악성화에 있어 HPV가 직접적으로 연관이 있는지의 여부는 아직 불확실하다. 구인두와 인접한 구강 및 후두에서도 HPV의 감염으로 인한 유두종이 관찰되며, 이 부위도 고 위험군의 HPV에 감염시 종양 발발의 원인이 될 수 있을 것이라 유추할 수 있다.

현재까지 여러 연구를 통해 밝혀진 HPV의 자궁 경부암 생성과 연관된 분자생물학적 병인론을 요약하면 다음과 같다. HPV 단백질 E6는 p53의 분해를 촉진하고 E7은 pRb를 불활성화 시키고 이어서 숙주의 게놈으로 바이러스의 융합(integration)이 일어난다. 바이러스 융합과 관련한 유전자의 분리는 E2 ORF(open reading frame)에서 가장 흔하게 일어나지만, 소수의 환자들에서는 E1 ORF(open reading frame)에서 발생하기도 한다. 두 부분 모두 바이러스의 복제와 전사에 있어 중요하며, E2의 분리는 E6/E7 종양단백의 조절 장해를 초래하여 궁극적으로 악성화를 유발한다. 게놈내로 융합이 안 된 Episome 상태에서는 E6/E7의 전사 단계는 HPV에 감염된 세포 내 Promotor 인자에 의해 조절되는데 이것은 전사인자 YY1의 결합부위를 포함한 바이러스성 그리고 세포성 전사인자에 의해 영향을 받는다.^{3,4)}

따라서 각 해부학적 위치에 따른 두경부 편평세포암에서 HPV의 숙주 게놈내의 융합 여부를 포함한 physical status

를 분석하고 이와 관련된 종양 유발 유전자인 p16, skp1, survivin, cyclin A, cyclin B1, HIF-1a EGFR과 c-myc-p16의 발현을 알아봄으로써 HPV와 두경부 편평세포암 발생 기전과의 연관성을 규명하는 것은 새로운 시각에서 두경부 편평세포암의 병인 중 하나를 규명하는데 반드시 필요한 연구라 생각된다.

대상 및 방법

1. c-DNA chip을 이용한 편도암과 만성편도염 환자에서 HPV 유병률 비교

1) 조직 표본의 선택과 DNA 추출

1995년부터 2005년까지 기간 동안 연세대학교 의과대학 이비인후과 교실에서 편도의 편평세포암으로 수술 받은 52명, 구강설의 편평세포암으로 수술 받은 36명, 후두의 편평세포암으로 수술 받은 94명 환자의 조직을 대상으로 하였다(Table 1). 파라핀 블록으로 10 마이크로미터단위로 절편을 하여 DNA 추출을 위해 1.5ml 에펜도르프 튜브에 담았다. 상호 오염을 방지하기 위해 매번 마이크로톰날을 철저히 세척하고 난 후 각 블록을 절편하였다. 파라핀에 담긴 표본은 자일렌에 5분간 처리하고 이후 14000rpm의 속도로 원심분리하였다. QiaAmp DNA minikit(Qiagen, USA, CA)를 이용하여 DNA 를 추출하였다. 광밀도 측정을 하여 분리된 DNA의 양(260/280nm의 비율)과 질(260nm에서의 흡수)을 결정하였다. Positive control로 쓰일 CasKi 세포와 SiHa 세포는 적절한 배지에 약 5일간 동정하였다. (CasKi 세포와 SiHa 세포, RPMI 1600[Gibco-BRL, Grand Island, N.Y.]) 단층으로 배양된 세포에 대한 프로토콜에 의해 QiaAmp DNA minikit를 이용하여 DNA를 분리하였다.

2) DNA 칩을 이용한 HPV 유전자형 확정

26가지 HPV형의 L1 서열로 이루어진 다수의 올리고뉴클레오티드 탐침에 의해 배열된 HPV 유전자형 DNA 칩을 사용하였다(Biocore, Korea, Seoul) 상응하는 L1의 PCR 생성물을 HPV 칩의 배열된 탐침에 보합결합시키며, Cy3를 발광시키는 532-nm laser를 사용한 형광 스캐너로 HPV 유

Table 1. Distribution of stage in patients with head and neck cancers

| | PTC | GC | TC | Total |
|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Stage I | 2 (3.8%) | 25 (26.6%) | 10 (27.8%) | 37 (20.3%) |
| Stage II | 10 (19.2%) | 19 (20.2%) | 16 (44.4%) | 45 (24.7%) |
| Stage III | 9 (17.3%) | 13 (13.8%) | 3 (8.3%) | 25 (13.7%) |
| Stage IV | 31 (59.6%) | 37 (39.4%) | 7 (19.4%) | 75 (41.2%) |

전자형을 확인하였다. (GenPix 4000B, Axon Instruments Inc, USA, CA) 이후 그 특정 탐침의 발광도에 대한 결과는 엑셀 스프레드시트에 출력하였다.

2. HPV의 숙주 게놈내 Integration 여부 판정 및 Viral copy number 정량화

1) Real time quantitative PCR

TaqMan 5'-exonuclease에 의한 정량적 실시간 PCR 배열을 이용하여 HPV E2 ORF와 E6 ORF의 복제수를 산출하였는데, 여기서 각각 HPV-16 E2와 E6에 특정한 상보성 탐침 존재 하에 E2 ORF의 76-bp 서열과 E6 ORF의 81-bp 서열에 대한 DNA를 증폭시키는 PCR을 시행하였다. E2 배열에 대한 프라이머와 탐침은 E2 ORF의 E2 중심부위를 검출할 수 있도록 고안되었는데, 이는 자궁경부암에서 HPV-16 융합에 따라 흔히 삭제되는 부위이다. 각 표본에 대하여 HPV-16의 E6, E2 서열을 위한 동량의 DNA가 정량화되었다. 각 표본은 3차례 배열하였다. PCR 증폭은 1×iQ SuperMix(BioRad, Hercules, CA), 200nM E2, E6 특정 프라이머(Table 1), 100nM의 이중표지된 E2(5'Hex와 3'BHQ2), E6(5'FAM과 3'BHQ1) 발광성 상보결합성 탐침 그리고 genomic DNA 템플레이트 200ng이 포함된 25- μ l 용액에서 시행하였다. 모든 실험은 실시간 iCycler PCR 장비(BioRad, Hercules, CA)를 사용하여 진행하였다. 연속적인 희석을 통해 HPV 바이러스 복제수에 대한 표준 그래프가 산출되었는데, 여기서 매실험마다 각 genome당 600개(각 genome당 6.6pg의 DNA)에 상당하는 CasKi(Ameri-

can Type Culture Collection, Manassas, VA) cell line genomic DNA를 이용하였다. 증폭과정은 50°C에서 2분 그리고 95°C에서 10분간의 정제 단계와 이어서 녹는 단계를 위한 95°C에서 15초와 결합 단계를 위한 60°C에서 1분간의 두 단계 PCR 주기를 거쳐 총 45 주기로 이어지 과정을 포함하였다(Table 2). HPV-16 바이러스 유전자의 물리적 상태를 확인하기 위해 E6 복제수에 대한 E2 복제수의 비를 산출하였다. 순수 에피솜 형태(episomal state)의 HPV-16은 동량의 E2 유전자수와 E6 유전자수를 가질 것(다시 말해 E2/E6 비=1)으로 추정되었으나, 바이러스 융합에 따른 E2의 선택적 파괴로 인한 경우에는 E6 유전자수에 비해 E2 유전자수가 상대적으로 적을 것으로 예상되었다. 이는 곧, E2/E6 비가 1 미만일 경우에는 융합된 형태(integrated state)와 에피솜 형태(episomal state) 모두 존재함을 나타내나 비가 0일 경우에는 융합된 형태만 존재함을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 융합된 E6 유전자수는 E6 유전자 전체 수(에피솜 형태와 융합 형태)로부터 에피솜 형태의 E2 유전자수를 감하여 산출하였다. E2 대 융합 형태의 E6 유전자의 비는 융합된 형태에 대해 에피솜 형태의 양을 의미하는 것이다. 1미만의 값은 융합된 형태가 많음을 의미한다. E2(음성)와 E6(양성) 증폭에 대한 대조군으로 자궁경부암 세포로부터 얻어진 SiHa에서 추출한 DNA를 이용하였는데, 이는 순수한 융합 형태의 HPV-16 유전자를 포함하고 E2 ORF와 E4 ORF를 분열시키는 것으로 알려져 있다. 바이러스 복제의 상대적인 양은 E6 유전자수 대 SiHa 세포의 E6 유전자수의 비를 산출하여 추정하였다.⁵⁻⁷⁾

Table 2. Primers and probes used for real time PCR

| Name | Sequence | Tm(°C) |
|--------------|---|--------|
| Probe 16E2 | 5'-(Hex)-CACCCCGCCGCGACCCATA-(BHQ2)-3' | 70 |
| Primer 16E2F | 5'-AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAG-3' | 59 |
| Primer 16E2R | 5'-CCAAGGCGACGGCTTTG-3' | 60 |
| Probe 16E6 | 5'-(6-FAM)-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCCAGTT-(BHQ1)-3' | 69 |
| Primer 16E6F | 5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3' | 59 |
| Primer 16E6R | 5'-TGTATAGTTTTCAGCTCTGTGC-3' | 60 |

Table 3. Comparative prevalence of hpv in head and neck cancer

| | PTC | GC | TC | Total |
|---|------------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------|
| Number | 52 | 94 | 36 | 182 |
| HPV prevalence | 38 (73.1%) | 7 (7.4%) | 13 (36.1%) | 58 (31.9%) |
| HPV-16 prevalence | 34 (89.5%) | 3 (42.9%) | 11 (84.6%) | 48 (82.8%) |
| HPV-16 integration state | 32 (94.1%) | 1 (33.3%) | 6 (54.5%) | 39 (81.3%) |
| HPV prevalence in control | 8/61 ¹ (11.6%) | 0/15 ² (0) | 1/25 ³ (4%) | 9/101 (8.91%) |
| Significance of HPV association with cancer | <i>p</i> <0.0001 | <i>p</i> >0.05 | <i>p</i> >0.05 | <i>p</i> <0.001 |

PTC : palatine tonsillar cancer, GC : glottic cancer, TC : tongue cancer, Control 1 means chronic follicular tonsillitis, 2, vocal polyp, and 3, leukoplakia

3. 통계학적 분석

SAS software, version 9.1(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)으로써 교차 도표와 Fisher' exact test를 이용하여 HPV의 상태간의 상관성을 분석하였다.

결 과

1. 편도암, 구강설암, 후두암 환자에서 HPV 유형률

편도암 환자 52례 중 38례에서 HPV가 검출되었으며 (73.1%), HPV 양성 중앙 환자 중에서 34례가(65.3%) HPV-16 양성이었다. 나머지 4개의 표본은 HPV-18, 33, 35, 58 등의 16번 형이 아닌 고위험형 바이러스에 감염된 경우였다 복합 감염을 보인 환자는 없었다. 69개의 만성편도암 표본 중 8개에서 HPV가 검출되었다(11.6%) : 3개에서 HPV-16이 확인되었고 나머지는 HPV-58형과 저위험형 바이러스에 감염되었다(HPV-6, 11 혹은 84). 편도암은 HPV 감염과 통계학적으로 유의한 상관성을 보였다($p < 0.0001$ by Chi square). 36례의 구강설암 환자에서는 13례(36.1%)에서 HPV가 검출되었으며, 이중 11례(30.5%)가 HPV-16에 양성을 보였다. 94례의 성문암 환자에서는 7례(7.4%)에서 HPV가 검출되었으며, 이중 3례(3.1%)가 HPV-16에 양성을 보였다(Table 3).

2. 바이러스의 물리적 상태 연구

연속적으로 희석한 HPV-16의 플라스미드 DNA를 이용한 E2 ORF와 E6 ORF에 대한 실시간 증폭 시스템상 둘 간의 흡사한 증폭 그래프를 통해 볼 때 비슷한 증폭 효율을 보임을 알 수 있었다. HPV-16의 E2와 E6의 물리적 상태와 복제수에 대한 결과는 Table 2에 나타나 있다(Table 2). 융합 형태의 E6는 E6의 값으로부터 E2의 값을 감하여 산출되었다. E2 대 융합형 E6의 비는 융합형에 대한 에피솜 형태의 양을 대표하였다. 1보다 작은 값은 융합형이 지배적임을 나타냈다.

본 연구의 결과상에서는 총 52례의 편도암 조직 중 34례의 HPV-16 양성 편도암의 94.9%에서 HPV-16 융합이 나타났다. 이 중에는 E2 서열을 확인할 수 없는 14개의 표본(41.2%)과 E2/ E6 의 비가 0과 1사이의 값을 갖는 총 18개의 표본(52.9%)을 포함하였다. 이는 각각 숙주 게놈에 바이러스 유전자가 완벽히 융합되었다는 것과 융합형과 에피솜 형태가 혼합되어 존재한다는 것을 의미한다. 총 36례의 구강설암 조직 중 11례가 HPV-16 양성을 보였으며 이중 6례(54.5%)에서 HPV-16 융합이 나타났다. 총 94례의 성문암 조직 중 3례의 성문암 조직에서 HPV-16 양성을 보였으며, 이중 1례(33.3%)에서 HPV-16 융합이 나타났다(Table 3).

고 찰

HPV가 두경부 편평세포암종과 관련이 있다는 보고는 많으나,⁸⁾ 기존의 연구는 HPV의 존재를 면역화학염색, PCR, 또는 in situ hybridization등에 의한 검출법으로 HPV의 유전자가 핵의 염색체에 융합된 상태(integrated state)인지 아니면 기회 감염 등에 의해 중앙의 형성과는 직접적 상관성이 없이 에피솜 형태(episomal state)로 발견되는지의 구분이 안되어 있는 상태였다. 제한효소에 의한 분해, 결합과 역 PCR 방법을 이용하여 HPV의 물리적 상태를 밝힌 최근 한 논문에서는 전체 22개의 편도암 표본에서 HPV가 검출 가능했던 11례(50%)에서 모두 에피솜 형태로 존재한다는 보고도 있으나,⁸⁾ Koskinen 등의 연구에 의하면 두경부암 23례에서 HPV-DNA 중 65%에서 융합형 혹은 혼합형으로 존재한다고 보고한 바 있다.⁹⁾

본 연구는 이러한 문제점에 대한 궁극증을 확인하고자 DNA 칩을 이용하여 HPV의 유형별 감염 빈도를 조사하였고, HPV-16감염의 경우 감염 상태가 중앙 형성과 직접적 영향이 있는 숙주내 염색체로 HPV의 유전자가 융합된 상태인지 아니면 에피솜 상태로 존재하는지를 분석하였다. 본 연구 결과에 의하면 전체 편도편평세포암종 환자 52례 중 38례(73.1%)에서 HPV가 검출되었으며, 이 HPV 양성 중앙 환자 중에 34례(65.3%)는 HPV-16형 양성이었다. 나머지 4례는 HPV-18, 33, 35, 58 등 다른 고위험형 바이러스에 감염되었다. 저위험형 HPV 감염이 보고된 예는 없었으며 HPV 복합 감염도 역시 없었다. HPV-16에 감염이 확인된 34례 중 32례에서 숙주 염색체로 HPV 유전자의 융합이 존재하는 경우였다. 반면 구강설암에서는 36례 중 11례에서만 HPV-16양성을 보였고 이중 6례만(16.6%)만이 중앙세포의핵에 융합된 형태 즉 직접적 중앙 유발인자로 추정되 상대적으로 낮은 빈도를 보였다. 후두암에서는 94례 중 3례에서만 HPV-16양성을 보였고 이중 1례만(1%)만이 중앙세포의핵에 융합된 형태를 보여 HPV-16과 중앙 형성과는 관련이 없음을 보여 주었다.

HPV-16 양성 암종 환자에 여러 결실 부위들이 있음을 발견되었는데, 그 중 가장 흔한 부위로는 단백 '경첩' 부위에 해당하는 E2 ORF의 일부분이었다. 이러한 성질을 이용하여 HPV유전자 중 E2와 E6유전자의 quantitative real time PCR 결과의 비율로 HPV-16의 감염 상태가 융합형인지 에피솜 형태인지를 판단할 수 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 다량의 융합된 HPV-16는 자궁경부 상피내암의 빠른 진행과 밀접한 관련이 있다. 이전 여러 연구를 포함하여, 본 연구에서 편도편평세포암종에서 부분 혹은 완전 융합 상태의 HPV-16가 고빈도로 존재한다는 사실은 자궁경부암에서의 상황과 흡사한데, 바이러

스의 융합은 많게는 전체의 63~100%까지 검출될 수 있다. 실시간 PCR이라는 기술을 이용하여 편평상피암에서 HPV의 물리적 상태를 용이하고도 언제든지 재현 가능할 수 있게 분석한 경우는 더러 있었지만, 편도편평세포암중 에서 적용한 경우는 없었다. 본 연구의 결과상 HPV-16 양성 편도편평세포암중 환자의 94.9%에서 HPV-16 융합을 보였으며, 이 중 41.2%에서는 완벽한 융합을 보였고, 52.9%에서는 융합형과 episomal형의 혼합 형태가 존재함을 확인할 수 있었다.

결 론

연구자들의 실험 결과로 미루어 편도편평세포암중의 종양 형성 과정과 HPV감염과의 관계는 매우 상관성이 있다고 판단된다. 구강설암에서는 약 20% 미만의 빈도로 종양 형성에 직접적인 원인이 된다고 생각하며, 후두암에서는 HPV는 종양유발인자로는 상관성이 없다고 판단된다. 자궁 경부암의 병인으로 HPV의 중요성은 이미 많은 부분 밝혀졌고, 이로 인하여 HPV의 백신 개발이 이루어져 상용화 되기에 이른 점을 감안하면, 편도 및 구강의 편평세포암중의 예방 및 치료에 있어 새로운 시도가 가능하게 하리라 기대된다.

중심 단어 : 인간유두종 바이러스 · 두경부 편평세포암중.

References

- 1) D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer.* *N Engl J Med.* 2007;356(19):1944-1956.
- 2) Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, et al. *HPV Integration Begins in the Tonsillar Crypt and Leads to the Alteration of p16, EGFR, and c-myc During Tumor Formation.* *Int J Cancer.* 2007;120:1418-1425.
- 3) Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Ho-

- wley PM. *Complex formation of human papillomavirus E7 protein with the retinoblastoma tumor suppressor gene product.* *EMBO J.* 1989;8:4099-4105.
- 4) Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53.* *Cell.* 1990;63:1129-1136.
- 5) Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. *Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique.* *J Clin Microbiol.* 2002;40:886-891.
- 6) Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. *Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis.* *Int J Gynecol Pathol.* 1998;17:146-153.
- 7) Vernon SD, Unger ER, Miller DL, Lee DR, Reeves WC. *Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer.* *Int J Cancer.* 1997;74:50-56.
- 8) Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Makitie A, Back L, Kontio R, et al. *Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck.* *Int J Cancer.* 2003;107:401-406.
- 9) Venuti A, Manni V, Morello R, De Marco F, Marzetti F, Marcante ML. *Viral integration into the host genome occurred in 43% of cases of HPV-16 and in 20% of cases of HPV-6. Viral RNA expression was detected by reverse transcription-PCR only in HPV-16 positive tumors.* *J Med Virol.* 2000;60:396-402.
- 10) Si HX, Tsao SW, Poon CSP, Wong YC, Cheung ALM. *Physical status of HPV-16 in esophageal squamous cell carcinoma.* *J Clin Virol.* 2005;32:19-23.
- 11) Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. *Disruption of the E1 and E2 open reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis.* *Int J Gynecol Pathol.* 1998;17:146-153.
- 12) Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. *Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique.* *J Clin Microbiol.* 2002;40:886-891.