

中咽頭扁平上皮癌

: HPV 関連腫瘍と非関連腫瘍の臨床病理学的検討

利 安 隆 史

目次

I	要旨	1
II	序文	2
	・ 中咽頭癌について	
	・ HPV 関連頭頸部腫瘍の発症部位および中咽頭癌部位との関係	
	・ HPV とその発癌機構	
	・ 頭頸部癌における HPV 感染と疫学	
	・ 中咽頭癌の治療方法	
III	病理組織学的検討	
	背景	13
	・ HPV の検出方法	
	・ HPV 関連腫瘍の病理組織像	
	・ HPV 関連腫瘍の染色体不安定性と ECAC について	
	目的 方法	21
	結果	31
	考察 結論	49

IV	HPV 関連腫瘍と非関連腫瘍の治療予後に関する検討	
	背景	57
	・ 中咽頭癌の放射線治療	
	目的 方法	63
	結果	64
	考察 結論	68
V	まとめ	70
VI	謝辞	71
VII	参考文献	72

I. 要 旨

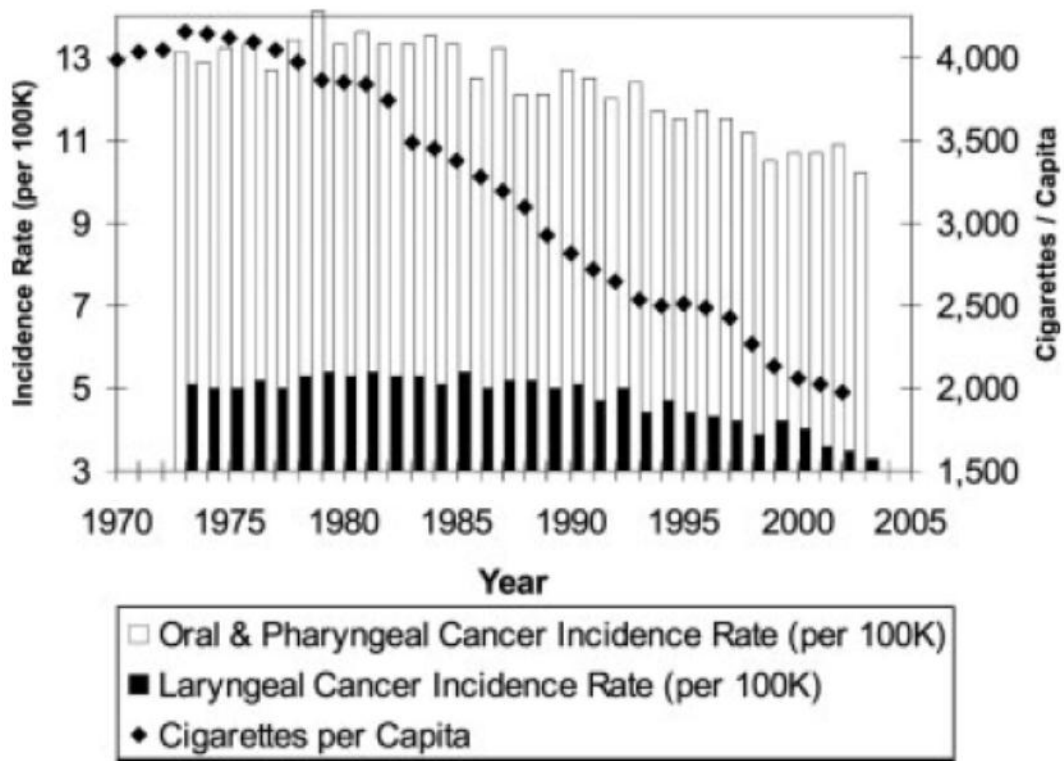
中咽頭扁平上皮癌 40 症例を対象に、ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) の検出、免疫組織学的に p16、p53、Ki67 の発現、HPV 関連腫瘍と HPV 非関連腫瘍の病理組織像の特徴を明らかにすると共に、HPV 関連の有無と臨床背景因子、治療予後との相関について解析した。本研究では、HPV 関連腫瘍は 28 例 (70%) (16 型 26 例、33 型 1 例、35 型 1 例)、HPV 非関連腫瘍は 12 例 (30%) であった。HPV 関連腫瘍では、p16 陽性かつ p53 陰性が 27 例 (96%) であり、HPV 非関連腫瘍では、p16 陰性かつ p53 陽性例が 10 例 (83%) であり、HPV 関連腫瘍と HPV 非関連腫瘍とは明らかに異なる病理組織学的特徴を認めた。HPV 感染と関連の深い子宮頸癌では、ECAC (Ectopic chromosome around centrosome) と呼ばれる特殊な核分裂像が特異的に出現することが報告されている。本研究では、中咽頭癌扁平上皮癌でも HPV 関連腫瘍の 64% に ECAC が検出され、非関連腫瘍には一例もみられなかった。このことから HPV 関連腫瘍の有用な病理組織マーカーになり得ると考えられた。

II. 序 文

□ 中咽頭癌について

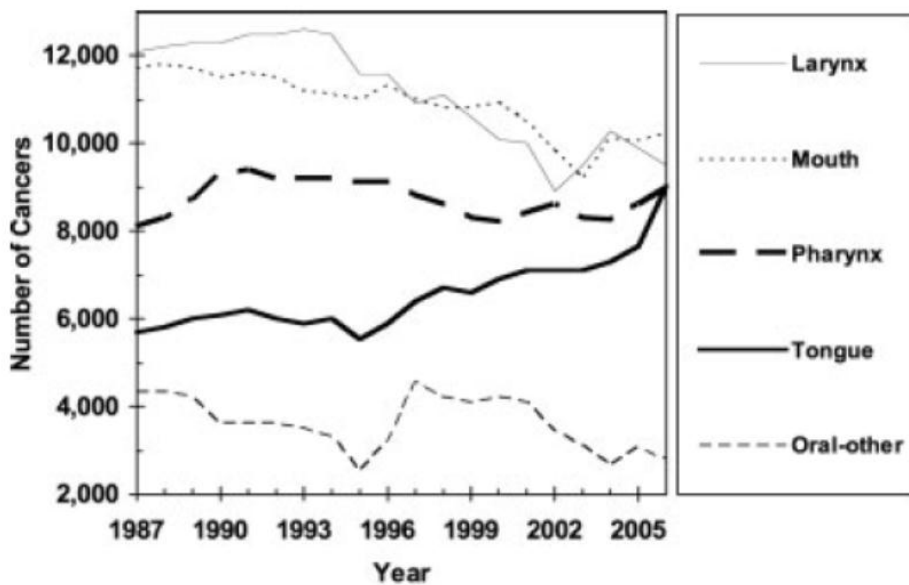
頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) は以前よりタバコやアルコールの暴露が発がん要因とされてきた。しかし最近では特に中咽頭癌ではヒトパピローマウイルス (human papillomavirus : HPV) の関与が報告されてきている[1-3]。近年の米国の報告では咽頭癌全体の発生率はほぼ横ばいであるのに対し、中咽頭癌は増加している (図 II-1、2)。その要因は、禁煙活動の啓蒙による喫煙率の低下に伴い、HPV 非関連咽頭癌の減少と、その減少を凌駕する HPV 関連の中咽頭癌の増加のためと考えられている[4]。HPV 関連頭頸部癌の発症は性交習慣と関与しており、生涯経膾セックスおよびオーラルセックスパートナーの数の増加が HPV の感染のリスクを有意に増加させ、その発症を増加させているとの報告もある[5-7]。HPV 感染は中咽頭癌にて重要な予後予測因子であるとされており[1]、中咽頭 HPV 関連腫瘍は、手術[8]、放射線治療[9]、化学療法[10]いずれの治療においても反応性がよく、予後良好と報告されている。2010 年の米国の報告では、中咽頭癌の HPV 感染のスクリーニングを 35% の施設でルーチンにて行っており、今後、施行を検討している施設も増加傾向にある[11]。本邦でも HPV 関連中咽頭癌の報告は、いくつか報告されているが[12, 13]まとまった報告は少なく、欧米に比べ HPV 関連中咽頭癌の認識も十分ではないのが現状である。

図 II-1 : 口腔/咽頭癌と喉頭癌の年齢調整罹患率と年間タバコ消費量



引用文献:[3]

図 II-2 : 米国における頭頸部癌の部位別年間発症数の経緯



引用文献:[3]

□ HPV 関連頭頸部腫瘍の発症部位および中咽頭亜部位との関係

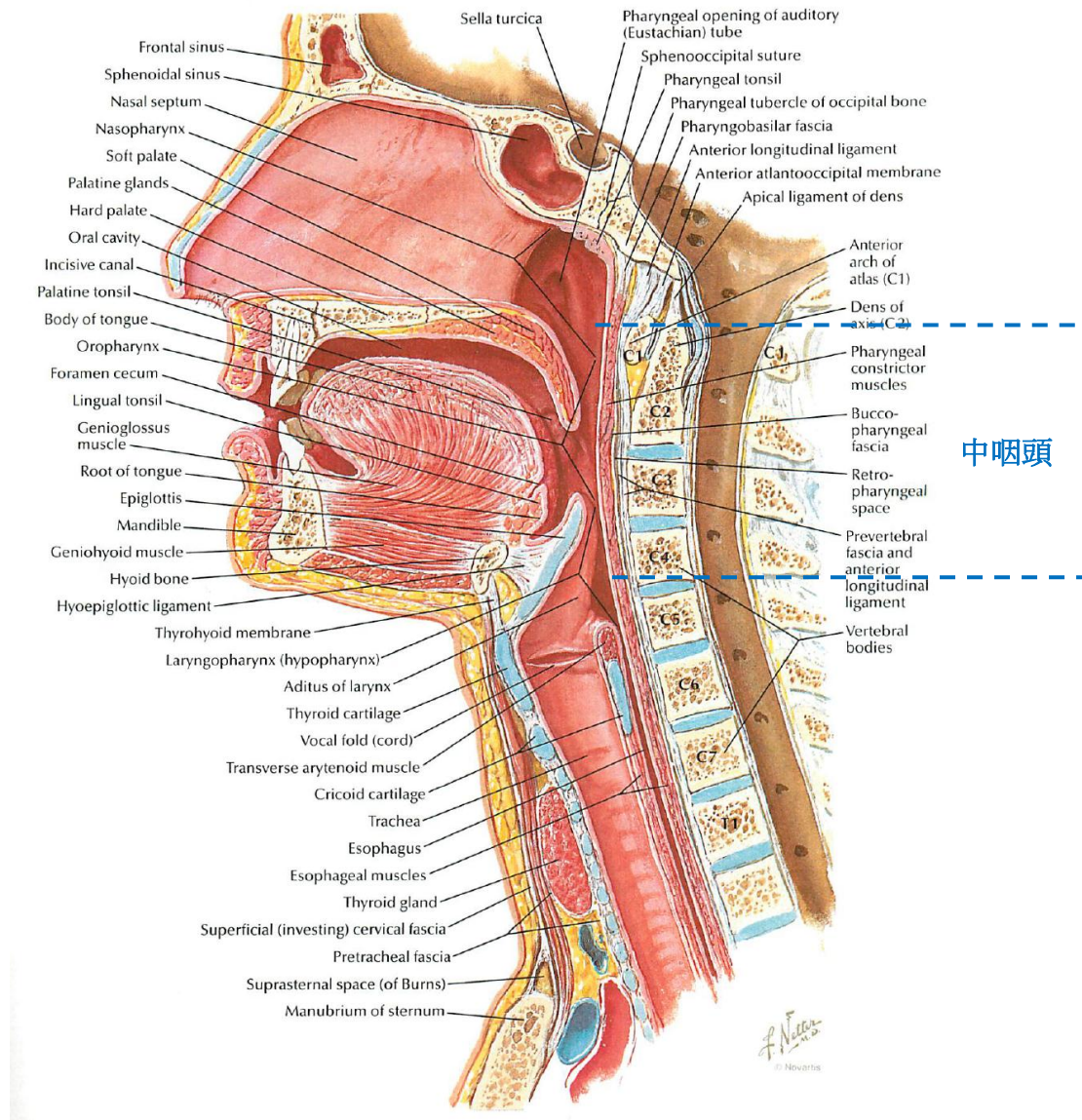
中咽頭腔(図 II-3)は以下の4つの亜部位、側壁(扁桃・口蓋弓・舌扁桃溝)、前壁(舌根・喉頭蓋谷)、上壁(軟口蓋下面・口蓋垂)、後壁(咽頭後壁)に分類される。中咽頭癌の発症頻度は、側壁:約60%、前壁:約25%、上壁:約10%、後壁:約5%と報告されている[14-21]。

頭頸部癌における HPV 関連腫瘍の発症部位の大部分は、中咽頭であり、その中でも扁桃、舌根に多く報告されている[22](写真 II-A)。国立病院機構東京医療センターでの報告によると、中咽頭癌 16 例中 8 例が HPV 陽性、8 例が HPV 陰性であったが、HPV 陽性 8 例は全例口蓋扁桃もしくは舌根であったのに対し、HPV 陰性 8 例中 5 例はその他の部位(後壁、軟口蓋、喉頭蓋谷、口蓋弓)であった[13]。その他の報告では、扁桃癌症例における HPV 陽性率は、35~85%[23-26]と報告されている。

扁桃、舌根に HPV 関連腫瘍の発症が多い理由は不明だが、関連する事実として、

- ①子宮頸部と同様に扁桃は HPV が到達しやすく、化生の過程が成立しやすい[27]
 - ②扁桃には陰窩構造があり、広範な単層の粘膜上皮を有し、基底細胞に HPV が到達しやすい[28, 29]
 - ③扁桃はリンパ組織であり、発現しているサイトカインなどが HPV 感染による形質転換を促進している[27, 30]
- などが挙げられている。

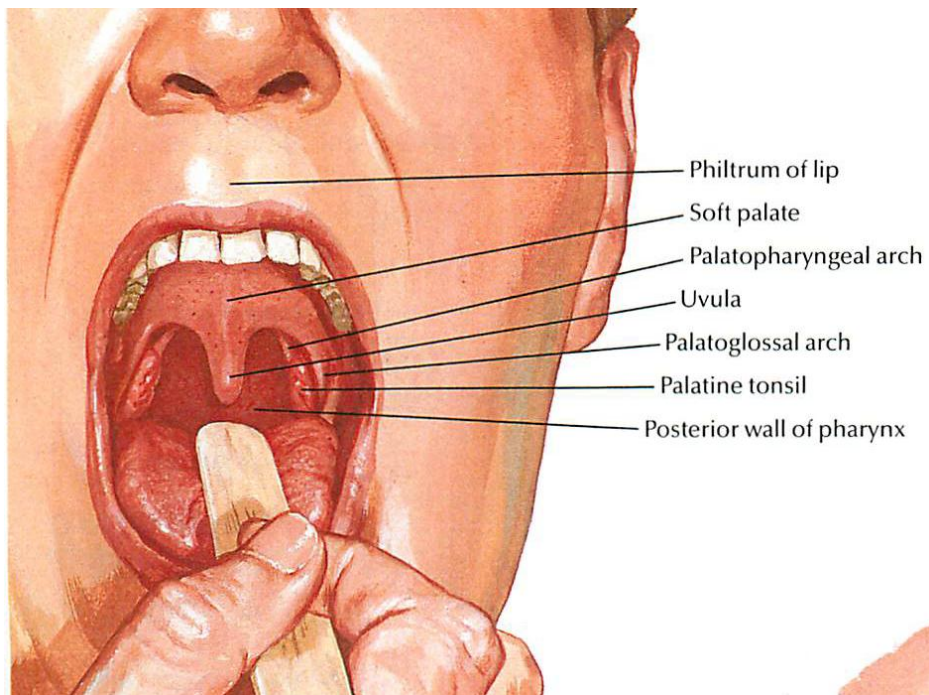
図 II-3A : 頭頸部解剖



中咽頭： 前方上部は口蓋咽頭弓を介して口腔と交通し、下部では舌根が前壁となる。上方では上咽頭と交通する。後壁・側壁はそれぞれ咽頭後壁・側壁である。下方では下咽頭と交通するが、境界は喉頭蓋・咽頭喉頭蓋襞である。

出典： Atlas of human anatomy/by Frank H. Netter
Novartis, Page 57, 9th printing 1997 printed in U.S.A.

図 II-3B : 口腔内から中咽頭腔の観察図



出典: Atlas of human anatomy/by Frank H. Netter
Novartis, Page 45, 9th printing 1997 printed in U.S.A.

写真 II-A : 右扁桃癌の 1 例



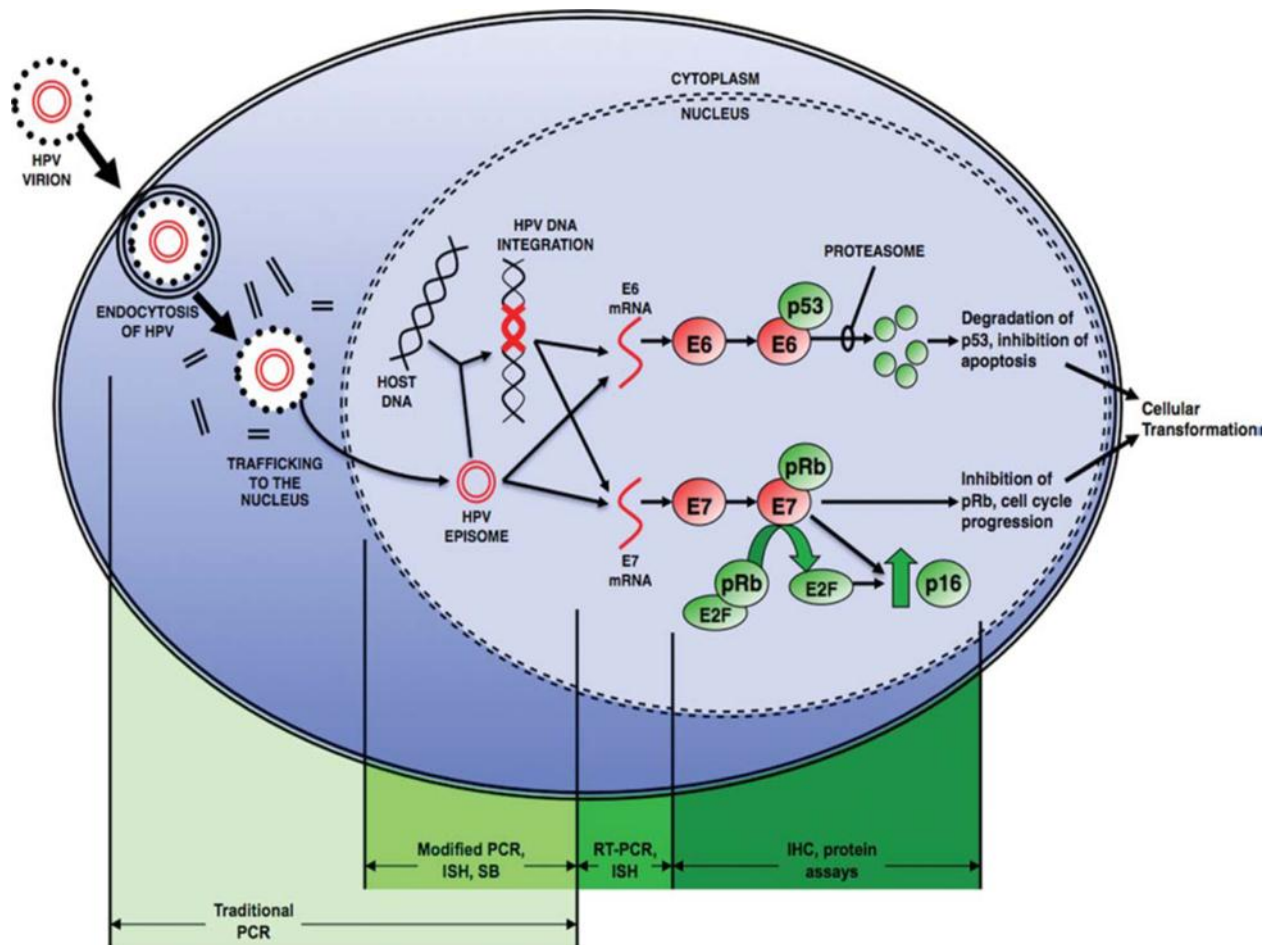
右中咽頭側壁(扁桃窩)に腫瘍(→)を認める。

□ HPV とその発癌機構

1983 年、Harald zur Hausen 博士らによって子宮頸癌から 16 型ならびに 18 型 HPV の DNA が発見され、その因果関係が初めて示唆された[31, 32]。その後の疫学的・分子生物学的研究から、子宮頸癌は HPV 感染によって発症することに疑いの余地はなくなり、HPV は子宮頸癌の原因ウイルスとして確定している。HPV は約 8000 塩基対からなる環状二本鎖 DNA をゲノムとしてもつ DNA ウイルスで、120 種類以上の型が同定されている。疫学的に癌との関連が示される高リスク型(16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 型等を含む約 20 の型)と、尖形コンジローマ等の良性病変形成にとどまる低リスク型(6, 11 型等)とに大別されており、子宮頸癌の 90%以上から高リスク型 HPV が検出されている。生殖器、口腔、喉咽頭等の上皮に感染する粘膜指向性の高リスク型 HPV は、子宮頸癌の他にも肛門管癌、陰茎癌、一部の頭頸部癌からも検出されており、強い因果関係が示唆されている[33]。

高リスク HPV が粘膜細胞に取り込まれ宿主細胞の DNA に組み込まれると、HPV 由来発癌遺伝子蛋白である E6 と E7 が高発現する。E6 蛋白は p53 遺伝子産物を、E7 蛋白は Rb 遺伝子産物を不活化することにより、癌化につながると考えられている。p16 は、E7 が Rb 蛋白と結合して転写調節因子である E2F を遊離することで促進される、細胞周期回転に対する負のフィードバックとして高発現する[2, 34](図 II-4)。

図 II-4 : HPV の感染、発癌メカニズムと関連蛋白



引用文献: [2]

□ 頭頸部癌における HPV 感染と疫学

頭頸部癌においても HPV との関連は以前より示されてきたが、最近の喫煙率や飲酒量の低下に伴い、改めて HPV 関連腫瘍が注目されるようになってきた。欧米では HPV 関連の頭頸部癌の発生率が上昇している。その背景には若者を中心とした、性活動の活発化、多様化があり、特に中咽頭癌は性活動との関連が明らかにされてきている[6]。HPV 関連の頭頸部癌の発症は性行為習慣と関連しており、生涯経膾セックスおよびオーラルセックスパートナーの数の増加が口腔内の HPV16 の感染のリスクを有意に増加させるという報告もある[5]。

米国では 1973 年の頭頸部癌の発症部位の 18%が中咽頭であったのに対し、2004 年には 31%に増加していると報告されている[35]。また同様にスウェーデンでは、中咽頭癌の HPV 関連腫瘍の割合は、1970 年台は 23%、1990 年台は 57%、2007 年には 93%に増加していると報告されている[25]。このように、欧米において HPV 感染は中咽頭癌における重要な発癌因子に位置づけられている。

頭頸部癌は喫煙との強い相関が指摘されている中、非喫煙者における腫瘍の大部分は HPV 関連であることは驚くべきことではない。非喫煙者は喫煙者にくらべ、HPV 関連中咽頭癌の割合が多く、年間の喫煙量は中咽頭癌の予後不良因子であることも報告されている[1, 36]。しかし口腔内 HPV 感染は、喫煙者、非喫煙者いずれにもおこり、両者の中咽頭癌の発症の原因になる。実際、HPV 関連扁平上皮癌患者の 10-30%はヘビースモーカーや大酒家であるとの報告もある[7, 37]。このことは、HPV 関連腫瘍

は非喫煙者だけでなく、喫煙者にも起こることを示している。

□ 中咽頭癌の治療方法

中咽頭癌の治療は、手術、放射線、化学療法を組み合わせる治療を行う。これまで放射線療法と外科的治療のいずれを主体にすべきかを厳密に検討した臨床研究がなく、標準治療は確立していなかった。特に中咽頭癌の治療は、臓器・機能温存に優れた放射線療法が中心になることが多い[38]とされてきたが、近年の再建術の進歩により外科的治療が選択される機会も増加し、治療者・施設間でのバリエーションが大きくなっている。しかし、2002年に報告された北米治療施設の成績に基づく扁桃、舌根癌に関するメタアナリシス[39]は、外科的治療と比較して放射線療法の長所と優位性を明確にした。この研究は、放射線療法と外科的治療が同等の局所領域制御率、生存率を示すことに加え、外科的治療に比べ放射線療法に伴う合併症は重篤なものが有意に少なく機能損失の程度も軽いことを示しており、中咽頭癌全般に対する標準治療としての放射線療法の重要性をあらためて支持している。

病期別治療法は、I～II期では放射線単独療法が推奨される。特に、外科的治療で大きな機能欠損が予想される扁桃、舌根癌などは、放射線療法が第一選択とされることが多い。ただし、軟口蓋、口蓋弓癌I期などで術後機能欠損が軽度と予想される場合には、外科的治療も考慮される。切除可能なIII期症例では、外科的治療(場合により術後照射を追加)が標準治療となっている[40]。また、III期症例には根治照射も標準的に用いられるが、特に扁桃癌は放射線単独療法のよい適応である[40]。IVA～B期症例のうち、切除可能例では外科的治療(場合により術後照射追加)が標準治療と

して推奨される。しかし、切除可能例でも大きな術後機能欠損が予想される場合には、放射線療法を考慮する。切除不能例においては放射線療法が標準治療である[40]。

頭頸部癌における化学療法に関しては、治療効果の点では同時併用の化学放射線療法が優れているというのが現在のコンセンサスである。化学療法の併用による放射線治療成績の向上は Pignonらのメタアナリシスにより証明されている[41]。Pignonらは、化学療法の併用により相対危険率は 10%低下し、2 年、5 年生存率はそれぞれ 4%向上すると報告している。特に同時併用療法では 11%の生存率増加がみられたが、導入化学療法、放射線治療後の化学療法は生存率への寄与はわずかであった。中咽頭癌を対象とした同時化学放射線治療と放射線治療単独との比較第 III 相試験の報告では、3 年生存率はそれぞれ 51%、30%、局所制御率は 66%、42%を認め、同時化学療法の併用の有用性を報告している[42]。これまでのところ化学療法の標準治療は確立されていないが、プラチナ製剤を基本とすることが多い[41, 42]。

外科併用療法として、根治線量照射後の残存原発巣救済手術、計画的ないし残存リンパ節転移巣への頸部郭清術も行われている。

III. 病理組織学的検討

[背景]

□ HPV の検出方法

中咽頭癌の HPV 検出検査のルーチン化が必要とされる中、最適な HPV 検出法はまだ確立されていない。HPV の検出方法には以下のような様々な方法がある[3, 43, 44]。

高リスク型 HPV-DNA の Polymerase chain reaction (PCR) による検出法は多くの方法が開発されており、Hybrid capture assay 法、PCR/reverse hybridization (リニアアレイ) 法、PCR-RFLP 法、multiplex PCR 法などを用いた検査があり、口腔内擦過液状検体や生検材料などさまざまサンプルから検出可能である。その中でも、本邦では子宮頸癌においては、ASC-US (Atypical squamous cells of undetermined significance) に対し高リスク型 HPV を一括検査する HPV DNA 「キアゲン」 HCII (ハイブリッド・キャプチャーII、三菱化学メディエンス) と、CIN1/2 に対して高リスク HPV をタイピングする Clinichip® HPV (積水メディカル) が保険適応になっている。これまで HPV-DNA タイピング検査は手法が複雑であったが、今回の研究に使用した Clinichip® HPV は、遺伝子増幅法 (LAMP 法) と電流検出型 DNA チップ法により 13 種の高リスク HPV ゲノムを型別に検出でき、高精度かつ簡便・迅速な検査法である (図 III-1)。

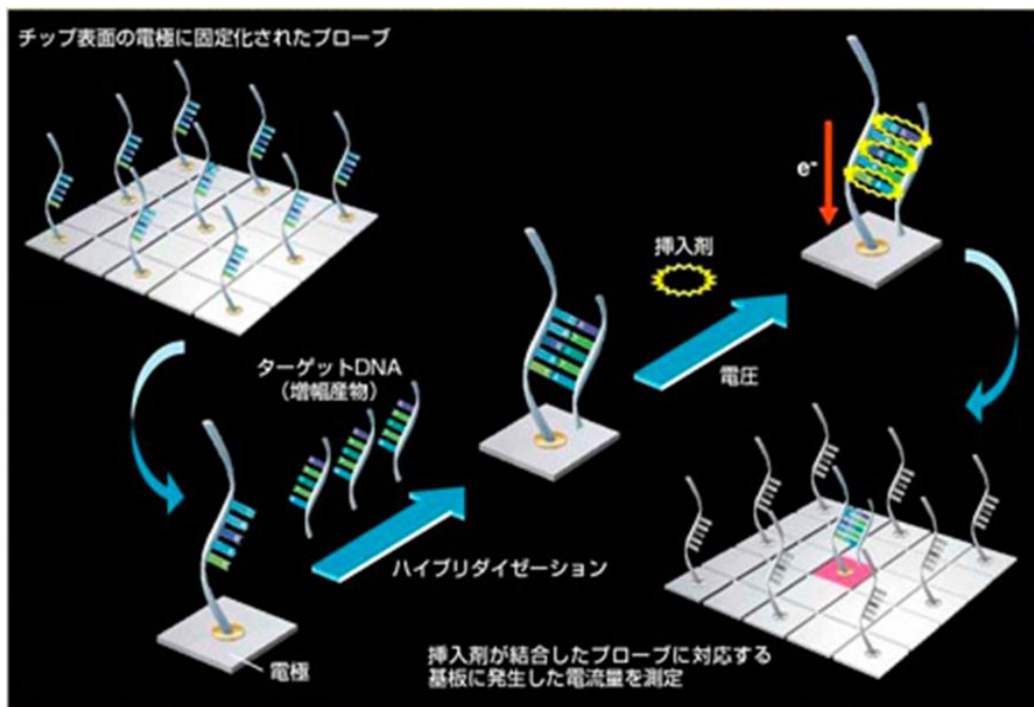
病理組織標本を用いた高リスク HPV に対する、In situ hybridization (ISH) 法は、腫

瘍細胞の DNA に組み込まれた HPV-DNA を直接可視化できる(図 III-2)。

HPV 関連腫瘍の分子マーカーとしては、p16 (p16^{INK4a}) が知られている。 p16 は HPV 関連腫瘍にて過剰発現し、またその過剰発現は中咽頭癌の臨床において良好な予後との相関が多く示されている[1, 45]。 p16 は細胞周期制御蛋白であり、その機能は pRB と共同してサイクリン依存性キナーゼの活性を抑制することにある。 E7 蛋白による pRB の不活化は p16 の過剰発現を許容するため、その高発現は E7 の高発現を反映する。このように p16 は HPV 関連腫瘍の良いマーカーとなりうることが報告されており、その検出法として p16 免疫組織化学(Immunohistochemistry: IHC)が推奨されている[44]。

HPV-DNA を検出する方法はコストが高いのが問題で、発現している p16 蛋白の検出で代用できるかは今後の課題である。中咽頭癌においては HPV 感染の有無を確認することは必要であると考えられるが、現在本邦では、頭頸部領域の HPV 検査は保険適応外である。

図 III-1： Clinichip®HPV を使用した HPV-DNA 検出法の測定原理

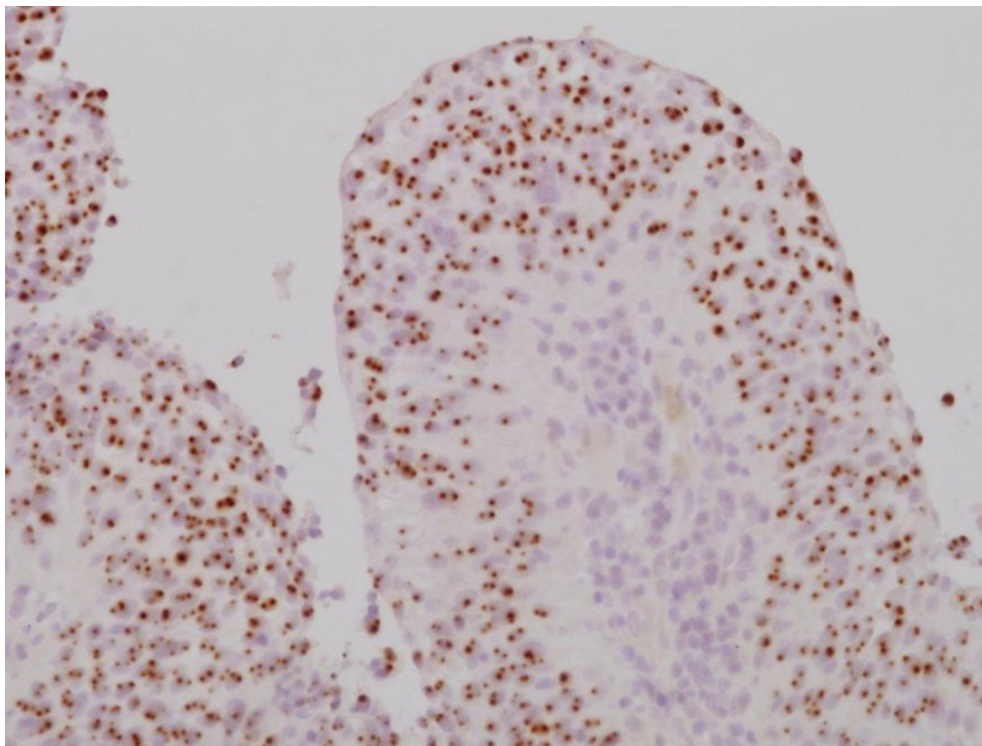


それぞれの DNA プローブが EC チップの電極板に固定されている

1. LAMP 増幅産物(ターゲット DNA)を HPV-DNA チップに注入する。
2. チップの表面の電極に固定化された 13 種の高リスク HPV の遺伝子と相補的な配列を持ったプローブがターゲット DNA と 2 本鎖を形成する。
3. HPV-DNA チップに挿入剤を注入すると、2 本鎖を形成したプローブに特異的に結合する。
4. HPV-DNA チップに電圧をかけ、挿入剤が結合したプローブに発生する電流が検出される。

引用： 積水メディカル <http://www.sekisuiomedical.jp/business/diagnostics/others/hpv/index.html>

図 III-2 : 中咽頭 HPV 関連腫瘍 In situ hybridization
拡大写真



腫瘍細胞の核にドット状に陽性所見を認める。直接 HPV-DNA を可視化できる。

□ HPV 関連腫瘍の病理組織像

中咽頭 HPV 関連腫瘍は非関連の扁平上皮癌に比べ角化傾向が乏しいと報告されている[46]。El-Mofty らは、その特徴像を詳細に検討しており[47-49]、中咽頭 HPV 関連腫瘍の病理組織像の特徴として、卵円形・紡錘形の細胞形状、不明瞭な細胞境界、高クロマチンの腫瘍、単相的でシート状・巣状・結節状の構造形成、少ない間質の発達、などの特徴を有すると報告している。

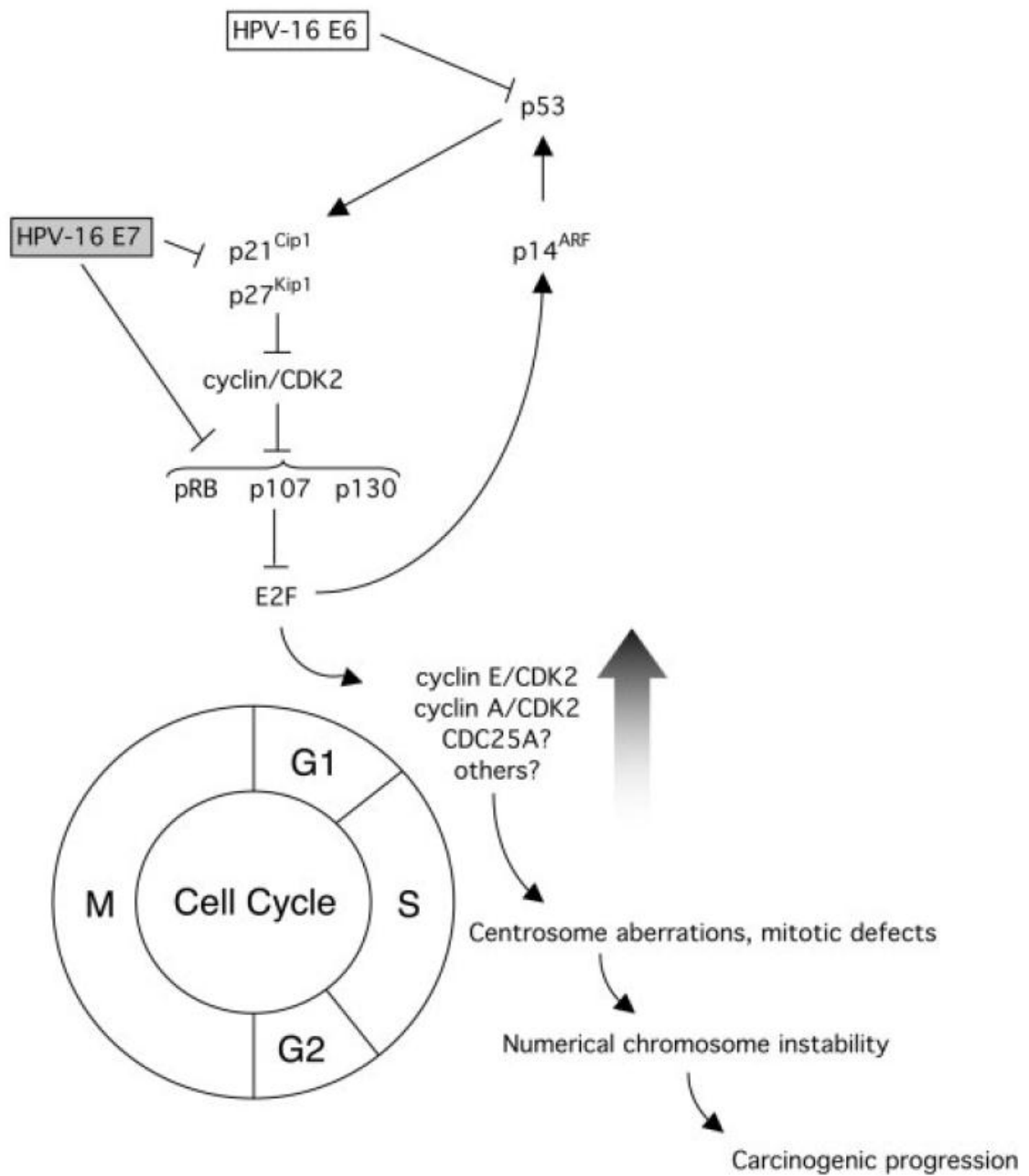
HPV 関連子宮頸癌と同様に[50-52]、HPV 関連中咽頭扁平上皮癌(SCC)においても Basaloid SCC[53], Adenosquamous carcinoma[54], Papillary SCC[55] などの SCC の変異型が知られている。Papillary SCC と Basaloid SCC の大部分に HPV の関与が報告されている[46, 55]。その他、中咽頭 HPV 関連未分化癌の報告もある[56]。いずれの病理組織型であっても、HPV 関連腫瘍の予後は良好であるとの報告がある[53]。

□ HPV 関連腫瘍の染色体不安定性と ECAC について

HPV 感染にて発現する E6, E7 は、それぞれ独立した機構で短期間に染色体不安定性を誘導することが知られている[34, 57, 58]。Duensing ら、により以下のような報告がなされている。E7 によるサイクリン A, E/CDK2 の制御を介して、中心体の過剰複製が生じる。これにより、有糸分裂時に複数の紡錘体極が形成される。また、E6 によって G2/M チェックポイントが無効化されるため、複数の紡錘体極形成による染色体の分配異常を伴ったまま細胞質分裂が進行し、異数体が発現する[59, 60]。また、E6, E7 発現細胞において DNA 損傷が蓄積した状態で細胞周期が進行すると、分裂後期に染色体(おそらく染色体末端部)間で橋状構造が形成され、架橋-DNA 切断-融合のサイクルが反復されることによって染色体の構造異常が引き起こされる[61]。これらの機序を介して E6, E7 による染色体不安定性が誘導され、染色体異常がもたらされる[57](図 III-3)。

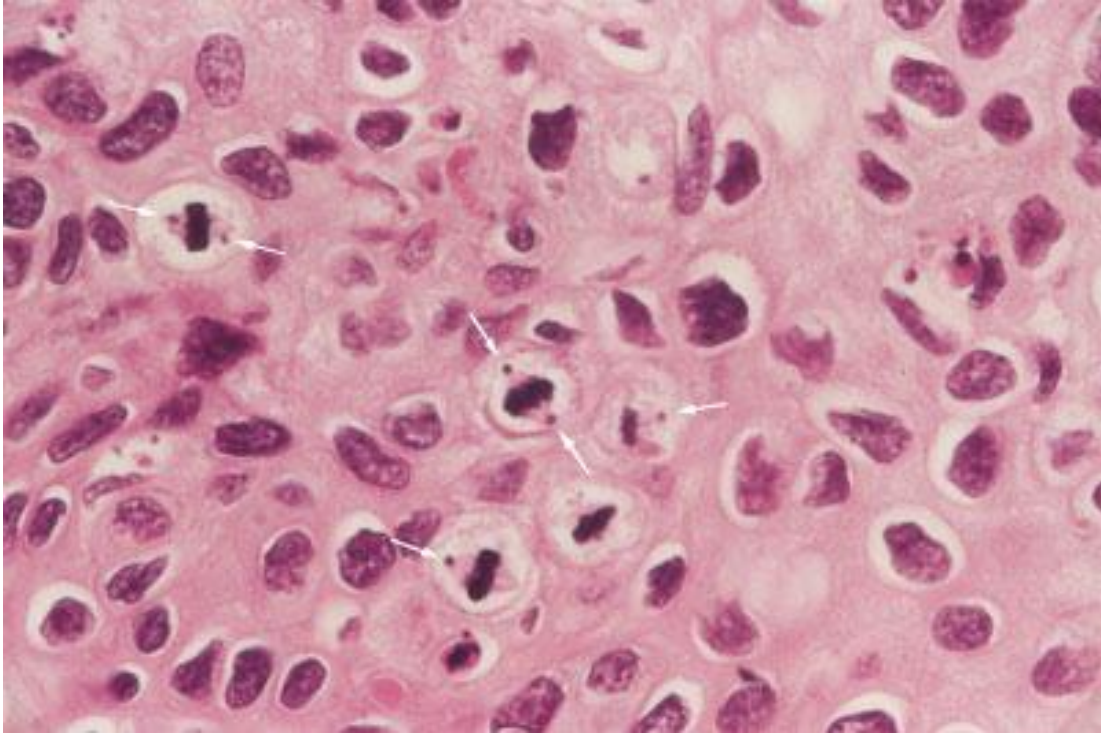
ECAC (Ectopic chromosome around centrosome) は、分裂中期細胞の両側中心体近傍に対称性に出現する 1 個の特定のサイズの異所性染色体である(図 III-4)[62]。この異所性染色体は、固定条件のよい標本では filamentous な構造が観察され、染色体であることは明らかであるが、ヒト胎盤 DNA による ISH にて、ヒト DNA よりなる染色体であることが証明されている。ECAC も染色体不安定性の背景の中に出現した染色体異常の一つの形態と考えられるが、ECAC は HPV 関連の子宮頸癌に特異的に出現することが、古田ら、により報告されている[62]。

図 III-3 : HPV 感染に伴う細胞内分子メカニズム



引用文献:[57]

図 III-4 子宮頸部 CIN2(Cervical intraepithelial neoplasia)での ECAC



分裂中期細胞に対称性に出現する異所性染色体(→)を確認できる。

引用文献: [62]

[目的]

下咽頭癌などの他部位の頭頸部癌に比べて中咽頭癌の治療成績が良好な理由は、HPV 関連腫瘍が一定の割合で含まれているためと考えられている。本邦では HPV 関連中咽頭癌に関する報告は少なく、本邦の中でも頭頸部癌症例の経験の多いがん研究会有明病院ではまとまったデータを得ることが可能であり、中咽頭癌にどの程度の割合で HPV 関連腫瘍が存在し、どの HPV 型の感染があるかを知ることは有用である。

HPV 関連腫瘍の予後良好性が報告されている中、HPV 関連腫瘍と非関連腫瘍を区別することは予後予測、治療方法の方向性を決める上でも有用であり、また子宮頸癌ワクチンが普及する中、中咽頭癌の予防の観点からも HPV 感染を知ることは重要である。

本研究では、頭頸部領域で HPV 関連腫瘍が最も多く報告されている側壁癌(扁桃癌を含む)症例を対象とし、その HPV 関連因子に関し検討を行った。多くのまとまった症例を比較検討することで、同じ扁平上皮癌でも HPV 関連腫瘍と非関連腫瘍で病理組織学的な相違が明確になると考えた。病理組織像や病理組織学的特徴を詳細に調べることにより、HPV 関連腫瘍、非関連腫瘍のそれぞれの特徴を比較検討し、臨床的に有用なデータの検索を試みた。特に本研究では、子宮頸癌 HPV 関連腫瘍の特異的な病理像である ECAC の発現にも着目した。

その目的は、

①中咽頭側壁癌における HPV 関連腫瘍の割合とその関与する HPV タイプの検索

②HPV-DNA の検出法の検討

③HPV 関連腫瘍と非関連腫瘍との病理組織像の差異の検討

④HPV 関連腫瘍と非関連腫瘍との免疫組織学的な差異の検討

である。

尚、本研究の実施は、がん研究会有明病院、治験・臨床研究倫理審査委員会にて

承認されている。

[方法]

2005年4月から2010年4月までに、がん研有明病院にて放射線治療を施行した中咽頭癌 87 例中、扁桃・側壁癌 71 例(舌根 8 例 軟口蓋 2 例 後壁 6 例を除いた)のうち、他院借用などのため病理標本入手困難な症例 27 例を除いた 44 例について、その病理組織学的検討を行った。そのうち、検体量が少ないものを除いた 40 例を対象とし、高リスク HPV-DNA の検出、病理組織像の検討、p16、p53、および Ki67 の免疫染色を行った。

• HPV-DNA の抽出方法

脱パラフィン

各症例のパラフィン包埋切片を 10 μm の厚さで薄切し 2.0 ml チューブに入れ、脱パラフィンを行った。チューブに直接、キシレン 1.5 ml を入れ 50°C で一晩おいた後、キシレンをいれかえ(1.5 ml ずつ) 50°C で 1 時間おき、これを二回繰り返した。キシレンをとり除きエタノール 1.5 ml を加え、50°C で 10 分置き、キシレンと同様にエタノールをいれかえて、これを三回繰り返した後、エタノールを除き切片を乾燥させた。

DNA 精製

Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion 社)を用いて抽出を行った。Digestion Buffer (Kit 付属) 400 μl と Protease (Kit 付属) 4 μl を切片の入ったチューブに入れ、混和後 50°C で 48 時間反応させた。反応後のチューブに

Isolation Additive (kit 付属) 480 μ l を入れ vortex した。ここで溶液が白濁することを確認した。次にエタノールを 1.1 ml 加え混和した。この時溶液が透明になることを確認した。Collection tube (Kit 付属) にセットした Filter Cartridge (Kit 付属) へ サンプルを 700 μ l アプライした。10000 rpm で 1 分遠心を行い、フロースルーを廃棄した。3 回繰り返してサンプルすべてをアプライした。Wash 1 Concentrate (Kit 付属) 700 μ l をカラムにアプライ、10000 rpm で 30 秒遠心を行い、フロースルーを廃棄した。Wash 2/3 Concentrate (Kit 付属) 500 μ l をカラムにアプライ、10000 rpm で 30 秒遠心を行い、フロースルーを廃棄した。さらに 10000 rpm で 30 秒遠心を行い、カラムのフィルターを乾燥させた。用時調整した RNase A [Nuclease-free water 50 μ l に RNase A (Kit 付属) 10 μ l を加える。] をカラムにアプライし、37°C 30 分で反応させた。Wash 1 Concentrate (Kit 付属) 700 μ l をカラムにアプライ、10000 rpm で 30 秒遠心を行い、フロースルーを廃棄した。Wash 2/3 Concentrate (Kit 付属) 500 μ l をカラムにアプライ、10000 rpm で 30 秒遠心を行い、フロースルーを廃棄した。95°C に温めた Nuclease-free water 30 μ l をカラムにアプライ、1 分間溶出させた。Collection tube を新しい 1.5 ml チューブと交換し 15000 rpm で 1 分遠心を行い、得られた溶液を DNA サンプルとした。

- Clinichip® HPV による HPV-DNA 検出方法

HPV の検出とタイピングは、Clinichip® HPV (Sekisui medical, Tokyo, Japan) を用いた。この方法は 13 種類のプライマーを使用し、LAMP 法による DNA の増幅し高リスク HPV-DNA を検出する方法である。それにより、それぞれのプライマーに対応する、高リスク HPV13 種類の DNA タイプ (type16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) を検出できる。この HPV-DNA 遺伝子タイピングのターゲットは L1 open reading frame である。

検体より抽出した DNA 溶液を 95°C で 5 分間加温後、直ちに氷上で冷却した。DNA 溶液各 1µl を 6 連の LAMP チューブに各々分け、24 µl の特異的プライマーを含む LAMP 試薬を加えた。そのチューブは 63°C で 90 分間、80°C で 5 分間加温後、直ちに氷で冷却した。それぞれのチューブからの 10 µl の DNA 増幅産物を 6µl のハイブリダイゼーション用の緩衝液 (クエン酸緩衝液) と混合し、混ぜ合わせた 50µl の LAMP 産物を Clinichip® HPV の EC チップに注入した。そのチップを、電気信号を検出する装置 GLH-2C601 (Toshiba Hokuto Electronics, Asahikawa, Japan) に挿入した。その結果はその装置にて自動的に判別される。

判定基準は、検体の平均電流値と陰性コントロールの平均電流値の差が 10nA かそれ以上の場合陽性と判定し、検体の平均電流値と陰性コントロールの平均電流値との差が 10nA 未満であれば陰性と判定した。陰性コントロールの平均電流値が 45nA 以

上の場合無効と判定した。

遺伝子タイプは、1 μ lあたり HPV-DNA が 250 コピーで 100%の検出とした。244 のテストサンプルにおいて、13 種類の高リスク遺伝子タイプに対する特異的プライマーを直接用いた PCR と、この HPV-DNA タイピングシステムを比較した試験では、HPV 遺伝子型の一致率は 95.5% (233/244)と報告されている。

- **Nested PCR 法**

HPV16 型および 18 型 DNA の E6 領域からそれぞれ 2 組のプライマーを選択し、2 段階に増幅する Nested PCR 法を行った。使用したプライマーを表 III-1 に示した。検体より抽出した DNA を調製し、増幅を行った。

- **In situ hybridization (ISH)**

HPV16 型、18 型、および一括して検出する Wide 型のプローブを用いて、腫瘍細胞内の HPV-DNA の局在を、ISH 法にて確認した。

HPV16 DNA Probe , HPV18 DNA Probe, Wide Spectrum HPV DNA Probe Cocktail, Biotinylated (Dako, Tokyo, Japan)をプローブとして使用した。Wide 型のプローブは HPV の types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 をターゲットとする。GenPoint™, Catalyzed Signal Amplification System (Dako, Tokyo, Japan) を使用し、ISH を行った。

- p16、p53、Ki67 免疫組織化学(Immunohistochemistry :IHC)

IHC を用いて、p16、p53、Ki67 の発現を調べた。脱パラフィン処理後、抗原賦活化を行い、免疫染色を行った。p16IHC では the CINtec histology kit (MTM Laboratories, Heidelberg, Germany) を使用した。 p53 と Ki-67 IHC では、それぞれ Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein Clone DO-7 と Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen Clone MIB-1 (DakoCytomation , Denmark)の抗体を使用した。検出は Dako の EnVision Kit を用いた。

p16、p53IHC の判定基準を表 III-6、III-7 にそれぞれ示した。Ki-67IHC は染色されている細胞の割合 (%)を示した。

- 病理組織像の評価

WHO 分類(表 III-2)、頭頸部癌 癌取扱い規約(表 III-3)にもとづき、2 人の病理専門医および放射線治療医により病理組織像の評価を行った。

ECAC の検出は、2 人の検者がブラインド試験にて評価した。標本プレパラートから ECAC を 1 つ以上検出できた場合、陽性と判断した。標本の大きさは、長径で最小 3 mm、最大 22 mm であり、詳細を表 III-8 に示した。

- 統計学的解析

HPV 因子と、免疫染色の結果、臨床医学的因子との関係は、連続データはt-検定、カテゴリカルデータは χ^2 二乗検定にて解析した。統計解析ソフトは、JMP 9 (SAS Institute, Inc. North Carolina, USA) を使用し、P 値 < 0.05 をもって有意差とした。

表 III-1: Nested PCR で使用した HPV-DNA 配列

Virus Type	Nucleotides		
	Location	Sequences	Product Length
Outer Primer			
HPV 16	217-236	GCGACGTGAGGTATATGACT	334 bp
	550-531	GGTTTCTCTACGTGTTCTTG	
HPV 18	282-301	TATACCGCATGCTGCATGCC	158 bp
	439-420	ACGGTTTCTGGCACCCGCAGG	
Inner Primer			
HPV 16	320-339	ATTAGTGAGTATAGACATTA	110 bp
	429-410	GGCTTTTGACAGTTAATACA	
HPV 18	328-347	ATTAGAGAATTAAGACATTA	110 bp
	437-418	GGTTTCTGGCACCCGCAGGCA	

HPV16 型および 18 型 DNA の E6 領域からそれぞれ 2 組のプライマーを選択

表 III-2 : WHO 分類 (WHO classification of tumours of the oropharynx)

Malignant epithelial tumours

Squamous cell carcinoma

- Verrucous carcinoma
- Basaloid squamous cell carcinoma
- Papillary squamous cell carcinoma
- Spindle cell carcinoma
- Acantholytic squamous cell carcinoma
- Adenosquamous carcinoma
- Carcinoma cuniculatum

表 III-3 : 頭頸部癌取扱い規約「改訂第 4 版」: 病理 組織分類

扁平上皮癌	Squamous cell carcinoma
	Well differentiated
	Moderately differentiated
	Poorly differentiated
	Undifferentiated carcinoma
	Other cancers
	Schneiderian carcinoma
	Basaloid carcinoma
	Neuroendocrine cell carcinoma
	Spindle cell carcinoma

[結果]

対象患者 40 例の患者背景、病理組織型、病期を表 III-4 に示した。年齢中央値は 61 歳、男性 32 例 (80%)、女性 8 例 (20%) であった。喫煙歴のある患者は 21 例 (52.5%) であった。腫瘍部位は扁桃を含む中咽頭側壁である。病理組織型は 39 例が Squamous cell carcinoma であり、1 例が Undifferentiated carcinoma であった。

表 III-5 に HPV 検出、免疫染色、病理組織像の結果の一覧を示した。HPV の検出に関しては LAMP 法と ISH 法の結果を症例ごとに示し、LAMP 法で陰性の症例では、HPV 型は ISH 法と Nested PCR 法の結果を記した。p16 と p53 の IHC の結果は、染色パターンを示し、Ki67 に関しては、染色細胞の陽性率を示した。病理組織像に関しては、分化度、ECAC の検出の有無を示した。

表 III-4 : 患者背景・部位・病理組織型・病期

患者背景	症例数
年齢	
中央値	61 歳 (39-84)
性別	
男性	32 例 (80%)
女性	8 例 (20%)
喫煙歴	
なし	16 例 (40%)
あり	21 例 (52.5 %)
不明	3 例 (7.5%)
腫瘍	
部位	
側壁	40 例 (100%)
病理組織型	
Squamous cell carcinoma	39 例 (97.5%)
Undifferentiated carcinoma	1 例 (2.5%)
病期	
I	1 例 (2.5%)
II	4 例 (10%)
III	7 例 (17.5%)
IV	28 例 (70%)

表 III-5 : HPV 検出、免疫染色、病理組織像の結果

症例		HPV		免疫染色			病理像	
No.	Type	LAMP	ISH	p16	p53	Ki67(%)	分化度	ECAC
1		-	-	-	+++	60	高	-
2		-	-	-	+++	90	高	-
3		-	-	-	+++	80	高	-
4		-	-	-	+++	70	高	-
5		-	-	-	+++	60	高	-
6		-	-	-	+++	60	高	-
7		-	-	-	+++	80	高	-
8		-	-	-	+++	60	高	-
9		-	-	-	+++	80	高	-
10		-	-	-	+++	90	低	-
11		- *	-	+++	+	80	高	-
12		- *	-	-	-	80	中	-
13	16	- *	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
14	16	- *	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
15	16	- *	+	+++	-~/+/spot++	80	中	-
16	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	-
17	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	-
18	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	-
19	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
20	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
21	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
22	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
23	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
24	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
25	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	未	+
26	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	-
27	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
28	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
29	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	低	-
30	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	低	-
31	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
32	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
33	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	高	-
34	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
35	16	+	+	+++	-~/+/spot++	80	中	+
36	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
37	16	+	+	+++	-~/+/spot++	90	低	+
38	16	+	+	+++	+++	80	中	-
39	33	+	w+	+++	-~/+/spot++	90	中	+
40	35	+	w+	+++	-~/+/spot++	90	中	-

表 III-5 の補足

No.	LAMP 法	Nested-PCR	ISH	P16 IHC	P53 IHC
11	-	16- 18-	w- 16- 18-	+++	+
12	-	16- 18-	w- 16- 18-	-	-
13	-	16+ 18-	w+ 16+ 18-	+++	-
14	-	16- 18-	w+ 16+ 18-	+++	-
15	-	16+ 18-	w+ 16- 18-	+++	-

LAMP : Clinichip®HPV による HPV-DNA の検出

w+:wide probe で陽性 16+: HPV16 陽性 18+:HPV18 陽性

*:Nested PCR 法を施行

分化度 高:高分化 中:中分化 低:低分化 未:未分化

表 III-6 : p16 免疫染色 判定基準

	染色パターン
-	核および細胞質に陽性染色のある癌細胞を認めない
+	核および細胞質に陽性染色のある癌細胞 < 30%
++	核および細胞質に陽性染色のある癌細胞 \geq 30%, < 90%
+++	核および細胞質に陽性染色のある癌細胞 \geq 90%

表 III-7 : p53 免疫染色の判定基準

	染色パターン
-	核に陽性染色なし
+	核に弱～中程度の陽性染色のある癌細胞を一部 (< 30%) に認める
- ~ + / spot ++	核に弱～中程度の陽性染色のある癌細胞を \geq 50% に認め かつ核に強度の陽性染色のある癌細胞一部 (\geq 10%) に認める
+++	核に強度の陽性染色のある癌細胞を瀰漫性 (\geq 70%) に認める

表 III-8 : 病理標本の大きさ

No.	標本の大きさ	長径×短径	mm	HPVの有無	ECACの有無
1	4×2	3×2		-	-
2	4×3	3×2		-	-
3	7×3	7×2		-	-
4	4×2			-	-
5	10×6			-	-
6	5×5	4×4		-	-
7	8×6			-	-
8	6×6			-	-
9	5×3	6×2		-	-
10	4×4	4×2		-	-
11	5×2			-	-
12	4×2			-	-
13	9×5	8×4		+	+
14	8×7			+	+
15	3×2	2×2	2×2	+	-
16	4×4			+	-
17	3×2	2×2		+	-
18	3×2			+	-
19	9×6	8×4		+	+
20	10×2			+	+
21	22×10	13×8	11×7 9×3 12×3	+	+
22	4×3	3×3		+	+
23	4×2	7×3	7×3 5×3 5×3	+	+
24	8×3	11×3		+	+
25	8×4			+	+
26	7×4	7×3	7×3	+	-
27	7×3	6×3		+	+
28	8×6	6×4		+	+
29	4×3	3×3		+	-
30	3×3	3×3		+	-
31	10×9			+	+
32	6×5	3×4		+	+
33	7×5	7×4	6×4	+	-
34	7×3	11×3		+	+
35	5×4	3×2		+	+
36	6×4	3×3		+	+
37	8×5	7×5	3×2 3×2	+	+
38	7×3	7×3		+	-
39	7×5			+	+
40	5×4			+	-

- HPV の検出とタイピング

Clinichip ®HPV を用いた LAMP 法にて、40 例中 25 例に高リスク HPV-DNA が検出された。ISH 法では 40 例中 28 例に HPV-DNA が検出された。Clinichip ®HPV で陰性、ISH で陽性であった 3 例については、さらに 16 型、18 型 DNA の E6 領域について、Nested PCR 法を施行した結果、最終的に 40 例中 28 例に HPV-DNA を同定した(表 III-5 補足)。そのタイピングは 26 例が HPV16 型、1 例が HPV33 型、1 例が HPV35 型であった(表 III-9)。

表 III-9 : 中咽頭側壁癌 HPV 陽性率と型

		Type 16	26 例 (93%)
HPV 陽性	28 例 (70%)	Type 33	1 例 (3.5%)
		Type 35	1 例 (3.5%)
HPV 陰性	12 例 (30%)		

- p16 IHC

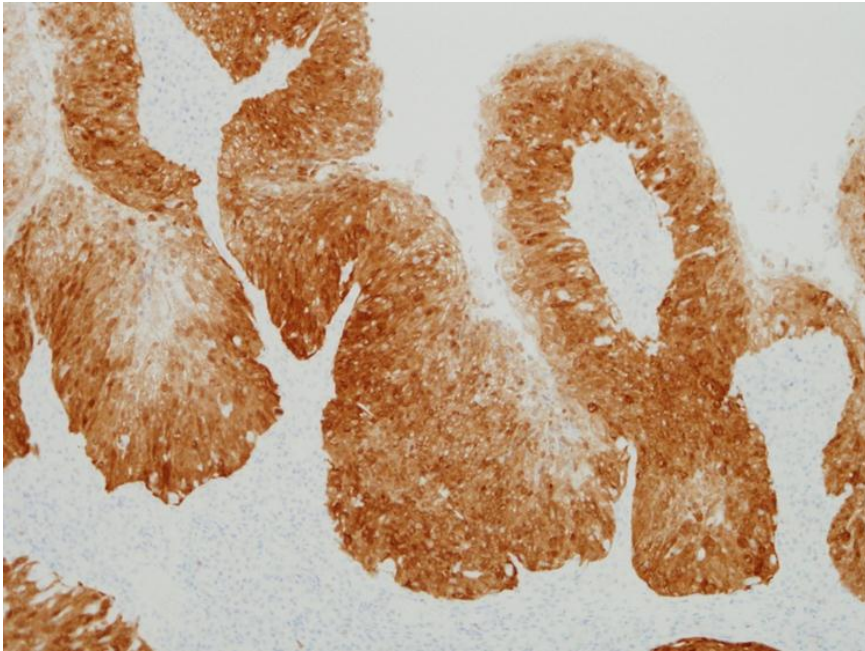
p16 IHC の染色パターンは、腫瘍細胞において瀰漫性に強く染まるか、全く染まらないかのどちらかであり、陽性、陰性の判別は容易であった(図 III-5,6)。p16 陽性は、40 例中 29 例に認められた。HPV 関連腫瘍 28 例はすべて p16 陽性であった。一方 HPV 非関連腫瘍 12 例中 11 例は p16 陰性であったが、1 例は p16 陽性であった(表 III-10)。

表 III-10 : p16 免疫染色

p16 免疫染色	HPV 関連 28 例	HPV 非関連 12 例
-	0 (0%)	11 (92%)
+	0 (0%)	0 (0%)
++	0 (0%)	0 (0%)
+++	28 (100%)	1(8%)

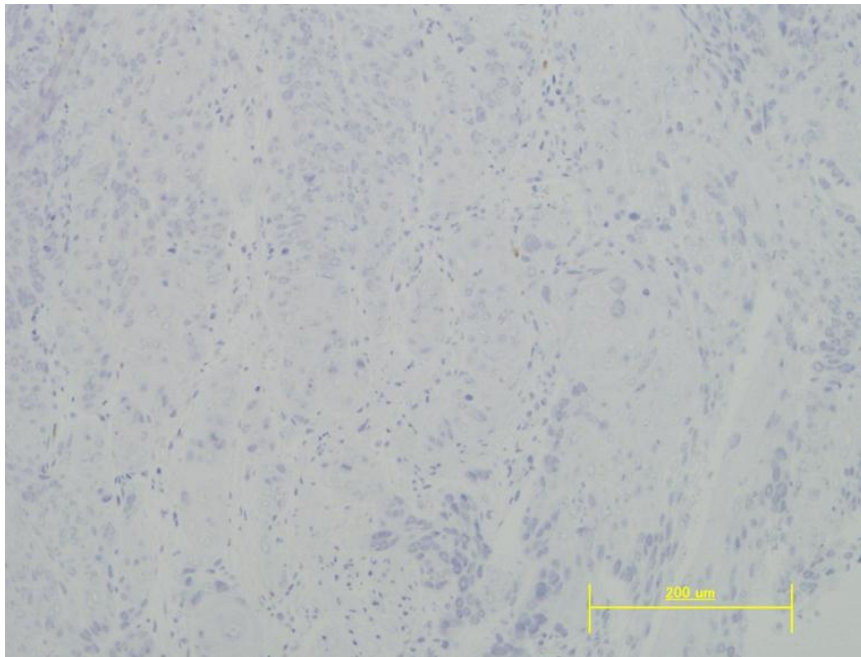
p<0.0001

図 III-5 : HPV 関連腫瘍の p16 免疫染色



腫瘍細胞の細胞質、核に瀰漫性に強い染色を認める。

図 III-6 : HPV 非関連腫瘍の p16 免疫染色



腫瘍細胞に全く染色を認めない。

• p53 IHC

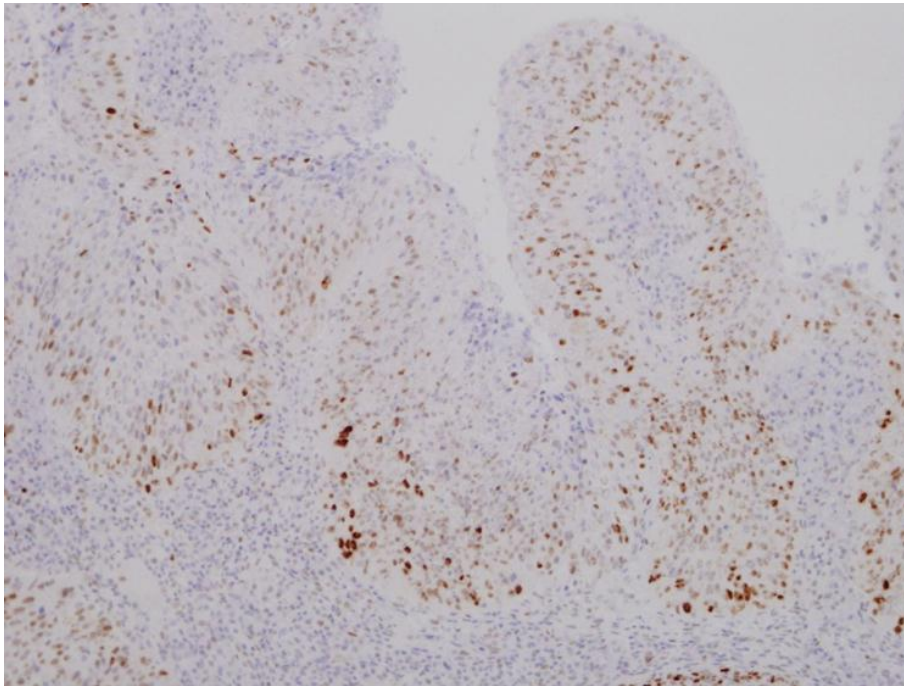
p53 IHC では、HPV 関連腫瘍 28 例中 27 例は特徴的な染色パターンを示した(表 III-11)。それは、核が淡く染まる腫瘍細胞が瀰漫性に存在し、その中に強く核が染まる腫瘍細胞がスポット状に点在する染色パターンであった(図 III-7)。HPV 関連腫瘍 28 例中 1 例のみが、瀰漫性で強い p53 染色パターンを示した。一方 HPV 非関連腫瘍 12 例中 10 例は腫瘍細胞内に瀰漫性に強い p53 の染色が確認された(図 III-8)。HPV 非関連腫瘍 12 例中 2 例の p53 染色は陰性であった。HPV 関連腫瘍の染色パターンは完全に陽性と判別できるものではないが、HPV 非関連腫瘍に認める瀰漫性に強い染色とは明らかに異なるパターンであった。

表 III-11 : p53 免疫染色

p53 免疫染色	判定区分	HPV 関連 28 例	HPV 非関連 12 例
-	陰性	0	1
+	陰性	0	1
-~+/spot++	陰性	27	0
+++	陽性	1	10

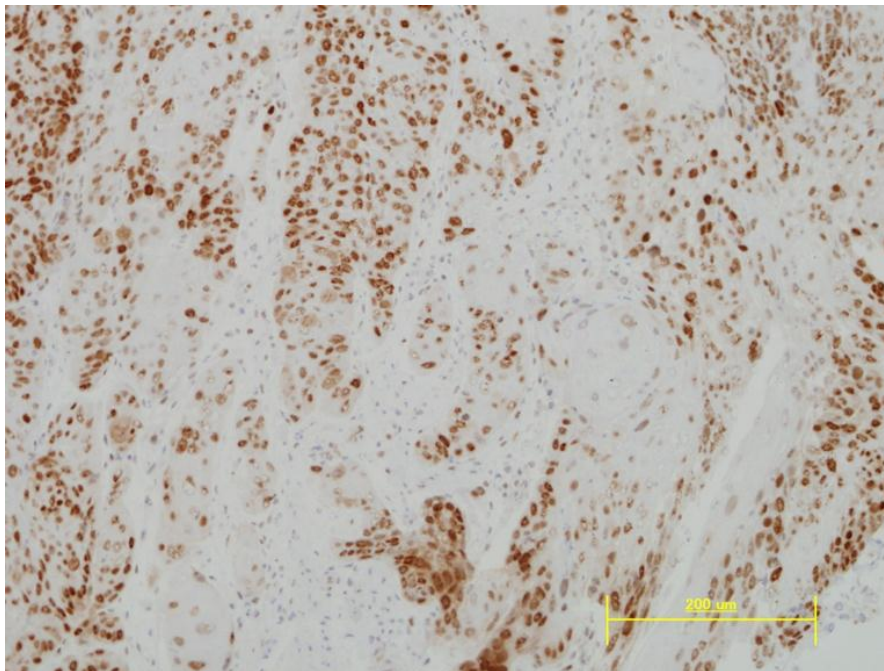
p<0.0001

図 III-7 : HPV 関連腫瘍の p53 免疫染色



瀰漫性に淡い陽性細胞がみられ、所々に強く染色される。

図 III-8 : HPV 非関連腫瘍の p53 免疫染色



瀰漫性に強く染色される。

• p16 と p53 の IHC

表 III-11 の判定区分により p53 の免疫染色の結果を陽性・陰性に分類した。その結果 p53 陽性例は 11 例、p53 陰性例は 29 例であった。p53 と p16 の免疫染色を組み合わせた結果(表 III-12)では、HPV 陽性 28 例中 27 例(96%)で p16 陽性/p53 陰性であり、HPV 陰性 12 例中 10 例(83%)で p16 陰性/p53 陽性であった。p16 と p53 とは、有意差をもって逆の相関関係を認めた。

表 III-12 : p16 と p53 の免疫染色結果

p16/p53	HPV 関連 28 例	HPV 非関連 12 例
p16+/p53+	1 (4%)	0
p16+/p53-	27 (96%)	1 (8%)
p16-/p53+	0	10 (83%)
p16-/p53-	0	1 (8%)

p<0.0001

- Ki67 IHC

HPV 関連腫瘍は非関連腫瘍にくらべ、表 III-13 に示すように、Ki67 の染色細胞の割合が高い傾向が認められた。

表 III-13 : Ki67 免疫染色

	HPV 関連 28 例	HPV 非関連 12 例
陽性細胞率 (平均値)	89%	74%
範囲	80-100%	60-100%

$p < 0.0001$

・ 病理組織像

HPV 関連 SCC 28 例の分化度は、高分化 1 例、中分化 23 例、低分化 3 例、未分化 1 例であった(表 III-14)。大部分は中分化に分類され、その病理組織像の特徴は、境界不明瞭な楕円形から紡錘状の細胞形態であり、所々で角化巣を認める像であった(図 III-9)。

一方 HPV 非関連 SCC12 例は、高分化 9 例、中分化 2 例、低分化 1 例で、大部分は高分化に分類され、その病理組織像は、細胞質が大きく核小体が目立ち、細胞境界明瞭であり癌真珠などの角化像が認められるのが特徴であった(図 III-10)。

表 III-14 : 病理組織像 分化度

分化度	HPV 関連 28 例	HPV 非関連 12 例
高分化	1	9
中分化	23	2
低分化	3	1
未分化	1	0

p < 0.0001

図 III-9 : HPV 関連腫瘍 ×400 HE 染色

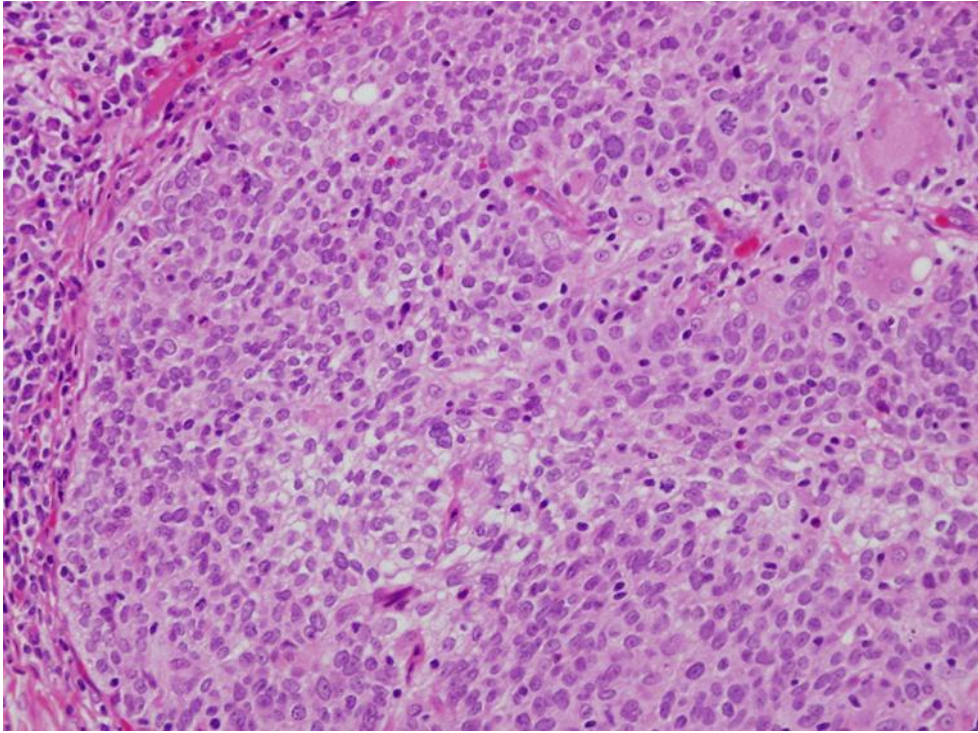
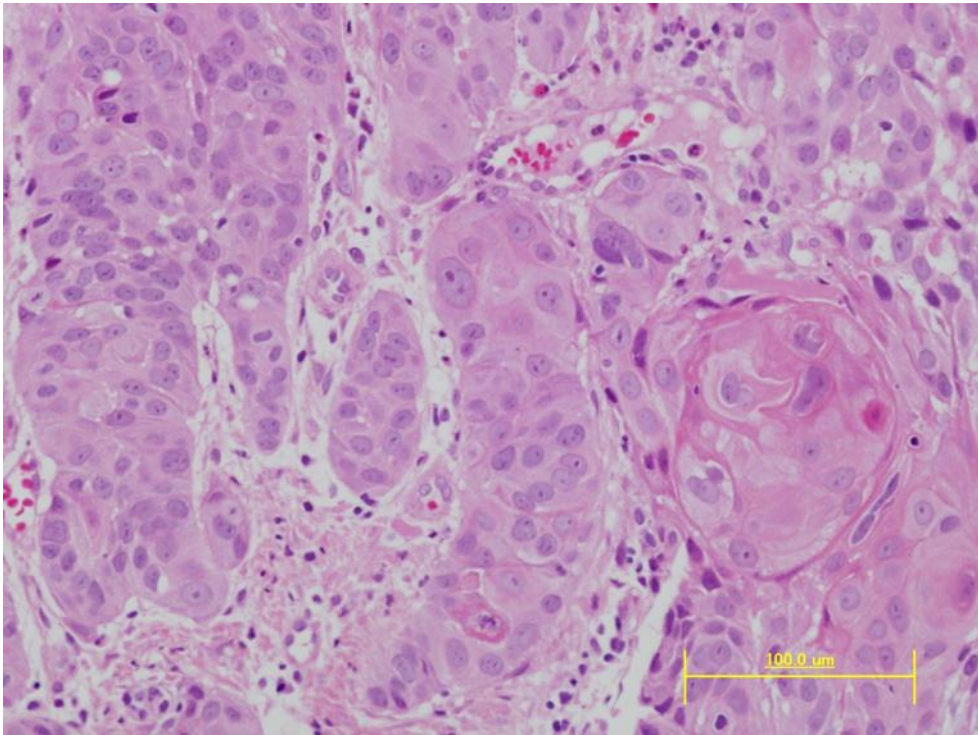


図 III-10: HPV 非関連腫瘍 ×400 HE 染色



• ECAC (Ectopic chromosome around centrosome) 検出率

ECAC は、分裂中期に対称性に傍中心体に出現する染色体である(図 III-11)。

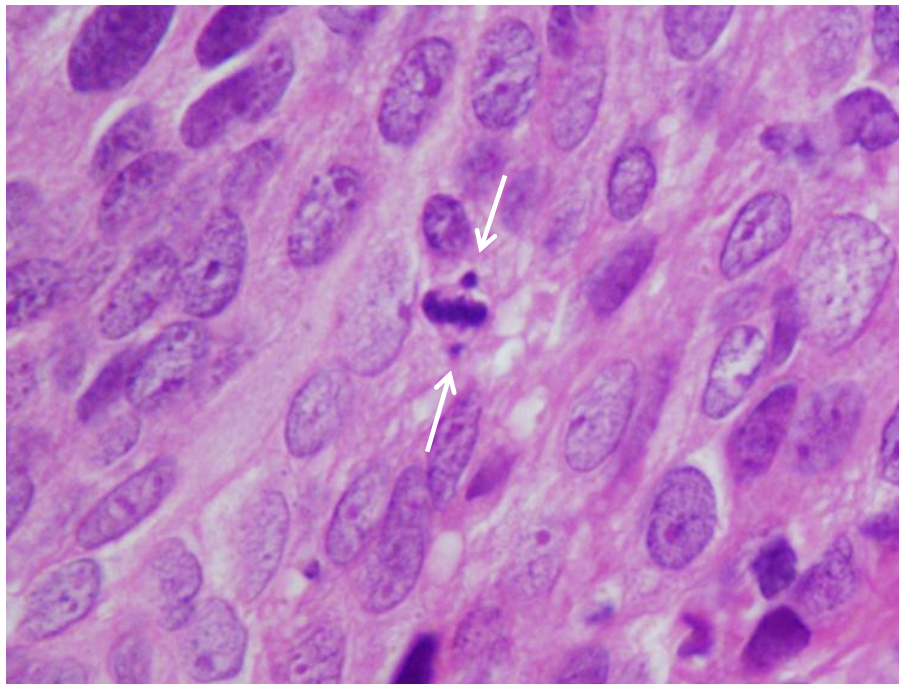
HPV 関連腫瘍 28 例のうち 18 例(64%)に ECAC を認め、一方 HPV 非関連腫瘍 12 例には ECAC は認めなかった(表 III-15)。p<0.0001 であり、ECAC は HPV 関連腫瘍のよい指標となった。

表 III-15 : ECAC 検出率

ECAC	HPV 関連 28 例	HPV 非関連 12 例
+	18 (64%)	0 (0%)
-	10 (36%)	12 (100%)

p<0.0001

図 III-11: HPV 関連中咽頭癌 ECAC 拡大写真



対称性に出現する異所性染色体(→)を確認した。

・ 患者背景と HPV 感染との相関

患者年齢の中央値は、HPV 陽性 28 例は 61.5 歳 (42-86)、HPV 陰性 12 例は 64 歳 (52-88) であり、HPV 陽性症例で若干年齢が低い結果であった。性別との相関では、男性 32 人中 HPV 陽性は 21 人 (66%)、HPV 陰性は 11 人 (34%) であるのに対し、女性 8 人中 HPV 陽性は 7 人 (88%)、HPV 陰性は 1 人 (12%) であり、女性患者において HPV 陽性率が高い傾向を認めた。喫煙歴との相関では、非喫煙者 16 人中 HPV 陽性は 15 人 (94%)、HPV 陰性は 1 人 (6%) であるのに対し、喫煙者 21 人中 HPV 陽性は 11 人 (52%)、HPV 陰性は 10 人 (48%) であり、非喫煙者の HPV 陽性率は有意差 ($p=0.0064$) をもって高い結果であった (表 III-16)。

表 III-16 : HPV と患者背景因子との相関

	HPV 関連 28 例	HPV 非関連 12 例	P 値
年齢 (歳)			p=0.6911
中央値	59.5	62.5	
範囲	39-84	51-83	
性別 (症例数)			p=0.2272
男性	21	11	
女性	7	1	
喫煙歴 (症例数)			p=0.0064
なし	15	1	
あり	11	10	
不明	2	1	

[考察]

・ HPV 検出とタイピング

Clinichip®HPV を用いた LAMP 法にて 25 例、ISH 法にて 28 例に HPV-DNA が検出された。3 例の ISH 陽性例で Clinichip®HPV で検出できなかった理由を、病理標本を見直し検討した。他検体と比べ 2 例にてリンパ球浸潤が強いこと、1 例にて腫瘍量が少ないこと、および標本中の HPV-DNA の L1 領域が欠失していることが原因として考えられた。ISH の結果において、症例ごとでそのドット状の陽性所見は異なっていたが、それは HPV の宿主 DNA へ取り込みされたコピー数が症例ごとで異なるためと考えられた。

HPV 型では、HPV16 型が 93% であり、HPV33 型と HPV35 型を 1 例ずつ認めた。本邦の他施設の報告でも、HPV16 型が大多数であり、HPV33、18、58 型が少数ながら報告されている。米国の報告でも頭頸部癌で検出される HPV は 90% 以上が HPV16 型で、本研究と同じ結果であった。子宮頸癌では、米国では HPV16、18 型の感染が 9 割をしめる一方、本邦でも、16、18 は高頻度であるが、52、58、33、31 といった他の高リスク型の HPV が約 3 割を占めている。16、18 型の割合を正確に知ることは、今後のワクチンによる予防対策を考える上でも大切である。

・ p16 IHC

HPV 関連腫瘍では p16 が過剰発現しているのに対し、HPV 非関連腫瘍では p16 遺伝子の変異、欠失、あるいはメチル化のため、その発現はないか減弱しているとされている。これらにより p16 は HPV 関連腫瘍の良いマーカーとなりうるとされている[49]。

p16 の IHC は広く普及しており、施行、判別が容易と報告されている。その染色パターンは腫瘍細胞における核と細胞質が強く瀰漫性に染色されるか、全く染色されないかのどちらかを示し、本研究結果でも同様に陽性、陰性の判別が容易であった。本症例の p16 陽性 29 例中 28 例は HPV 陽性であり、本研究にても p16IHC は臨床的に HPV 関連腫瘍の有用な検査法であると判断された。

p16 が中咽頭癌の HPV 関連腫瘍の厳密な意味で最適なバイオマーカーになりうるかどうかは、p16 の HPV に感染に対する特異性にある。実際 p16 の過剰発現は HPV 感染と別のメカニズムによっても起こりうるとされている。p16 の過剰発現は HPV 非関連腫瘍でも少数であるが報告されており、本研究にても 1 例の p16 陽性/HPV 陰性症例を認めた。HPV-DNA が検出されない p16 過剰発現症例の臨床的意義は今後検討されるべき課題である。

- ・ p53 IHC

子宮頸癌と異なり、頭頸部癌では、HPV 関連腫瘍と p53 変異に伴う腫瘍が混在して認められる[38, 63-66]。頭頸部 HPV 非関連腫瘍では p53 の変異頻度が高く、一方 HPV 関連腫瘍では p53 の変異頻度は低く、破壊性の変異が少ないと報告されている[38, 64, 66]。Westra らは、扁桃癌における p53 蛋白の DNA 結合領域である L2/L3 領域の変異(破壊的変異)の有無に関し検討している。p53 の変異を認めた 14 例の扁桃癌のうち、HPV 陰性の 11 例のうち 7 例は破壊的変異を認めたのに対し、HPV 陽性の 3 例は全て非破壊的変異であったと報告している[66]。すなわち HPV 関連腫瘍で p53 変異が共存する場合でも、その p53 の変異は破壊的でなく p53 の機能が保持されている可能性が示唆される。

本研究で確認された HPV 関連腫瘍における p53 の IHC の特徴的染色パターンは、HPV 非関連腫瘍の染色パターンとは明らかに異なっていた。HPV 関連腫瘍のそれは、弱い核の染色を瀰漫性に認め部分的に強い染色を認めるものである。一般的に HPV 非関連腫瘍の染色パターンは、変異型 p53 の半減期が長く核内に長期に渡り蓄積したものをしているものと考えられている。一方 HPV 関連腫瘍の染色パターンは、HPV 関連腫瘍の p53 変異が少ない、破壊的変異がないなどの報告からも、腫瘍細胞内の機能欠損のない p53 や野生型 p53 の過剰発現を見ている可能性が考えられた。過剰発現の理由として、腫瘍内の低酸素や DNA ダメージなど環境によるアップレギュレーションや、ウイルス蛋白による p53 蛋白の安定化などが考えられるが明らかではない。

頭頸部 HPV 関連腫瘍での p53 の過剰発現は報告されているが[63, 64]、p53 の IHC 判別は陽性細胞率を 20%から 30%程度を境に陰性、陽性を判別し、明確な染色パターンによる判別は報告されていない。中咽頭癌では異なった発癌機構にて発症した腫瘍を見るため、p53 でのこの HPV 関連腫瘍特有の p53 染色パターンの認識は重要と考えられた。

本研究の結果から、中咽頭扁平上皮癌の p53IHC の判別にて-~/spot++のパターンであれば HPV 関連腫瘍の可能性が高く、+++のパターンであれば HPV 非関連腫瘍の可能性が高いと考えられた。本研究にて HPV 関連腫瘍の 1 例に+++のパターンを認めたが p53 の機能破壊的変異を合併している可能性が示唆された。p53 の変異解析により、今回の染色パターンとの相関がさらに明らかになると考えられた。

p53 がアポトーシスを誘導する重要な蛋白であることを考えると、HPV 関連腫瘍内に機能型 p53 が過剰発現していることが、その腫瘍の放射線治療や化学療法に対する反応良好性と関与している可能性も示唆された。

- Ki67 IHC

Ki67は細胞周期関連核タンパク質であり、増殖中の細胞では、G1期、S期、G2期、M期において発現するが、増殖を休止しているG0期においては存在しないため、細胞増殖と細胞周期のマーカーとして用いられている。HPV関連腫瘍のKi67陽性細胞率は平均約90%に対し、HPV非関連腫瘍のそれは約75%であり、HPV関連腫瘍の細胞増殖の活性は、HPV非関連腫瘍に比べ高いことが示された。

- 病理組織像の検討

中咽頭 HPV 関連腫瘍の病理組織像に関しては、ワシントン大学の El-Mofty らのグループが詳細に報告している[47-49]。彼らは中咽頭癌の病理組織像を角化型(K型)と非角化型(NK型)に分類し詳細に検討している。角化型は豊富な好酸性細胞質、明瞭な細胞境界、腫瘍巢の周りの豊富な線維化間質、細胞間橋、明瞭な核小体などの典型的扁平上皮癌の特徴を有するとしている。一方、非角化型は卵円形、紡錘形の細胞形状、不明瞭な細胞境界、高クロマチン腫瘍、単相的でシート状・巣状・結節状の構造形成、未熟な間質の発達などの特徴を有するとしている。さらに角化型と非角化型の混在する場合をハイブリッド型(H型)とし、NK型とH型はHPV関連腫瘍と関連し、K型はHPV非関連腫瘍と関連すると報告している。本研究でもWHO分類および癌取扱い規約にもとづき詳細に病理組織像を検討した。HPV関連腫瘍の大部分

は中分化に分類され、HPV 非関連腫瘍の大部分は高分化に分類された。中分化の病理像はNK型、高分化はK型にほぼ相当すると考えられた。しかし、HPV 関連腫瘍の厳密な区別が難しい症例もあった。

本研究では未分化癌を1例に認め、HPV陽性、IHCの結果はp16陽性、p53陰性であった。米国の中咽頭未分化癌16例をまとめた報告[56]では、88%がHPV陽性で、94%がp16陽性、68%がp53陰性で、かつ全例Epstein Barr virus (EBV)は陰性、予後はHPV関連中咽頭SCCと同様、予後良好であったと報告している。本研究での中咽頭未分化癌も同様の病理組織学的特徴であり、予後良好を認めた。

・ ECAC の検出

腫瘍細胞の中には、異常核分裂像が多く認められることが知られている。ECAC も染色体不安定性の背景の中に出現した染色体異常の 1 つの形態と考えられるが、ECAC は HPV 関連の子宮頸癌に特異的に出現することが、古田らにより報告されている。本研究にて、我々は HPV 関連の中咽頭癌にのみ、64% の頻度で ECAC を検出した。一方 HPV 非関連腫瘍には ECAC を全く検出しなかった。ECAC の発見頻度は腫瘍標本の大きさに影響をうけるため一定しないが、特異度が高いため、同定できた場合の HPV 関連腫瘍との相関は非常に高いと考えられた。病理組織像から HPV 関連の有無を評価する、強力な診断マーカーになると考えられた。

・ 喫煙と HPV の関連

頭頸部癌は以前より喫煙との強い相関が指摘されてきたが、HPV 関連の頭頸部癌は非喫煙者に多いことが報告されている。本研究でも、喫煙歴と HPV 関連腫瘍発症に有意な相関を認めた。喫煙歴のない中咽頭扁平上皮癌患者は、HPV 関連腫瘍の割合が高いことが示された。また、喫煙者の約半数は HPV 関連であり、このことは、HPV 関連腫瘍は非喫煙者だけでなく、喫煙者にも起こることが示された。HPV 関連の頭頸部癌は、喫煙、飲酒と密接な関係のある従来 of 頭頸部癌とは異なるメカニズムで発癌に至っていることが示唆された。

[結論]

本研究では中咽頭側壁癌の70%にHPV関連腫瘍を認めた。HPV関連腫瘍と非関連腫瘍は、病理組織像、p16、p53、Ki67のIHCの発現パターンに関して明らかな相違を認めた。HPV関連腫瘍の病理組織像を見る場合、分化度でHPV関連腫瘍と非関連腫瘍を区別することはある程度可能であった。今回我々が着目したHPV関連腫瘍に特異的な異常核分裂像の1つであるECACの検出は、HPV関連腫瘍の診断においてきわめて特異度が高く、非常に有用と考えられた。子宮頸部では、HPV感染を上皮内病変で認め、ECACは低リスク型HPV感染病変にはみられず、高リスク型HPV感染の前がん病変や癌病変のみに出現するので、高リスク型HPV感染の癌化リスクの高い病変を鑑別するのによい指標となる。一方、頭頸部領域では関連腫瘍と非関連腫瘍があり、発癌のメカニズムの異なる癌を区別し、治療効果や予後を予測するために非常に重要と考えられた。ECAC、HPV-DNA検査、p16、p53を組み合わせた免疫染色により、HPV関連腫瘍と非関連腫瘍の個別化をはかり、治療効果予測がより明確にできると考えられた。さらに、前癌病変に対しての癌化リスクの評価にも、これらの検索が有用である可能性が示唆された。

IV. HPV 関連腫瘍と非関連腫瘍の治療予後に関する検討

[背景]

□ 中咽頭癌放射線治療

頭頸部癌にて HPV 関連腫瘍は中咽頭癌、特に扁桃や舌根に多く認められ、放射線治療や化学療法にて非常に良好な成績が報告されている。がん研有明病院にて 2005 年 4 月から 2010 年 4 月までに放射線治療を施行した中咽頭側壁癌(扁桃癌を含む)51 例の治療成績は、3 年全生存率 85%、3 年無再発生存率 80%であり、欧米での報告とくらべても、遜色のない結果が得られている。しかし、放射線治療後の有害事象として口腔内乾燥や嚥下機能低下などの副作用を認め、特に晩期障害としての口腔内乾燥は必発である。その理由は、中咽頭腔とほぼ同じ高さに耳下腺などの唾液腺が位置し、照射野にそれらが含まれるからである。

近年、放射線治療方法の1つとして強度変調放射線治療(IMRT: Intensity Modulated Radiation Therapy)が開発され、それにより病変部に必要十分な線量を投与し、かつリスク臓器の線量を減少させることが可能になった。すでに欧米では IMRT が普及し良好な成績が報告され、中咽頭癌放射線治療の標準治療になりつつある(表 IV-1)[8-15]。IMRT によるリスク臓器への線量低減により、放射線治療に伴う口腔内乾燥や嚥下機能低下などの副作用軽減が試みられている[13, 29]。当院では 2008 年 12 月より頭頸部癌の治療に IMRT を施行しており、その 1 例を示す(図 IV-1,2)。

中咽頭癌には放射線化学療法の場合 66Gy/33Fr, 照射単独の場合 66Gy/30Fr の線量投与を行っている。放射線治療計画では、脊髄・脳幹の線量制約に加え、照射に伴う唾液量減少を軽減するために耳下腺への照射線量の低減を行っている。Eisbruchらは、放射線治療を施行した患者の実際の耳下腺からの唾液量を経時的に測定することにより、耳下腺平均線量 25-30Gy 以下では治療後 2 年の耳下腺唾液分泌量が治療前の状態に回復したと報告しており[67]、IMRT 治療計画時には、耳下腺線量が 26Gy 以下になるように目標設定している。Nuttingらは、3次元放射線治療と IMRT の患者の口腔内乾燥に調査し、自他覚所見ともに IMRT で良好な結果を認めたと報告している[68]。

HPV 関連中咽頭癌は放射線治療や化学療法に対する治療効果が高く、予後良好との多数の報告がなされているが、現状では区別することなく治療している。NCCN 治療ガイドライン(2011)においても、HPV 因子による治療法の区別に関しては明記されていない。しかし今後、HPV 関連中咽頭癌の治療強度の低減の可能性が検討されるべき状況にある。

放射線治療においては、HPV 関連中咽頭癌患者の治療後長期生存を考えると、照射線量低減による口腔内乾燥などの QOL の改善効果は非常に意義あるものと考えられている。さらに IMRT によりその効果は高まると考えられる。この課題に対し、

Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)は HPV 関連中咽頭癌患者における

Phase II の臨床試験 ECOG1308 を施行している。ECOG1308 では、3 剤併用の導入化学療法後、CR 症例に対しては低線量 54Gy/27Fr の IMRT と cetuximab、non-CR に対しては高線量 69.3Gy/33Fr の IMRT と cetuximab の同時併用を施行するもので、ECOG2399 の結果[67]と比較を予定している。その目的は、腫瘍制御と QOL (Quality Of Life) に対する、照射線量の低減の可能性を評価することであり、今後の結果が待たれるところである。

表 IV-1A : 中咽頭癌 IMRT 各施設治療成績

著者	施設	年	数	F/U (月)	St III-IV (%)	LRC/LRF (%)	OS (%)
Chao	Wash U	2004	74	33	93	LRC:87(4y)	87(4y)
Garden	MDACC	2007	51	45	84	LRC:93(3y)	78(3y)
Huang	UCSF	2008	71	33	100	LC:94 RC:94(3y)	83(3y)
Daly	Stanford	2010	107	27	100	LRC:92(3y)	83(3y)
Mendenhall	U Florida	2010	130	42	90	LC:87 RC:94(5y)	76(5y)
Feng	U Michigan	2010	73	36	100	LRC:96(3y)	NA
Eisbruch	RTOG0022	2010	69	32	0	LR:9(2y)	NA
Setton	MSKCC	2011	442	37	95	LF:5	85(3y)

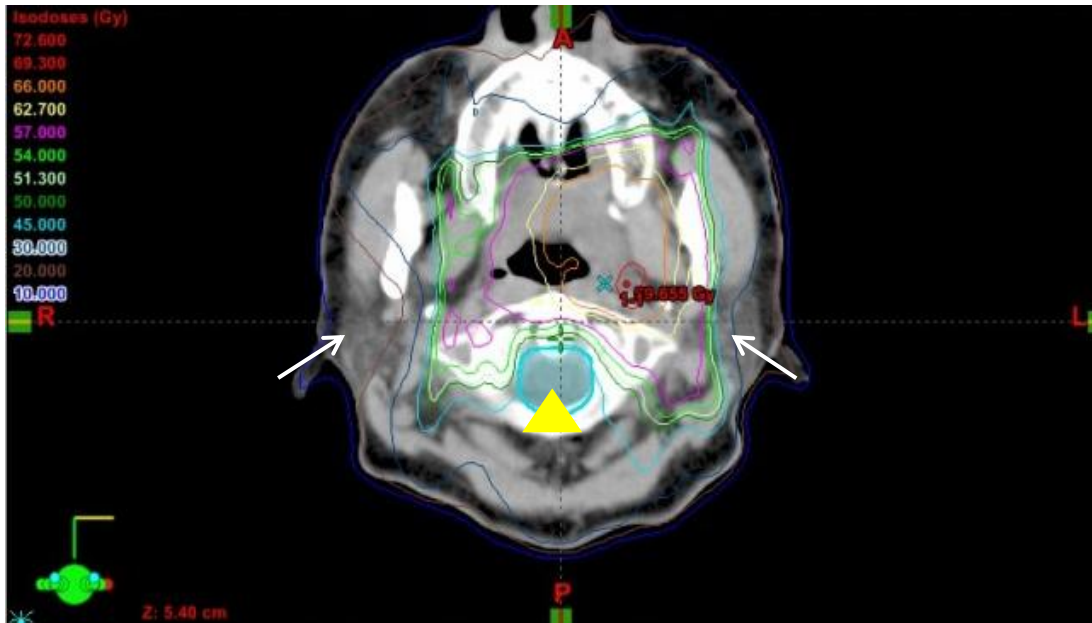
St: Stage LRC : local-regional control LRF: local-regional failure

表 IV-1B : 中咽頭癌 亜部位

著者	施設	年	数	LW	AW	PW	SW
Chao	Wash U	2004	74	68	24	0	8
Garden	MDACC	2007	51	65	31	4	0
Huang	UCSF	2008	71	35	61	4	0
Daly	Stanford	2010	107	44	50	4	3
Mendenhall	U Florida	2010	130	40	51	0	9
Feng	U Michigan	2010	73	48	52	0	0
Eisbruch	RTOG0022	2010	69	49	39	0	12
Setton	MSKCC	2011	442	50	46	3	2

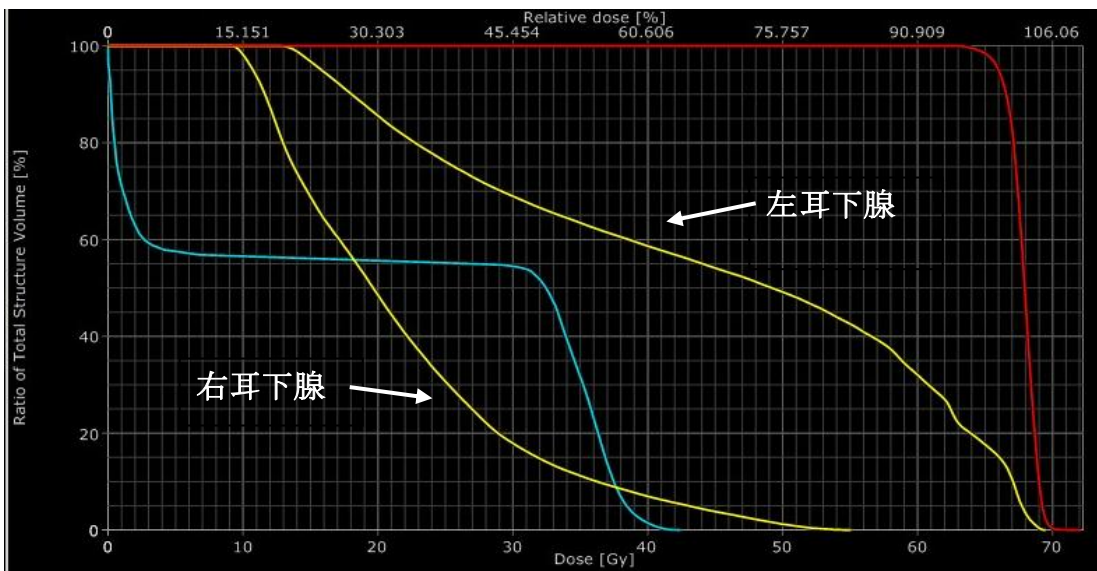
LW:側壁 AW:前壁 PW:後壁 SW:上壁

図 IV-1A : 中咽頭 IMRT 左扁桃癌の腫瘍断面での線量分布図



耳下腺(→)、脊髄(△)の線量を下げる。左上に線量を表示した。

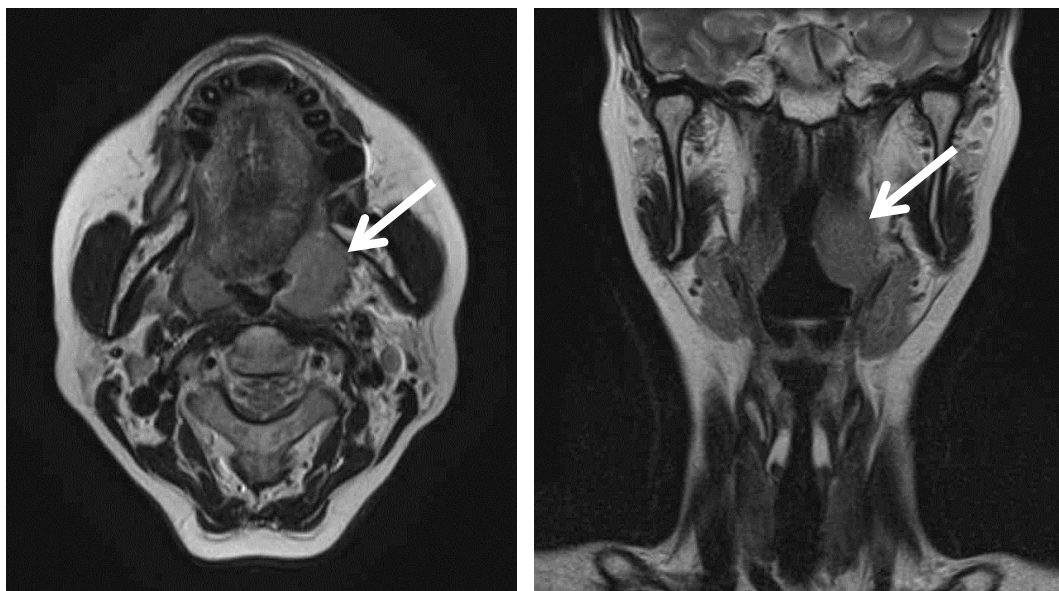
図 IV-1B : Dose Volume Histogram



赤:PTV(Planning Target Volume) 青:脊髄 黄:耳下腺(右と左)
 縦軸:ターゲットおよびリスク臓器の照射体積(%)横軸:照射線量(Gy)
 IMRT により右耳下腺線量を左に比べ大幅に減らすことが可能となる。

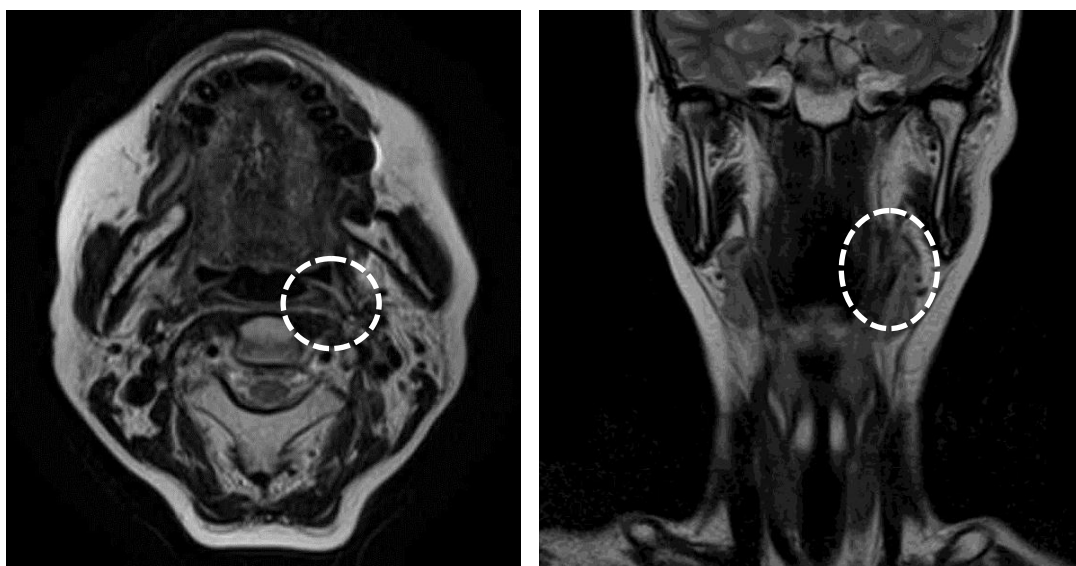
図 IV-2 : 左扁桃癌 (T2N2bM0) の一例

治療前 MRI (T2 強調画像)



左扁桃に腫瘍(→)を認める。

治療 (化学放射線療法) 後 MRI (T2 強調画像)



治療後、腫瘍は消失 (点線) している。

[目的]

本研究の対象症例において、HPV 関連腫瘍と非関連腫瘍の治療効果・治療予後に関する比較・検討を行う。

[方法]

本研究での中咽頭側壁癌 40 例を HPV 関連腫瘍 28 例と、HPV 非関連腫瘍 12 例に分類し、その病期、治療方法、治療効果を回顧的に調査し、比較した。Kaplan-Meier 法による生存曲線を作成し、生存率を評価した。Kaplan-Meier 法による生存曲線の 2 群間の有意差は、log-rank test、Generalized Wilcoxon test にて検定した。統計解析ソフトは、JMP 9(SAS Institute, Inc. North Carolina, USA)を使用し、P 値<0.05 をもって有意差とした。

[結果]

HPV 関連腫瘍群は非関連腫瘍群に比べ、進行症例が多い傾向であり、特に頸部のリンパ節転移の進行例を多く認めた(表 IV-2)。そのため、治療方法も導入化学療法から開始した症例が多かった。

放射線治療方法は、3D-CRT を使用したものが 38 例、IMRT を使用したものが 2 例であった。原発巣に対し 66-70Gy/33-35Fr の照射が基本であった。

HPV 関連腫瘍群 28 例の病期は、I 期 0 例、II 期 2 例、III 期 4 例、IVA 期 20 例、IVB 期 2 例であった。その治療方法は、Induction Chemotherapy (以下 IC) + Concurrent Chemoradiationtherapy (以下 CCRT) が 3 例、IC + Radiationtherapy (以下 RT) が 5 例、CCRT が 9 例、RT 単独が 11 例、であった。照射前頸部廓清は 1 例で施行された。治療一次効果は、CR 25 例、PR 3 例、PD 0 例、であった(表 IV-3)。経過観察期間中央値は、2 年 8 か月であった。PR 症例 3 例のうち、原発救済手術にて無再発が 1 例、頸部廓清にて無再発が 1 例、死亡が 1 例であった。CR 症例のうち 2 例で再発を認め、遠隔転移再発 1 例(肺転移)、原発再発 1 例(3 年 7 か月の生存を確認)であった。原発 T4 症例 3 例、N2c (両側 LN 転移) 2 例、N3 症例(6cm 以上) 1 例に対し IC+CCRT もしくは IC+RT が施行され、全例 CR であった。

HPV 非関連腫瘍群 12 例の病期は、I 期 1 例、II 期 2 例、III 期 3 例、IVA 期 6 例、IVB 期 0 例、であった。その治療方法は、IC+RT 1 例、CCRT 6 例、RT

単独 5 例であった。照射前頸部廓清は1例に施行された。治療一次効果は CR 10 例、PR 0 例、PD 1 例、不明 1 例であった(表 IV-3)。観察期間中央値は、2 年 2 か月。治療効果不明の症例は、CCRT1 コース目化学療法後、急性腎不全による死亡を認めた。PD 症例 1 例は原発救済手術にて無再発であった。CR 症例のうち 1 例に原発再発あり救済手術にて再発なし。CR 症例の 1 例に原因不明死を認めた。

Kaplan-Meier 法による生存曲線を作成した(図 IV-3, 4)。HPV 関連腫瘍、非関連腫瘍の 2 年粗生存率はそれぞれ 96%、82%であった。2 群間の有意差検定では、log-rank test で $p=0.1196$ 、Generalized Wilcoxon test で $p=0.1106$ であった。2 年無増悪生存率はそれぞれ 89%、65%であった。2 群間の有意差検定では、log-rank test で $p=0.2121$ 、Generalized Wilcoxon test で $p=0.1090$ であった。

表 IV-2 : 臨床病期

	HPV 関連 28 例	HPV 非関連 12 例	P 値
T			p=0.9916
T1	5 (18%)	2(17%)	
T2	14(50%)	6(50%)	
T3	6(21%)	3(25%)	
T4	3(11%)	1(8%)	
N			p=0.0466
N0	3 (11%)	7 (58%)	
N1	3 (11%)	0 (0%)	
N2a	4 (14%)	1(8%)	
N2b	14 (50%)	3 (25%)	
N2c	2 (7%)	1(8%)	
N3	2 (7%)	0(0%)	
M			
M0	28(100%)	12(100%)	

表 IV-3 : 治療一次効果

治療効果	HPV 関連 28 例	HPV 非関連 12 例
CR	25 (89%)	10 (83%)
PR	3 (11%)	0
PD	0	1 (8.5%)
不明	0	1 (8.5%)

図 IV-3 : 全生存率

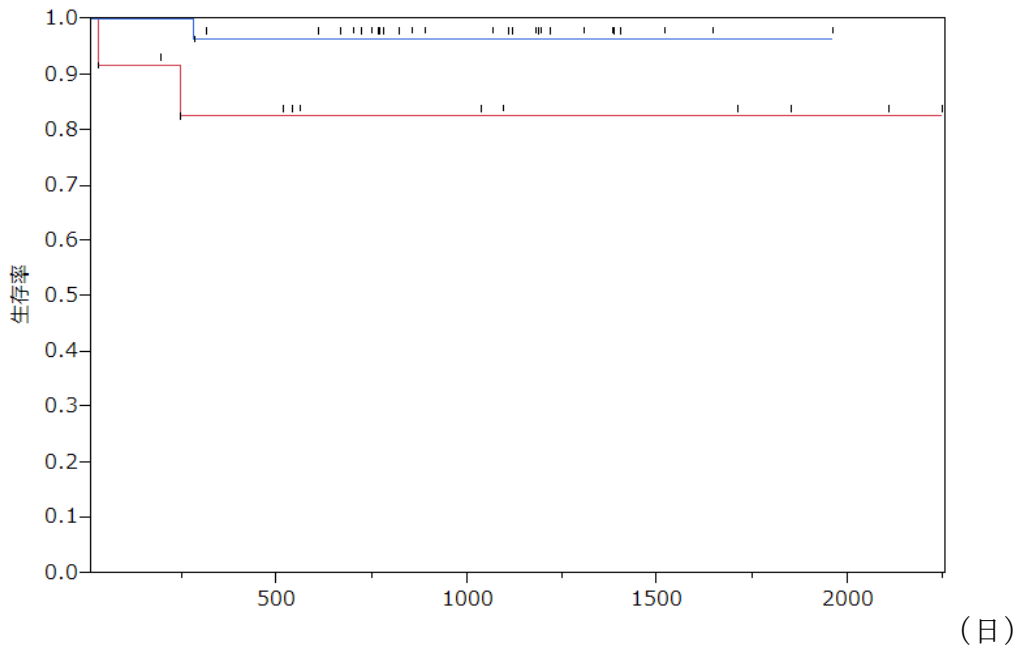
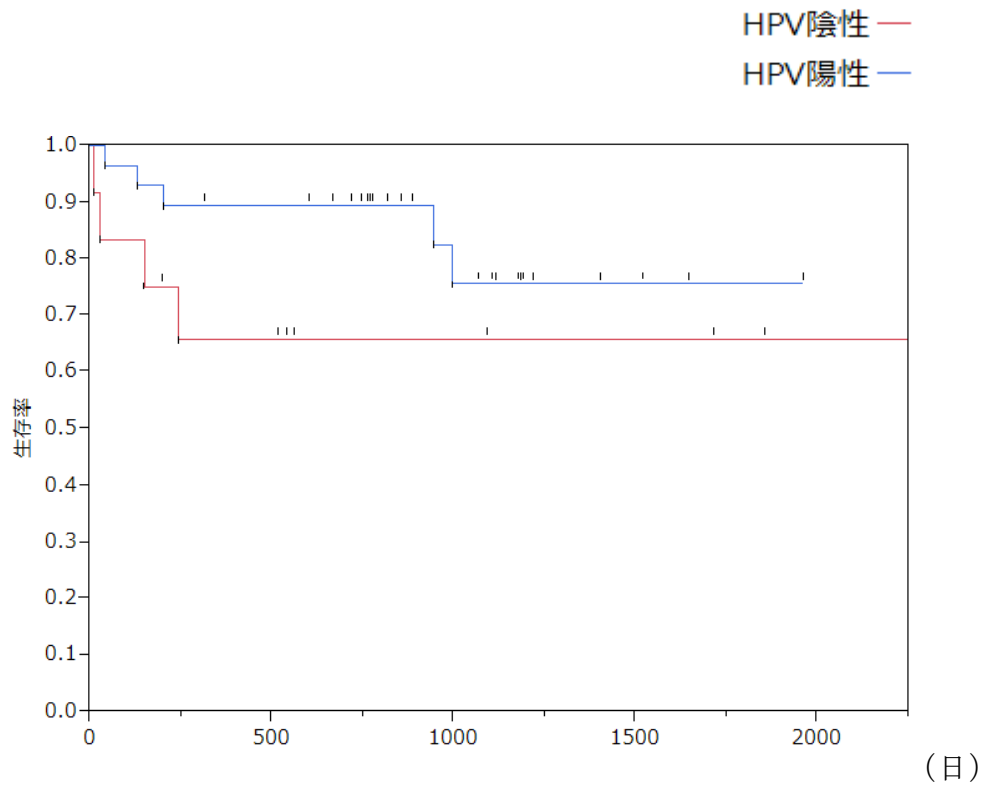


図 IV-4 : 無増悪生存率



[考察]

HPV 関連腫瘍群は非関連腫瘍群に比べ、進行症例が多い傾向であり、特にリンパ節因子の進行例を多く認めた。HPV 関連中咽頭癌は非関連中咽頭癌にくらべ、原発の大きさが小さい割に、局所リンパ節転移が多い傾向が報告されており[36]、本研究の対象症例も同様の傾向を認めた。それにもかかわらず HPV 関連腫瘍群では、2 年粗生存率 96%と非常に良好な結果が得られた。これまでの欧米での報告と同様に、HPV 関連腫瘍の予後が良好であることが示された。また、原発 T4 症例 3 例、N2c (両側リンパ節転移)症例 2 例、N3 症例 (6cm 以上) 1 例の進行症例に対しても CR を認めていることは特筆すべきことであり、HPV 関連腫瘍の良好な治療反応性を反映していると考えられる。

一方 HPV 非関連腫瘍群も、病期は HPV 関連群に比べ進行症例は少ないものの、生存率は比較的良好な結果が得られた。HPV 非関連腫瘍群と HPV 関連腫瘍群の 2 群間における生存率に有意差は認めなかった。HPV 非関連腫瘍死亡例の 2 例のうち、1 例は治療中の治療関連死であり、1 例は中咽頭癌以外の原因不明死であった。今回の検討では、HPV 非関連腫瘍症例は有意に生存率が低いとは判断できなかった。

他施設での報告にくらべ当院の治療成績が良い結果が得られている理由に、外科医による救済手術の体制の充実、適切な治療法の選択、研究対象が中咽頭側壁癌に限定していることなども関与している可能性が考えられた。また、経過観察期間が短

く、対象患者数が少ないことも影響している可能性があり、今後の慎重な経過観察が必要と考えられる。

本研究症例においても HPV 関連中咽頭癌の予後良好性は明らかであった。進行症例でも HPV 関連腫瘍では制御可能な例も認められ、手術と放射線化学療法の治療選択における HPV 因子の意義は大きいと考えられた。HPV 関連腫瘍では症例によっては過剰治療になっている可能性もあり、患者の QOL 向上のため治療強度の低減を検討する必要性が示唆された。

[結論]

HPV 関連中咽頭側壁癌の当院での治療結果は非常に良好であった。これは HPV 関連腫瘍が化学療法や放射線治療に対し良好に反応することが原因と考えられた。

HPV 関連腫瘍に対し現在の治療より強度を下げ、HPV 非関連腫瘍に対しては強度を上げた治療が可能かどうかは、今後の検討課題である。

V. まとめ

本研究では中咽頭側壁癌の70%にHPV関連腫瘍を認め、本邦でも欧米同様に、HPV関連中咽頭癌の増加が予測された。HPV関連腫瘍と非関連腫瘍は、病理組織像、p16、p53、Ki67のIHCの発現パターンに関して明らかな相違を認めた。臨床的に中咽頭癌のHPVの検出は、もはや必要な臨床情報の1つである。今回我々が着目したHPV関連腫瘍に特異的な異常核分裂像の1つであるECACの検出は、HPV関連腫瘍の診断においてきわめて特異度が高く、非常に有用と考えられた。

本研究において、HPV関連腫瘍群はHPV非関連腫瘍群に比べ進行症例が多いが、HPV関連腫瘍群の治療予後は非常に良好であった。ECAC、HPV-DNA検査、p16、p53を組み合わせた免疫染色により、HPV関連腫瘍と非関連腫瘍の個別化が可能であった。今後それらにもとづき治療効果を予測しQOLを考慮したオーダーメイド治療を検討する必要がある。

本研究が今後の中咽頭扁平上皮癌やHPV関連腫瘍の研究の一助になれば幸いである。

VI. 謝 辞

本論文は筆者が東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。

東京大学医学部附属病院 放射線科准教授 中川 恵一 先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。また東京大学医学部附属病院 放射線科のスタッフの方々には、日々適切な助言、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。

がん研究会有明病院 病理部 石川 雄一 先生、古田 玲子 先生には研究遂行にあたり直接ご指導を戴き、放射線治療科 小口 正彦 先生、小塚 拓洋 先生には日々適切な助言、ご指導を戴いた。ここに感謝の意を表す。

VII. 参考文献

1. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C *et al*: **Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer**. *N Engl J Med* 2010, **363**(1):24-35.
2. Allen CT, Lewis JS, Jr., El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B: **Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications**. *Laryngoscope* 2010, **120**(9):1756-1772.
3. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA: **HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic**. *Lancet Oncol* 2010, **11**(8):781-789.
4. 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**(7):1429-1435.
5. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML: **Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection**. *J Infect Dis* 2009, **199**(9):1263-1269.
6. Dahlstrom KR, Li G, Tortolero-Luna G, Wei Q, Sturgis EM: **Differences in history of sexual behavior between patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma and patients with squamous cell carcinoma at other head and neck sites**. *Head Neck* 2011, **33**(6):847-855.
7. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R: **Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers**. *J Natl Cancer Inst* 2008, **100**(6):407-420.
8. Rich JT, Milov S, Lewis JS, Jr., Thorstad WL, Adkins DR, Haughey BH: **Transoral laser microsurgery (TLM) +/- adjuvant therapy for advanced stage oropharyngeal cancer: outcomes and prognostic factors**. *Laryngoscope* 2009, **119**(9):1709-1719.
9. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, Tornillo L, Wolfensberger M, Terracciano LM: **Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality?** *Int J Cancer* 2010, **126**(5):1256-1262.

10. Adelstein DJ: **Concurrent chemoradiotherapy in the management of squamous cell cancer of the oropharynx: current standards and future directions.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007, **69**(2 Suppl):S37-39.
11. Shoushtari AN, Rahimi NP, Schlesinger DJ, Read PW: **Survey on human papillomavirus/p16 screening use in oropharyngeal carcinoma patients in the United States.** *Cancer* 2010, **116**(2):514-519.
12. Mizumachi T: 中咽頭扁平上皮癌における HPV 感染と治療成績の検討. *頭頸部癌* 2010, **36**(4):498-501.
13. Tokumaru Y: 頭頸部扁平上皮癌におけるヒト乳頭腫ウイルス(HPV)の感染と p53 遺伝子変異. *頭頸部癌* 2009, **35**(4):360-364.
14. Chao KS, Ozyigit G, Blanco AI, Thorstad WL, Deasy JO, Haughey BH, Spector GJ, Sessions DG: **Intensity-modulated radiation therapy for oropharyngeal carcinoma: impact of tumor volume.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004, **59**(1):43-50.
15. Garden AS, Morrison WH, Wong PF, Tung SS, Rosenthal DI, Dong L, Mason B, Perkins GH, Ang KK: **Disease-control rates following intensity-modulated radiation therapy for small primary oropharyngeal carcinoma.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007, **67**(2):438-444.
16. Huang K, Xia P, Chuang C, Weinberg V, Glastonbury CM, Eisele DW, Lee NY, Yom SS, Phillips TL, Quivey JM: **Intensity-modulated chemoradiation for treatment of stage III and IV oropharyngeal carcinoma: the University of California-San Francisco experience.** *Cancer* 2008, **113**(3):497-507.
17. Daly ME, Le QT, Maxim PG, Loo BW, Jr., Kaplan MJ, Fischbein NJ, Pinto H, Chang DT: **Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of oropharyngeal cancer: clinical outcomes and patterns of failure.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010, **76**(5):1339-1346.
18. Mendenhall WM, Amdur RJ, Morris CG, Kirwan JM, Li JG: **Intensity-modulated radiotherapy for oropharyngeal squamous cell carcinoma.** *Laryngoscope* 2010, **120**(11):2218-2222.
19. Feng FY, Kim HM, Lyden TH, Haxer MJ, Worden FP, Feng M, Moyer JS, Prince ME, Carey TE, Wolf GT *et al*: **Intensity-modulated chemoradiotherapy aiming to reduce dysphagia in patients with oropharyngeal cancer: clinical and functional results.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(16):2732-2738.
20. Eisbruch A, Harris J, Garden AS, Chao CK, Straube W, Harari PM, Sanguineti G, Jones CU, Bosch WR, Ang KK: **Multi-institutional trial of accelerated hypofractionated intensity-modulated radiation therapy for early-stage**

- oropharyngeal cancer (RTOG 00-22).** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010, **76**(5):1333-1338.
21. Setton J, Caria N, Romanyshyn J, Koutcher L, Wolden SL, Zelefsky MJ, Rowan N, Sherman EJ, Fury MG, Pfister DG *et al*: **Intensity-Modulated Radiotherapy in the Treatment of Oropharyngeal Cancer: An Update of the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Experience.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012, **82**(1):291-298
 22. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE *et al*: **Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**(9):709-720.
 23. Hoffmann M, Ihloff AS, Gorogh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, Rittgen W, Schwarz E, Kahn T: **p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer.** *Int J Cancer* 2010, **127**(7):1595-1602.
 24. Luginbuhl A, Sanders M, Spiro JD: **Prevalence, morphology, and prognosis of human papillomavirus in tonsillar cancer.** *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009, **118**(10):742-749.
 25. Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ahrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D *et al*: **Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma?** *Int J Cancer* 2009, **125**(2):362-366.
 26. Straetmans JM, Olthof N, Mooren JJ, de Jong J, Speel EJ, Kremer B: **Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas.** *Laryngoscope* 2009, **119**(10):1951-1957.
 27. Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB: **Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma.** *Am J Pathol* 1998, **152**(1):145-156.
 28. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG: **Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas.** *Cancer* 2001, **92**(11):2875-2884.
 29. Frisch M, Biggar RJ: **Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas.** *Lancet* 1999, **354**(9188):1442-1443.
 30. Franceschi S, Munoz N, Snijders PJ: **How strong and how wide is the link**

- between HPV and oropharyngeal cancer?** *Lancet* 2000, **356**(9233):871-872.
31. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H: **A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer.** *EMBO J* 1984, **3**(5):1151-1157.
 32. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H: **A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**(12):3812-3815.
 33. Yugawa T, Kiyono T: **[Molecular basis of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses].** *Uirusu* 2008, **58**(2):141-154.
 34. Narisawa-Saito M, Kiyono T: **Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins.** *Cancer Sci* 2007, **98**(10):1505-1511.
 35. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC: **Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years.** *Cancer* 2005, **103**(9):1843-1849.
 36. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, Hopman AH, Ramaekers FC, Speel EJ: **Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas.** *Int J Cancer* 2008, **122**(12):2656-2664.
 37. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP: **Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers.** *Int J Cancer* 2004, **108**(5):766-772.
 38. Fallai C, Perrone F, Licitra L, Pilotti S, Locati L, Bossi P, Orlandi E, Palazzi M, Olmi P: **Oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy or radiochemotherapy: prognostic role of TP53 and HPV status.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009, **75**(4):1053-1059.
 39. Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, Amdur RJ, Hinerman RW, Villaret DB, Moore-Higgs GJ, Greene BD, Speer TW, Cassisi NJ *et al*: **Squamous cell carcinoma of the oropharynx: surgery, radiation therapy, or both.** *Cancer* 2002, **94**(11):2967-2980.
 40. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Merlano M, Bruzzi P, Lefebvre JL: **Cancer of the oropharynx.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2002, **41**(1):107-122.
 41. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L: **Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group.**

- Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer.** *Lancet* 2000, **355**(9208):949-955.
42. Calais G, Alfonsi M, Bardet E, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tortochaux J, Oudinot P, Bertrand P: **Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma.** *J Natl Cancer Inst* 1999, **91**(24):2081-2086.
 43. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH: **A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen.** *Int J Cancer* 2007, **121**(11):2465-2472.
 44. Lewis JS, Jr., Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, El-Mofty SK: **p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status.** *Am J Surg Pathol* 2010, **34**(8):1088-1096.
 45. Ragin CC, Taioli E: **Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis.** *Int J Cancer* 2007, **121**(8):1813-1820.
 46. Begum S, Westra WH: **Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status.** *Am J Surg Pathol* 2008, **32**(7):1044-1050.
 47. El-Mofty SK, Zhang MQ, Davila RM: **Histologic identification of human papillomavirus (HPV)-related squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes: a reliable predictor of the site of an occult head and neck primary carcinoma.** *Head Neck Pathol* 2008, **2**(3):163-168.
 48. El-Mofty SK, Patil S: **Human papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal nonkeratinizing squamous cell carcinoma: characterization of a distinct phenotype.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006, **101**(3):339-345.
 49. Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis JS, Jr.: **HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome.** *Head Neck Pathol* 2009, **3**(3):186-194.
 50. Hording U, Teglbjaerg CS, Visfeldt J, Bock JE: **Human papillomavirus types 16 and 18 in adenocarcinoma of the uterine cervix.** *Gynecol Oncol* 1992, **46**(3):313-316.
 51. Noel J, Lespagnard L, Fayt I, Verhest A, Dargent J: **Evidence of human**

- papilloma virus infection but lack of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of uterine cervix: report of two cases and review of the literature.** *Hum Pathol* 2001, **32**(1):135-138.
52. Teshima H, Beaudenon S, Koi S, Katase K, Hasumi K, Masubuchi K, Orth G: **Human papillomavirus type 18 DNA sequences in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix.** *Arch Gynecol Obstet* 1997, **259**(4):169-177.
53. Chernock RD, Lewis JS, Jr., Zhang Q, El-Mofty SK: **Human papillomavirus-positive basaloid squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: a distinct clinicopathologic and molecular subtype of basaloid squamous cell carcinoma.** *Hum Pathol* 2010, **41**(7):1016-1023.
54. Keelawat S, Liu CZ, Roehm PC, Barnes L: **Adenosquamous carcinoma of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic study of 12 cases and review of the literature.** *Am J Otolaryngol* 2002, **23**(3):160-168.
55. Jo VY, Mills SE, Stoler MH, Stelow EB: **Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: frequent association with human papillomavirus infection and invasive carcinoma.** *Am J Surg Pathol* 2009, **33**(11):1720-1724.
56. Carpenter DH, El-Mofty SK, Lewis JS, Jr.: **Undifferentiated carcinoma of the oropharynx: a human papillomavirus-associated tumor with a favorable prognosis.** *Mod Pathol* 2011.24(10):1306-1312
57. Duensing S, Munger K: **Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins.** *Int J Cancer* 2004, **109**(2):157-162.
58. Duensing S, Munger K: **Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability.** *Oncogene* 2002, **21**(40):6241-6248.
59. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K: **The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(18):10002-10007.
60. Duensing A, Liu Y, Tseng M, Malumbres M, Barbacid M, Duensing S: **Cyclin-dependent kinase 2 is dispensable for normal centrosome duplication but required for oncogene-induced centrosome overduplication.** *Oncogene* 2006, **25**(20):2943-2949.
61. Duensing S, Munger K: **The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome**

- instability.** *Cancer Res* 2002, **62**(23):7075-7082.
62. Furuta R, Hirai Y, Katase K, Tate S, Kawaguchi T, Akiyama F, Kato Y, Kumada K, Iwasaka T, Yaegashi N *et al*: **Ectopic chromosome around centrosome in metaphase cells as a marker of high-risk human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasias.** *Int J Cancer* 2003, **106**(2):167-171.
63. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WN, Ramaekers FC, Hopman AH, Manni JJ: **A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8.** *Int J Cancer* 2003, **107**(3):394-400.
64. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN *et al*: **EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(19):3128-3137.
65. Obata A, Eura M, Sasaki J, Saya H, Chikamatsu K, Tada M, Iggo RD, Yumoto E: **Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx.** *Int J Cancer* 2000, **89**(2):187-193.
66. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM: **Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(2):366-369.
67. Eisbruch A, Ten Haken RK, Kim HM, Marsh LH, Ship JA: **Dose, volume, and function relationships in parotid salivary glands following conformal and intensity-modulated irradiation of head and neck cancer.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999, **45**(3):577-587.
68. Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, Urbano TG, Bhide SA, Clark C, Miles EA, Miah AB, Newbold K, Tanay M *et al*: **Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial.** *Lancet Oncol* 2011, **12**(2):127-136.