KISEP Original Article
臨床耳鼻：第17卷 第2號 2006
J Clinical Otolaryngol 2006;17:203-211

비 · 부비동 반전성 유두종에서 인체유두종 바이러스와 p16의 발현

부산대학교 의학전문 대학원 이비인후과학교실,[1] 병리학교실[2]
윤종근[1] · 김지연[2] · 조규섭[1] · 노환중[1]

Human Papilloma Virus and p16 Expression in Sinonasal Inverted Papilloma

Jong-Keun Yoon, MD[1], Jee-Yeon Kim, MD[2], Kyu-Sup Cho, MD[1] and Hwan-Jung Roh, MD[1]
[1]Department of Otolaryngology and [2]Pathology, Pusan National University College of Medicine, Busan, Korea

－ABSTRACT－

Background and Objectives：Clinicopathologically inverted papilloma (IP) shows dynamic range of broad spectrum from inflammatory polyp with squamous metaplasia to malignant transformed squamous cell carcinoma (SCC). Correlation between human papilloma virus (HPV) and IP has been reported. However, the involvement timing and types of HPV in the evolution of multistep stages of IP are unknown. The aim of this study was to determine HPV types and the timing of HPV infection during IP tumorigenesis and to know relationship with HPV infection and histological grades in IP by evaluation of $p16^{INK4}$ expression as a surrogate marker of HPV infection. **Patients and Methods**：Of 57 formalin-fixed paraffin-embedded specimens which had been taken from 38 sinonasal IP patients, 5 specimens were classified as grade I, 23 specimens as grade II, 22 specimens as grade III and 7 specimens were grade IV. The presence of HPV DNA was evaluated by laser captured microdissection in the representative lesion of each grade. **Results**：HPV DNA was expressed in 7 specimens (12.3%). 5 specimens were high-risk HPV types and 2 specimens were unspecified types. All of the HPV DNA positive lesions were grade I and II. Overall p16 protein overexpression was observed in 45.6% of sinonasal IP and 60.0% in grade I, 47.8% in grade II, 45.5% in grade III and 28.6% in grade IV. There was statistical significance between of p16 expression and HPV DNA regardless of grades ($p=0.039$). **Conclusion**：HPV infection, mainly high-risk types, occurs in the benign IP as an early event during multistep tumorigenesis of IP. **(J Clinical Otolaryngol 2006;17:203-211)**

KEY WORDS：Papilloma, inverted · Papillomavirus · Laser capture microdissection · Protein p16.

서 론

반전성 유두종은 비강과 부비동을 침범하는 비교적 드문 질환이다. 모든 비종양의 0.5~4%를 차지하고[1] 매년 10만명당 0.74~1.5명이 발생하며 모든 비 · 부비동 유두종의 약 70%를 차지한다.[2]

임상병리학적으로 반전성 유두종은 편평상피화생을 가진 염증성 용종에서부터 편평상피암까지 다양한 양상을 보인다. 이것은 반전성 유두종이 호흡원주상피가 점차적으로 도립 편평화생되고 그다음 편평상피로 대치되는 단계적인 조직학적 변화를 보인다는 사실에 근거하며, 이형성증은 편평상피화생에서 발생하여 상피내암과 침습성의 편평세포암으로 이어질 수 있다.[3-5] 이 사실은 반전성 유두

논문접수일 : 2006년 8월 13일
심사완료일 : 2006년 10월 9일
교신저자 : 노환중, 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10
부산대학교 의학전문 대학원 이비인후과학교실
전화 : (051) 240-7333 · 전송 : (051) 248-1248
E-mail : rohhj@pusan.ac.kr

종이 연속적인 다단계로 발생하고 진화한다는 사실을 시사하며, 반전성 유두종의 다단계 종양형성에 근거한 새로운 병리학적 등급시스템이 제시되었다.[6)]

비·부비동 유두종에서 인체유두종 바이러스(human papilloma virus, HPV)가 보고된 이후, 비·부비동에 생기는 반전성 유두종 발생에 HPV가 관여한다는 보고는 꾸준히 있었다.[7-10)] 현재까지 비·부비동 유두종과 비·부비동암에서 HPV의 이환율은 각각 33.3%와 21.7%으로 보고되었지만,[7)] 반전성 유두종의 다단계 발생에 있어 HPV의 침습시기와 유형에 대해서는 알려진 바가 없다.

이에 저자는 비·부비동 반전성 유두종을 다단계 과정에 따라 병리학적으로 등급 분류하고 각 등급에 특이적인 부위를 미세절개하여, 반전성 유두종의 종양발생에 있어 HPV의 감염 시기를 결정하고, 반전성 유두종의 단계에 따른 HPV 유형의 유병율을 알아보고자 하였다. 그리고 HPV감염의 대리표지자(surrogate marker)로서 $p16^{INK4}$의 발현을 조사하여 반전성 유두종에서 인체유두

Table 1. Inverted papilloma grading system[6)]

Grade	Histopathological chracteristics	Specimens (%)
I	Ciliated respiratory epithelium with underlying squamous metaplasia, at least 12 cell layers thick, associated with early inversion of squamous metaplasia	5 (8.8)
II	Partially ciliated respiratory epithelium with luminal squamous metaplasia and increased prominence of inversion including the involvement of seromucinous glands	23 (40.3)
III	Near complete absence of respiratory epithelium, metaplasia replaced by stratified squamous epithelium, and varying degrees of dysplasia	22 (38.6)
IV	Invasive squamous cell carcinoma in the presence of inverted squamous metaplastic and dysplastic change ; features of grades II and III will be present when grade IV is diagnosed	7 (12.3)
Total		57 (100)

IP : inverted papilloma

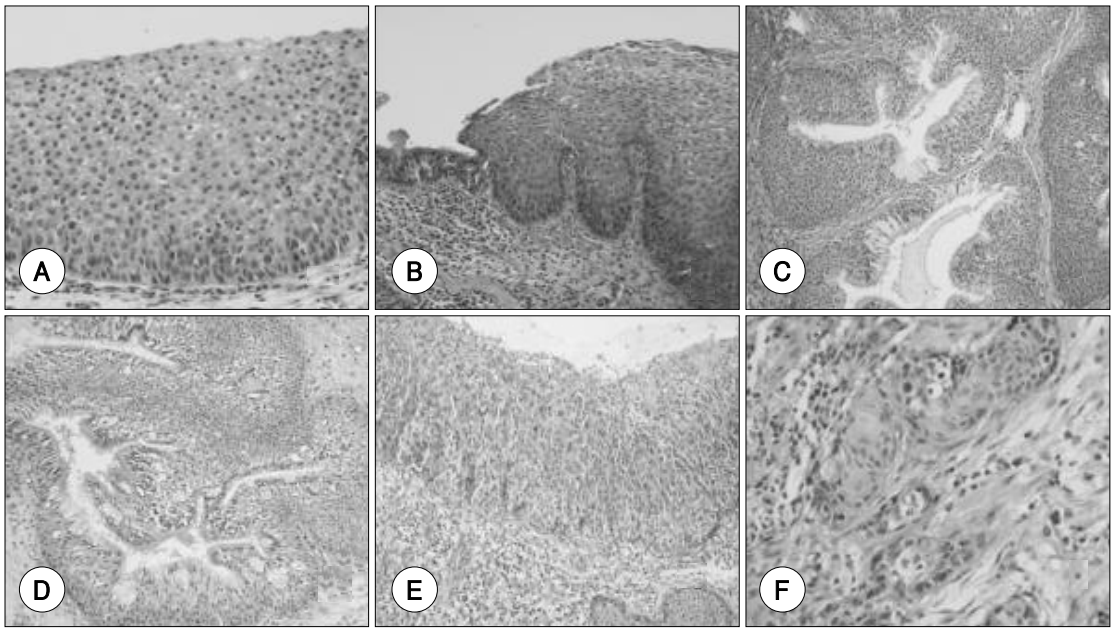

Fig. 1. Representative figures of histologic classification of inverted papilloma shows grade I (A : ×200 and B : ×400), grade II (C : ×200 and D : ×400), grade III (E : ×200) and grade IV (F : ×400).

종 바이러스의 감염과 병리조직학적 등급과의 상관관계를 알고자 하였다.

대상 및 방법

조직 채취 및 처리

1998년부터 2002년까지 비 · 부비동 반전성 유두종으로 수술한 38명의 환자에서 채취한 57절편의 반전성 유두종 조직을 사용하였다. 환자의 나이는 35~72세였고, 여자가 11명, 남자가 27명이었다.

조직은 hematoxylin and eosin(H & E) 염색과 면역조직화학염색을 위해서 4 μm 두께로 절개하고, 레이저 포획 미세절개(laser captured microdissection)후 HPV DNA chip을 위해서 10 μm 두께로 절개하였다.

병리조직학적 등급

비 · 부비동 반전성 유두종의 병리조직학적 등급은 Roh 등[10]이 제시한 방법으로 구분하였으며, 동일 검체에서 다른 등급이 관찰될 때는 높은 등급으로 분류하였다(Table 1, Fig. 1). 관찰자간 오류를 피하기 위해, 두명의 병리과 의사가 모든 조직슬라이드를 관찰하였다.

HPV DNA Chip 검사

레이저 포획 미세절개

조직을 10 μm 두께로 절개하고 H & E 염색을 한 후 각 조직학적 등급을 대표할 수 있는 부위를 레이저세포포획기를 사용하여 미세절개하였다(Fig. 2). Ⅲ 등급 병변에서는 이형성 부위만 선택하여 절개하였으며, Ⅳ 등급 병변에서는 침습적인 편평세포암 부분만 선택하여 절개하였다. PixCell Laser Capture Microscope(Arcturus Engineering Inc., Mountain View, CA, USA)을 사용하여 7.5~10 μm 크기, 75 mW의 강도로, 50 milliseconds동안 3000회 레이저를 쏘아 미세절개를 하였다. 조직은 광학적으로 투명한 캡에 설치된 열가소성 중합체 막으로 덮고, 적외선 레이저를 선택된 세포에 주사한 후 막이 부분적으로 녹으면 세포들을 포획한 후 중합체 캡과 미세절개된 세포들을 0.5 μl의 DNA 세포용해액(lysis buffer)이 담겨진 0.5 ml 미세원심분리관(microcentrifuge tube)에 옮겼다.

DNA 추출

DNA는 미세절개한 조직에서 DNA 동정 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하고, 목표 HPV DNA는 동일한 GPd5+/GP6d+ primers를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭시키고 단일염료인 indocarbocyanine dUTP로 표시하였다. β-globin은 PC03/04 primers를 PCR로 증폭시켜 내부대조군으로 사용하였으며 β-globin의 크기는 110 bp였다. 모든 조직의 PCR 생산물은 ethidium bromide 0.5 g/ml이 포함된 2% agarose gel을 통한 전기영동으로 검출하였고, HPV DNA의 크기는 150 bp였다(Fig. 3).

HPV 유전자형

HPV의 검출과 유전자형은 HPV DNA chip(Biomed Lab Co, Seoul, Korea)으로 시행하였다. HPV DNA chip은 PCR에 근거한 DNA 미세배열장치(microarray system)로 15가지의 고위험형(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 and 69)과 7가지의 저위험형(6, 11, 34, 40, 42, 43 and 44)으로 구성되는 총 22

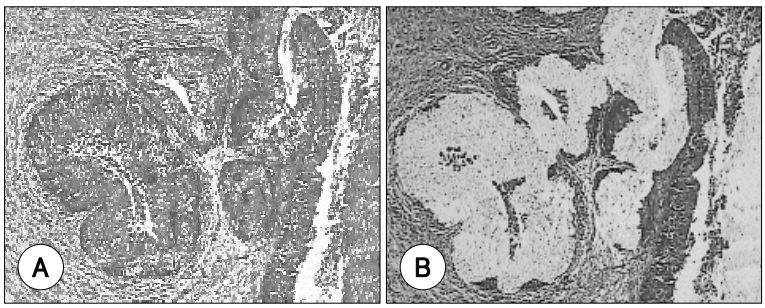

Fig. 2. Laser captured microdissection in grade II was performed (A and B : ×200).

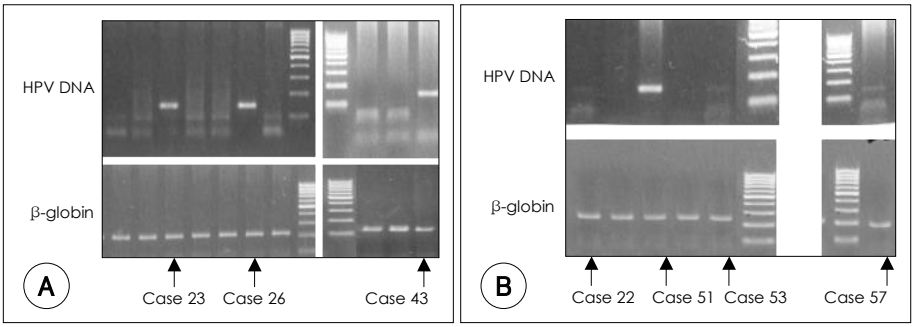

Fig. 3. HPV DNA amplified by polymerase chain reaction (PCR) was detected in 7 specimens.

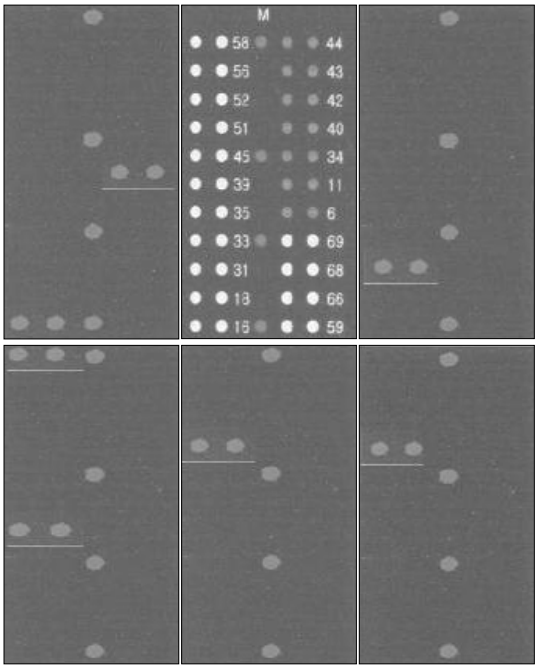

Fig. 4. HPV DNA Chip shows double positive dots in positive case.

가지의 유형을 검사할 수 있다.

HPV DNA가 증폭된 산물 10 μl와 β-globin이 증폭된 산물 0.5 μl의 혼합물에 3 N NaOH 용액(10% volume/volume)을 첨가하여 변성시키고, 실온에서 5분간 배양한 후 1 M Tris-HCL, pH 7.2(5% volume/volume)을 첨가하여 중화하였다. 그 다음 3 N HCL(10% volume/volume)을 첨가하고 5분간 얼음으로 냉각하였다. 조직은 12×saline sodium phosphate-ethylene diamine tetraacetic acid buffer(SSPE ; Sigma, St. Louis, MO) 50 μl와 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)의 혼합용액으로 섞은다음 DNA chip에 사용하였다. 접종은 40℃에서 2시간동안 이루어졌고, 3×SSPE로 2분간, 1×SSPE로 2분간 세척하고, 실온에서 2분간 공기건조하였다.

접종된 인체유두종 바이러스는 DNA chip scanner(Scanarray lite ; GSI Lumonics, Ottawa, Ontario, Canada)를 사용하여 관찰하였으며, HPV DNA가 증폭된 PCR 산물에 존재한다면 HPV의 증폭물은 동일한 유형의 일치하는 특이 oligonucleotide에 융합하고 HPV DNA chip 슬라이드에 이중 양성점으로 관찰되었다(Fig. 4). 조직이 전기영동겔상에서는 150 bp의 양성띠로 나타났지만, HPV DNA chip에 음성인 경우는 비특이적인 HPV로 표시하였다.

$p16^{INK4A}$

면역조직화학염색

10% 포르말린에 고정된 파라핀블록 조직을 4 μm두께로 절개하고 xylene으로 녹인 후, 100%, 95%, 75% 그리고 50% 알코올에 담그고 물로 씻어내었다. 내인성 peroxidase의 활성을 막기위해, 조직절편은 각각 5분간 5번에 걸쳐 무수 메탄올의 0.3% H_2O_2로 담근 후 물로 씻어 내었다. 항원 복구를 위해, 조직절편을 10 mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에 담그고 고강력오븐에서 12분간 끓였다. 비특이적 항원을 제거하기 위해, 조직절편을 염소의 혈청에 30분간 적용하였다. $p16^{INK4A}$을 검출하기 위해 p16 단백을 위한 일차단일세포군항체(DAKO, Carpenteria, CA, USA, 1 : 200)와 4℃에서 하룻밤동안 습한 방에서 배양한 후 조직절편은 biotinylated anti-rabbit an-

tibody와 streptavidin-peroxidase complex(LSAB system ; DAKO, Carpenteria, CA, USA)로 30분간 37℃에서 배양하였다. 각 단계 사이에는 PBS로 몇 번 조심스럽게 씻어내었다. 절편은 3-amino-ethyl carbazol(AEC)로 배양한 후 Mayer's hematoxylin으로 약하게 대조염색을 하고 단계적으로 알코올로 탈수 하고, 공기로 말린 뒤 슬라이드를 제작하였다.

$p16^{INK4A}$의 판독

p16의 면역조직화학적 발현은 모든 검체를 임상적 혹은 병리학적 정보 없이 핵과 세포질의 양성의 강도와 비율에 따라 평가하였다. 강도는 strong과 weak으로 판독하였으며, 양성으로 염색된 세포의 비율에 따라 focal은 종양세포의 50% 이하에서 양성일 때, diffuse는 양성염색이 50% 이상일 때로 하였다(Fig. 5). 검체가 focal weak로 염색양상을 보일 때는 음성, diffuse strong, focal strong, diffuse weak를 보일 때는 양성으로 판독하였다.

통계 분석

통계학적 분석은 chi-square test와 Fisher's exact test을 이용하였다. SPSS program(version 12.0)을 사용하였으며, 통계학적 유의수준은 0.05로 하였다.

결 과

조직학적 등급

57개의 검체 중 Ⅰ 등급이 5개, Ⅱ 등급이 23개, Ⅲ 등급이 22개, Ⅳ 등급이 7개였다(Table 1, Fig. 1).

HPV 유전자형

57개의 검체 중 HPV DNA가 양성인 경우는 7개(12.3%)였다. HPV 11/16형이 1개, 31형이 1개, 35/58형이 1개, 52형이 2개였으며 형을 결정할 수 없는 경우가 2개이었다.

Ⅰ 등급인 5개의 검체 중 2개(40%)는 HPV DNA 양성이었다. 2개의 검체 중 한 개는 52형에 양성이었고, 나머지 한 개는 형을 결정할 수 없었다. Ⅱ 등급인 23개의 검체 중 5개(21.7%)에서 HPV DNA 양성이었으며, 11/16형, 31형, 35/58형, 52형, 형을 결정할 수 없는 경우가 1개이었다. Ⅲ 등급과 Ⅳ 등급인 29개의 검체 모두는 HPV DNA 음성이었다(Table 2).

$p16^{INK4A}$ 면역조직화학염색

57개의 검체 중 26개에서 p16 단백에 양성을 보였다

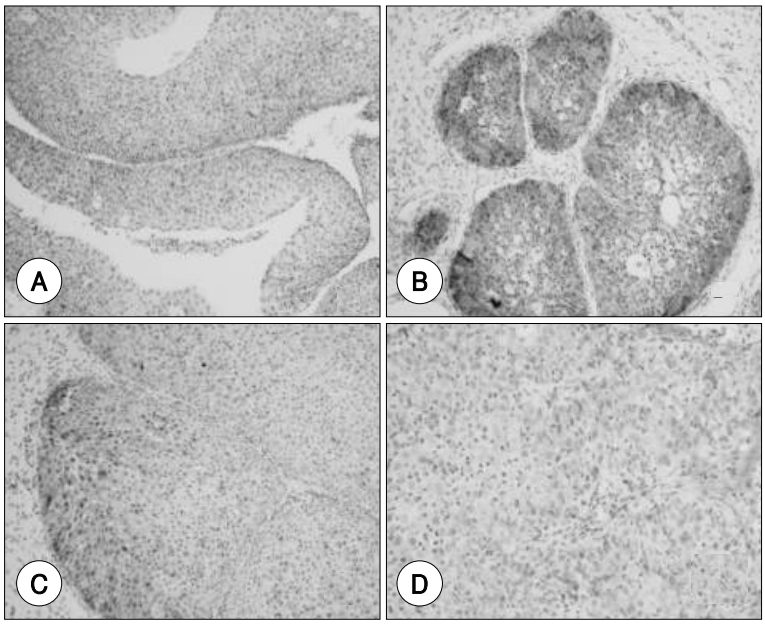

Fig. 5. Immunohistochemical staining for $p16^{INK4A}$ shows overexpression in grade I (A : ×200), grade II (B : ×100), grade III (C : ×200) and grade IV (D : ×400).

(Table 3, Fig. 6). Ⅰ 등급인 5개의 검체 중 3개(60%)에서 diffuse strong으로 양성을 보였다. Ⅱ 등급인 23개의 검체 중 11개(47.8%)에서 7개는 focal strong, 1개는 diffuse weak 그리고 3개의 검체는 diffuse strong을 보였으나 나머지 12개의 검체는 2개에서 focal weak인 것을 포함하여 음성을 보였다. Ⅲ 등급인 22개의 검체에서 10개(45.5%)는 양성을 보였는데, 4개는 focal strong, 1개는 diffuse weak, 5개는 diffuse strong으로 양성이었지만, 나머지 12개는 focal weak 3개를 포함하여 음성이었다. Ⅳ 등급인 7개 검체에서는 2개(28.3%)가 diffuse strong으로 양성이었고 나머지 5개는 음성이었다.

HPV 유전자형과 p16 발현과의 연관성

HPV DNA 음성인 50개의 검체 중 30개가 p16에 음성을 보였으며, Ⅰ 등급이 2개, Ⅱ 등급이 11개, Ⅲ 등급이 12개, Ⅳ 등급이 5개이었다. p16에 양성을 보인 20개의 검체는 Ⅰ 등급이 1개, Ⅱ 등급이 7개, Ⅲ 등급이 10개, Ⅳ 등급이 2개였다. HPV DNA 양성인 7개 검체 중 6개(85.7%)는 p16에 양성을 보였으며, 한 개는 Ⅱ 등급에서 p16에 음성을 보이면서 HPV 35/58형에 양성을 보였다(Table 4, Fig. 7). HPV DNA와 p16의 발현은 등급과는 관계없이 통계학적으로 유의성이 있었다(p=0.039). HPV DNA가 없는 Ⅲ, Ⅳ 등급에서는 p16이 Ⅲ 등급에서는 22개 중 10개(45.6%), Ⅳ 등급에서는 7개 중 2개(28.6%)에서 발현되었으나 통계학적 유의성은 없었다(p=0.665).

Table 2. Result of HPV DNA presence using HPV DNA chip

IP grades (No.)	HPV (+) specimens (%)	HPV types
Ⅰ (5)	2 (40.0)	52, unspecified
Ⅱ (23)	5 (21.7)	11/16, 31, 35/58, 52, unspecified
Ⅲ (22)	0 (0.0)	
Ⅳ (7)	0 (0.0)	
Total (57)	7 (12.3)	

HPV : human papilloma virus, IP : inverted papilloma, No. : number

고 찰

HPV는 자궁경부의 암유발인자로 잘 알려져 있으며, 또한 예후를 예측하는 지표로도 알려져 있다. 지금까지 200가지가 넘는 HPV형이 알려져 있으며, 고위험군과 저위험군으로 나누어져 있다. 고위험군은 HPV 16, 18, 31, 33,

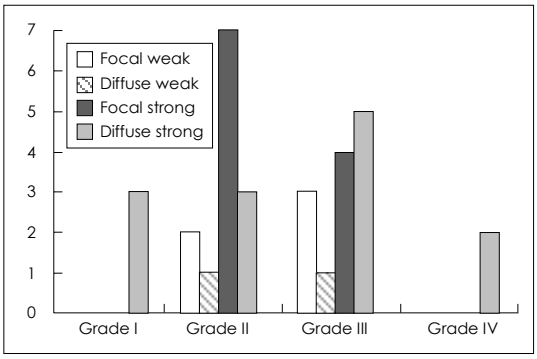

Fig. 6. Representative figures of p16 expression shows in each grades. In grade I, 3 specimens show strong positive, in grade II, 7 specimens show focal strong, 1 specimen diffuse weak and 3 specimens diffuse strong. In grade III, 4 specimens shows focal strong, 1 specimen diffuse weak and 5 specimens diffuse strong. In grade IV, 2 specimens show diffuse strong positive.

Table 3. Expression of p16 by immunohistochemistry

p16 expression	IP Grade (No.)				
	Ⅰ (5)	Ⅱ (23)	Ⅲ (22)	Ⅳ (7)	Total (57)
Negative	2	10	9	5	26
Focal weak	0	2	3	0	5
Focal strong	0	7	4	0	11
Diffuse weak	0	1	1	0	2
Diffuse strong	3	3	5	2	13
(+) Specimens (%)	3 (60.0)	11 (47.8)	10 (45.5)	2 (28.6)	26 (45.6)

Specimens showing negative and focal weak staining pattern are classified as negative, and focal strong, diffuse weak and diffuse strong are classified as positive. IP: inverted papilloma, No.: number

Table 4. Correlation between HPV infection and p16 expression

HPV/p16	IP Grade				
	I	II	III	IV	Total (%)
−/−	2	11	12	5	30 (52.6)*
−/+	1	7	10	2	20 (35.1)
+/−	0	1	0	0	1 (1.8)*
+/+	2	4	0	0	6 (10.5)
Total	5	23	22	7	57 (100)

HPV : human papilloma virus, IP : inverted papilloma, * : p=0.039

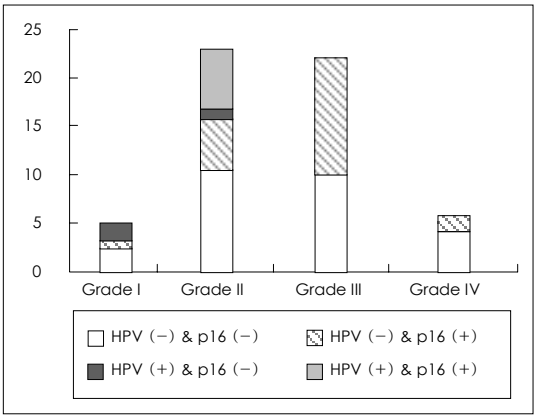

Fig. 7. Correlation between HPV DNA and p16 expression. HPV DNA negative and p16 negative were 2 specimens in grade I, 11 specimens in grade II, 12 specimens in grade III and 5 specimens in grade IV. HPV negative but p16 positive were 1 specimen in grade I, 7 specimens in grade II, 10 specimens in grade III and 2 specimens in grade IV. HPV positive but p16 negative was only 1 specimen in grade II. HPV positive and p16 positive were 2 specimens in grade I and 4 specimens in grade II.

35, 39, 45, 52, 58, 59, 67, 68형이며 저위험군은 6, 11, 13, 32, 34, 40, 42, 44, 53, 54, 55, 63형이다.[11] 최근 HPV 형질전환 종양유전자 E6과 E7의 발현이 비 · 부비동 유두종에서 증명되었으며,[12] 저위험군 HPV형은 특징적으로 비 · 부비동 유두종에만 관여하고, 고위험군의 HPV형은 비 · 부비동 악성종양에서 더 흔히 발견된다고 보고되었다.[11][12]

HPV와 비 · 부비동 반전성 유두종의 관계에 대해서는 많은 연구가 있었으나, HPV 감염이 종양형질전환의 시작 시점에 관여하는지에 대한 연구는 없었다. HPV가 세포 표면을 통과하기 위해서는 편평상피세포가 필요하기 때문에 정상적인 호흡상피를 감염시킬 수는 없으므로 호흡상피로의 편평상피화생은 HPV감염의 초기 단계로 반드시 필요하다.[5] 편평상피화생은 기도, 특히 기관지에서 초기 전암병변의 변화로 여겨져왔으며,[13] 반전성 유두종의 특징인 재발과 악성변화와 관련되어 있다고 믿어지고 있다. 화생을 유발하는 유해한 자극은 세포생물학과 세포주기 조절에 중요한 단백이나 화학적 물질의 변화와 유전자 이상의 축척을 초래하는 것으로 생각된다. Ⅰ, Ⅱ 등급 병변은 편평상피화생과 편평상피를 포함하며, Ⅲ 등급은 이형성세포를, Ⅳ 등급은 암으로의 전환을 포함한다. 본 연구에서 모든 양성 HPV DNA 병변은 Ⅰ, Ⅱ 등급에서 관찰되었으며, Ⅲ, Ⅳ 등급에서는 관찰되지 않았다. 그러므로 HPV가 목표가 되는 세포로 접근하기위해서는 편평원주상피접합부가 반드시 필요하다는 것을 알 수 있었으며,[14] HPV의 감염은 다단계 종양형성 과정중 초기단계에 일어난다는 것을 알 수 있었다. 누적되는 다른 유전자 손상은 이형성(Ⅲ 등급)과 악성변화(Ⅳ 등급)로 진행하는데 필요할 것으로 생각된다.

이전의 비 · 부비동 반전성 유두종에 대한 연구들은 다단계 종양형성에 관여하는 조직병리학적 등급을 고려하지 않고 이루어졌다.[3][4] 본 연구는 다단계 종양형성에 근거한 병리학적 등급에 따른 HPV 감염의 유형과 유병율에 대해 조사하였다. 57개의 조직 중 7개(12.3%)에서 HPV DNA가 발현되었으며, 2개의 조직에서는 HPV 11/16형과 HPV 33/58형의 동시감염소견을 보였다. 5개의 조직은 고위험군 HPV형을 보였으며, 2개의 조직은 HPV DNA의 증폭은 보였으나 형을 결정할 수는 없었다. 본 연구에서 HPV 감염의 유병율은 다른 연구와 비교할 때 비교적 낮은 편이며, 이는 HPV DNA chip 연구가 전체 반전성 유두종 조직에서 행해지지 않고 Table 1에서 처럼 각각의 등급에 적당한 특징적인 현미경학적 소견을 보이는 부분에서만 시행한 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 저위험군 HPV형이 양성 반전성 유두종에 발현된다는 다른 보고와 달리 본 연구는 고위험군 HPV형이 Ⅲ, Ⅳ 등급이 아닌 Ⅰ, Ⅱ 등급의 양성병변에 관여한다는 것을 보여주었다.

대리표지자(surrogate marker)는 정상세포에서는 발현되지 않지만 바이러스 종양발생유전자에 대해 숙주세포가 반응하여 발현하는 유전자를 말하며 반전성 유두종에서도 HPV의 감염은 있지만 바이러스 종양발생물질의 발

현율은 상대적으로 낮아 세포 대리표지자를 검출하는 시도가 있었으며, HPV의 발현이 증가함에 따라 매우 특이적으로 $p16^{INK4A}$단백이 과 발현되는 것이 보고되었다.[15] $p16^{INK4A}$은 cyclin 의존적 kinase 2A 유전자 산물로 고위험군 HPV형이 존재하는 자궁경부의 전암성, 암성 병변에서 과다 발현되며,[15] 자궁경부암의 발생과정에서 HPV의 E6와 E7 종양유전자는 종양억제유전자인 p53과 Rb 유전자 단백질의 불활성화를 유발하여 G1단계에서 각각 p53과 Rb 경로의 붕괴를 초래한다.[16] 자궁경부병변에서 $p16^{INK4}$의 과다발현은 전사인자(transcription factor)인 E2F-1의 증가에 기인한 것으로 생각되며, 이것은 cyclin 의존적 kinases에 의한 Rb 단백질의 인산화 보다 HPV의 종양형성물질인 E7 단백질에 결합한 후 Rb 단백질로부터 분비되는 것으로 생각된다.[17] E7의 결합은 E2F가 세포주기 진행에 필요한 하류의 세포 표적 유전자를 활성화 시키도록 하여 Rb와 E2F의 상호작용을 붕괴시킨다. 또한 E2F는 p53이 분해되는 것을 방지함으로써 p53의 축적에 기여하는 INK4A에 의해 암호화되는 생산물의 발현을 활성화 시킨다. 그러므로 $p16^{INK4A}$은 HPV의 종양유전자에 의한 Rb의 불활성화에 따라 상향 조절된다.[18] 실제로 $p16^{INK4A}$의 과다발현은 고위험군과 저위험군의 HPV형에 감염된 자궁경부병변에서 큰 차이를 보인다. $p16^{INK4A}$의 발현은 휴지기에서 증식기로 변화하는 동안 및 세포주기를 통해 진행하는 동안 항상 지속적으로 나타난다.[19] $p16^{INK4A}$의 과다발현을 전암성 및 암성 경부병변의 생물학적 표지자로 사용하는 이론적 근거는 고위험군 HPV 종양형성 발현의 활성화는 자궁경부의 이형성과 암의 병인에 문지기(gatekeeper) 역할을 할 것이라는 가설에 근거를 두고 있다.[20] 고위험군 HPV형은 종양 억제 단백질의 기능부전과 바이러스의 통합으로 $p16^{INK4A}$의 과다발현에 관여할 것으로 생각된다.

면역조직화학분석에서 반전성 유두종의 45.6%에서 $p16^{INK4A}$ 단백질의 발현이 증가되었다. $p16^{INK4A}$ 단백질의 발현율은 Ⅰ 등급에서 60%, Ⅱ 등급에서 47.8%, Ⅲ 등급에서 45.5%, Ⅳ 등급에서 28.6%를 보였다. $p16^{INK4A}$ 단백질을 발현하는 반전성 유두종 중 HPV DNA 양성인 조직에서 면역조직화학염색 상 강한 양성 반응을 보였다. HPV DNA 양성을 보인 7개중 2개를 제외하고는 모두 고위험군 HPV형이 검출되었으며, 이는 $p16^{INK4A}$ 단백질 발현의 강한 강도는 고위험군 HPV형의 감염과 관련이 있는 것을 증명해준다. 하지만 Ⅳ 등급 병변에서 p16의 발현이 의미있게 감소한 것은 자궁 경부암과 다른양상으로 의미있게 주목해야 할 부분이다. 자궁 경부에서 HPV 감염은 암적 변화에서 중요한 원인이 되지만, 반전성 유듀종에서는 HPV가 암의 형성과 연관이 없을 가능성도 있다는 것을 지지한다고 할 수 있다.

본 연구에서는 HPV DNA의 대리표지자로 $p16^{INK4A}$ 단백질을 사용하였지만 HPV DNA 양성률(12.3%)과 $p16^{INK4A}$ 단백질 발현율(45.6%) 사이에는 상당한 차이를 보였다. 이는 $p16^{INK4A}$은 전체 병변에서 시행하여 다양한 발현을 보였지만, HPV DNA 검사를 위해 얻은 조직은 레이저세포포획기를 이용한 미세절개를 각 등급 병변에 특징적인 국소부위에 하였기 때문으로 생각된다.

결 론

본 연구를 통해 HPV 감염은 비 · 부비동 반전성 유두종의 발생과정에서 양성변화인 초기 단계에 일어나고 고위험군 HPV 형이 관여함을 알 수 있었다. 하지만 대리표지자인 $p16^{INK4A}$ 발현이 양성인 세포에서 HPV DNA를 검출하는 것에 대한 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

중심 단어 : 반전성 유두종 · 인체유두종 바이러스 · 레이저 세포포획기 · p16 단백질.

REFERENCES

1) Lawson W, Ho BT, Shaari CM, Biller HF. *Inverted papilloma: a report of 112 cases. Laryngoscope 1995;105:282-8.*
2) Tang AC, Grignon DJ, MacRae DL. *The association of human papillomavirus with Schneiderian papillomas: a DNA in situ hybridization study. J Otolaryngol 1994;23:292-7.*
3) Nielsen PL, Buchwald C, Nielsen LH, Tos M. *Inverted papilloma of the nasal cavity: pathological aspects in a follow-up study. Laryngoscope 1991;101:1094-101.*
4) Michaels L, Young M. *Histogenesis of papillomas of the nose and paranasal sinuses. Arch Pathol Lab Med 1995;119:821-6.*
5) Schwerer MJ, Sailer A, Kraft K, Maier H. *Cell proliferation and p27kip1 expression in endophytic schneiderian papillomas. Laryngoscope 2002;112:852-7.*
6) Roh HJ, Procop GW, Batra PS, Citardi MJ, Lanza DC. *Inflammationand the pathogenesis of inverted papilloma. Am J Rhinol 2004;18:65-74.*

7) Buchwald C, Franzmann MB, Jacobsen GK, Lindeberg H. *Human papillomavirus (HPV) in sinonasal papillomas: a study of 78 cases using in situ hybridization and polymerase chain reaction. Laryngoscope 1995;105:66-71.*
8) Kraft M, Simmen D, Casas R, Pfaltz M. *Significance of human papillomavirus in sinonasal papillomas. J Laryngol Otol 2001;115:709-14.*
9) Hwang CS, Yang HS, Hong MK. *Detection of human papillomavirus (HPV) in sinonasal inverted papillomas using polymerase chain reaction (PCR). Am J Rhinol 1998;12:363-6.*
10) Harris MO, Beck JC, Lancaster W, Gregoire L, Carey TE, Bradford CR. *The HPV 6 E6/E7 transforming genes are expressed in inverted papilloma. Otolaryngol Head Neck Surg 1998;118:312-8.*
11) Bernard HU. *The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol 2005;32 Suppl 1:S1-6.*
12) Syrjanen KJ. *HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. J Clin Pathol 2003;56:174-81.*
13) Lee JS, Lippman SM, Benner SE, Lee JJ, Ro JY, Lukeman JM, *et al. Randomized placebo-controlled trial of isotretinoin in chemoprevention of bronchial squamous metaplasia. J Clin Oncol 1994;12:937-45.*
14) Syrjanen S. *HPV-related squamous cell tumors of the airways and esophagus. Epidemiology and malignant potential. In: Gross G, von Krogh G, editors. Human papillomavirus infections in dermatovenereology. Boca Raton: CRC Press; 1997. p.181-99.*
15) Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang SC, Pater MM, *et al. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. Br J Cancer 1997;75:1410-6.*
16) Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, *et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:4350-4.*
17) Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. *Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol 1998;153:1741-8.*
18) Serrano M, Hannon GJ, Beach D. *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 1993;366:704-7.*
19) Soucek T, Pusch O, Hengstschlager-Ottnad E, Wawra E, Bernaschek G, Hengstschlager M. *Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 during the ongoing cell cycle. FEBS Lett 1995;373:164-9.*
20) Durst M, Bosch FX, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. *Inverse relationship between human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression and cell differentiation in nude mouse epithelial cysts and tumors induced by HPV-positive human cell lines. J Virol 1991;65:796-804.*