

한국 여성의 자궁경부 조직에서 고위험 Human Papillomavirus 10개 유전형의 감염 빈도에 기초한 HPV 예방 백신의 구성 방안 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

김문홍 · 김용범 · 이철민 · 노주원 · 김재원
박노현 · 송용상 · 강순범 · 이효표

Study on the Proper Composition of Human Papillomavirus Vaccine Based on the Prevalence of Ten High-risk Human Papillomaviruses Infection in Uterine Cervical Cancerous and Noncancerous Tissues Obtained from Korean Women

Moon-Hong Kim, Yong-Beom Kim, Chul-Min Lee, Ju-Won Roh,
Jae-Weon Kim, Noh-Hyun Park, Yong-Sang Song,
Soon-Beom Kang and Hyo-Pyo Lee

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,
Seoul National University, Seoul 110-744, Korea*

Objective: There are more than 20 cancer-associated HPV types, but little is known about the prevalence of HPV types in Korean women. Our aim was to investigate the prevalence of 10 high-risk HPV types in samples obtained from Korean women in order to establish a strategy of HPV vaccine development for Korean women.

Material and Method: Cervical scrapes or tissues collected from a total of 781 women were tested for the presence of HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58 by multiplex nested PCR system developed by our laboratory recently.

Results: Among evaluable 751 samples, 153 with invasive cervical cancer (ICC), 56 with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 542 with benign gynecologic disease (BGD), HPV DNA of any type was detected in 372 (49.5%) samples in total, 71.9% in ICC, 67.9% in CIN, 41.3% in BGD. HPV 16 and 18 were detected in 77 and 19 cases of ICC, 26 and 5 cases of CIN, 125 and 30 of BGD, respectively. The most frequently detected HPV type in ICC was 16 and followed by 18, 33, 31, 52, 58, 51, 45, 56, 35 in decreasing order. Nearly 80% of ICC contain either HPV 16, 18, 31, or 33. Among 372 cases detected to contain HPV DNAs, 272 (73.1%) cases were infected with single HPV type, 79 (21.2%) cases with two types, 19 (5.1%) cases with three types,

and only two cases with four types. There was significant difference in single infection rate between CIN and BGD, and borderline significance between cervical cancer and BGD.

Conclusion: In Korean women, mixed infection with multiple HPV types occurs in nearly 30% of infected women. HPV type distribution appears somewhat dissimilar in this report with that of previous reports from other countries. These data may be relevant to the rational design of prophylactic HPV vaccine strategies.

Key Words: Cervical cancer, Human papillomavirus, Multiplex PCR, Korean women, HPV vaccine

서 론

자궁경부 및 전암병변의 발생과정에서 HPV (Human Papillomavirus)가 결정적인 역할을 한다는 점은 널리 인정되고 있다.¹⁾ 이렇게 자궁경부암의 원인 인자가 밝혀지면서 진단 및 치료 면에서 중대한 변화가 진행되고 있는데 진단 면에서는 기존에 1940년대에 Papanicolaou에 의해 개발되어 시행되어 온 세포진 검사에 보조적인 방법으로써 HPV 검사가 동시에 시행되어 유용한 보조 수단으로 사용되고 있다.²⁾ 치료 면에서는 HPV 백신을 개발하기 위한 노력이 경주되고 있으며, 특히 예방용 HPV 백신은 10년 이내에 임상 적용될 것으로 예상되는 등 자궁경부암의 조기진단 및 치료에 혁신적인 변화를 예고하고 있다.³⁾

HPV는 현재까지 70여종 이상의 유전형이 밝혀져 있고 이중에 30여종이 항문-생식기에 감염되어 종양 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{4,5)} 자궁경부암 조직에서 발견되는 HPV 유전형은 HPV 16이 50~60%, HPV 18이 약 10%에서 검출되나 그 외의 유전형은 대상 검체나 연구가 시행된 나라에 따라 다양한 결과를 보이고 있다.^{4~6)} 이러한 사실은 자궁경부암의 1차, 2차 예방, 특히 HPV 백신의 개발과 관련하여 중대한 의미가 있다. 즉, 예방 백신으로 유력시되는 virus-like particles (VLP)는 기본적으로 유전형-특이성(genotype-specific)을 보이므로, 임상 적용하고자 할 때는 적어도 네가지 정도의 HPV 유전형을 예방 백신에

포함시켜 임상 시험이 진행된다고 할 때 해당 국가 여성의 검체에서 발견되는 HPV 유전형 분포에 따라서는 백신의 구성이 달라지게 되는 것이다.^{7,8)}

특정 인구 집단에서 HPV 감염의 유병률은 일정 시점에서 인구 집단의 개인 중 어느 정도가 새로운, 지속성, 혹은 재발성 HPV 감염의 상태에 있는지를 말해준다. 유병률은 대상 인구 집단이 해당 질병에 얼마나 이환되어 있는지 나타내 주는 중요한 지표이며 진단 방법, 연구 대상 집단의 인구학적 특성, 행동 특성에 따라 다양한 결과를 나타내게 된다. 지금까지 보고된 생식기 HPV 감염의 유병률을 보면 나이-특이 유병률과 나이-특이 발생률은 비슷한 추세를 보인다. 또한 자궁경부 HPV DNA 유병률은 성인 초기에 최고치를 보이다가 급격히 감소하는 경향을 보이며 성 상대자가 많을수록 증가한다.^{9~11)} 이러한 결과는 나이가 증가하면서 면역학적으로 HPV 감염이 감소할 가능성을 시사하는 것이다. HPV 감염의 자연사는 아직 확실하게 전 과정이 알려져 있지 않다. 보통 자궁경부의 병리학적 진단이 정상에서 고도 이형증, 침윤성 자궁경부암으로 진행할수록 HPV DNA 유병률도 증가한다.^{12,13)} Cross sectional 또는 전향적 연구에 따르면 특정 HPV 유전형 감염은 고도 이형증으로의 진행을 예측하는 지표로 기능하게 된다. 대부분의 생식기 HPV 유전형은 자궁경부상피내종양(Cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 중 CIN 1과 연관이 있고 CIN 2, 3와 연관된 HPV 16, 18, 31, 45 등은 고위험 HPVs로 구분된다.¹⁴⁾ 정상

세포진 소견을 보이는 여성에서 가장 흔히 발견되는 HPV 유전형은 16번이며 자궁경부암과의 연관성도 가장 크다고 알려져 있다. 최근 연구에 따르면 고위험 HPV 감염이 지속적이고 특정 수준 이상의 바이러스 유전체가 감염되어 있는 경우에 지속적인 CIN 진단과 연관된다고 한다.¹⁵⁾ 항문-생식기에 나타나는 유전형 특이성 HPV 유병률에 대한 자료는 자궁경부의 경우를 제외하고는 많지 않다. 통상 HPV 유전형은 나이 군에 따라 비슷한 분포를 보인다. PCR 방법에 의한 연구 결과에 따르면 여러 HPV 유전형의 혼합 감염의 빈도는 20~30% 정도로 CIN의 위험도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 특정 유전형의 감염이 다른 유전형의 감염을 촉진시키는지 혹은 방해하는지는 알려져 있지 않다.¹⁶⁾

그러나 국내에서는 현재까지 자궁경부 조직에서 발견되는 HPV 유전형의 분포에 관하여 한국 여성을 대상으로 한 체계적인 연구 보고가 없기 때문에, HPV 예방 백신의 개발 및 제조 전략 수립에 있어 기초적인 자료조차 제공하지 못하는 실정이므로, 이에 대한 연구가 절실히 필요하리라 사료된다.

따라서 저자들은 HPV 검출 및 유전형 결정을 보다 쉽게 수행할 수 있는 방법을 확립하고 이 방법을 적용하여 다양한 HPV 유전형의 감염 빈도를 한국 여성의 자궁경부 암성, 비암성 조직에서 확인함으로써 조만간 임상에 적용될 것으로 예상되는 HPV 예방 백신의 구성을 제안함을 목적으로 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1) 연구대상

서울대학교병원 산부인과에서 CIN 또는 자궁경부암으로 진단된 환자와 양성 부인과 질환으로 수술 받은 환자를 대상으로 수술 전에 cytobrush를 이용하여 얻어진 탈락세포 또는 수술 후 얻은 자궁경부 조직 총 781개(정상; 557예, 전암성 병변; 61예, 침윤암; 163예)를 본 연구의 실험에 이용하였다.

정상세포의 종양화에 중요한 역할을 수행하는 HPV E6, E7, E1 ORFs 염기서열에 기초하여 gen-

Table 1. Sources of cloned HPV DNAs

HPV types	Request cloned DNA from
16, 18	<i>E.-M. de Villiers</i>
31, 35	<i>A. Lrincz</i>
33	<i>G. Orth</i>
45	<i>E.-M. de Villiers (on behalf of K. Shah)</i>
51	<i>E.-M. de Villiers (on behalf of S. Silvetstein)</i>
52	<i>W. Lancaster</i>
56	<i>A. Lrincz</i>
58	<i>T. Matsukura</i>

eral primer (GP)를 제작하고 GP 내부영역의 유전자 염기서열을 이용하였으며, type-specific primer를 제작하여 multiplex nested PCR 방법을 확립하며 이를 이용하여 한국 여성에서 채취된 표본에서 HPV 유전형의 감염률 및 혼합 감염의 분포를 확인하였다. 이러한 시스템의 설계 및 검증을 위한 original HPV DNA는 다음의 저자에게서 직접 구하였다(Table 1).

2) 연구방법

자궁경부암으로 진단된 환자와 자궁근종 등 양성질환으로 수술 받는 환자의 자궁경부 조직을 수술 직후 수술장에서 직접 채취하여 각각 0.5×0.5 cm 크기로 자른 후 PBS 1 ml에 보관하였다. 자궁경부암 환자의 경우 일부를 잘라 동결조직 검사하여 암조직임을 확인하였다. DNA 추출을 위하여 Eppendorf tube PBS 1 ml에 담긴 조직을 약사발에서 봉으로 갈아서 분말이 되도록 하였다. TEN (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0.1 mM) 500μl과 10% SDS (sodium dodesyl sulfate) 25μl을 섞어 50°C 에서 1시간 보온시킨 후 proteinase-K 10~15μl (100μg/ml)을 넣고 다시 50°C에서 1시간 보온시킨 뒤 37°C 에서 밤새 방치하였다. 이것을 PCI (25 : 24 : 1) 1 volume에 섞어 vortex에 4~5초간 흔들어 준 후 12,000 rpm에서 2~4분간 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 떠내는 과정을 2번 반복하였다. 상층액만 분리한 후 100% 차가운 에탄올 1 ml (2 volume)과 3 M NaAc (pH 5.2) 0.1 volume (50μl)을 넣어 -70°C에서 20분간 얼

린 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 가라앉은 DNA pellet을 70% 차가운 에탄올 2 volume (1 ml)을 넣어 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 밤새 상온에서 말렸다. 증류수 100 μ l을 섞어 보관하였다.

HPV DNA 검색의 양성대조군으로서 HPV 16의 감염이 증명되어 있는 CaSki (500~5,000 copy/cell), SiHa (1 copy/cell) 자궁경부암 세포주를 사용하였다. 세포주는 미국의 ATCC로부터 구입하고 fetal bovine serum 10%를 함유한 RPMI 배지에서 배양하여 사용하였다. 동결된 세포주의 경우 액체 질소통에 보관되었던 것을 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 μ g/ml proteinase K 용액에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 용액에 phenol과 chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1, vol/vol)액을 동량 넣고 잘 흔들어 부유액을 만든 다음 5분간 microcentrifuge로 원심분리하여 상층액을 취한 후, 다시 동량의 chloroform-isoamyl alcohol 용액을 가하여 부유액을 만들고 원심분리하였다. 이 용액에 50 mg/ml의 RNase A를 첨가하여 RNA를 제거한 후 phenol과 chloroform-isoamyl alcohol 용액으로 처리하여 DNA를 정제하고, spectrophotometer로 260 nm과 280 nm의 비가 1.8 근처인 것을 확인하여 농도 및 순도를 확인하였다. HPV 재조합 plasmid의 분리는 Sambrook 등의 방법을 사용하여 추출하였다.¹⁷⁾ 얻어진 plasmid를 spectrophotometer로 확인하여 농도 및 순도를 결정하였다.

Primer의 고안은 다음과 같이 하였다. 자궁경부 세포 내에 존재하는 HPV DNA를 효율적으로 검출하기 위하여 multiplex nested PCR 방법을 고안하였다. PCR primer 선정의 원칙으로서 파라핀 포매된 조직에서도 효과적으로 작동할 수 있도록 증폭물의 크기는 400 bp 미만으로 하였으며, 자궁경부암 조직에서도 소실되지 않는 E6, E7 및 E1 5' end의 염기서열을 이용하는 것을 원칙으로 삼고 고안하였다. 우선 미국 NCI (National Cancer Institute) GenBank에 등록되어 있는 HPV의 genomic DNA와 amino acid의 염기서열을 구하고 DNASIS와 Amplify 프로그램을 이용하여 primer 선정의 적절성을 확인함으로써 1차 PCR에 사용할 primer pair를 고안하였다. 16 series (HPV type 16, 31, 33,

35, 52, 58)의 consensus primers를 E6-E7 portion에서 만들었고, 18 series (HPV type 18, 45, 51, 56)의 consensus primers는 E7-E1 portion에서 만들었으며, 최종산물의 크기는 각각 281~296 bp, 318~337 bp이었다. 1st PCR에서는 위 primer 4개를 넣어 시행하였다(Table 2). 2차 PCR은 multiplex PCR을 하기 위하여 CP 내부영역의 유전자 염기서열을 DNASIS, Amplify 프로그램으로 homology 및 annealing temperature를 분석하여 생성된 유전자 증폭물의 크기가 유전형에 따라 차이가 나게 재차 증폭시키는 nested-PCR에 적합한 primer로 설정·제작하였다. Type-specific nested PCR은 high

Table 2. Primer sequences of 1st PCR

Target subtype	Nucleotide seq. 5'-3'	Nucleotide position
HPV 16	TGTCAAAAGCCACTGTGTCC	419-438
	TGGACAAGCAGAACCGGACA	687-706
HPV 18	CAATTAAGCGACTCAGAGGA	677-696
	GTAGACAAAAAACAGGAGAT	983-1003
HPV 31	TGTCAAAGACCGTTGTGTCC	423-442
	TGGACAAGCAGAACCGGACA	685-704
HPV 33	TGTCAAAGACCTTTGTGTCC	424-443
	TGGACAAGCACAACCGCCA	698-717
HPV 35	TGTCAAAAACCGCTGTGTCC	425-444
	TGGACAAGCAAAACCGACA	690-709
HPV 45	CAATTAAGCGAGTCAGAGGA	677-696
	GTAGAGAAAAAACAGGGGAT	983-1003
HPV 51	CAATTTGACAGCTCAGAGGA	641-660
	GTAGAAAAAACAGGAGAT	940-960
HPV 52	TGTCAAACGCCATTATGTCC	417-436
	TGGACAAGCAGAACAAGCCA	684-703
HPV 56	CAATTGGACAGCTCAGAGGA	653-672
	GTAGAAAAAACAGGAGAT	964-984
HPV 58	TGTCAAAGACCATTGTGTCC	425-444
	TGGACAAGCACAACCGCCA	702-721

Table 3. Primer sequences of 2nd PCR

Target subtype	Nucleotide 5'-3'	Nucleotide position
HPV 16	ATATAAGGGGTCGGTGGACC	483-502
	TATGAGCAATTA <u>AA</u> TGACAG	634-653
HPV 18	GAAGGTACAGAC <u>CGGG</u> GAGGG	926-945
	GACGACCTTCGAGCATTCCA	830-849
HPV 31	CGATTCCACAACATAGGAGG	477-495
	TATGAGCAATT <u>ACCC</u> GACAG	632-651
HPV 33	TATGAGCAATT <u>ACCC</u> GACAG	544-563
	TATGAGCAATTA <u>AGT</u> GACAG	645-664
HPV 35	CAAAAACCGCTGTGTCCAGT	428-447
	TATGAGCAATT <u>GTGT</u> GACAG	634-653
HPV 45	GAGGAGGAAAACGATGAAGC	692-711
	GAAGGTAC <u>CGAC</u> GGGGAGGG	926-945
HPV 51	CAGCAGATGTTAATGGGCGA	809-828
	GAAGGTACAGAG <u>GAT</u> GAGGG	883-902
HPV 52	TGGACAGGGCGCTGTTCAGA	495-514
	TATGAGCAATT <u>AGGT</u> GACAG	625-644
HPV 56	GCTTATGGGTGCGTTAACAG	838-857
	GAAGGTACAGAT <u>TGGG</u> GAGGG	907-926
HPV 58	TTGGAGACCCCGACGTAGAC	526-545
	TATGAGCAATT <u>TGT</u> GACAG	646-665

risk series (HPV type 16, 18, 45, 56, 58; 2nd-1 PCR), intermediate risk series (HPV type 31, 33, 35, 51, 52; 2nd-2 PCR)를 나누어 시행하였다. 먼저 inner consensus primer (3' end primer; high, intermediate 각 1개)와 inner type-specific primers (5' end primer; high, intermediate 각 5개)를 제작·사용하였다. 따라서 1st PCR에 필요한 primers의 수는 4개, 2nd-1 & 2nd-2 PCR에서는 각 6개의 primers가 필요하였다. 이 2nd-1, 2nd-2 PCR을 모두 거침으로서 최대 10개 유전형(genotype)이 검출할 수 있었다(Table 3).

Primer의 크기는 20~26 base pair (bp)로 하였다. Primer의 합성은 DNA synthesizer (MilliGen 7500)를 사용하며 primer의 정제는 Oligonucleotide Purification Cartridge (Applied Biosystem)를 사용하였다.

PCR은 Song등의 논문에 나온 방법을 적용하여 실시하였다.¹⁸⁾ PCR이 끝난 DNA 용액 중 10µl의 시료를 취하여 loading dye와 섞은 다음 8% polyacrylamide gel에서 20A, 1시간 동안 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 polyacrylamide gel은 1µg/ml 농도의 ethidium bromide 용액에서 15분간 염색한 후 UV transilluminator 하에서 증폭된 DNA band 유무를 관찰하고 ASA 감도 3,000의 흑백 polaroid 카메라로 염색된 gel을 촬영하여 즉시 판독하였다(Fig. 1).

3) 통계분석

통계분석을 위해서 SPSS version 10[®]을 사용하

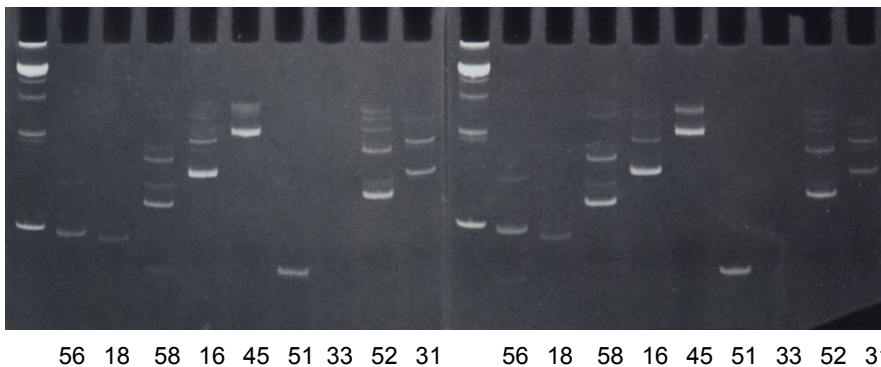


Fig. 1. PCR for HPV typing.

였고 Chi-square, logistic regression analysis 등을 이용하여 유의성을 판정하였다.

결 과

자궁경부의 상피내종양(CIN) 또는 자궁경부암으로 진단된 환자와 양성 부인과 질환으로 수술 받은 환자를 대상으로 수술 전에 cytobrush를 이용하여 얻어진 탈락세포 또는 수술 후 얻은 자궁경부 조직 781예 중 30예가 PCR에 적합하지 않았다. 751예 중 정상 자궁경부군이 542예, CIN군이 56예, 자궁경부암군이 153예이었다. 각 군의 평균

연령은 각각 42±12.3세, 39±16.4세, 52±14.9세로 차이가 없었다(Table 4).

전체적으로 372예(49.5%)에서 HPV가 검출되었으며, 정상조직군 224예(41.3%), CIN군 38예(67.9%), 자궁경부암군 110예(71.9%)에서 HPV가 검출되었다(Table 4). HPV 감염 양성일 때의 자궁경부 질환에 대한 위험도는 CIN에 대하여 3.01(p<0.001), 자궁경부암에 대하여는 3.63배였다(p<0.001).

각 HPV 형별 분포를 보면, 전체적인 결과는 HPV 16형이 가장 많이 검출되었으며, 33형, 18형, 31형, 52형, 58형, 51형, 45형, 56형, 35형 순으로 검출률이 감소하였다. HPV 16형, 33형, 18형과 31

Table 4. Prevalence of HPV infection

	Control	CIN & CIS	Cervical cancer	Total
No. of subjects	542	56	153	751
Age	42±12.3	39±16.4	52±14.9	NS
Prevalence of HPV infection	224/542 (41.3%)	38/56 (67.9%)	110/153 (71.9%)	p<0.001
OR of HPV infection (95% CI; p value)	1.0 (Reference)	3.01 (1.68~5.41; <0.001)	3.63 (2.45~5.37; <0.001)	

Table 5. Distribution of HPV subtypes and risk for cervical lesion according to the mixed infection

HPV subtype	16	33	18	31	52	58	51	45	56	35
Cases	133	77	75	39	34	30	27	23	21	13
%	28.2	16.3	15.9	8.3	7.2	6.4	5.7	4.9	4.4	2.8
Rank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Risk	H	I	H	I	I	H	I	H	H	I

	Control (n=542)	CIN & CIS (n=56)	Cervical cancer (n=153)
High prevalence	16, 33, 18, 31	16, 18, 33, 31	16, 18, 33, 31
Distribution by risk	H : 127 I : 131	H : 39 I : 22	H : 116 I : 37
Single infection /mixed infection	174 (77.7%) /50 (22.3%)	22 (57.9%) /16 (42.1%)	76 (69.1%) /34 (30.9%)
OR of mixed infection (95% CI; p value)	1.0 (reference)	3.94 (2.06~7.53; <0.001)	2.81 (1.74~4.54; <0.001)

H: High risk type, I: Intermediate risk type

형이 거의 80%를 차지하였다. 자궁경부암군에서는 약간 순서의 차이가 있어서 16형, 18형, 33형, 31형, 52형, 58형, 51형, 45형, 56형, 35형 순으로 나타났다. 정상조직군에서도 HPV 16형이 가장 많이 검출되었으며, 33형, 18형, 31형, 51형, 52형, 58형, 45형, 56형, 35형 순으로 검출률이 감소하였다. 고위험군(HPV 16, 18, 45, 56, 58)과 중위험군(HPV 31, 33, 35, 51, 52)으로 나누어 비교해보면, 각각 정상조직군은 108예와 101예, CIN군은 39예와 22예, 자궁경부암군은 116예와 37예이었다. 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Table 5).

HPV가 검출된 372예 중 272예(73.1%)에서 한 종류가, 79예(21.2%)에서 두 종류가, 19예(5.1%)에서 세 종류가, 2예(0.6%)에서 네 종류의 HPV가 검출되었다. 한 가지형만 검출된 경우는 정상조직군에서는 224예 중 174예(77.7%), CIN군에서는 38예 중 22예(57.9%), 자궁경부암군 110예 중 76예(69.1%)이었다. 두 가지 형이 발견된 경우는 각각 44예, 9예, 26예이었고, 세 가지 형이 발견된 경우는 각각 5예, 7예, 7예이었고, 네 가지형이 발견된 경우는 정상조직군이 1예, 자궁경부암군이 1예이었다(Table 5). 정상조직군, CIN군, 그리고 자궁경부암군에서의 단일 감염률 및 혼합 감염률은 차이가 있었으며, 혼합감염시 CIN에 대한 위험도는 3.94로 HPV 유무만을 고려하였을 때보다 다소 증가하였으나, 자궁경부암에 대하여는 오히려 위험도가 2.81배로 감소하여 혼합감염 자체가 위험도를 더 증가시키지는 않는 것으로 나타났으며, HPV 감염 유무 자체가 더욱 중요한 인자로 밝혀졌다(Table 5).

고 찰

HPV의 생활사를 살펴보면 편평상피세포에서만 복제주기를 가지고 있다는 점이 특징이다. 대부분 바이러스의 유전자발현과 복제과정이 최종분화를 진행 중인 suprabasal epithelium에서 일어나고 이러한 사실은 면역세포의 감시로부터 탈출하기 위함이 아닐까 추정되고 있다.^{5,14)}

저자들은 자궁경부암성, 비암성 질환을 가진 한국 여성에서의 HPV 유전형별 감염률을 조사하여 HPV 예방 백신의 전략수립에 기여하고자 본 연

구를 시행하였다. 결과를 보면 HPV 유전형 중 16, 18, 33, 31이 상위를 차지하면서 전체의 80%의 빈도를 점유하는 것으로 나타났다. 이 사실은 한국인을 위한 HPV 예방 백신을 구성하기 위하여 16, 18, 33, 31 유전형의 L1 단백질로 구성된 virus-like particles (VLPs)을 항원으로 이용한 전략을 수립해야 한다는 사실을 알려주고 있으며 Douglas와 John⁷⁾이 HPV 유전형 중 다빈도인 것은 16, 18, 31, 45라고 보고한 것과 상이한 결과를 보여주고 있다.

고위험군 HPV의 감염빈도를 보면 정상조직, CIN, 자궁경부암 순으로 증가하는 양상을 보여 자궁경부암과 고위험군 HPV의 인과관계를 강화시키는 것을 볼 수 있었고 자궁경부암에서 혼합 감염률이 대조군에 비하여 유의하게 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 Chang등의 보고와 일치하는 바이며,¹³⁾ 이들 유전형의 표면단백으로 제작한 백신에 의한 보호효과를 예측함에 있어서 단일 유전형에 의존한 백신보다 복수 유전형의 항원을 이용한 백신이 좋을 것이라는 설명에 부합된다고 할 수 있다.

HPV는 원형의 double-stranded DNA 바이러스로 길이는 8 kb 정도이고 상류전사 조절부위(upstream regulatory region, URR), 조기 유전자 부위(early region), 후기 유전자 부위(late region)의 세 부분으로 구성된다. HPV 16, 18, 45 등과 같은 고위험 HPV 유전형의 E6, E7 유전자는 자궁경부 종양에서 선택적으로 보존되고 발현되어 발암 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{15,19)} 즉, E6, E7은 세포내 종양 억제 유전자인 p53, pRb와 각각 결합하여 불활성화시킴으로써 염색체의 안전성이 소실되고 세포 성장 조절 유전자(cellular growth control genes)의 통제가 불가능해져 자궁경부의 암화 과정에 기여하게 된다. HPV와 연관된 자궁경부 암화 과정에서는 숙주의 면역 반응도 중요한 역할을 한다는 증거가 있다. 예를 들면, HPV 양성인 경도 이형증의 60% 이상이 자연 소실되며 HIV 감염자나 면역 억제제를 사용하는 환자에서는 HPV와 연관된 종양의 발생이 증가한다. 또한, 생식기 HPV 감염의 빈도는 성활동이 시작된 직후에 가장 높고 이후에는 감소한다는 사실은 일단 HPV에 감염되면 장기간에 걸친 면역이 유도됨을 시사한다. 이러한 사실이 HPV

백신 개발의 배경이다. 예방 및 치료용 백신이 개발되고 있는데 예방 백신은 HPV 감염을 막아주는 중화 항체를 유도하는 것이고, 치료 백신은 기존의 감염을 세포 매개성 면역 반응을 통해 제거하게 된다.^{3,18)}

치료 백신을 제작하는 방안의 하나는 유전공학 적 방법에 의해 목표 세포에 바이러스성 단백질 과발현되도록 하여 T-세포 매개성(CTL) 면역 반응이 유도되도록 하는 것이다. E6, E7 유전자를 naked DNA 형태로 또는 재조합 바이러스 벡터에 실어 목표 세포에 넣어 주면 세포 매개성 면역 반응이 유도된다. 이 방법은 E6, E7 유전자 또는 벡터로 사용된 바이러스의 발암성이 문제가 된다. 또 다른 방법은 E6, E7 펩타이드를 이용하는 방법이다. 실제로 정상인과 자궁경부암 환자에서 HPV 16 E7 펩타이드에 의해 유도된 CTL 반응으로 HPV 16을 함유한 특정 종양 세포가 용해되는 현상이 증명되어 있다.^{3,7)} 이 방법은 안전하고 투여가 간편하나 HLA haplotype의 다양성 때문에 역시 다양한 펩타이드를 필요로 하게 된다. 세포 매개성 면역 반응을 유도하려는 치료 백신의 제작에 있어 최대의 문제점은 백신이 효과를 나타내자면 HPV 감염 세포의 항원기(epitope) 처리 기전이 온전해야 한다는 것이다. 그러나 침윤성 자궁경부암에서는 흔히 세포 표면의 HLA class I 분자가 줄어 있고 β 2-microglobulin 유전자의 변이, 결손이 나타나는 등 면역 체계가 악성 세포를 인지하는데 문제가 있다. 따라서 치료 백신이 성공하자면 결국 HLA class I 항원 발현이 비교적 온전한 전암성 병변을 대상으로 삼게 될 전망이다.

예방 백신은 HPV가 목표 세포에 들어가기 전에 중화시킬 수 있는 항체를 만드는 것이 목적이다. 이 중화 항체(neutralizing antibody)는 viral capsids를 만드는 후기 유전자인 L1, L2 중 L1의 삼차원적 항원기(conformational epitopes)와 결합하는 것으로 알려져 있다. 따라서 HPV에 대한 예방 백신은 유전자 재조합 기술을 이용해 L1, L2 구조 단백을 만들어 사용하게 된다. L1, L2 유전자를 진핵세포에서 발현시키면 내부에 DNA만 없고 형태는 자연에 존재하는 HPV와 똑같은 VLPs(virus-like particles)가 만들어지는데 동물의 유두종 바이러스 모델에서 이 VLP의 효과적인 예방

기능이 증명된 바 있다. HPV는 성적 활동에 의해 전파되므로 예방 백신으로 효과를 보자면 아직 성적 활동에 들어가지 않은 젊은 여성 및 남성이 접종 대상이 되어야 할 것이다.²⁰⁾ 또한 VLP는 기본적으로 유전형-특이성(genotype-specific)을 보이므로 임상에 적용하고자 할 때는 적어도 몇 가지 HPV 유전형이 다가(multivalent, 多價) 백신을 사용해야 할 것으로 보인다. 지금까지의 연구 결과는 HPV 16, 18, 31, 45를 포함시키자는 주장이 우세하나,⁷⁾ HPV 감염 유전형이 지역에 따라 차이가 있기 때문에 이는 해당 지역의 HPV prevalence 연구 결과에 따라 달라져야 할 부분으로 보인다. 저자들의 연구결과로 보아 한국 여성을 위한 예방백신은 HPV 16, 18, 33, 31형을 대상으로 하여 다가 백신을 제작해야 한다고 사료된다.

결 론

저자들은 서울대학교병원 산부인과에서 진단 및 치료를 받은 781명의 환자의 자궁경부 검체를 이용하여 HPV 10가지 유전형에 대한 유병률을 조사하였고 그 결과로 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 정상자궁경부와 자궁경부 상피내종양, 자궁경부암군을 비교했을 때 HPV의 감염률은 상피내종양 및 자궁경부암군에서 유의하게 높았으며, HPV 감염에 의하여 자궁경부종양의 위험도가 증가하는 것으로 나타났다.

2) 한국 여성에서 HPV의 유전형 중 가장 감염 빈도가 높은 순서는 16형, 33형, 18형, 31형, 52형, 58형, 51형, 45형, 56형, 35형 순으로 나타났고, 자궁경부암군에서는 16형, 18형, 33형, 31형, 52형, 58형, 51형, 45형, 56형, 35형 순으로 나타났다.

3) HPV의 혼합감염률은 정상대조군에 비하여 CIN군에서는 유의하게 높았으며, 자궁경부암군에서는 경계성 유의성을 나타내었다.

4) 한국 여성을 위한 예방백신(prophylactic vaccine)은 HPV 16, 18, 33, 31형을 대상으로 하여 제작해야 한다.

참고 문헌

- 1) Dillner J, Lehtinen M, Bjorge, et al. Prospective seroe-

- pidemiologic study of human papillomavirus infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 3: 89(17): 1293-1299.
- 2) Walboomers JM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1): 12-19.
 - 3) Steller MA, Schiller JT. Human papillomavirus immunology and vaccine prospects. *Monogr Natl Inst* 1996; 21: 145-148.
 - 4) Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman MH, et al. Determinants of genital papillomavirus infection in low-income women in Washington, D.C. *Sex Trans Dis* 1993; 20: 279-285.
 - 5) Labropoulou V, Diakomanolis E. Type-specific prevalence of genital human papillomaviruses in benign, premalignant, and malignant biopsies in patients from Greece. *Sex Transm Dis* 1997; 24(8): 469-474.
 - 6) Becker TM, Wheeler CM, McGough NS, et al. Sexually transmitted diseases and other risk factors for cervical dysplasia among southwestern Hispanic and non-Hispanic white women. *JAMA* 1994; 271: 1181-1187.
 - 7) Douglas RL, John TS. Papillomaviruses and cervical cancer: Pathogenesis and vaccine development. *Monogr Natl Cancer Inst* 1998; 23: 27-30.
 - 8) Zhang T, Bauer HM, Wheeler CM, et al. Genital HPV type-distribution in women by cytologic diagnosis, age, anatomic site and population. Abstract. Papillomavirus workshop. Seattle. WA. USA, July 1991.
 - 9) Fischer M, Rosenfeld WD, Burk RD, et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in suburban adolescents and young adults. *J Pediatr* 1991; 119: 821-825.
 - 10) Torroella-Kouri M, Morsberger S. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 1998; 70(1): 115-120.
 - 11) van den Brule AJ, Walboomers JMM, de Maine M, Denemans P, Meijers CHLM. Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologically normal smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 48: 404-408.
 - 12) Backe J, Roos T. Prevalence of human papillomavirus DNA in cervical tissue. Retrospective analysis of 855 cervical biopsies. *Arch Gynecol Obstet* 1997; 259(2): 69-77.
 - 13) Chang DY, Chen RJ. Prevalence of single and multiple infection with human papillomaviruses in various grades of cervicalneoplasia. *J Med Microbiol* 1997; 46(1): 54-60.
 - 14) Schneider A, Zahm DM. Different detectability of high-risk HPV in smears from incident and prevalent high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Gynecol Oncol* 1997; 65(3): 399-404.
 - 15) Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 5: 102(5A): 3-8.
 - 16) Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991; 265: 472-477.
 - 17) Sambrook J, Nicken S, Coulsen AR. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Lab. Press. 1989.
 - 18) Song YS, Kee SH, Kim JW, et al. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol* 1997; 66(2): 275-281.
 - 19) van den Brule AJC, Snijers PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM. PCR-based detection of genital HPV genotypes: An update and future perspectives. *Papillomavirus Rep* 1993; 4: 95-99.
 - 20) Schiffman MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. 1994. In current topics in microbiology and immunology, Vol. 186, pp 56-78.