

# Humant papillomvirus viktig faktor i tonsillcancers ökade incidens



**EVA MUNCK-WIKLAND**, professor, överläkare, öron-, näs- och halskliniken, Karolinska Universitetssjukhuset Solna  
**LALLE HAMMARSTEDT**, ST-läkare, öron-, näs- och halskliniken, Karolinska Universitetssjukhuset Solna  
**DAVID LINDQUIST**, doktorand, institutionen för onkologi-patologi, Karolinska institutet  
**MIRCEA ROMANITAN**, ST-läkare,

institutionen för onkologi-patologi, Karolinska institutet  
**HANNA DAHLSTRAND**, med dr, ST-läkare, Radiumhemmet, Karolinska Universitetssjukhuset Solna  
**TINA DALIANIS**, professor, institutionen för onkologi-patologi, Karolinska institutet  
tina.dalianis@ki.se  
samtliga Stockholm

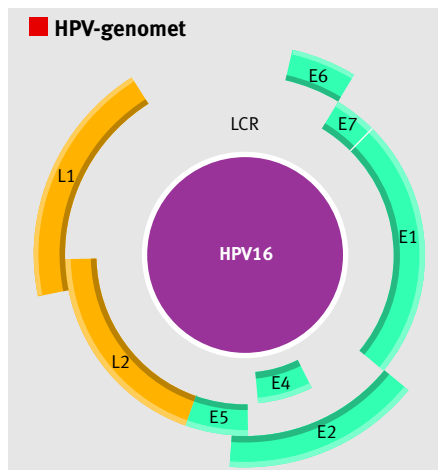
Då preventiva vacciner mot humana papillomvirus (HPV) är på väg in i kliniken [1] riktas särskilt stort intresse mot infektioner med HPV och virusets koppling till uppkomsten av cancer. Mest känt är sambandet mellan HPV-infektion och risken för utveckling av cervixcancer, där HPV påvisas i nästan 100 procent av fallen [2]. Det finns också ett starkt samband mellan HPV-infektion och cancer i andra regioner, exempelvis huvudhalsregionen, där det är vanligast förekommande i tonsillcancer [2-5].

I denna artikel vill vi fokusera på den parallella ökningen av tonsillcancerincidensen och ökningen av HPV-positiva tonsillcancerfall i Stockholmsregionen under perioden 1970-2002.

## Virus som riskfaktor för cancer

Cancer i huvudhalsregionen utgör 3-4 procent av alla cancerfall i Sverige, och frekvensen är dubbelt så hög hos män som hos kvinnor [6]. Uppemot 80-90 procent av all cancer i denna region förklaras av rökning och alkohol [7, 8]. Dessutom har olika virus föreslagits som riskfaktorer [9]. Epstein-Barrvirus (EBV) var det första virus som uppmärksammades, då man under 1980-talet kunde påvisa förekomst av EBV i nasofarynx i södra Kina [10].

Under senare år har förekomst av HPV rönt större intresse och påvisats i flera typer av huvudhalsstumörer. Proportionen av HPV-positiva tumörer varierar med tumörens lokalisering. HPV-frekvensen generellt i huvudhalsstumörer är ca 20 procent men är högst i orofarynxcancer, och i t ex tonsill- och tungbascancer påvisas HPV i 35-100 procent av fallen [2-5, 7-9, 11, 12]. Avseende cancer i struphuvudet är rapporterna mera varierande med HPV-förekomst i 6-45 procent av fallen. Den stora variationen vad gäller HPV-frekvens kan bero på både geogra-



**Figur 1.** Schematisk bild över HPV 16-genomet. LCR = långa kontrollregionen. L1, L2, E1, E2 och E4-E7 representerar schematiskt de regioner på genomet som kodar för respektive protein.

fiska och metodologiska skillnader [11]. I denna artikel vill vi också påvisa att det även finns skillnader i frekvensen av HPV beroende på tidsperioden.

## Humant papillomvirus

Det finns över 100 olika HPV-typer [12]. Vissa är benigna och finns i vanliga hudvårtor (HPV 1, 2, 4) eller kondylom och papillom (HPV 6 och 11) [2]. Andra klassas som onkoga (HPV 16, 18, 31, 33 m fl) och förekommer i maligna tumörer, t ex cervixcancer och tumörer i huvudhalsregionen [2, 9]. Alla HPV har dubbelsträngat cirkulärt DNA och omges av en kapsid med 52-55 nm diameter [12].

Genomet delas funktionellt i tre delar, den tidiga, den sena och den långa kontrollregionen (Figur 1). Den tidiga regionens gener E1, E2, E4-E7 är viktiga för HPV:s patogenes och transformande förmåga, och hos onkoga HPV klassas E6 och E7 som onkoga. E6 binder det cellulära proteinet p53 och E7 binder det cellulära proteinet pRB och samverkar till att förhindra cellens reglering av cellcykeln, vilket bidrar till tumörutvecklingen.

Samma interaktioner sker mycket svagare eller inte alls vid infektioner med »benigna« HPV-typer. Den sena regionens gener kodar för proteinerna L1 och L2 i viruskapsiden. Under vissa förhållanden kan L1-molekylerna bilda tomma viruskapsid-

## SAMMANFATTAT

**Humant papillomvirus (HPV)** hittas i så gott som alla biopsier från livmoderhalscancer. **Nu uppmärksammas** alltmer att HPV förekommer även i andra tumörformer, bl a huvudhalscancer och anogenitala tumörer.

**HPV med dominans** av HPV 16 detekteras i minst hälften av alla tonsillcancerbiopsier.

**Incidensen av tonsillcancer** i Stockholmsområdet har ökat med en faktor 2,8 under perioden 1970-2002.

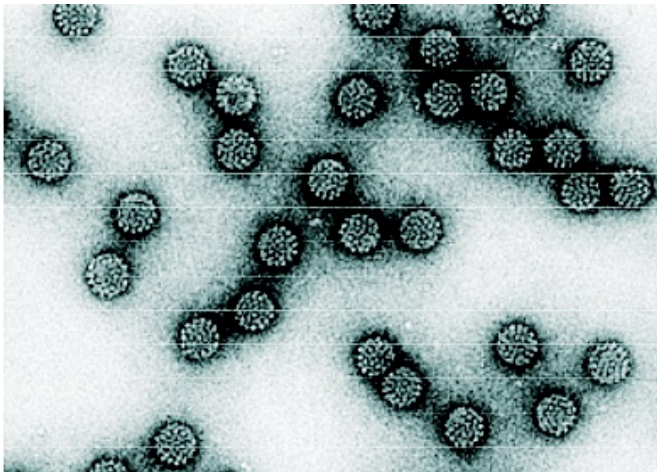
**Under samma period** har proportionen HPV-positiva tonsillcancerbiopsier i Stockholmsområdet ökat med en faktor 2,9 ( $P < 0,001$ ).

**Distributionen av HPV-positiva fall** var 7/30 (23 procent) på 1970-talet, 12/42 (29 procent) på 1980-talet, 48/84 (57 procent) på 1990-talet och 32/47 (68 procent) åren 2000-2002.

**En signifikant och parallell** ökning av tonsillcancerincidensen och förekomsten av HPV under perioden förekommer således.

**Vår hypotes är** att HPV kan spela en viktig roll för ökningen av tonsillcancer.

**Detta bör påverka** såväl framtida förebyggande strategier (exempelvis vaccination) som behandlingen vid denna cancerform.



**Figur 2.** Humant papillomvirus-likart partiklar (elektronmikroskopisk bild).

der, s k viruslika partiklar (VLP), utan hjälp av andra produkter (Figur 2) [13]. Det är dessa VLP som används för preventiva vacciner mot HPV 16 [1].

**HPV i mer än hälften av all tonsillcancer**

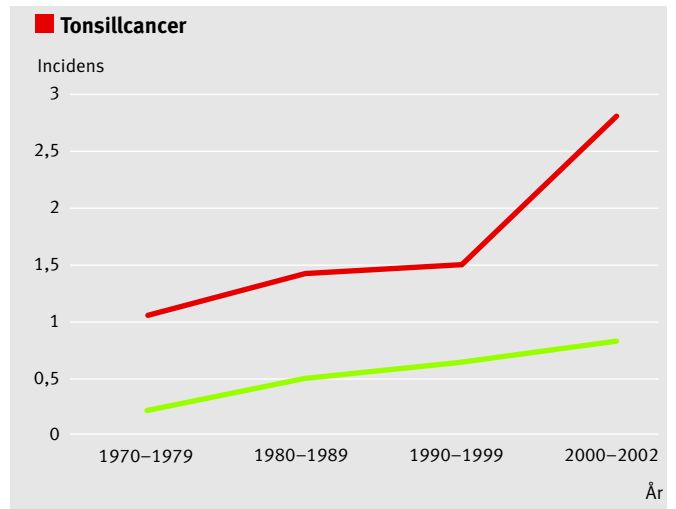
Tonsillcancer är den vanligaste cancerformen i orofarynx. Oftast söker patienterna när tumören är i ett avancerat stadium och har spridit sig till halsens lymfkörtlar [6]. Typiska debutsymtom är sväljningssvärigheter, halssmärta och värk från örat. Tonsillcancer behandlas i Sverige oftast med fulldos strålterapi. Den kirurgiska behandlingen beror på tumörens utbredning, eventuell spridning till de lokala lymfkörtlarna och effekten av strålterapi. Patienter med små tumörer (stadium I-II) har en femårsöverlevnad på 60-70 procent. Patienter med mera avancerade tumörer (stadium III-IV) har en femårsöverlevnad på 10-25 procent [6].

HPV-DNA påvisas i 45-100 procent av all tonsillcancer [5, 14]. Skillnaderna i frekvensen har förklarats bero till stor del på vilka metoder som används för detektion och på vilken typ av material som analysen görs. Det är allmänt känt att det är lättare att detektera HPV i färskfrusna (-70°C) tumörer än i tumörer som varit formalinfixerade och paraffinbäddade länge. Detta beror på att DNA bryts ner i formalinfixerat material; dessutom ger längre förvaring ökad nedbrytning.

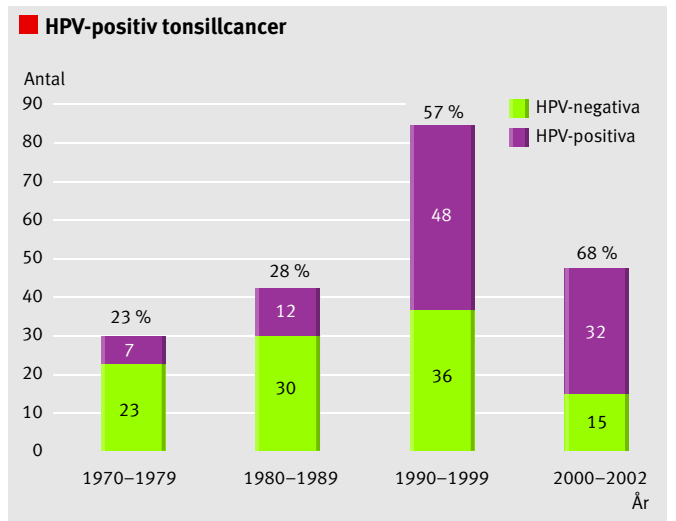
Den vanligaste metoden idag för att detektera HPV-DNA är HPV-specifik polymeraskedjereaktion (PCR). Tidigare användes de mindre känsliga Southern blot- och in situ-hybridiseringsteknikerna. Med PCR-teknik är första steget ofta en generell HPV-PCR, som ger möjlighet att upptäcka flera HPV-typer. Därefter undersöks HPV-typ med exempelvis HPV-typspecifik PCR och/eller sekvensering. Metoderna för HPV-detektion har successivt förbättrats, och en ökning av HPV-positiva tonsillcancerfall har observerats. Mot bakgrund av våra senaste resultat anser vi emellertid att den observerade ökningen i proportionen av HPV-positiv tonsillcancer inte enbart beror på metodförbättring.

**HPV 16 – prognostiskt gynnsam faktor**

Vi har tidigare visat att HPV 16 är vanligast och en prognostiskt gynnsam faktor vid tonsillcancer, då 52 procent av patienterna med HPV-positiv tonsillcancer var tumörfria tre år efter diagnosen, jämfört med enbart 21 procent av patienterna med HPV-negativa tumörer (P=0,025) [5]. Patienterna med HPV-positiv tonsillcancer hade signifikant högre femårsöverlevnad än patienter med HPV-negativa tumörer (53,5 jämfört med 31,5



**Figur 3.** Åldersstandardiserad incidens (1/100 000) av tonsillcancer i Stockholms läns landsting 1970-2002. Röd kurva = incidens hos män. Grön kurva = incidens hos kvinnor.



**Figur 4.** Antal undersökta patienter, HPV-positiva och HPV-negativa samt den procentuella andelen HPV-positiv tonsillcancer under 1970-, 1980- och 1990-talen samt 2000-2002.

procent). HPV 16 var en signifikant prognostiskt positiv faktor oavsett tumörstadium, kön och ålder.

**Parallell ökning av tonsill- och HPV-positiv tonsillcancer**

Redan 1995 rapporterade Frisch och medarbetare att tonsillcancerincidensen hos män hade ökat i USA [15]. Samma observation gjordes i Finland [16]. Vi har nyligen undersökt incidensen av tonsillcancer i Stockholmsregionen [17] och i Sverige [opublicerat]. I likhet med det som rapporterats i USA och Finland kunde vi påvisa en 2,9-faldig (2,6 hos män och 3,5 hos kvinnor) ökning av tonsillcancerincidensen i Stockholmsområdet under perioden 1970-2002 (Figur 3).

Parallellt med detta undersökte vi hur proportionen av HPV-positiv cancer förhöll sig under samma period [17]. Av 515 diagnostiserade tonsillcancerfall kunde vi erhålla biopsimaterial från 237 diagnostiska tonsillcancerprov. Alla prov reevaluerades histopatologiskt för att säkerställa att de innehöll mer än 70 procent cancerceller. Biopsier med mindre andel än 70 procent mikrodissikerades för att få fram representativt tumörmateri-

al. Analys för HPV-DNA utfördes med PCR, med generella primer GP5+/6+, CPI/IIG [17]. Prov som var positiva för HPV vidareanalyserades med typspecifik PCR eller sekvenserades för att säkerställa HPV-typ. Parallellt utfördes PCR med en human gen, S14, för att bekräfta att proven var amplifierbara med PCR [17]. Amplifierbart DNA erhöles från majoriteten av alla prov (203) även om bortfallet var större i äldre prov än i nyare: 28 procent på 1970-talet, 8 procent på 1980-talet, 2 procent på 1990-talet och 0 procent 2000–2002.

Under den aktuella perioden var således totalt 99/203 (49 procent) av proven HPV-positiva och majoriteten (87 procent) HPV 16-positiva. Under samma period (1970–2002) som den signifikanta incidensökningen av tonsillcancer noterades uppmärksammades även en signifikant ökning (2,9 gånger,  $P < 0,001$ ) av antalet HPV-positiva tonsillcancerfall. Fördelningen av HPV-positiva fall var 7/30 (23,3 procent) på 1970-talet, 12/42 (29 procent) på 1980-talet, 48/84 (57 procent) på 1990-talet och 32/47 (68 procent) åren 2000–2002 (Figur 4).

## DNA-kvalitet, sex och ålder

Vi anser att denna ökning inte beror på kvaliteten på det DNA som erhållits under tidsperioden. Ökningen var nämligen signifikant inte bara på 1970-talet utan också på 1980-talet, då DNA-kvaliteten redan var mycket bättre [17]. Det är möjligt att ökningen beror på ändrade sexualvanor, exempelvis lägre debutålder, flera livstidspartner och på att oral-genitalt sex blivit vanligare.

Det har rapporterats att risken för HPV-infektion ökar med >5 livstidssexpartner och med HIV- och herpes simplex-virus 2-seropositivitet [18]. Det har också visats att det finns en ökad risk för orofarynxcancer med lägre ålder vid sexdebut och med ökat antal sexpartner bland män [19]. Dessutom har patienter som uppger att de har haft oral-genitalt sex högre risk att få HPV-positiv munhåle- och orofarynxcancer än patienter som inte rapporterar motsvarande (oddskvot 4,2; 95 procents kon-

fidensintervall 1,5–11,7) efter justering för kön, tumörlokalisering och rökning [20]. Det fanns också en signifikant skillnad avseende medianålder mellan patienter med HPV-positiv och HPV-negativ cancer ( $P < 0,01$ ) [17]. Patienter med HPV-positiv tonsillcancer hade en medianålder på 55 år, medan patienter med HPV-negativ cancer hade en medianålder på 65 år. Detta gällde för både män och för kvinnor.

## Vaccination även mot HPV-positiv tonsillcancer

Sammanfattningsvis har tonsillcancerincidensen ökat i Stockholmsområdet de senaste 32 åren [17]. Parallellt har förekomsten av HPV ökat mer än trefaldigt från 1970-talet till 2000-talet [17]. Vi har tidigare visat att HPV förekommer i mer än hälften av alla tonsillcancer idag och är en prognostiskt gynnsam faktor [2-5, 7-9, 11]. Det kan tyda på att det finns ett immunsvaret mot viruset, som bidrar till den bättre överlevnaden. Detta är något som bör undersökas ytterligare.

Behandlingsstudier med HPV-baserad vaccination av patienter med HPV-positiv cervixcancer pågår bl a i Nederländerna [Melief C, pers medd, 2006]. Det skulle vara angeläget att utföra en sådan studie på patienter med HPV-positiv tonsillcancer. Det är också viktigt att undersöka om preventiv vaccination mot t ex HPV 16 bidrar till att minska frekvensen HPV i munhåla och orofarynx. Det är möjligt att ett framtida vaccin förhindrar utvecklingen av inte enbart cervixcancer utan även HPV-positiv tonsillcancer.

Att tonsillcancerincidensen ökat parallellt med förekomsten av HPV i tonsillcancer är angeläget att uppmärksamma. Det betyder att potentiella såväl preventiva åtgärder som konsekvensen av HPV 16-vaccination bör diskuteras. Det faktum att förekomst av HPV vid tonsillcancer oftast ger en prognostisk fördel innebär att valet av behandlingsstrategi kan påverkas.

## ■ Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.

### REFERENSER

- Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 2005;6:271-8.
- zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1288(2):F55-78.?
- Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conrad C, et al. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res.* 1998;58(1):5-13.
- Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer.* 2000;89(3): 300-4.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, 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):709-20.
- Nathanson A, Lewin F, Lind M, Lundgren J, Strander H. Huvud-, hals, och esofaguscancer. Stockholm: Onkologiskt Centrum Stockholm-Gotland. Vårdprogram 1999.
- Decker J, Goldstein J. Risk factors in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1982;306(19):1151-5.
- Licitra L. Cancer of the oropharynx. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;41(1):107-22.
- de Villiers EM. Viruses in cancers of the head and neck. *Adv Otorhinolaryngol.* 1991;46:116-23.
- Zeng Y, Zhang LG, Li HY, Jan MG, Zhang Q, Wu YC, et al. Serological mass survey for early detection of nasopharyngeal carcinoma in Wuzhou City, China. *Int J Cancer.* 1982;29(2):139-41.
- Dahlstrand H, Dalianis T. Presence and influence of human papillomavirus in tonsillar cancer. *Adv in Cancer Res.* 2005;93:59-89.
- Dahlgren L, Dahlstrand-Mellin H, Lindquist D, Björnstål L, Öhd J, Lindholm J, et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer.* 2004;112:1015-9.
- Howley PM. Papillomaviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, editor. *Fields virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publ; 1996. p. 947-78.
- Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol.* 1993; 67(12): 6929-36.
- Frisch M, Hjalgrim H, Jaeger AB, Biggar RJ. Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States. *Cancer Causes Control.* 2000;11(6):489-95.
- Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol.* 2004;57(5): 449-55.
- Hammarstedt L. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer.* Epub Sep 21, 2006.
- Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES, et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behaviour and HIV serostatus. *J Infect Dis.* 2004;189(4):686-98.
- Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(21): 1626-36.
- Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer.* 2003;104(3):336-44.