

Papillomviren in benignen und malignen Tumoren des Mundes und des oberen Respirationstraktes*

E.-M. de Villiers¹, H. Weidauer², J.-Y. Le¹, C. Neumann³,
H. zur Hausen¹

¹ Referenzzentrum für humanpathogene Papillomviren, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

² Universitäts-Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Heidelberg

³ Universitäts-Hautklinik, Münster

Einleitung

Papillomviren werden in zunehmendem Umfang als kausale Faktoren für Hautpapillome, aber auch für bowenoide Proliferationen erkannt (s. Zusammenfassung, 10, 16). Zur Pathogenese scheint die Infektion einer proliferationsfähigen Zelle (Basalzellschicht) wichtige Voraussetzung zu sein. Daher finden Primärinfektionen bevorzugt in Mikroläsionen statt oder in Bereichen, in denen noch proliferierende Zellen die Oberfläche erreichen (z. B. die Transformationszone der Cervix). Die Infektion führt zur Aufnahme und Persistenz der viralen DNA im Zellkern, wo diese in der Regel als freies Ringmolekül verbleibt. Funktionen der viralen DNA verstärken das Wachstum der infizierten Zelle, die meist noch differenzierungsfähig bleibt. So lange die Zelle proliferiert, wird eine eigenständige Virusvermehrung unterdrückt. Erst bei erfolgreicher Differenzierung wird selbständige Virusvermehrung eingeleitet. Das bedeutet, daß die infizierte, aktiv proliferierende Basalzellschicht keine Viruspartikel beinhaltet und auch frei von viralen Strukturproteinen ist und die Virusproduktion im differenzierenden und keratinisierenden Oberflächenbereich als Indiz für darunterliegende Basalzellen gewertet werden kann.

In den letzten Jahren mehren sich Anhaltspunkte für eine Beteiligung von Papillomvirus-Infektionen auch an malignen Erkrankungen der Haut und des Genitalbereichs. So konnten Orth und Jablonska mit ihren Mitarbeitern (s. Zusammenfassung, 10) bestimmte Papillomvirustypen in Plattenepithelcarcinomen bei Epidermodysplasia verruciformis nachweisen. Unsere Gruppe (siehe Zusammenfassung, 16) zeigte auf, daß Cervix-, Vulva- und Peniscarcinome in besonderer Weise mit 2 HPV-Infektionen (HPV 16 und 18) in Verbindung stehen.

Da erste Berichte auch Hinweise auf Papillomvirus-Infektionen in Tumoren des Mundes (1, 8), des Larynx (10, 13) und der Lunge (15) geben, war eine Untersuchung von proliferativen Erkrankungsformen des Mundes und des oberen Respirationstraktes von besonderem Interesse. Dieses Manuskript enthält eine erste Zusammenfassung von Ergebnissen über Papillomvirus-Infektionen in dieser Region.

Zusammenfassung

Insgesamt 113 benigne und maligne Tumoren des Mundes und des oberen Respirationstraktes und 2 Kontrollbiopsien wurden auf bekannte Papillomvirustypen untersucht. Von insgesamt 54 papillomatösen Veränderungen erwiesen sich 34 (63 %) als positiv. In 72 % der Larynxpapillome ließen sich HPV 6 oder HPV 11 nachweisen. Die übrigen oralen Papillomatosen enthielten in 15,6 % HPV 6, in 9,4 % HPV 11, in 9,4 % HPV 7, in 12,5 % HPV 13 und in 9,4 % HPV 32. Überraschend hoch ist der Anteil von HPV 7 positiven Tumoren. In malignen Tumoren ließ sich zumeist keine Papillomvirus-DNA nachweisen. Eine Ausnahme machten Biopsien von 3 Mundbodencarcinomen und einer zugehörigen Metastase, die dreimal HPV 16 und einmal eine HPV 2-verwandte DNA aufwiesen.

Papilloma Viruses in Benign and Malignant Tumours of the Mouth and upper Respiratory Tract

A total of 113 benign and malignant tumours of the mouth and upper respiratory tract have been analysed for the presence of papilloma virus DNA. Thirty-four (63 %) of 54 papillomatous lesions were found to contain such DNA. Seventy-two percent of the laryngeal papillomas contained HPV 6 or HPV 11 DNA, whereas the oral papillomatoses harboured HPV 6 (15,6 %), HPV 11 (9,4 %), HPV 7 (9,4 %), HPV 13 (12,5 %) and HPV 32 (9,4 %) DNAs. The high number of HPV 7 DNA-positive lesions was unexpected. In most of the malignant tumours no papilloma-viral DNA was found, with the exception of 3 tongue-base carcinomas, and in a metastasis from one of the tumours, which contained HPV 16 (3 biopsies) and HPV 2 related sequences (1 biopsy).

Material und Methoden

Nach chirurgischer Entfernung wurde ein Teil der Biopsie zur histologischen Untersuchung, der andere Teil zur DNA Extraktion verwendet.

Die gesamte zelluläre DNA wurde nach der Methode wie von Gissmann u. Mitarb. (6) beschrieben, extrahiert, nämlich mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol. 1 µg der gesamten DNA wurde in vitro durch Zugabe von ³²P-TTP translatiert. Diese radioaktiv-markierte zelluläre DNA wurde dann auf einem Southern Blot, das HPV 1-19, 21-26, 30, 31 trägt, unter stringenten Bedingungen hybridisiert (4). Nach Exposition auf einem Röntgenfilm über eine Woche wurde festgestellt, ob eine HPV-Sequenz in der zellulären DNA nachweisbar war.

Wenn eine weitere Analyse erforderlich war, wurden 10 µg zellulärer DNA mit Hilfe eines Restriktionsenzymys verdaut, auf einem Agarose Gel aufgetrennt und danach auf Nitrozellulose Filter gebracht (14). Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten fraglichen HPV-DNA erfolgte unter stringenten (Tm -18 °C) oder nicht-stringenten (Tm -40 °C) Bedingungen.

Ergebnisse

Aus dem Mund, Nasen- und Rachenraumbereich wurden 113 Biopsien auf Anwesenheit von HPV-DNA getestet. Zelluläre Gesamt-DNA aus jeder Biopsie wurde unter strin-

* Herrn Prof. Dr. H.-G. Boenninghaus zum 65. Geburtstag gewidmet.

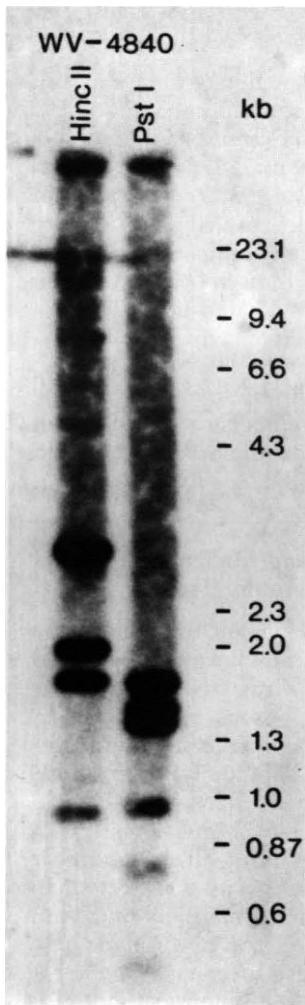


Abb. 1 Über Hybridisierung mit ³²P-radioaktiv markierter HPV 11 DNA auf Restriktionsenzym-gespaltener zellulärer DNA konnte die Anwesenheit von HPV 11 DNA Sequenzen bestätigt werden.

genten Bedingungen mit DNA von HPV 1 bis 19, 21 bis 26, 30, 31 und zum Teil von HPV 32 getestet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse wird in Tab. 1 wiedergegeben. In 16 von 22 Fällen von Larynx-Papillomen wurde Papillomvirus DNA nachgewiesen. Es enthielten hiervon 11 Biopsien HPV 6 DNA und 5 HPV 11 DNA. In 5 Biopsien von Morbus Heck wurden in 2 Fällen HPV 6 DNA und 2 anderen HPV 13 DNA nachgewiesen.

Unterschiedliche Typen von HPV-DNA wurden in Biopsien von oraler Papillomatose nachgewiesen, nämlich in 3 Fällen HPV 6, in 3 weiteren HPV 7, 2 Biopsien enthielten HPV 13 und 3 andere HPV 32. Je eine Biopsie eines Nasenpapilloms (Abb. 1), eines Zungenpapilloms und eines Gaumenpapilloms enthielten HPV 11 DNA Sequenzen.

Aus verschiedenen Arten von untersuchten Carcinomen konnten nur in 4 Biopsien von Mundboden-Carcinomen HPV-DNA gefunden werden. Hier handelte es sich um zwei Mundbodencarcinome und eine Metastase, die jeweils HPV 16 enthielten und um ein weiteres Mundbodencarcinom, das HPV 2-verwandte Sequenzen aufwies.

Diskussion

Benigne und maligne Tumoren des Mund-, Hals- und Nasenbereichs wurden auf die Anwesenheit von Papillomvirus-Sequenzen untersucht. Solche Sequenzen konnten in 34,2 % der untersuchten Fälle nachgewiesen werden. Bis jetzt wurde der möglichen Genese von oralen und Nasen-Rachen-Tumoren nur wenig Aufmerksamkeit gewidmet.

Das von Pfister u. Mitarb. (12) aus einer fokalen epithelialen Hyperplasie (Morbus Heck) isolierte HPV 13 Virus wurde bis jetzt nur in ähnlichen Läsionen gefunden. Darüberhinaus haben wir auch HPV 6 verwandte Sequenzen in 2 Morbus Heck Biopsien nachgewiesen (2). Obwohl HPV 11 aus einem laryngealen Papillom isoliert wurde (6), wird

Tab. 1

Erkrankung	Zahl untersuchter Gewebe	2	6	7	11	13	16	18	32	Negativ
Histologisch normale Mucosa	2									2
Morbus Heck	5		2			2				1
Orale Papillomatosen	23		3	3		2			3	12
Nasales Papillom	1				1					—
Gaumenpapillom	2				1					1
Zungenpapillom	1				1					—
Laryngeales Papillom	22		11		5					6
Leukoplakie der Zunge	3									3
Oropharyngeale Tumoren	2									2
Nasopharyngeale Tumoren	2									2
Parotis-Tumoren	7									7
Submandibulare Tumoren	1									1
Gaumen-Tumoren	4									4
Laryngeale Karzinome	15									15
Oropharyngeale Karzinome	2									2
Epipharyngeales Karzinom	1									1
Uvula-Karzinome	2									2
Hypopharyngeales Karzinom	1									1
Nasen-Karzinom	1									1
Zungen-Karzinome	6									6
Mundboden-Karzinome	5	1					3			1
Metastasen ungeklärter Herkunft	2									2
Kaposi-Sarkome	3									3
Gesamtzahl	113	davon 38 (34 %) positiv								

dieses Virus, wie auch HPV 6 und 16, überwiegend in genitalen Läsionen gefunden. Von 22 untersuchten Larynx-Papillomen enthielten 11 Biopsien HPV 6 DNA und 5 weitere HPV 11 DNA Sequenzen.

Der Papillomvirus Typ 7 wird hauptsächlich in Handwarzen bei Metzgern angetroffen (11), wobei bisher nur 2 Ausnahmen beobachtet wurden. Hier handelte es sich um 2 Fälle von filiformen Warzen in 2 Patienten, die keine Kontakte zum Fleischhandel oder zur Fleischindustrie hatten (3). Alle diese Läsionen betrafen die Epidermis. Wir beschreiben hier die Anwesenheit von HPV 7 Sequenzen in 3 Biopsien. Zwei Biopsien eines Patienten (eines von der Mucosa der Zahnbasis und eine weitere von der Wangenschleimhaut) enthielten HPV 7 DNA. Die dritte Biopsie war von einer condylomatösen Veränderung der Mundschleimhaut entnommen worden. In 3 ähnlichen Läsionen wurde HPV 32 nachgewiesen (1, *Le et al.*, in Vorbereitung).

Wie von *Löning* u. Mitarb. (8) beschrieben, konnten wir auch in einem Gaumenpapillom sowie in einem Zungenpapillom HPV 11 nachweisen (2, 9).

Obwohl HPV 30 ursprünglich aus einem Larynx-Karzinom isoliert wurde (7), konnten wir in 15 weiteren solcher Biopsien keine Papillomvirus DNA nachweisen.

HPV 2 ist ein Virus, das vornehmlich in Handwarzen gefunden wird und bisher nur selten in Papillomen der Mucosa nachgewiesen wurde. Jedoch waren in einem Mundboden-Karzinom HPV 2-verwandte DNA-Sequenzen vorhanden. HPV 16 DNA wurde in 3 weiteren Mundboden-Karzinom-Biopsien gefunden (5).

Da die Zahl der Karzinome aus anderen Bereichen des Mund- und Nasenrachenraumes verhältnismäßig klein war und der verwendete Test eine relativ geringe Sensitivität besitzt, können die negativen Resultate der übrigen Biopsien nicht ausschließen, daß einige dieser Tumoren mit Papillomvirus-Infektionen in Verbindung gebracht werden können.

Literatur

(1) Beaudenon, S., F. Praetorius, D. Kremsdorf, M. Lutzner, N. Worsaae, G. Orth: A New Type of Human

Papillomavirus associated with Oral Focal Epithelial Hyperplasia (eingereicht)

(2) De Villiers, E.-M., C. Neumann, J.-Y. Le, H. Weidauer, H. zur Hausen: Infection of the oral mucosa with defined types of human papillomaviruses. *Medical Microbiology and Immunology* 174 (1986) 287-294

(3) De Villiers, E.-M., C. Neumann, T. Oltersdorf, G. Fierlbeck, H. zur Hausen: Butchers Wart Virus (HPV 7) Infections in Non-Butchers. *Journal of Investigative Dermatology* (Im Druck)

(4) De Villiers, E.-M., A. Schneider, G. Gross, H. zur Hausen: Analysis of benign and malignant urogenital tumors for human papillomavirus infection by labelling cellular DNA. *Medical Microbiology and Immunology* 174 (1986) 281-286

(5) De Villiers, E.-M., H. Weidauer, H. Otto, H. zur Hausen: Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int. J. Cancer* 36 (1985) 575-578

(6) Gissmann, L., V. Diehl, H.-J. Schultz-Coulon, H. zur Hausen: Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *Journal of Virology* 44 (1982) 393-400

(7) Kahn, T., E. Schwarz, H. zur Hausen: Molecular Cloning and Characterization of the DNA of a New Human Papillomavirus (HPV 30) from a Laryngeal Carcinoma. *Int. J. Cancer* 37 (1986) 61-65

(8) Löning, T., H. Ikenberg, J. Becker, L. Gissmann, I. Hoepfner, H. zur Hausen: Analysis of oral papillomas, leukoplakias and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *Journal of Investigative Dermatology* 84 (1985) 417-420

(9) Naghashfar, Z., E. Sawada, M. J. Kutcher, J. R. Swancar, J. Gupta, R. Daniel, H. Kashima, J. D. Woodruff, K. V. Shah: Identification of Genital tract Papillomavirus Genomes

in Lesions of the Oral Cavity. *J. Cell Biochem. Suppl.* 9 c (1985) 74

(10) Orth, G., M. Favre, F. Breitbart, O. Croissant, S. Jablonska, S. Obalek, M. Jarzabek-Chorzelska, G. Rzesza: Epidermodysplasia verruciformis: A model for the role of papillomaviruses in human cancer. In: *Viruses in Naturally Occurring Cancers*, (eds. M. Essex, G. Todaro and H. zur Hausen) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1980) 259-282

(11) Orth, G., S. Jablonska, M. Favre, O. Croissant, S. Obalek, M. Jarzabek-Chorzelska, N. Jibard: Identification of Papillomaviruses in Butchers Warts. *Journal of Investigative Dermatology* 76 (1981) 97-102

(12) Pfister, H., I. Hettich, U. Runne, L. Gissmann, G. N. Chiff: Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesion. *Journal of Virology* 47 (1983) 363-366

(13) Scheurlen, W., A. Stremmlau, L. Gissmann, D. Höhn, H.-P. Zenner, H. zur Hausen: Rearranged HPV 16 Molecules in an Anal Carcinoma and in a Laryngeal Carcinoma. *Int. J. Cancer* (eingereicht)

(14) Southern, E. M.: Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503-517

(15) Stremmlau, A., L. Gissmann, H. Ikenberg, M. Stark, P. Bannasch, H. zur Hausen: Human Papillomavirus Type 16 related DNA in an Anaplastic Carcinoma of the Lung. *Cancer* 55 (1985) 737-740

(16) zur Hausen, H., A. Schneider: The Role of Papillomaviruses in Human Anogenital Cancer. In: *The Papillomaviruses* (eds. P. M. Howley and N. P. Salzman) (zum Druck eingereicht)

Dr. E.-M. de Villiers
Referenzzentrum für humanpathogene Papillomviren
Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 280
6900 Heidelberg