HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	鼻副鼻腔内反性乳頭腫の悪性転化に関わる遺伝子変異の検討
Author(s)	安川, 真一郎
Description	配架番号：2413
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13034号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13034
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71024
Type	doctoral thesis
File Information	Shinichiro_Yasukawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

鼻副鼻腔内反性乳頭腫の悪性転化に関わる

遺伝子変異の検討

（Investigation of genetic mutation involved in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma.）

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

安川　真一郎

学　位　論　文

鼻副鼻腔内反性乳頭腫の悪性転化に関わる

遺伝子変異の検討

（Investigation of genetic mutation involved in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma.）

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

安川　真一郎

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	8 頁
実験方法	10 頁
実験結果	15 頁
考察	25 頁
統括及び結論	30 頁
謝辞	31 頁
引用文献	32 頁

A）発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表予定である。

Shinichiro Yasukawa, M.D.[1], Satoshi Kano, M.D., Ph.D.[1], Hiromitsu Hatakeyama, M.D., Ph.D.[2], Yuji Nakamaru, M.D., Ph.D.[1], Dai Takagi, M.D., Ph.D.[1], Takatsugu Mizumachi, M.D., Ph.D.[1], Masanobu Suzuki, M.D., Ph.D.[1], Takayoshi Suzuki, M.D.[1], Akira Nakazono, M.D.[1], Shinya Tanaka, M.D., Ph.D.[3], Hiroshi Nishihara, M.D., Ph.D.[4], Akihiro Homma, M.D., Ph.D.[1]

[1] Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

[2] Department of Otolaryngology, Yokohama City University Medical Center, Yokohama, Japan.

[3] Department of Cancer Pathology, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

[4] Department of Cancer Genome Medical Center, Hokkaido Cancer Center, Sapporo, Japan.

Genetic mutation analysis of the malignant transformation of sinonasal inverted papilloma by targeted amplicon sequencing.

Head & Neck （投稿中）

本研究の一部は以下の学会に発表した。

安川真一郎、畠山博充、水町貴諭、加納里志、本間明宏、福田 諭
鼻副鼻腔内反性乳頭腫の再発・悪性転化に関与する遺伝子変異の解析
第 40 回日本頭頸部癌学会、大宮ソニックシティ、さいたま市
2016 年 6 月 9-10 日

B）緒言

鼻副鼻腔腫瘍の組織学的分類

鼻副鼻腔領域には、皮膚、粘膜上皮、腺組織、血管、神経・神経外胚葉組織、軟骨、骨、軟部組織、血液リンパ系細胞、歯原性組織などが含まれており、これらを発生母地とする多彩な良悪性腫瘍が発生する[1]（図 1)。2017 年の頭頸部腫瘍の WHO（World Health Organization） 組織学分類では鼻副鼻腔腫瘍は「上皮系悪性腫瘍」「上皮系良性腫瘍」「軟部組織腫瘍」「骨軟骨腫瘍」「血液リンパ球系腫瘍」「神経外胚葉腫瘍」「胚細胞腫瘍」「二次性腫瘍」に分類されている[2]（表 1）。さらに「上皮系悪性腫瘍」には「扁平上皮癌」「リンパ上皮癌」「鼻副鼻腔未分化癌」「腺癌」「唾液腺型癌」「神経内分泌腫瘍」、「上皮系良性腫瘍」には「鼻副鼻腔乳頭腫」「唾液腺型腺腫」など多数の腫瘍が含まれる。

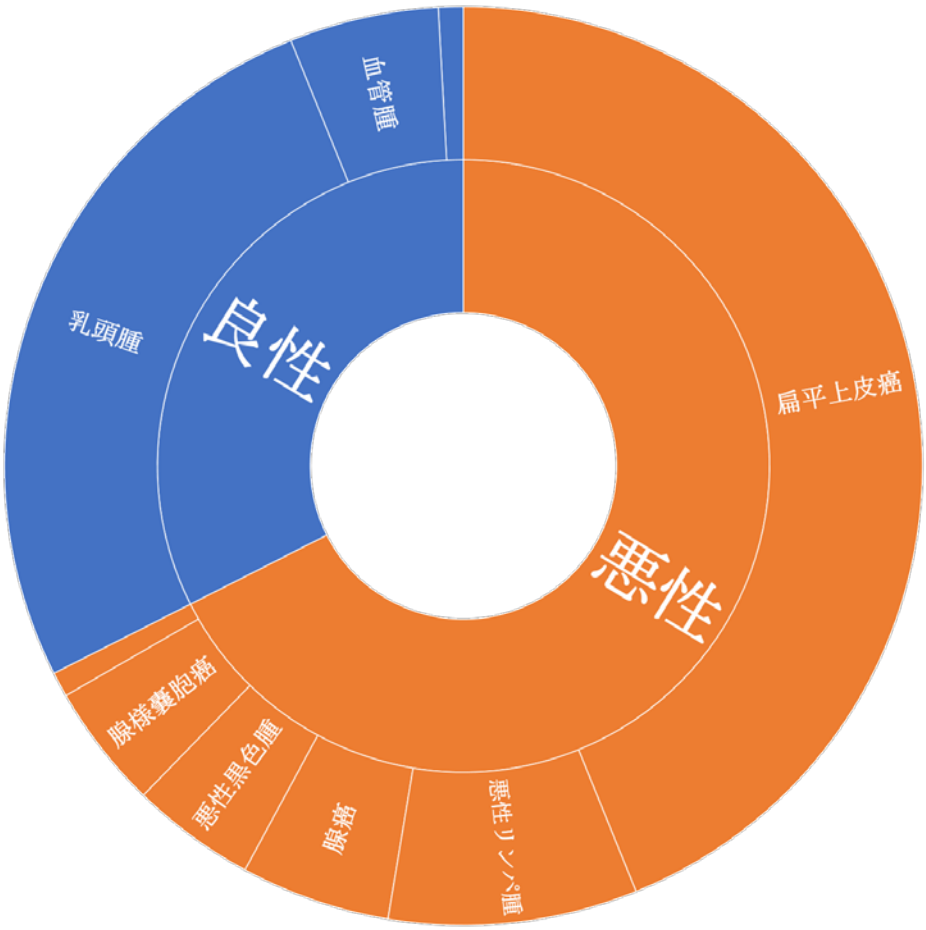

図 1. 鼻副鼻腔腫瘍の組織型内訳

Malignant epithelial tumors

Squamous cell carcinoma

Lymphoepithelial carcinoma

Sinonasal undifferentiated carcinoma

Adenocarcinoma

Salivary gland–type carcinomas

Neuroendocrine tumors

Benign epithelial tumors

Sinonasal papillomas

Salivary gland–type adenomas

Soft tissue tumors

Malignant tumors

Borderline and low malignant potential tumors

Benign tumors

Tumors of bone and cartilage

Malignant tumors

Benign tumors

Hematolymphoid tumors

Neuroectodermal

Germ cell tumors

Secondary tumors

表 1 鼻副鼻腔腫瘍の WHO 組織学分類（2017，一部改変）

鼻副鼻腔悪性腫瘍は全悪性腫瘍の 1%以下で、頭頸部癌の約 3%を占める。鼻副鼻腔悪性腫瘍は上顎洞に最も多く発生し（約 60%）、そのほか鼻腔（約 20%）、篩骨洞（約 15%）、前頭洞と蝶形骨洞（約 3%）にも発生する。組織型では扁平上皮癌（55%）、非上皮性悪性腫瘍（悪性リンパ腫など、20%）、腺系悪性腫瘍（15%）、未分化癌（7%）、その他（3%）である[3]。鼻副鼻腔悪性腫瘍の予後は不良で、5 年生存率は 50%以下である[4]。その原因として、鼻副鼻腔が空洞構造のため、発生した悪性腫瘍が隣接組織に浸潤するまで無症候性であることが多く、初診時には局所進行癌であることが多いことが考えられる[5]。リンパ節転移を生じることは少ないが、リンパ節転移を生じた症例の予後は悪い。治療に関しては、これまでは術前化学療法、拡

大切除を含めた外科的治療、術後放射線治療の三者を組み合わせた集学的治療が行われてきたが、機能温存と整容の観点から、近年では超選択的動注を用いた化学療法併用放射線治療や粒子線（重粒子線，陽子線など）治療も行われるようになってきた[6]。

一方、鼻副鼻腔には様々な良性腫瘍も発生するが、最多なのは鼻副鼻腔乳頭腫である。鼻副鼻腔乳頭腫は鼻副鼻腔の呼吸性上皮に生じ、分葉状の腫瘤で表面の形態から診断しやすいが、時に表面平滑な腫瘤として生じ炎症性ポリープとの鑑別が困難なこともある。組織学的に外反性、円柱上皮性、内反性の 3 タイプに分類される（図 2）。

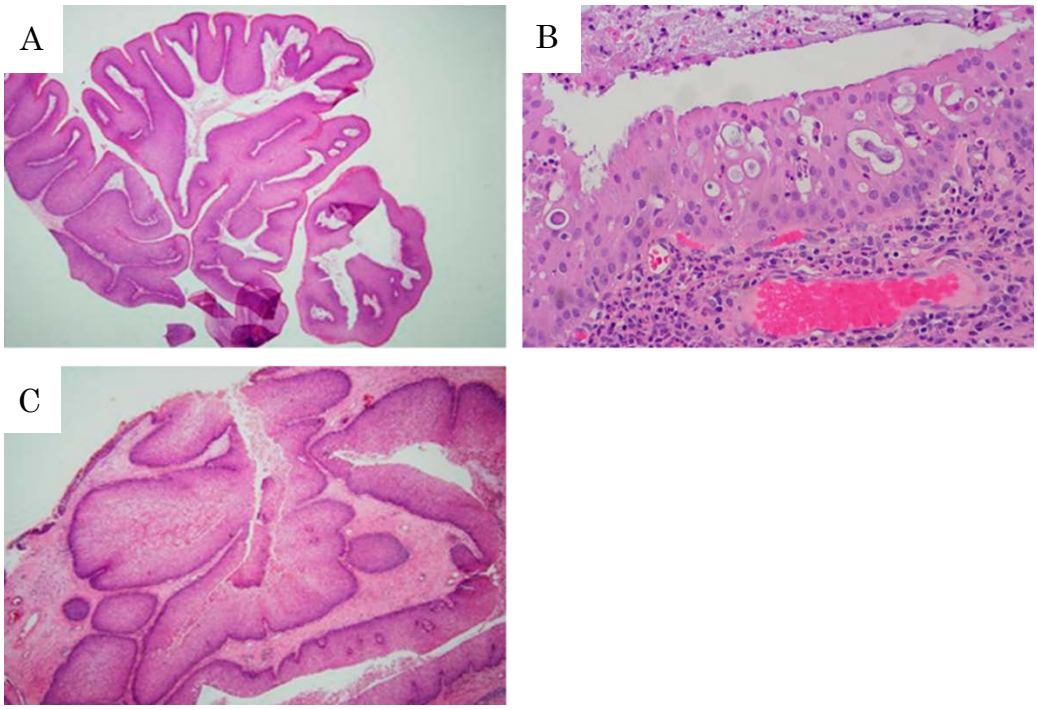

図 2. 鼻副鼻腔乳頭腫の病理組織像

(A)外反性乳頭腫、(B)円柱上皮性乳頭腫、(C)内反性乳頭腫。

鼻副鼻腔内反性乳頭腫の疫学と臨床所見

今回の研究対象である内反性乳頭腫は鼻副鼻腔乳頭腫の中で最も多く、年間発生率は 10 万人当たり 0.6 人である。発症年齢は 40 歳代以上に多く、4:1 の割合で男性に多い。好発部位は鼻腔外側であり、また内反性乳頭腫の 80%以上で血清中の扁平上皮癌抗原が上昇するといわれている [7, 8]。内反性乳頭腫の癌合併率は、同時性 7.1%、異時性 3.6%と報告されており、そのため病理学的には良性腫瘍であるが、臨床的には悪性転化を念頭に治療計画を立てる必要がある [9]。しかし、内反性乳頭腫の悪性転化の存在を治療前に肉眼的、画像的に完全に診断することは現在のところ困難である。

鼻副鼻腔内反性乳頭腫の治療と予後

鼻副鼻腔内反性乳頭腫の薬物療法は一般的に有効ではないため [10]、治療は外科手術が基本である。以前は外切開あるいは経上顎洞による鼻の外側からのアプローチによる摘出が行われていたが、近年では内視鏡下副鼻腔手術（Endoscopic sinus surgery: ESS）の進歩により、鼻内法による摘出が広く行われてきている。ESS のほうが複雑で入り組んだ構造の鼻副鼻腔の隅々まで観察できるため再発率が低下したと報告され [11, 12]、現在の標準術式となっている。また、手術で摘出された内反性乳頭腫の一部に異形成や扁平上皮癌が含まれているものが存在することがあり、これは、内反性乳頭腫が異形成を経て扁平上皮癌となる過程を示していると考えられる（図 3）。

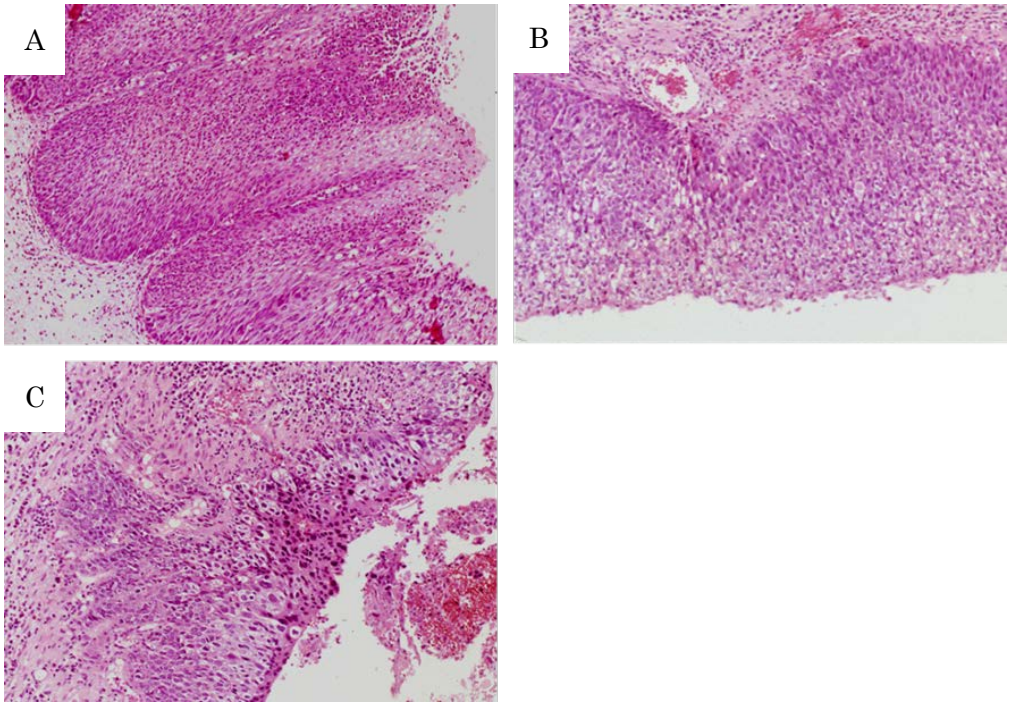

図 3. 同一症例において、複数の異なる組織型が認められた鼻副鼻腔腫瘍
(A)内反性乳頭腫、(B)異形成、(C)扁平上皮癌。

次世代遺伝子シークエンサーの臨床応用

現在、次世代遺伝子シークエンサー（Next Generation Sequencer, NGS）は様々な分野の研究で幅広く用いられており、多くの疾患において原因遺伝子の同定が進んでいる [13]。全ゲノムシークエンスや全エクソームシークエンスは検査にかかる費用や時間の面から臨床での利用機会は少なかった。しかし、近年、アンプリコンシークエンスにより標的遺伝子を効率よく検索することができるようになり、臨床でも利用されるようになってきた [14]。肺癌や乳癌など、いくつかの腫瘍で NGS を臨床応用しようという試みが行われている [15, 16]。頭頸部扁平上皮癌に関しても、NGS を用いた遺伝子解析により悪性化に関与する変異遺伝子が同定されている [17]。しかし、内反性乳頭腫の悪性化に関与する NGS を用いた網羅的な遺伝子解析は、現在まで世界的にも報告されていない。

今回、内反性乳頭腫、異形成、扁平上皮癌の各種組織の変異遺伝子を比較することによって、内反性乳頭腫の悪性化に関与する変異遺伝子が予測できるのではないかと考えた。そこで本研究では当院で手術された鼻副鼻腔内反性乳頭腫および鼻副鼻腔扁平上皮癌の検体を使って、NGS を用いたアンプリコンシークエンスによる遺伝子変異の検索を行った。

C）略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AKT1	v-ak transforming murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALK	anaplastic Lymphoma Kinase
APC	activated protein C
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CDH1	cell division cycle 20 homolog 1
CTNNB1	Beta-catenin
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERBB2	avian erythroblastosis oncogene B 2 receptor tyrosine kinase 2
FBXW7	F-box and tryptophan(W) aspartic acid(D) repeat domain-containing 7
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FOXL2	forkhead helix-box family of transcription factors2
GNAQ	guanine nucleotide-binding protein alpha-q
GNAS	guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating
H&E	hematoxylin & eosin
HPV	human papillomavirus
IP	inverted papilloma
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
KRAS	kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1
MET	mesenchymal-epithelial transition gene
MSH6	mutator small subunit homolog 6
NGS	next generation sequence
NRAS	neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
PDGFRA	platelet derived growth factor receptor alpha
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PTEN	phosphatase and Tensin homolog

SCC	squamous cell carcinoma
SMAD4	deleted in pancreatic cancer locus 4
SNP	single nucleotide polymorphism
SRC	proto-oncogene tyrosine-protein kinase sarcoma
STK11	serine/threonine kinase 11
TP53	tumor protein 53
WHO	World Health Organization

D）実験方法

対象症例

北海道大学病院耳鼻咽喉科にて 2007 年から 2016 年までに手術が行われた鼻副鼻腔内反性乳頭腫および扁平上皮癌の 29 症例を対象とした。本実験は北海道大学病院倫理委員会による承認のもと行われた（自 017-0092）

ワークフロー

NGS による遺伝子解析のワークフローを図 4 に示す。

図 4. NGS による遺伝子解析のワークフロー

病理組織学的検討

ホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE）組織から作製された hematoxylin & eosin（H&E)標本を二人の病理医が再検討し組織型を決定した。組織型の内訳は内反性乳頭腫単独の症例（IP 群）が 10 例、異形成を伴う内反性乳頭腫の症例（IP with dysplasia 群）が 8 例であった。扁平上皮癌組織を含む症例（SCC 群）は 11 例であり、そのうち内反性乳頭腫を伴う扁平上皮癌の症例（SCC with IP 群）が 5 例、扁平上皮癌単独の症例（pure SCC 群）が 6 例であった（表 2)。

以後、以下の略語を用いることとする。
IP 群：内反性乳頭腫単独の症例
IP with dysplasia 群：異形成を伴う内反性乳頭腫の症例
SCC 群：扁平上皮癌組織を含む症例
SCC with IP 群：内反性乳頭腫を伴う扁平上皮癌の症例
pure SCC 群：扁平上皮癌単独の症例
※SCC 群は SCC with IP 群と pure SCC 群の総称とする。

組織型	症例数（%）
内反性乳頭腫単独（IP群）	10（34）
異型性を伴う内反性乳頭腫（IP with dysplasia群）	8（28）
扁平上皮癌を含む(SCC群)	11（38）
内反性乳頭腫を伴う扁平上皮癌（SCC with IP群）	5（17）
扁平上皮癌単独（pure SCC群）	6（21）

表 2. 鼻副鼻腔腫瘍の組織型の内訳

DNA 抽出

H&E 標本にて腫瘍含有割合が最も高い領域を確認し、その FFPE 組織から 10 μm に薄切した切片を 5 枚ずつ作製した。作製した切片のうち、腫瘍含有割合が高い領域を選択して病変を切り取り、ゲノム DNA の抽出を行った。異なる組織型を含む症例からは、それぞれの組織型の領域より病変を切り取り、ゲノム DNA の抽出を行った。ゲノム DNA 抽出には、

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit（Qiagen, Hilden, NRW, Germany)を用いた。

ターゲットアンプリコンシークエンスの設定

アンプリコンシークエンスパネルとして TruSight Tumor 26（illumina, San Diego, CA, USA）を用いた。これは、肺、大腸、悪性黒色腫、胃、および卵巣などの固形腫瘍に関連が深いとされる 26 遺伝子の 175 アンプリコン領域をシークエンスするものとなっている（表 3)。これらの遺伝子のうち、*EGFR* 遺伝子, *ERBB2* 遺伝子, *PIK3CA* 遺伝子, *PTEN* 遺伝子, *TP53* 遺伝子が頭頸部腫瘍において変異が多数報告されている [17]（図 5)。

AKT1	ALK	APC	BRAF	CDH1	CTNNB1	EGFR
ERBB2	FBXW7	FGFR2	FOXL2	GNAQ	GNAS	KIT
KRAS	MAP2K1	MET	MSH6	NRAS	PDGFRA	PIK3CA
PTEN	SMAD4	SRC	STK11	TP53		

表 3. TruSight Tumor 26 遺伝子リスト

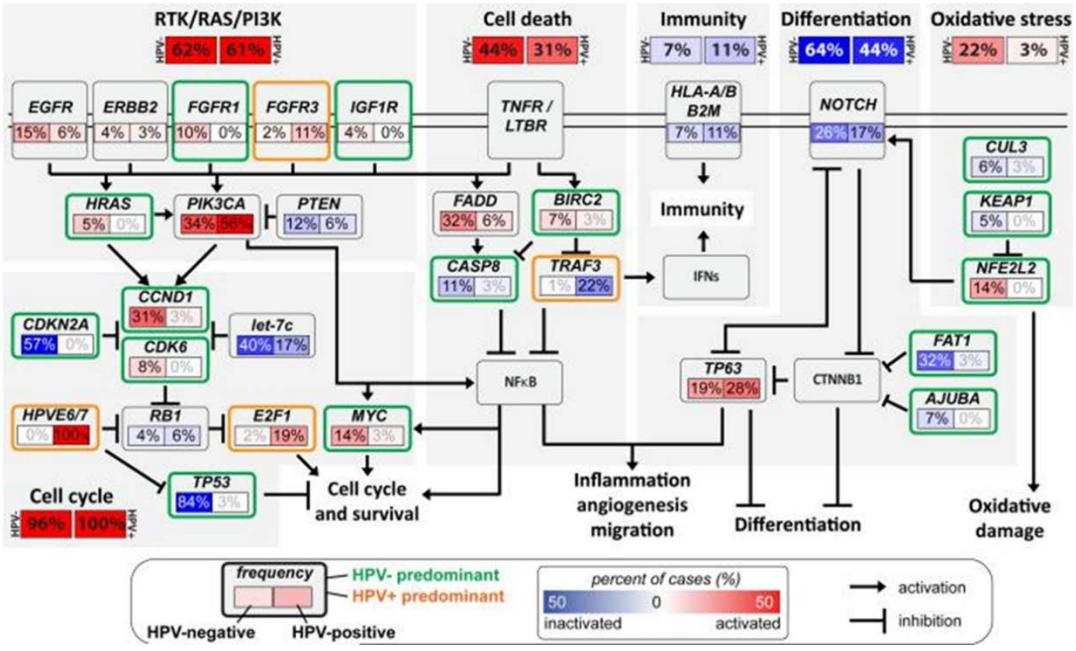

図 5. 頭頸部腫瘍における、シグナル伝達経路と転写因子の調節 [17]

ライブラリ作製

① Qubit dsDNA BR assay kit（Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA）および GeneRead DNA QuantiMIXE Assay Kit（Qiagen）にて得られた DNA 濃度を確認すると、14.1-568.3 ng/µl であった。得られたゲノム DNA を滅菌蒸留水で 16 µl に希釈し、GeneRead DNAseq Panel PCR Regent V2（Qiagen）を用いて polymerase chain reaction（PCR）法にて標的遺伝子を増幅した。PCR サイクルは 23 サイクルを基準としたが、DNA 濃度が十分に得られなかった症例に関しては GeneRead DNA QuantiMIXE Assay Kit の結果に従いサイクル数を増やした。

② PCR 産物を混和し、Agencourt AMPure XP（Beckman Coulter, Brea, CA, USA）を 72 µl 添加し、磁性ビーズに結合させた。それを 96 well plate に加えて 1800 rpm で 1 分混和した後、室温で 5 分静置した。さらに、96 well plate を磁性ラック上に 5 分静置し、溶液が透明になったことを確認した後、ビーズを乱さないように上清を除去した。次に磁性ラック上で 80%エタノールを 400 µl 加え、室温で 30 秒静置した後、上清を除去し、これを 2 回繰り返した。その後ラック上に 96 well Plate を 15 分間静置し、ビーズを完全に乾燥させた後、滅菌蒸留水を 28 µl 加えて 1800 rpm で 2 分混和し、DNA を溶出させた。そして 96 well plate を磁性ラック上に静置して溶液が透明になった後、25 µl の上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。

③ Agilent 2100 bioanalyzer と Agilent DNA 1000 Kit（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）で DNA 濃度を測定し、GeneRead DNA Library Core kit（Qiagen）を用いて末端修復とアダプターライゲーションを行い、精製 DNA ライブラリとした。

④ 精製 DNA ライブラリに AMPure XP を 36 µl 加え、1800 rpm で 1 分混和した後、室温で 5 分静置した。次に 96 well plate を磁性ラック上に 5 分静置し、溶液が透明になったことを確認した後、ビーズを乱さないように上清を除去した。そして磁性ラック上で 80%エタノールを 400 µl 加え、室温で 30 秒静置した後、上清を除去し、これを 2 回繰り返した。さらにラック上に 96 well plate を 15 分間静置し、ビーズを完全に乾燥させた後、滅菌蒸留水を 19 µl 加えて 1800 rpm で 2 分混和

し、DNA を溶出させた。その後 96 well plate を磁性ラック上に静置して溶液が透明になった後、17 µl の上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。

⑤ 精製した DNA ライブラリを GeneRead DNA Amp kit（Qiagen）で PCR 増幅させ、MinElute PCR Purification kit（Qiagen)で精製した。ライブラリの最終濃度を Agilent 2100 bioanalyzer と Agilent DNA 1000 Kit、および GeneRead Library Quant Kit（Qiagen）で測定した。

⑥ DNA ライブラリを滅菌蒸留水で 4 nM に希釈し、1 件体当たり 5 µl ずつ抽出し、12 検体分のライブラリと 0.2 N 水酸化ナトリウム 60 µl を混和した後、室温で 5 分静置してライブラリを変性させた。次に変性ライブラリ 6 µl を氷冷 HT1（Hybridization Buffer）（illumina）994 µl で希釈し、ライブラリ希釈液 792µl に 12.5 Pm pHIx（Illumina）を混和した。最後にライブラリ希釈液を Miseq V2 Regent kit（Illumina）の試薬カートリッジに 600 µl 添加し、Miseq（Illumina）でシークエンスした。

データ解析

アンプリコンシークエンスにより Miseq から得られた FastQ ファイルを illumina より提供されている解析サーバー、BaseSpace Variant Studio version2,2 で解析し、変異を検出した。一塩基多型（single nucleotide variants, SNP）と塩基の挿入（insertion）、欠失（deletion）を検出した。SNP は read depth 1000 以上、変異陽性率 10%以上のアミノ酸置換を起こす変異に限定した。

統計解析

統計解析にはエクセル統計 version 1.03（株式会社社会情報サービス、Tokyo, Tokyo, Japan）を用いた。各群での変異遺伝子数の比較には、Kruskal-Wallis 検定、カイ二乗検定を用いた。P 値は 0.05 未満を統計学的に有意差ありと判定した。

E）実験結果

①IP 群、IP with dysplasia 群の異形成組織、SCC 群の扁平上皮癌組織における変異遺伝子の比較

解析した 29 症例のうち、全例において 1 個以上の変異遺伝子が検出され、合計 129 個のアミノ酸変異を伴う変異遺伝子が検出された。本研究で使用したシークエンスパネルで解析した 26 遺伝子のうち、検出された変異遺伝子の個数は IP 群では 1-5 個（中央値 3 個）、IP with dysplasia 群の異形成組織では 3-6 個（中央値 4.5 個）、SCC 群の扁平上皮癌組織では 3-9 個（中央値 6 個）であり、IP 群、IP with dysplasia 群の異形成組織、SCC 群の扁平上皮癌組織の順に変異遺伝子の数は増加する傾向が見られた（図 6）。また、IP 群、SCC 群の扁平上皮癌組織では、変異遺伝子数に有意差を認めた（$P< 0.05$、 Kruskal-Wallis 検定）。症例ごとの変異遺伝子の詳細は図 7 に示す。また、SCC 群のうち、SCC with IP 群の扁平上皮癌組織では平均 5.6 個の変異遺伝子が、pure SCC 群では平均 5.8 個の変異遺伝子が検出され、また両群の変異遺伝子パターンに差は認めなかった。

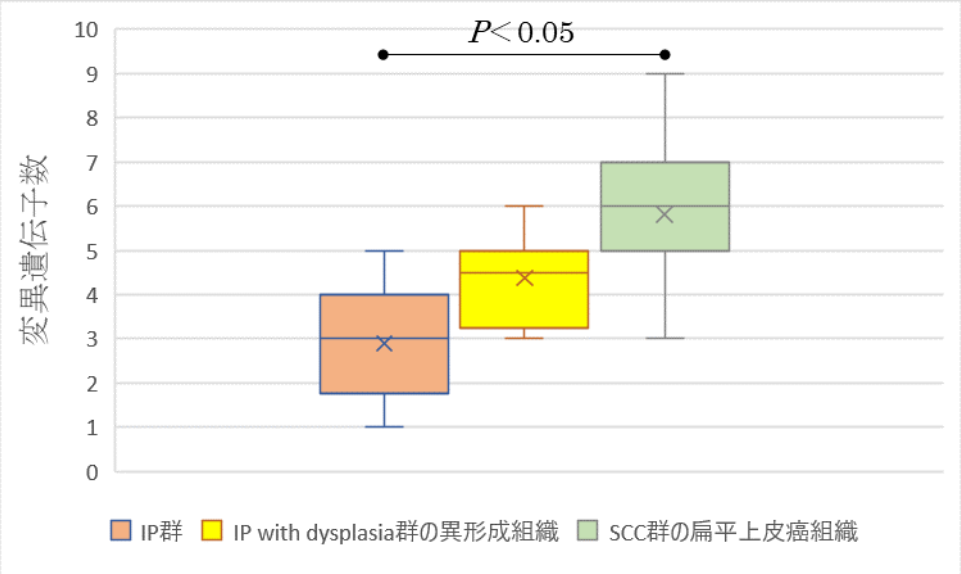

図 6. 各組織群での変異遺伝子数

IP 群、IP with dysplasia 群の異形成組織、SCC 群の扁平上皮癌組織の順に変異遺伝子の数は増加していた。IP 群、SCC 群の扁平上皮癌組織では、変異遺伝子数に有意差を認めた（$P < 0.05$、 Kruskal-Wallis 検定）。

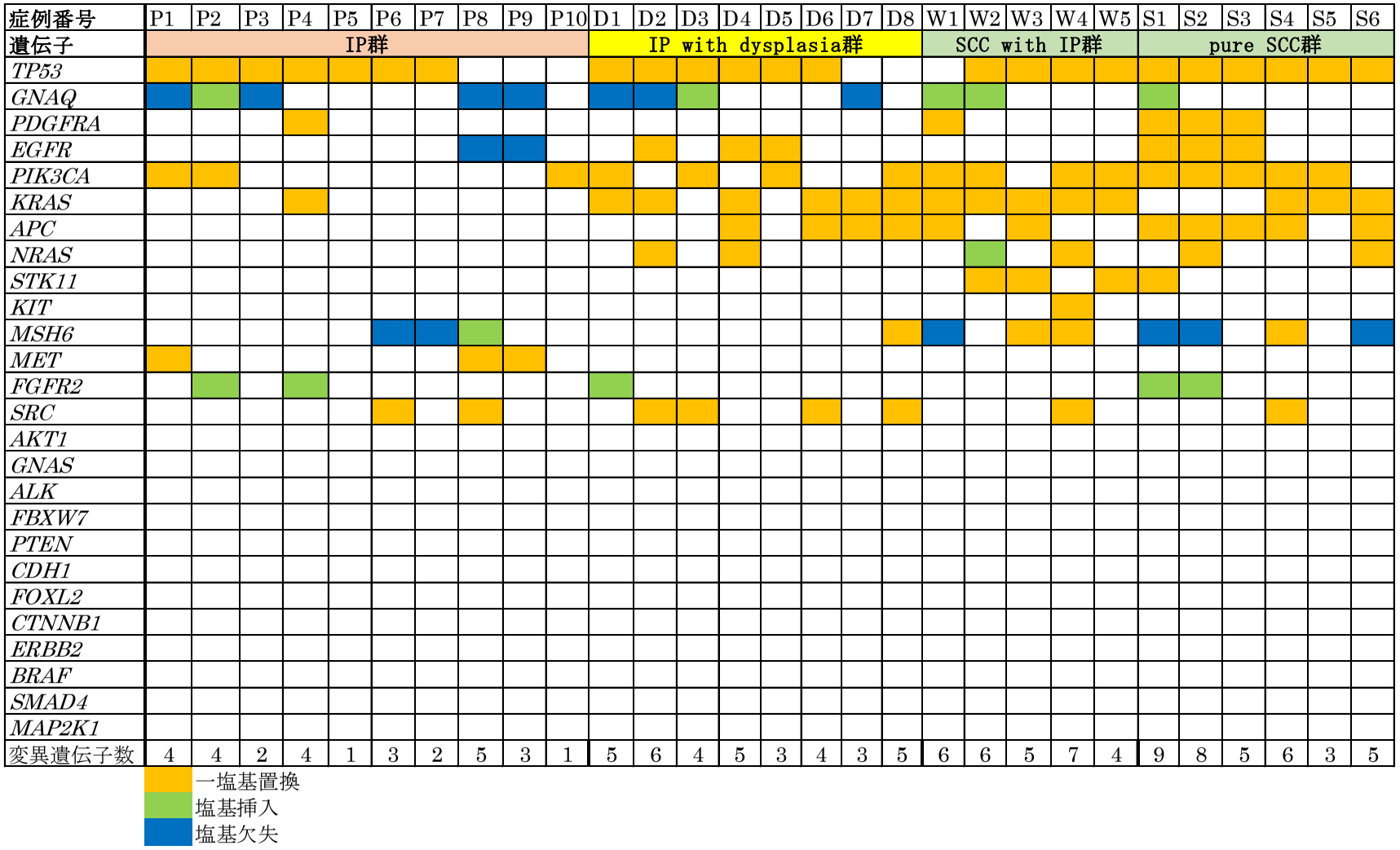

図7. 症例ごとの遺伝子変異と変異数。

IP群、IP with dysplasia群の異形成組織、SCC with IP群の扁平上皮癌組織、pure SCC群の比較。

解析した遺伝子別に検討を行うと、*PDGFRA*、*PIK3CA*、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* の 6 遺伝子において IP 群、IP with dysplasia 群の異形成組織、SCC 群の扁平上皮癌組織で変異遺伝子の変異陽性率に差を認めた(表 4)。*PDGFRA* 遺伝子と *STK11* 遺伝子は IP 群と IP with dysplasia 群の異形成組織では変異が少ないが、SCC 群の扁平上皮癌組織では有意に多く認めた（$P < 0.05$、カイ二乗検定)。特に *STK11* 遺伝子は IP 群、IP with dysplasia 群の異形成組織において変異を認めなかった。*KRAS* 遺伝子は IP 群では変異が少ないが、IP with dysplasia 群の異形成組織と SCC 群の扁平上皮癌組織では同等に多く認めた（$P< 0.01$、カイ二乗検定)。*PIK3CA* 遺伝子、*APC* 遺伝子、*NRAS* 遺伝子では IP 群＜IP with dysplaasia 群の異形成組織＜SCC 群の扁平上皮癌組織の順に変異が多くなり、特に *APC* 遺伝子と *NRAS* 遺伝子は IP 群において変異を認めなかった。また *TP53* 遺伝子はどの群においても高頻度の遺伝子変異を認めた（IP 群：70%、IP with dysplaasia 群の異形成組織：75%、SCC 群の扁平上皮癌組織：91%)。

	変異陽性率 (%)			
遺伝子	全症例	IP群	IP with dysplasia群	SCC群
TP53	79	70	75	91
GNAQ	41	50	50	27
PDGFRA	17	10		36
EGFR	28	20	38	27
PIK3CA	55	30	50	82
KRAS	52	10	75	73
APC	38		50	64
NRAS	21		25	36
STK11	14			36
KIT	3			9
MSH6	38	30	13	64
MET	10	30		
FGFR2	17	20	13	18
SRC	28	20	50	18

表 4. 各遺伝子における変異陽性率

PDGFRA、PIK3CA、KRAS、APC、NRAS、STK11 の 6 遺伝子において IP 群、IP with dysplasia 群の異形成組織、SCC 群の扁平上皮癌組織で変異遺伝子の出現率に差を認めた。TP53 遺伝子はどの群においても高頻度の遺伝子変異を認めた。

②遺伝子変異の遺伝子座と頻度

異なる症例で 2 回以上の再現性があった遺伝子変異の遺伝子座と頻度を表 5 に示す。特に頻度の多かった変異は、*TP53* 遺伝子の g.7579472G>C で 26%（IP 群：30%、IP with dysplasia 群の異形成組織：25%、SCC 群の扁平上皮癌組織 27%）、*APC* 遺伝子の g.112175770G>A で 24%（IP 群：0%、IP with dysplasia 群の異形成組織：27%、SCC 群の扁平上皮癌組織：27%）であった。

			変異陽性率 (%)			
遺伝子	塩基変化	遺伝子座	全症例	IP群	IP with dysplasia群	SCC群
TP53	C>A	7570312	7			18
	T>A	7577150	10		13	18
	G>T	7578511	10	10		18
	G>C	7579472	26	30	25	27
GNAQ	G>GAA	80343587	14	10	13	18
	G>GA	80343587	17	20	13	18
	GAA>G	80343587	7	10		9
	GA>G	80343587	17	10	13	9
PDGFRA	A>G	55141055	7	10		9
	C>T	55152040	7		13	9
EGFR	C>CGGG	55249012	14	10	13	18
	AA>TT	55249013	10		25	9
	C>CGGGTTT	55249012	7	10	13	0
	G>A	55249063	7	10		9
PIK3CA	C>T	178917627	7	10		9
KRAS	G>A	25378661	14	10	25	9
	A>G	25362777	10	10	25	0
APC	C>T	112174550	7		13	9
	G>A	112175642	10			27
	G>A	112175770	24		25	27
STK11	A>G	153247353	7			18
MSH6	A>T	48030559	10	20		9
	AC>A	48030639	10	10	13	9
	A>AC	48030639	10	10	13	9
	T>A	48030692	17	10	13	27

表 5. 遺伝子変異の遺伝子座と変異陽性率

特に頻度の多かった変異は、*TP53* 遺伝子の g.7579472G>C で 26%、APC 遺伝子の g.112175770G>A で 24%であった。

③IP with dysplasia 群または SCC with IP 群での、同一症例における内反性乳頭腫組織と異形成組織または扁平上皮癌組織の変異遺伝子の比較

IP with dysplasia 群または SCC with IP 群での、同一症例における異なる組織での変異遺伝子の違いを検討した。IP with dysplasia 群では、内反性乳頭腫または異形成のいずれかの組織に変異を認めた遺伝子はのべ 39 個認めたが、そのうち、内反性乳頭腫組織のみに認めた変異遺伝子は 4 個（10%）、逆に異形成組織のみに認めた変異遺伝子は 6 個（15%）、いずれの組織にも認めた変異遺伝子は 29 個（75%）であった（図 8）。

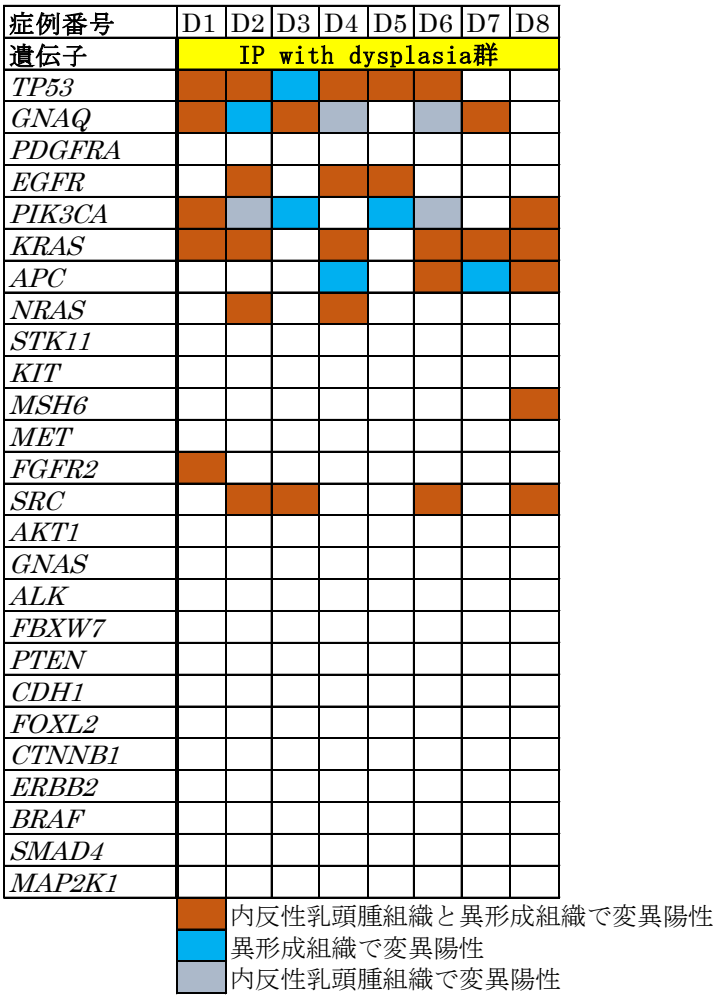

図 8. IP with dysplasia 群での、同一症例における内反性乳頭腫組織と異形成組織の変異遺伝子の比較

内反性乳頭腫組織のみに認めた変異遺伝子は 10%、異形成組織のみに認めた変異遺伝子は 15%、いずれの組織にも認めた変異遺伝子は 75%であった。

SCC with IP 群では、内反性乳頭腫または扁平上皮癌のいずれかの組織に変異を認めた遺伝子はのべ 29 個認めたが、その内、内反性乳頭腫組織のみに認めた変異遺伝子は 1 個（3%）、逆に扁平上皮癌組織のみに認めた変異遺伝子は 2 個（7%）、いずれの組織にも認めた変異遺伝子は 26 個（90%）であった（図 9）。

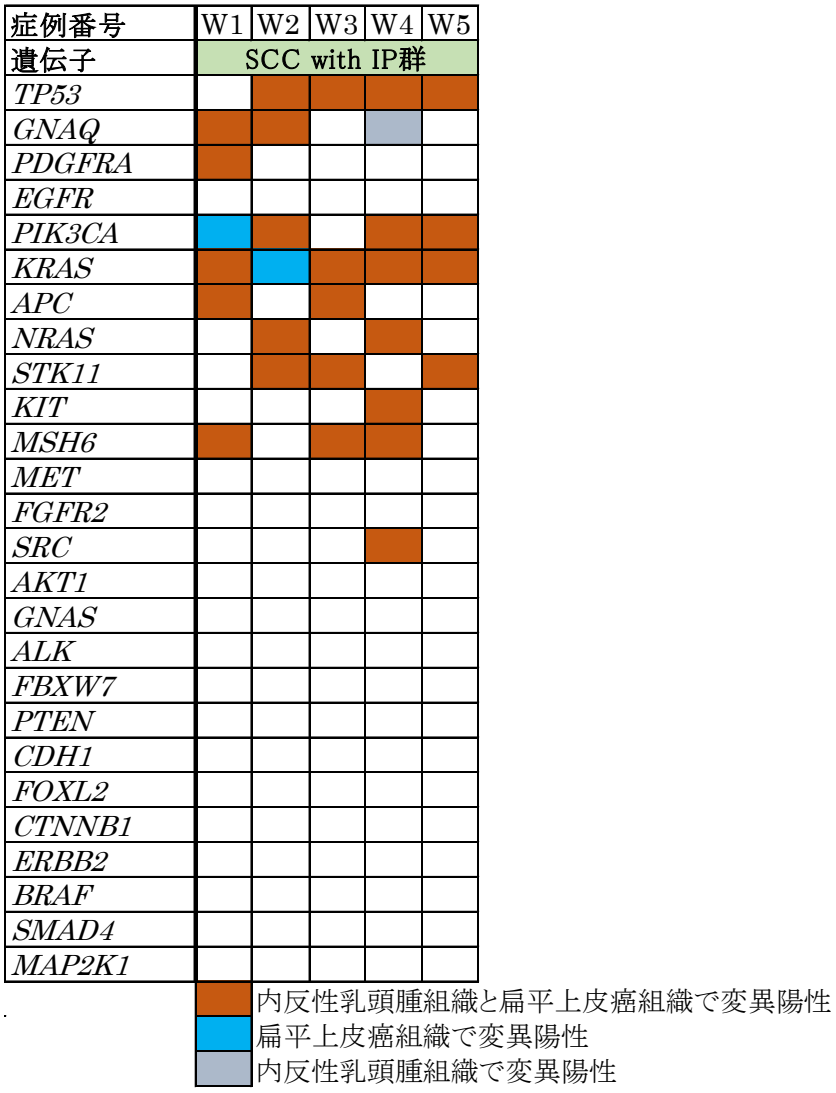

図 9. SCC with IP 群での、同一症例における内反性乳頭腫組織と扁平上皮癌組織の変異遺伝子の比較

内反性乳頭腫組織のみに認めた変異遺伝子は 3%、扁平上皮癌組織のみに認めた変異遺伝子は 2 個（7%）、いずれの組織にも認めた変異遺伝子は 90%であった。

④IP 群、IP with dysplasia 群、SCC with IP 群の各群における内反性乳頭腫組織での変異遺伝子の比較

IP 群、IP with dysplasia 群、SCC with IP 群の各群における内反性乳頭腫組織での変異遺伝子を比較検討した。解析した全 26 遺伝子のうち、IP 群では 1-5 個（平均 2.9 個、中央値 3 個）の変異遺伝子が検出された。一方、IP with dysplasia 群の内反性乳頭腫組織では 2-6 個（平均 4.0 個、中央値 5 個）、SCC with IP 群の内反性乳頭腫組織では 4-8 個（平均 5.4 個、中央値 5 個）の変異遺伝子が検出された（図 10）。IP 群と、SCC with IP 群の内反性乳頭腫組織では変異遺伝子数に統計学的有意差を認めた（$P < 0.05$、Kruskal-Wallis 検定）。

また、遺伝子別に解析を行うと、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* の 4 遺伝子において内反性乳頭腫組織での変異遺伝子の出現率に差を認めた（図 11）。この 4 遺伝子の変異は、IP 群では *KRAS* 遺伝子に変異を認めた 1 症例のみであったが、SCC with IP 群の内反性乳頭腫組織では全症例で 2 遺伝子以上の変異を認めた。

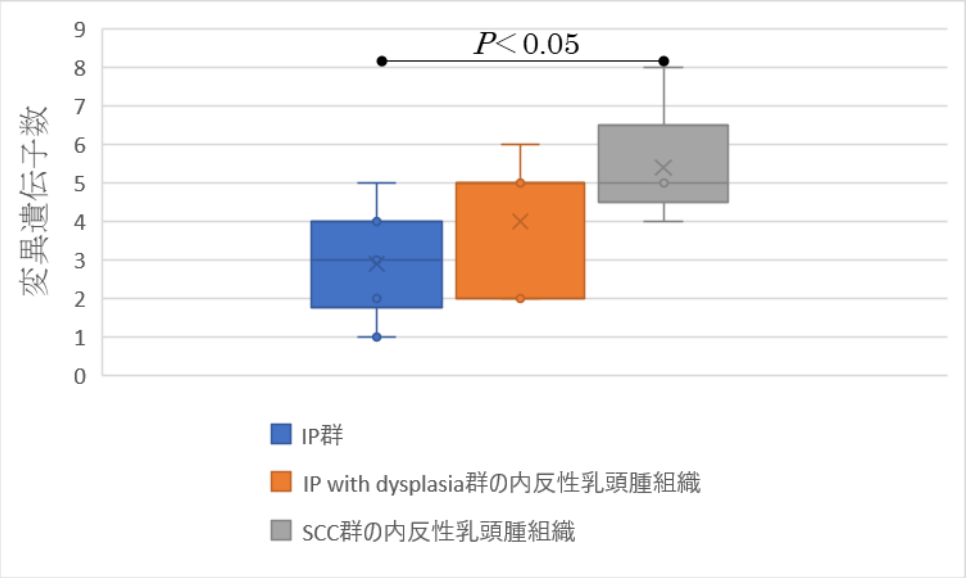

図 10. IP 群、IP with dysplasia 群、SCC with IP 群の、内反性乳頭腫組織における変異遺伝子数

IP 群と、SCC with IP 群の内反性乳頭腫組織では変異遺伝子数に統計学的有意差を認めた（$P < 0.05$、 Kruskal-Wallis 検定）。

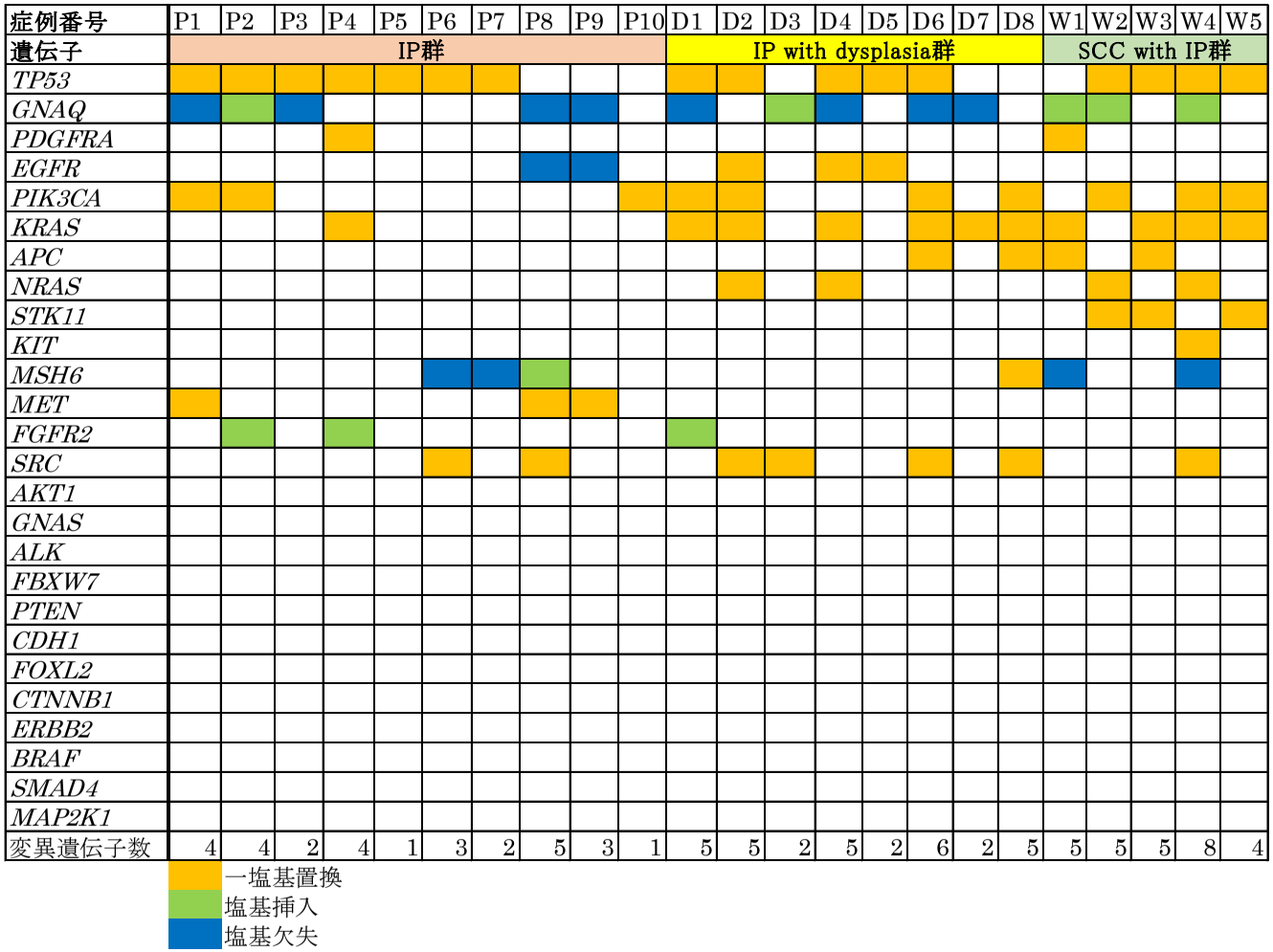

図11. 症例ごとの内反性乳頭腫組織における遺伝子変異と変異数。

IP群、IP with dysplasia群の内反性乳頭腫組織、SCC with IP群の内反性乳頭腫組織の比較。

KRAS、*APC*、*NRAS*、*STK11* の 4 遺伝子のみでの変異数を解析すると、IP 群では 0-1 個（平均 0.1 個、中央値 0 個）、IP with dysplasia 群の内反性乳頭腫組織では 0-2 個（平均 1.3 個、中央値 1.5 個）、SCC with IP 群の内反性乳頭腫組織では 2-3 個（平均 2.2 個、中央値 2 個）であった（図 12）。IP 群と、IP with dysplasia 群の内反性乳頭腫組織では変異遺伝子数に有意差を認めた（P < 0.05、 Kruskal-Wallis 検定）。IP 群と、SCC with IP 群の内反性乳頭腫組織では、変異遺伝子数に有意差を認めた（P < 0.05、Kruskal-Wallis 検定）。

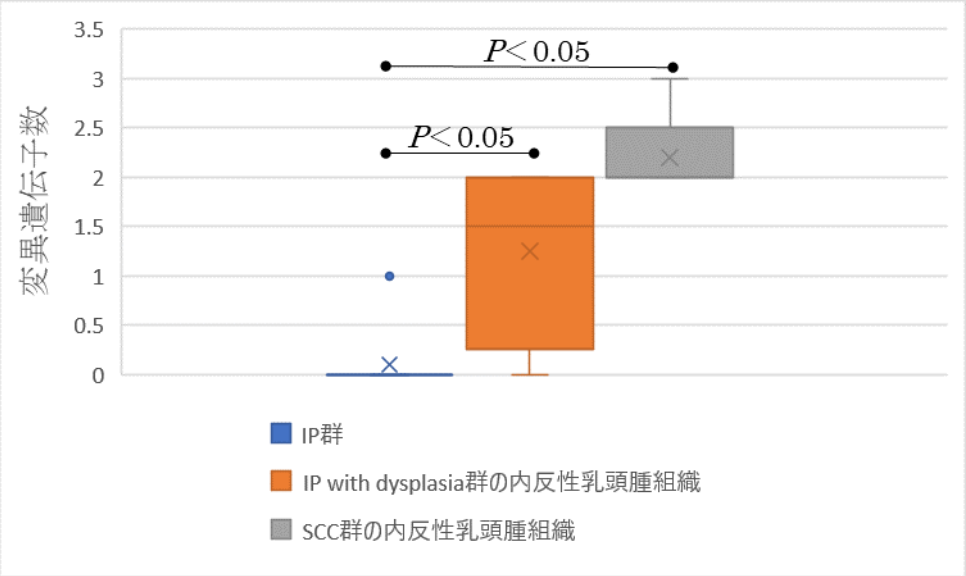

図 12. IP 群、IP with dysplasia 群、SCC with IP 群の内反性乳頭腫組織における特定遺伝子（KRAS、APC、NRAS、STK11）の変異遺伝子数

IP 群と、IP with dysplasia 群の内反性乳頭腫組織では変異遺伝子数に有意差を認めた（P < 0.05、 Kruskal-Wallis 検定）。IP 群と、SCC with IP 群の内反性乳頭腫組織では、変異遺伝子数に有意差を認めた（P < 0.05、Kruskal-Wallis 検定）。

結果のまとめ

① IP 群、IP with dysplasia 群の異形成組織、SCC 群の扁平上皮癌組織の順に変異遺伝子の数は増加していた。特に *PDGFRA*、*PIK3CA*、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* の 6 遺伝子は 3 群間で変異遺伝子の出現率に差を認めた。*TP53* 遺伝子はどの群においても高頻度の遺伝子変異を認めたが、3 群間での差は認めなかった。

② 頻度の多かった遺伝子変異部位は、*TP53* 遺伝子の g.7579472G>C（全症例における変異陽性率 26%）、*APC* 遺伝子の g.112175770G>A（全症例における変異陽性率 24%）であった。

③ IP with dysplasia 群または SCC with IP 群の同一症例において、内反性乳頭腫組織と異形成または扁平上皮癌組織では、変異遺伝子のパターンに差は認められなかった。

④ IP 群、IP with dysplasia 群、SCC with IP 群における内反性乳頭腫組織では、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* 遺伝子で変異率に統計学的な有意差を認めた。

F）考察

内反性乳頭腫の悪性転化に関与する遺伝子変異

内反性乳頭腫の悪性転化に関する研究はこれまでにも多数報告されている。癌化の原因は依然として不明であるが、これまでに報告されている仮説は、ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）の感染、慢性炎症、環境汚染、職業暴露（溶接煙霧、ニッケル化合物、有機溶剤）などがある[18, 19]。また、内反性乳頭腫の悪性転化に関与するバイオマーカーとしては、細胞周期に作用する p53、p21、p27 分子や、E-cadherin、Catenin、Fascin、Desmoglein 3 などの細胞間接着因子、Osteopontin といった血管新生因子などが報告されている[20-27]。しかし、遺伝子変異を解析した報告は Udager らの *EGFR* 遺伝子と *KRAS* 遺伝子に関する解析のみである[28, 29]。彼らは内反性乳頭腫 50 例と内反性乳頭腫由来の扁平上皮癌 22 例の *EGFR* の遺伝子変異を解析し、その結果内反性乳頭腫では 88%、内反性乳頭腫由来の扁平上皮癌では 77%の *EGFR* 遺伝子の変異があったと述べているが、両者に統計学的な有意差はなく、*EGFR* 遺伝子の変異と内反性乳頭腫の悪性転化との因果関係は証明できなかった。

そこで、今回我々は、内反性乳頭腫の悪性転化に関与する遺伝子を同定するために、NGS を用いたターゲットアンプリコンシークエンスを行うことで、26 の癌関連遺伝子の変異を一度に解析した。その結果、IP 群、IP with dysplasia 群の異形成組織、SCC 群の扁平上皮癌組織の順に変異遺伝子の数は増加していた（図 6）。

中でも、*PDGFRA*、*PIK3CA*、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* の 6 遺伝子は 3 群間で変異遺伝子の出現率に差を認めた（表 4）。特に、IP 群ではほとんど変異を認めず、SCC 群の扁平上皮癌組織で高頻度に変異を認めた *KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* 遺伝子は内反性乳頭腫の悪性転化への関与が強く示唆された。*KRAS* の遺伝子変異に関しては、Udager らが、鼻副鼻腔乳頭腫の亜型である円柱上皮乳頭腫および円柱上皮乳頭腫由来扁平上皮癌の全症例で *KRAS* 遺伝子の変異を認めたと報告している[30]。しかし、彼らの報告では、内反性乳頭腫および内反性乳頭腫由来の扁平上皮癌では *KRAS* 遺伝子変異を 1 例も認めていない。

一方、本研究では *TP53* 遺伝子はどの群においても高頻度の遺伝子変異を認めた（表 4）。しかしながら、Lin らは、免疫染色法により内反性乳頭腫では p53 陽性が 30%であったのに対し、内反性乳頭腫由来の扁平上皮癌では p53 陽性が 62%であり、p53 の変異が内反性乳頭腫の悪性転化に重要であると述べている[31]。そこで、本研究の *TP53* 遺伝子を変異部位別に解

析すると、g.7570312C>A は全体では 7%の変異率であるが、IP 群、IP with dysplasia 群では変異がなく、SCC 群でのみ 18%の変異を認めた。また、g.7577150T>A は全体では 10%の変異率であるが、IP 群では変異を認めず、IP with dysplasia 群では 13%、SCC 群では 18%の変異を認めた（表 5）。これらの結果より、*TP53* 遺伝子は変異部位によって p53 タンパク質の機能低下をきたし、内反性乳頭腫の悪性転化に関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、内反性乳頭腫の悪性転化には *PDGFRA*、*PIK3CA*、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11*、*TP53* 遺伝子変異が関与し、これらの遺伝子が何らかの要因により異時性に変異を来たし、多段階発癌している可能性が示唆される。

他の癌腫に関しての研究では、1988 年、ボーゲルシュタインはヒト大腸癌発症に関する膨大なデータを元に、複数の変異遺伝子と悪性化の過程を結びつけた多段階発癌説を提唱した。この多段階発癌のシナリオは変異する遺伝子の種類や順番に多少の変更があるにせよ大腸癌以外のがんでも成り立つと考えられている。そのモデルによると、癌化は以下のように進行する。

まず、正常な大腸の上皮細胞が変化して肥大上皮となる。この細胞に継続した刺激が加わると、初期腺腫（class I）となり癌化が始まる。この初期癌細胞では遺伝子発現抑制性のシトシンのメチル基が除かれ、増殖促進系の遺伝子の発現が亢進する。もう一段進んだ中期腺腫（class II）の状態では、*KRAS* 遺伝子に点変異が起き、細胞増殖が促進される。後期腺腫（class III）にまで進むと、しばしば癌抑制遺伝子である *DCC* や *TP53* の変異が見出される。p53 が欠失すると癌腫になり、無制限の細胞増殖を始めるようになる（図 13）。この過程には *MCC* や *APC* などの癌抑制遺伝子の変異も観察されることがある。

内反性乳頭腫の悪性転化においても *TP53*、*KRAS*、*APC* といった遺伝子の変異を認めており、大腸癌で提唱されている多段階発癌のシナリオが起こっている可能性がある。

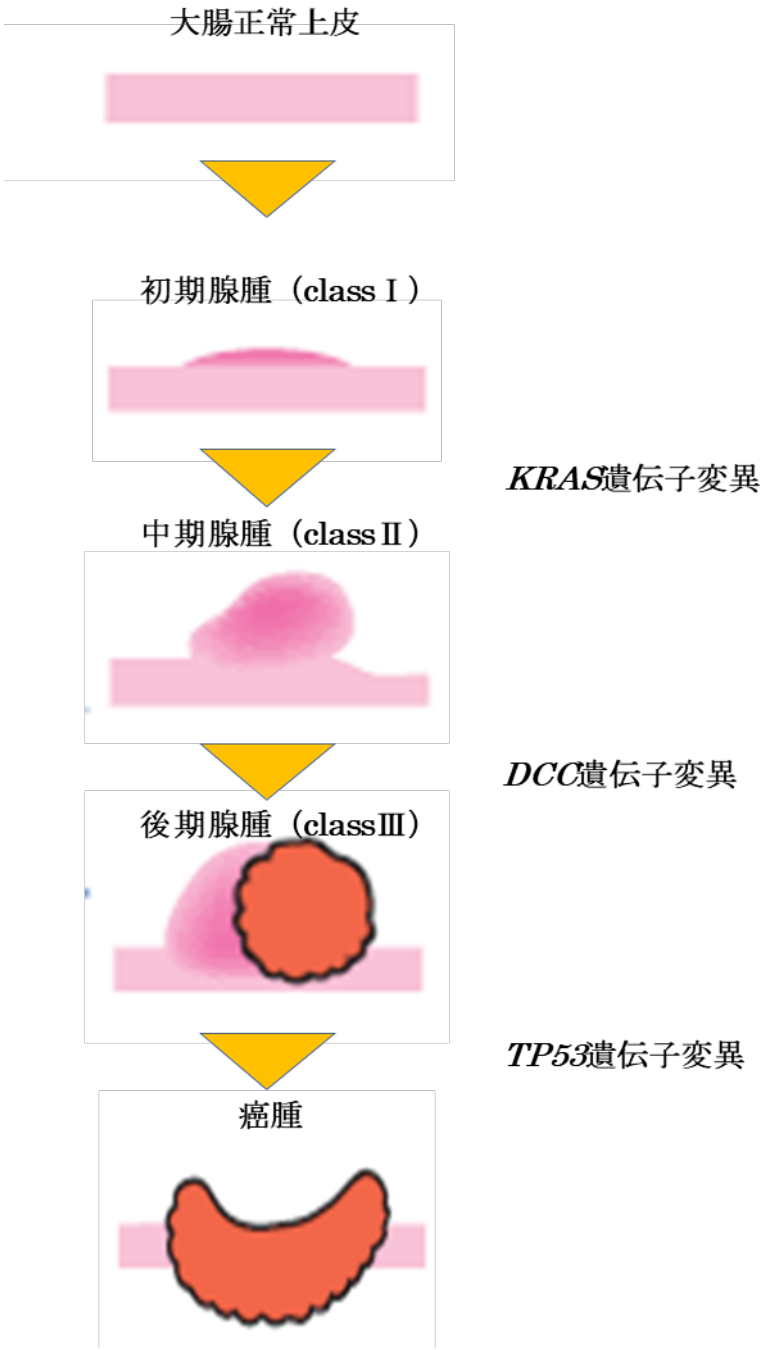

図 13. 大腸癌の多段階発癌モデル

内反性乳頭腫由来の扁平上皮癌と de novo 発癌の扁平上皮癌の鑑別

現在、内反性乳頭腫由来の鼻副鼻腔癌の診断は、病理組織学的に内反性乳頭腫の存在を認めるしかないが、内反性乳頭腫組織が癌に完全に置換された場合は内反性乳頭腫由来か de novo 発癌かを鑑別することができない。また、内反性乳頭腫と扁平上皮癌が別々に発生し、扁平上皮癌がその近傍の内反性乳頭腫に直接浸潤をきたした場合には、de novo 発癌を内反性乳頭癌由来と誤診する可能性がある。そこで本研究では、SCC with IP 群と、pure SCC 群の 2 群を比較検討した（図 7）。その結果、両群において、変異遺伝子の個数、各遺伝子での変異率、複数遺伝子での変異パターンに差は認められなかった。よって、今回の結果からは変異遺伝子の違いによって de novo 発癌を内反性乳頭癌由来癌を鑑別することは困難であると考えられた。

内反性乳頭腫における変異遺伝子の術前診断への応用

内反性乳頭腫の約 10%は悪性転化するため、内反性乳頭腫の標準治療は腫瘍の完全切除である [32]。しかし、内反性乳頭腫の発生する鼻副鼻腔は解剖学的に眼窩や頭蓋内といた重要部位と隣接しており、その部位の拡大切除は術後の合併症や機能障害に大きな影響を及ぼす危険性がある。そのため、術前に悪性組織の混在の有無が判明できれば、適切な切除ラインの設定や不必要な拡大切除の回避が可能となる。しかしながら、現在は、腫瘍の肉眼的所見や CT、MRI、PET といった画像検査を用いても、内反性乳頭腫の悪性転化の有無を術前に完全に診断することは容易ではない。また、悪性転化した場合の内反性乳頭腫内に占める癌組織の割合は 10%から 95% と言われているため [33]、術前に行った腫瘍の生検組織に悪性成分が含まれなかった場合は、術前の生検によっても悪性転化を正しく診断できない危険性がある。そのため、内反性乳頭腫の悪性転化に関する新たな術前診断の開発は、臨床的に非常に有益であると考えられる。

本研究では、IP with dysplasia 群または SCC with IP 群での、同一症例における内反性乳頭腫組織と異形成組織または扁平上皮癌組織の変異遺伝子の違いを検討した。その結果、IP with dysplasia 群では、内反性乳頭腫または異形成のいずれかの組織に変異を認めた遺伝子はのべ 39 個認めたが、そのうち、内反性乳頭腫のみに認めた変異遺伝子は 4 個（10%）、逆に異形成のみに認めた変異遺伝子は 6 個（15%）であった（図 8）。また、SCC with IP 群では、内反性乳頭腫または扁平上皮癌のいずれかの組織に変異を認めた遺伝子はのべ 29 個認めたが、その内、内反性乳頭腫組織のみに認め

た変異遺伝子は 1 個（3%）、逆に扁平上皮癌組織のみに認めた変異遺伝子は 2 個（7%）であった（図 9）。つまり、同一症例において、内反性乳頭腫組織と異形成または扁平上皮癌組織では、変異遺伝子のパターンに差は認められなかった。この結果より、内反性乳頭腫の組織生検の遺伝子変異を調べることで、内反性乳頭腫より発生した扁平上皮癌組織の遺伝子変異パターンを推測することができる可能性がある。

さらに、本研究では、IP 群、IP with dysplasia 群、SCC with IP 群の各群における内反性乳頭腫組織の変異遺伝子を比較検討した（図 10、11）。その結果、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* の 4 遺伝子で変異率に統計学的な有意差を認めた（図 12）。このことから、術前に行った内反性乳頭腫の生検組織における *KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* 遺伝子の変異を解析することで、内反性乳頭腫内に扁平上皮癌の存在や、将来的な内反性乳頭腫の悪性転化の危険性を予測できる可能性があると考えられた。

G）総括および結論

1. 得られた新知見

① NGS を用いたターゲットアンプリコンシークエンスによる解析により、内反性乳頭腫の悪性転化には複数の変異遺伝子（*PDGFRA*、*PIK3CA*、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11*、*TP53*）が関与している可能性が示唆された。

② IP 群、IP with dysplasia 群、SCC with IP 群の各群における内反性乳頭腫組織の変異遺伝子の解析の結果、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* の 4 遺伝子で変異率に統計学的な有意差を認めた。

2. 新知見の意義

本研究により、内反性乳頭腫の悪性転化に関与する可能性がある変異遺伝子が複数同定された。今回のような複数の遺伝子を網羅的に解析した報告は過去になく、得られた知見は世界初の報告である。

本研究結果をもとに、術前に行った内反性乳頭腫の生検組織における *KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* の遺伝子変異を解析することで、内反性乳頭腫内に扁平上皮癌の存在や、将来的な内反性乳頭腫の悪性転化の危険性を予測できる可能性がある。それにより、術前に悪性組織の混在の有無が判明でき、適切な切除ラインの設定や不必要な拡大切除の回避ができる可能性が示唆された。

3. 今後の研究展開と課題

本研究により得られた結果をもとに、以下の研究展開を検討している。

① 本研究の一番の課題は、解析した症例数が少ないことである。本研究により判明した内反性乳頭腫の悪性転化に関与すると思われる候補遺伝子を中心に、さらなる症例を蓄積し解析していきたい。

② 本研究により内反性乳頭腫からの多段階発癌の関与が示唆されたが、その理論を検証するために、同一症例での初回手術時の内反性乳頭腫組織と、再発時の内反性乳頭腫由来の扁平上皮癌組織および共存する内反性乳頭腫組織の遺伝子変異を解析したい。

③ 将来の臨床応用を念頭に、より正確かつ効率的に内反性乳頭腫の悪性転化を予測できる変異遺伝子とその遺伝子座を同定する。

H）謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究院感覚器病学分野　耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室　福田諭名誉教授および本間明宏教授、ならびに腫瘍病理学分野　田中伸哉教授に深く感謝いたします。

また、適切な助言と直接のご指導を賜りました国立病院機構 北海道がんセンター がんゲノム医療センター長・慶應義塾大学病院腫瘍センター 客員教授　西原広史先生、北海道大学大学院医学研究院感覚器病学分野　耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室　加納里志先生、ならびに横浜市立大学附属市民総合医療センター　耳鼻咽喉科准教授　畠山博充先生に心から感謝致します。

また、耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室、腫瘍病理学分野、ならびに北海道大学病院がん遺伝子診断部のスタッフや大学院生には実験に関する様々なことをご指導いただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、本研究にあたってのご指導・ご協力を頂いた全ての皆様に、心よりお礼申し上げます。

【引用文献】

1 Mirza, S., Bradley, P.J., Acharya, A., Stacey, M., & Jones, N.S. Sinonasal inverted papillomas: recurrence, and synchronous and metachronous malignancy. *J. Laryngol. Otol.* 121, 857-864 (2007).

2 Adel, K.E., John, K.C.C., Jennifer, R.G., Takashi, T. & Pieter, J.S. *WHO Classification of Head and Neck Tumours, 4th ed.* IARC, Lyon, 2017.

3 Batsakis, J.G. & Suarez, P. Schneiderian papillomas and carcinomas : a review. *Adv. Anat. Pathol.* 8, 53-64 (2011).

4 Vincent, T.D. Jr., Theodore, S.L., Steven, A.R., Ronald, A.D. & Robert, A.W. *Cancer: Principles & Practice of Oncology, 9th ed.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011.

5 Stanley, E.T., William, R.P., John, G.B. & Robert, D.L. *Comprehensive Management of Head and Neck Tumors. 2nd ed.* WB Saunders, Philadelphia, 1999.

6 Homma, A., Oridate, N., Suzuki, F., Taki, S., Asano, T., Yoshida, D., Onimaru, R., Nishioka, T., Shirato, H. & Fukuda, S. Superselective High-dose Cisplatin Infusion with Concomitant Radiotherapy in Patients with Advanced Cancer of The NasalCavity and Paranasal Sinuses : a Single Institution Experience. *Cancer*. 115, 4705-4714 (2009).

7 Suzuki, M., Deng, Z., Hasegawa, M., Uehara, T., Kiyuna, A. & Maeda, H. Squamous cell carcinoma antigen production in nasal inverted papilloma. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 26, 365-370 (2012).

8 Thompson, L. Benign neoplasms of the nasal cavity, paranasal sinuses, and nasopharynx. In, *Head and Neck Pathology.,* Elsevier, Amsterdam, 2006, 124-154.

9 Thompson, L. Malignant neoplasms of the nasal cavity, paranasal sinuses, and nasopharynx. In*, Head and Neck Pathology., Elsevier, Amsterdam, 2006,* 155-213.

10 Phillips, P.P., Gustafson, R.O. & Facer, G.W. The clinical behavior of inverting papilloma of the nose and paranasal sinuses: report of 112 cases and review of the leterature. *Laryngoscope*. 100, 463-469 (1990).

11 Draf W. *Endoskopie der Nasennebenohlen; in Technik,typische Befunde, Therapeutische Molichkeiten*. Springer, Berlin, 1978.

12 Venkatachalam, V.P. & Jain, A. Comparative evaluation of functional endoscopic sinus surgery and conventional surgery in the management of chronic sinusitis. *J. Indian Med. Assoc.* 100, 78-79 (2002).

13 Davey, J.W., Hohenlohe, P.A., Etter, P.D., Boone, J.Q., Catchen, J.M. & Blaxter, M.L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet*. 12, 499-510 (2011).

14 Coco, S., Truini, A., Vanni, I., Dal, B.M.G., Alama, A., Rijavec, E., Genova, C., Barletta, G., Sini, C., Burrafato, G., Biello, F., Boccardo, F. & Grossi, F. Next Generation sequencing in non-small cell lung cancer: new avenues toward the personalized medicine. *Curr. Drug Targets*. 16, 47-59 (2015).
15 Roy-Chowdhuri, S., de Melo Gagliato, D., Routbort, M.J., Patel, K.P., Singh, R.R., Broaddus, R., Lazar, A.J., Sahin, A., Alvarez, R.H., Moulder, S., Wheler, J.J., Janku, F., Gonzalez-Angulo, A.M., Chavez-MacGregor, M., Valero, V., Ueno, N.T., Mills, G., Mendelsohn, J., Yao, H., Aldape, K., Luthra, R. & Meric-Bernstam, F. Multigene Clinical Mutational Profiling of Breast Carcinoma Using Next-Generation Sequencing. *Am. J. Clin. Pathol.* 144, 713-721 (2015).
16 Michael, M., Kelly, K.F., Elizabeth, M.G., Sheri, D.S. & Andrew, N. F. Multi-marker Solid Tumor Panels Using Next-Generation Sequencing to Direct Molecularly Targeted Therapies. *PLoS Curr. 6,* (2014).
17 The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 517, 576-582 (2015).
18 Deitmer, T. & Wiener, C. Is there an occupational etiology of inverted papilloma of the nose and sinuses? *Acta. Otolaryngol.* 116, 762-765 (1996).
19 d'Errico, A., Zajacova, J., Cacciatore, A., Baratti, A., Zanelli, R., Alfonzo, S. & Beatrice, F. Occupational risk factors for sinonasal inverted papilloma: a case-control study. *Occup. Environ. Med.* 70, 703-708 (2013).
20 Katori, H., Nozawat, A. & Tsukuda, M. Relationship between p21 and p53 expression, human papilloma virus infection and malignant transformation in sinonasal-inverted papilloma. *Clin. Oncol.* 18. 300-305 (2006).
21 Giant, C.L., Adam, S., Sarah, A.B.S., Steven, C., Martin, G., Christine, K., Heather, W., Jonathan, B.M., Mark, E.P., Thomas, C. & Mark, A.Z. MDP16, EGFR, Cyclin D1, and p53 staining patterns for inverted papilloma. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 3, 885-889 (2011).
22 Oncel, S., Cosgul, T., Calli, A., Calli, C. & Pinar, E. Evaluation of p53, p63, p21, p27, ki-67 in paranasal sinus squamous cell carcinoma and inverted papilloma. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 63, 172-177 (2011).
23 Saegusa, M., Nitta, H., Hashimura, M. & Okayasu, I. Downregulation of p27Kip1 expression is correlated with increased cell proliferation but not expression of p21waf1 and p53, and human papillomavirus infection in benign and malignant tumours of sinonasal regions. *Histopathology.* 35, 55-

64 (1999).
24 Koo, B.S., Jung, B.J., Kim, S.G., Liang, Z.L., Yeong, M.K. & Rha, K.S. Altered expression of E-cadherin and & ß-catenin in malignant transformation of sinonasal inverted papillomas. *Rhinology.* 49, 479-485 (2011).
25 Norris, H.J. Papillary lesions of the nasal cavity and paranasal sinuses. I. Exophytic(squamous) papillomas. A study of 28 cases. *Laryngoscope.* 72, 1784-1797 (1962).
26 Hope, H.W., Samiah, Z., Youming, H., Herman, Y., Luis, C. & Beverly, Y. WangFascin over expression is associated with dysplastic changes in sinonasal inverted papillomas: a study of 47 cases. *Head Neck Pathol.* 3, 212-216 (2009).
27 Huang, C.C., Lee, T.J., Chang, P.H., Lee, Y.S., Chuang, C.C., Jhang, Y.J., Chen, Y.W., Chen, C.W. & Tsai, C.N. Desmoglein 3 is overexpressed in inverted papilloma and squamous cell carcinoma of sinonasal cavity. *Laryngoscope*. 120, 26-29 (2010).
28 Udager, A.M., Rolland, D.C.M., McHugh, J.B., Betz, B.L., Murga-Zamalloa, C., Carey, T.E., Marentette, L.J., Hermsen, M.A., DuRoss, K.E., Lim, M.S., Elenitoba-Johnson, K.S.J. & Brown, N.A. High-frequency targetable EGFR mutations in sinonasal squamous cell carcinomas arising from inverted sinonasal papilloma. *Cancer. Res.* 75, 2600-2606 (2015).
29 Udager, A.M., McHugh, J.B., Betz, B.L., Montone, K.T., Livolsi, V.A., Seethala, R.R., Yakirevich, E., Iwenofu, O.H., Perez-Ordonez, B., DuRoss, K.E., Weigelin, H.C., Lim, M.S., Elenitoba-Johnson, K.S. & Brown, N.A. Activating KRAS mutations are characteristic of oncocytic sinonasal papilloma and associated sinonasal squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* 239, 394-398 (2016).
30 Altavilla, G., Staffieri, A., Busatto, G., Canesso, A., Giacomelli, L. & Marioni, G. Expression of p53, p16INK4A, pRb, p21WAF1/CIP1, p27KIP1, cyclin D1, Ki-67 and HPV DNA in sinonasal endophytic Schneiderian (inverted) papilloma. *Acta. Otolaryngol.* 129, 1242-1249 (2017).
31 Cheung, F.M., Laum T.W., Cheungm L.K., Lim A.S., Chowm S.K., Lom A.W. Schneiderian papillomas and carcinomas: a retrospective study with special reference to p53 and p16 tumor suppressor gene expression and association with HPV. *Ear Nose Throat J.* 89, E5–E12 (2010).
32 Re, M., Zizzi, A., Ferrante, L., Stramazzotti, D., Goteri, G., Gioacchini, F.M., Olivieri, F., Magliulo, G. & Rubini, C. p63 and Ki-67 immunostainings in laryngeal squamous cell carcinoma are related to survival. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 271, 1641–1651 (2014).
33 Lawson, W., Schlecht, N.F. & Brandwein-Gensler, M. The role of the human papillomavirus in the pathogenesis of Schneiderian

Inverted papillomas: an analytic overview of the evidence. *Head Neck Pathol.* 2, 49–59 (2007)