

전립선 암조직에서의 사람파필로마바이러스의 감염과 p53단백질의 발현에 대한 연구

생명공학연구소 바이러스종양 R.U., KIST, ¹제일제당(주) 종합연구소,
²계명대 임상병리학교실, ³경희대학교 생물학과

권두한 · 진승원 · 강병태 · 윤희식 · 유왕돈¹ · 김현수¹ · 이상숙² · 이호자 · 박순희³

=Abstract=

Human Papillomavirus Infections and p53 Expression in Prostatic Carcinoma

Dur Han Kwon, Seung Won Jin, Byung Tae Kang, Heesik Yoon, Wang Don Yoo¹,
Hyeun Soo Kim¹ Sang Sook Lee², Ho Sa Lee³ and Sue Nie Park

Virus/Oncology R.U., Kor. Res. Ins. of Biosci. & Biotech. Taejon, ¹R&D Ctr. of Cheil Food & Chemicals, Co., Kyunggi-Do, ²Dept. of Ant. & Pathol. Keimyoung Med. School, Daegu, ³Dept. of Biol. KyeungHee Univ. Seoul, Korea

Prostatic carcinoma is the leading second cause of cancer in men. Previous epidemiological studies implicated human papillomavirus as an infectious agent. Since there are only limited studies on the association of HPV to prostate cancer, we examined the prevalence of HPV infections in Korean prostate cancer patients. We observed that out of 26 cases, 4 cases and 5 cases were infected by HPV 16(27%) and HPV 18 (31%), respectively and 3 cases by both (46%) and at least 18 were positive for HPV (69%). For these samples, immunohistochemical detection of the p53 and proliferative cell nuclear antigen (PCNA) were also studied, using monoclonal antibodies. Sixteen of 26 (61%) showed immunostaining for p53 protein. While 8 samples with no HPV infection (100%) showed all positive for p53 protein staining, less than half of the 18 patients with any HPV infection (44%) showed p53 protein staining. These findings indicate that altered expression of p53 protein occurs in the more than half of prostate cancers, however, p53 expression is less frequent in HPV infected tissues. This implies that there might be an inverse correlation in general between HPV infection and p53 amplification. However, while 50% (4 of 8) of HPV negative prostate cancer was positive for PCNA staining, 13 out of 18 HPV infected patients (72%) were positive. Therefore HPV infection is more strongly associated with increase proliferation. In addition HPV infected cancer patients are generally in more advanced status implying that HPV infection plays a role in the development of highly malignant prostatic carcinomas, even though the statistical significance of this interpretation might be waited for the analysis of more cases.

Key Words : Human papillomavirus (HPV), p53, Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA), Prostate Tissues.

서 론

전립선암은 전세계적으로 남성에서 가장 많이

발생하는 암으로서, 사망율도 두번째로 높은 암이다 [1]. 전립선암의 발생률은 나이에 따라 증가하는데 50대에는 10% 정도에서 80대에는 70%까

지 높아진다 [2]. 전립선암의 발생원인으로는 음식, androgen 등의 호르몬, 유전적 요인, 환경적 요인 등이 전립선암화에 영향을 주는 것으로 추측되고 있으나 아직까지 정확히는 밝혀져 있지 않으며 좋은 암모델 연구시스템이 개발되어 있지 않다 [1]. 근래의 분자생물학적 연구에서 세포주기에 관련된 인자들이 세포의 암화기작과 관련되어 있음이 알려졌다 [3, 4]. 그중 p21로 알려진 ras유전자의 돌연변이가 여러 암조직에서 발견되었는데 [5, 6, 7], 전립선암조직에서도 ras유전자의 돌연변이가 보고되었다 [8, 9]. 한편 가장 중요한 암억제인자로 알려진 p53 단백질의 돌연변이는 대부분의 암종에서 발견되고 있는데 [10, 11], 전립선암조직에서도 p53의 돌연변이가 발견되고 있다 [11, 12]. 그러나 이들 유전적 변이들은 대부분 precancerous leison이나 초기 암조직에서는 그 발견율이 낮고 진행성암에서 발견되는 율이 높으므로 발암의 직접원인이 아닐 것으로 생각되고 있다. 또다른 발암요인으로는, 자궁경부암의 발암요인으로 알려진 HPV의 감염에 의해서도 전립선암이 유발될 가능성이 제시되고 있다 [13]. HPV는 그동안 자궁경부암 외에도 구강암, 후두암 등과 관련되어 그 발암원성이 밝혀져 왔으며, HPV 형종에서도 악성종양과 관련된 HPV 16형과 18형의 E6, E7 단백질은 각각 p53단백질, Rb단백질과 결합하여 종양억제단백질로서의 기능상실을 유도할 수 있는 것으로 보고되어 왔다 [45, 15]. 한편 in vitro에서 prostate cell line의 수립이 어려운 것으로 보고되고 있는데 최근 HPV의 유전자를 이용하여 prostate cell line의 수립이 이루어지고 있어 HPV와 prostate cancer의 관련여성의 연구가 체계적으로 이루어질 수 있는 전기가 마련되고 있다.

전립선암조직에서의 HPV 감염연구는 여러나라에서 보고되고 있으나 나라별로 감염빈도를 달리 나타나고 있다. 캐나다의 경우 전립선암환자의 52% (7/16)에서 HPV가 발견되었으나 [16], 인근국가인 일본의 경우는 악성종양과 관련된 HPV 16, 18, 33형에 대한 감염을 조사한 결과, 전립선암환자중 41% (28/68)가 이들 HPV 형에 감염되어 있었다 [9]. 또 프랑스에서의 전립선암환자에 대해서도 암화에 따라 차이는 있으나 41% (16/39)가 HPV에 감염되어 있었다 [13]. 그러나 미국에서의 전립선암환자의 HPV 감염율은 매우 낮은 것으로 보고되었다 [17]. 아직까지 국내에

서는 한국인 남성 전립선암에 대한 연구가 극히 미미한 상황이나 따라서 한국인 남성 전립선암에서 사람파필로마바이러스의 감염을 검색하고, p53, ras 등의 변이를 조사하여 전립선암의 발생 및 진행과정 중에 이들인자의 관련성을 분석하는 연구를 수행하여 계속 증가되고 있는 한국인에서의 전립선암에 암화의 진단 및 치료에 필요한 정보를 제공할 수 있다.

그러므로 본 연구에서는 한국인 남성 전립선암조직에서 사람파필로마바이러스 DNA의 감염을 확인하고 아울러 p53의 발현을 조사하였다. 또한 암조직에서 세포의 이상증식의 지표 [18]로 알려진 PCNA의 발현을 검색하여 그리고 이들 결과를 종합하여 사람파필로마바이러스의 감염과 p53단백질 발현 및 PCNA의 발현의 상관관계를 분석하여 이들 요인이 전립선암 발생과의 관련성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

Genomic DNA의 분리

전립선암조직은 계명대의 임상병리학교실에서 파라핀포매조직으로 보관된 것을 사용하였으며, 전립선암 파라핀포매조직에서 권등 [18]의 방법을 사용하여 genomic DNA를 추출하여 β -globin 유전자의 존재를 확인하기 위한 template DNA로 사용하였으며 100 μ l의 반응용액에 0.2 mM dNTP, 1 μ M primer 1 (5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3')과 primer 2 (5'-GCTCACTCAGTGTG GCAAAG-3')을 사용하여 2.5 U Taq polymerase (바이오니아사), PCR buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20, pH 7.4)와 혼합하여 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 15초간 반응시키고 30회 반복하여 PCR을 수행하였다.

HPV 감염확인

전립선암조직에서 β -globin의 536bp절편이 확인된 시료는 adenocarcinoma (23종), small cell carcinoma (2종), 그리고 transitional cell carcinoma (1종)이었다. HPV 16형과 18형의 감염을 검색하기 위해서는 아래 표1과 같이 HPV 16E6유전자 또는 HPV 18E7유전자의 일부를 특이적으로 증폭할 수 있는 각 primer set를 사용하였으며, 다른 형의 HPV의 감염을 검색하기 위해서는 약 20여

Table 1. Sequences of primer sets used for the amplification of HPVs infected in prostate cancer tissue

HPV 16 E6 specific primer set	upstream primer downstream primer	5'-GCAAGCAACAGTTACGCGACGT-3' 5'GCAACAAGACATACACGACCGG-3'
HPV 18 E7 specific primer set	upstream primer downstream primer	5'-TCACGAGCAAATTAAGCGACT-3' 5'CTGAGCTTTCTACTACTAGC-3'
HPV consensus primer set	upstream primer(MY11) downstream primer(MY09)	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3' 5'CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'

M=A+C, R=A+G, W=A+T, Y=C+T

종류의 HPV감염을 검색할 수 있는 HPV consensus primer set [20]을 사용하여 각각 PCR을 위와 같은 조건으로 수행하였다. HPV DNA를 포함하는 대조시료로서는 Caski(HPV 16형 감염), HeLa(HPV 18형 감염)세포주로부터 추출한 genomic DNA를 사용하였으며, HPV DNA 음성 시료로서는 L929 세포주로부터 추출한 genomic DNA를 사용하였다.

면역조직반응

각 파라핀포매조직을 slide glass에 고정한후 실온에서 정상 말혈청과 30분 반응시키고 p53에 대한 단일클론항체 (DO-1, Oncogene Sience co.) 또는 PCNA (PC-10, Oncogene Sience co.)에 대한 단일클론항체(1: 500)을 37℃에서 1시간 반응시키고 PBS (8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15g Na₂PO₄, 0.2 g KHPO₄/l, pH 7.4)로 3회 세척하였다. Biotinylated anti-mouse IgG를 37℃에서 30분 동안 반응시키고 다시 PBS로 3회 세척한 다음 streptoavidin-conjugated peroxidase(1:1000)을 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척하고 diaminobenzidine (0.6mg/ml PBS)을 실온에서 10분간 반응시켰다. 대조반응은 Mayer's hematoxylin으로 실시하였다

결 과

HPV에의 감염

한국 남성의 전립선암 파라핀포매조직으로부터 β -globin 유전자의 존재가 확인된 26 cases에서 PCR에 의해 HPV 유전자의 존재를 확인한 결과, 18 cases (69%)에서 HPV 감염이 발견되었는데, 7 cases (27%)의 전립선암조직에서 HPV 16형의 감염이 확인되었으며 (Fig. 1), HPV 18형은 8 cases (31%)에서 발견되었다 (Fig. 2). 이중 3 cases에서는 HPV 16형과 HPV 18형 DNA가 함께 발견되었

다. 또다른 HPV에의 감염을 조사하기 위하여 HPV L1 consensus primer로 L1 유전자 일부를 증폭시킨 결과 (Fig. 3, HPV 16: 451 bp, HPV 18: 454 bp, HPV 33: 448bp)에서는 11 cases가 양성으로 나왔다. 이중 4 cases는 HPV 16형 또는 HPV 18형으로 확인되었고 나머지 7 cases가 다른 형의 HPV (27%)에 감염된 것으로 생각된다 (Table 2).

p53단백질의 발현

p53 단백질은 정상조직에서는 일반적으로 그 발현량이 적어 in situ immunohistochemistry법에 의해서는 검출이 잘 되지 않는다. 그러나 본 실험에서는 정상조직과 암조직 부위가 동시에 있는 시료를 선택하여 전립선 암조직의 파라핀 포매조직에 대해 p53단백질의 발현을 검색한 결과, 과량이 발현된 경우가 16 cases (62%)로 나타났으며 그 대표적인 염색결과를 그림 4에 제시하였다. 이 조직에서 정상조직부분은 염색이 되지 않고 암조직부분에 강하게 염색되어 있는 것을 알 수 있다. (Fig 4). p.53이 과량 발현된 16 cases는 HPV가 감염안된 시료가 8 caeses (50%)이었고 HPV 양성은 반수인 8명 (50%)이어쓰며, HPV 16형 또는 18형에 감염된 경우는 5 cases이었고 3 cases은 다른 형의 HPV에 감염된 경우이었다. p 53단백질이 발현되지 않은 10 cases에서는 모두 HPV의 감염이 확인되었으며 (100%) HPV 16형의 감염이 4 cases이고 HPV 18형의 감염이 5 cases이며 HPV 16형과 HPV 18형의 동시감염이 2 cases이었고 또다른 HPV 형에의 감염이 3 case로 나타났다 (Table 2).

PCNA단백질의 발현

PCNA는 세포가 증식할 때 그 발현량이 증가하는 단백질로 알려져 있다. 특히 비정상적인 세포증식이 일어나는 경우에 이 단백질의 발현량

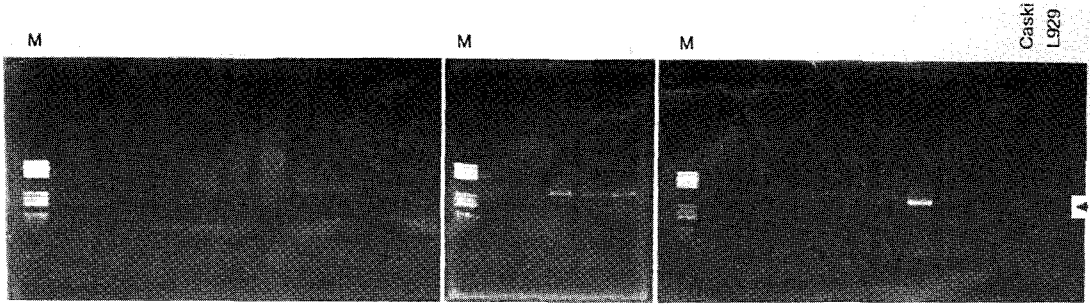


Fig. 1. Detection of HPV 16 sequences in human prostatic tissues by PCR. The expected 323 base pair fragment is evident by ethidium bromide staining in several lanes. M lane: pBR322 DNA/*Hae* III digest, Caski: HPV 16 positive L929: HPV negative.

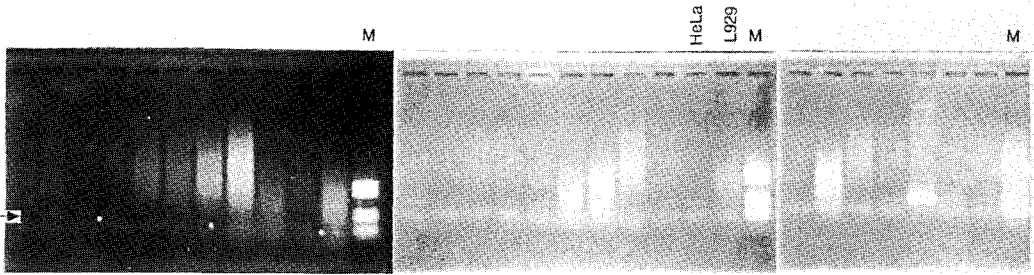


Fig. 2. Detection of HPV 18 sequences in human prostatic tissues by PCR. The expected 161 base pair fragment is evident by ethidium bromide staining in several lanes. M lane: pBR322 DNA/*Hae* III digest, HeLa: HPV 18 positive, L929: HPV negative.

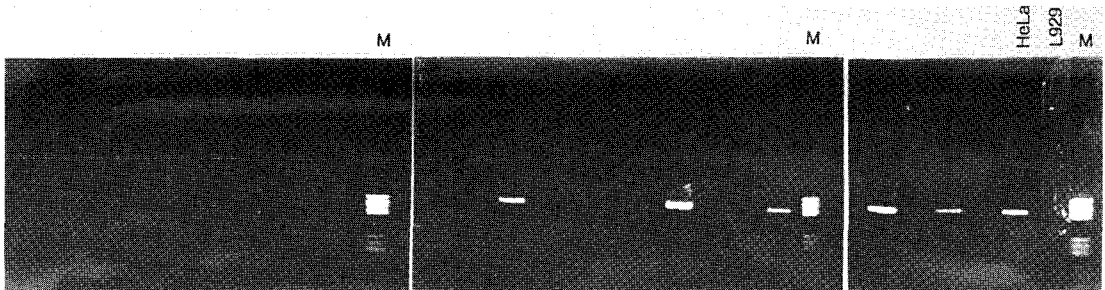


Fig. 3. Detection of HPV L1 gene in human prostatic tissues by PCR. The expected 451 base pair (HPV 16 type) fragment is evident by ethidium bromide staining in several lanes. M lane: pBR322 DNA/*Hae* III digest, HeLa: HPV positive, L929: HPV negative.

이 현저히 증가하므로 암세포나 전구암세포에서 검색이 잘 된다. 그러므로 다른 암화과정의 지표들과 더불어 세포증식의 지표로 이용할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 전립선암조직에서 PCNA 단백질의 발현을 검색하였으며 염색된 대표적인 조직을 그림 5에 제시하였다 (Fig 5). PCNA에 양성인 조직은 17 cases (65%)로 나타났으며, 이중 HPV 감염은 13 cases (72%)에서 발견되었으며,

나머지 3 cases에서는 p53단백질이 과량발현된 조직이었다. PCNA단백질이 발현되지 않은 9 cases에서 3 cases (33%)는 HPV 감염만 확인된 조직이며, p53 단백질만이 발현된 조직은 4 cases (44%)이고, 나머지 2 cases는 HPV 감염과 p53단백질의 발현이 함께 확인된 조직이었다 (Table 2).

고 찰

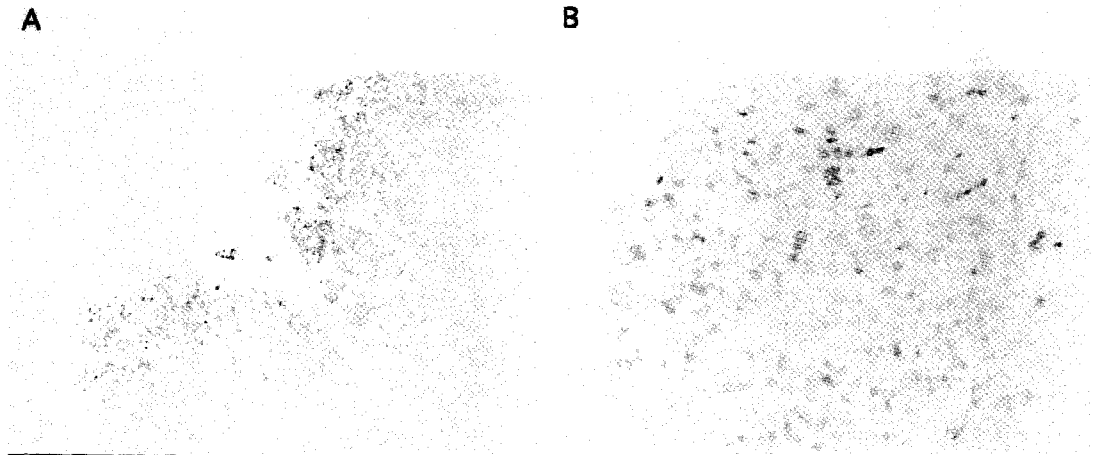


Fig. 4. Immunostaining of p53 protein in prostate cancer tissues. A: $\times 40$, B: $\times 200$.

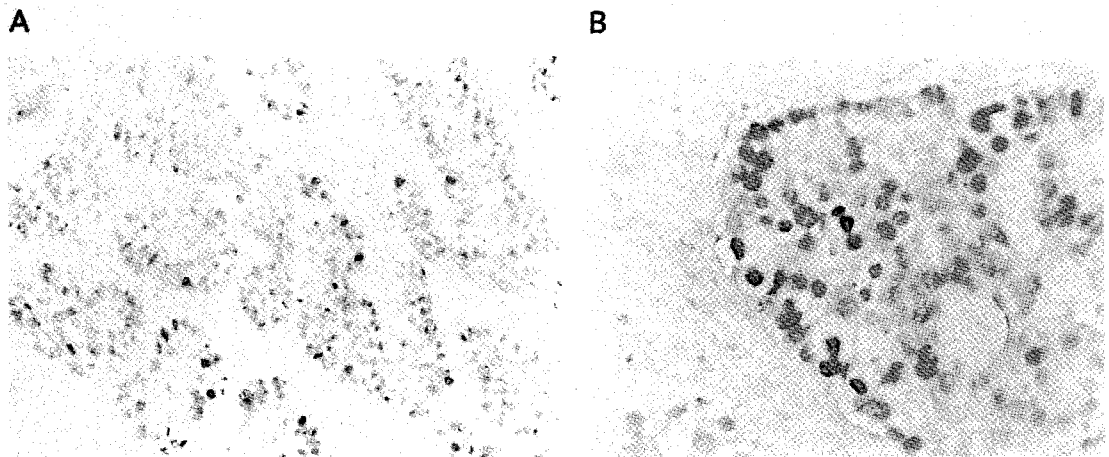


Fig. 5. Immunostaining of PCNA protein in prostate cancer tissues. A: $\times 100$, B: $\times 400$.

전립선암의 주된 발암원인은 정확히 밝혀져 있지 않으나 현재까지의 연구결과에 의하면 여러가지 원인에 의한 암유전자 *ras*의 변이와 암억제유전자 *p53*의 변이가 암화에 중요한 관련인자로 보인다. 그리고 HPV가 etiological agent일 가능성을 시사하는 보고가 여러 연구자에 의해 제시되었다. 본 연구에서 조사된 26 cases의 전립선암 조직에서는 이들 두 요인에 의한 영향이 매우 큰 것으로 생각된다. 그리고 이들 두 요인을 비교하면 HPV 감염율 (69%)이 *p53*단백질의 발현 (62%)보다 높게 나타났다.

HPV 감염에 의한 전립선 세포의 암화 가능성은 Weijerman등 [21]에 의해서 보고되었는데 정

상적인 전립선 세포에 HPV 18형의 DNA를 삽입한 결과 세포의 형질이 변환되었다. 악성종양을 유발하는 HPV 16형 또는 18형의 발견빈도는 본 연구에서는 46% (12/26)으로 나타났는데 일본의 경우 [16]는 41% (28/68)으로 비슷한 분포를 나타내었으며, 여성의 자궁경부암에서는 HPV 16형의 발견빈도수는 일반적으로 60%이상으로 매우 높고 18형은 약 15-20%정도인데 비하여 [21], 전립선암조직에서는 26 cases의 조직중에서 HPV 16형은 27%, HPV 18형은 31%로 HPV 18형의 발견빈도수가 더 높았으며 이러한 결과는 Anwar등 [9]이 발표한 결과 (HPV 16: 11/68, HPV 18: 17/68)와 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 Suzuki 등 [23]이 발표한 전립선 초기암에서의 HPV감염

Table 2. p53 expression, PCNA staining and the presence of HPV in the prostate carcinomas

No.	Tumor type	Age of patients	HPV			HPV & p53	PC NA	PC NA & HPV	PC NA & p53		
			16	18	consensus					any HPV	p53
1	Adenocarcinoma	80	-	-	-	-	+	+	●		
2	Adenocarcinoma	66	-	+	-	+	-	+	●		
3	Adenocarcinoma	66	-	-	+	+	-	-			
4	Adenocarcinoma	52	-	-	+	+	+	●	●		
5	Adenocarcinoma	71	-	-	-	-	+	-			
6	Adenocarcinoma	86	-	+	+	+	-	+	●		
7	Adenocarcinoma	61	+	-	+	+	+	●	●		
8	Small cell carcinoma	82	-	+	+	+	-	+	●		
9	Adenocarcinoma	79	+	-	-	+	+	●	●		
10	Small cell carcinoma	75	-	-	-	-	+	+	●		
11	Adenocarcinoma	68	-	-	-	-	+	+	●		
12	Adenocarcinoma	64	+	+	+	+	+	●	-		
13	Adenocarcinoma	84	-	+	-	+	+	●	●		
14	Adenocarcinoma	81	-	-	+	+	+	●	●		
15	Adenocarcinoma	74	-	-	-	-	+	-			
16	Transitional cell	62	-	-	-	-	+	+	●		
17	Adenocarcinoma	77	-	-	-	-	+	-			
18	Adenocarcinoma	69	+	-	-	+	-	+	●		
19	Adenocarcinoma	77	-	-	+	+	+	●	●		
20	Adenocarcinoma	74	-	+	-	+	+	●	-		
21	Adenocarcinoma	66	+	+	-	+	-	+	●		
22	Adenocarcinoma	72	-	-	+	+	-	+	●		
23	Adenocarcinoma	76	-	-	+	+	-	+	●		
24	Adenocarcinoma	64	-	-	-	-	+	-			
25	Adenocarcinoma	60	+	-	+	+	-	-			
26	Adenocarcinoma	66	+	+	-	+	-	-			
total			7	8	11	18	16	8	17	13/18	10/16
%			27	31	42	69	31	65	72	62	

물은 51 cases에서 8 cases (16%)로 낮았는데 아마도 이 차이는 같은 지역이라하더라도 예민도가 낮은 방법으로 검색한 결과로 추측된다. 프랑스인에서의 전립선암에서는 HPV 16형 (16/39)만이 발견되었고 HPV 18형 또는 다른 HPV형은 발견되지 않았다 [13]. 본 연구에서는 HPV 16형과 HPV 18형 이외의 다른 HPV에의 감염도 19% (5/26)으로 나타났는데, 일반적으로 HPV 6형과 11형은 양성종양과 연관된 것으로 알려져 있으므로 [22], 이들 5 cases는 악성종양을 유발하는 또다른 HPV형에 감염되어 있는 것으로 생각된다. 그리고 HPV 16형의 E6유전자 또는 HPV 18형 E7유전자의 존재가 확인된 조직에서 L1 공통 primer에 의해 증폭되지 않은 경우가 7 cases이었는데 이는 조직의 고정 또는 보존과정에서 DNA의 파손으로 인한 것으로 생각된다.

p53단백질의 고량발현은 16 cases에서 발견되었으며, 이중 HPV 감염은 50%인 8 cases에서 발견되었는데 HPV 16형만의 감염은 3 cases이었고 HPV 18형의 감염은 3 cases이었으며 동시감염이 1 case이었다. p53 단백질이 발견되지 않은 나머지 10 cases에서 HPV 감염이 확인되었는데, HPV 16형에의 감염이 4 cases이고 HPV 18형에의 감염이 5 cases이며 HPV 16형과 HPV 18형의 동시감염이 2 cases이었고 또다른 HPV 형에의 감염이 3 case로서, 이들 HPV E6 유전자에 의해 p53단백질이 분해되고 있음을 암시할 뿐만 아니라 이들 암에서 HPV가 etiologic agent로서의 역할을 시사하는 것으로 보인다.

PCNA단백질의 발현은 17 cases에서 양성으로 나타났는데 HPV 감염과 PCNA단백질의 동시발현은 13 case (76%)로 p53단백질과 PCNA단백질

동시발현 (59%)보다 높은 상관관계를 나타내었다. PCNA단백질의 발현이 확인된 조직은 모두 p53단백질 발현 또는 HPV 감염을 수반하였는데 이는 p53단백질의 이상이나 HPV에 감염된 세포가 암화되는 과정에서 세포증식이 일어나고 있음을 시사한다.

이밖에 *ras*유전자의 이상 역시 전립선암의 발암원인으로 생각되고 있는데 [8, 9], 유럽이나 미국에서는 전립선암조직에서 *ras*유전자의 돌연변이가 매우 낮은데 비해 [8, 13], 일본의 경우 [9]는 상대적으로 높게 보고되었다 (16/68, 28%). 본 연구에서도 *ras*유전자의 돌연변이를 조사한 24 cases중 13 cases (54%)로 *ras*유전자의 돌연변이가 매우 높게 발견되었으며, 그중 10 cases는 HPV에도 감염되어 있었다 (manuscript in preparation).

전립선암조직에서의 발암원인으로 생각되고 있는 HPV 감염을, p53단백질 변이, *ras*유전자의 변이 등에 대한 빈도수는 지역적으로 차이점을 보이고 있어서 지역적으로 혹은 인종적으로 전립선암의 암화과정은 약간씩 차이를 나타내는 것으로 생각된다. 지역적으로 발암원인 또는 기작의 차이를 나타내는 것은 전립선조직의 암화과정은 다른 조직보다 환경 또는 유전적인 영향을 더 크게 받고 있을 것으로 추정된다. 따라서 지역적 인종적 차이에 따른 발암원인에 대한 연구가 보다 많이 이루어져야 전립선암조직의 발암기작이 밝혀지리라 생각된다. 본 연구에서는 현재 국내에서도 계속 그 발생률과 사망률이 증가추세에 있는 한국 남성에서의 전립선암의 발암원인을 밝히고 암화과정에 대한 정보와 조기진단기술 수립에 도움이 되는 기초자료를 제기하고자하였다.

결 론

본 연구에서는 전립선암의 발생원인으로 생각되고 있는 HPV감염이나 p53단백질의 발현을 검색하고 그 상관관계를 분석하고자 하였다. 전립선암조직에서 HPV 감염율이 69%가 되는 것을 확인하였고 p53단백질의 이상발현율이 62%가 되는 것을 관찰하였다. 조사된 26개의 전립선암조직에서는 HPV 감염, 또는 p53단백질 과량발현 증 한가지 이상이 발견되었으며 이는 HPV감염이나 p53단백질의 변이등이 전립선조직에서의

발암관련인자임을 강력히 시사하고 있다.또한 p53단백질이 발현되지 않은 10 cases에서는 모두 HPV의 감염이 확인되어서, HPV E6단백질에 의해 p53단백질이 분해되었거나 이들 암에서 HPV감염이 중요한 etiologic agent일 수 있음을 시사하였다.그리고 p53 단백질의 과량발현 또는 HPV감염은 각각 62%, 72%가 PCNA단백질의 발현을 수반하여 암화과정 중에 세포증식현상이 수반되는 것을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Chiarodo A: National cancer institute roundable on prostate cancer: future research directions. *Cancer Res* 53: 2498-2505, 1991.
2. Susan GG: Advances in prostate cancer detection and treatment. *Decision Resources* 27: 1-15, 1991.
3. Martin GS: Oncogens: 20 years later. *Genes & Develop* 9: 1289-1301, 1995.
4. Kamb A: Cell cycle regulators and cancer. *Trend In Genetics* 11: 136-141, 1995.
5. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, and Vogelstein, B: Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. *Nature (Lond.)* 327: 289, 1987.
6. Kovnat A, Buick RN, Choo B, De Harven E, Kopelyan I, Trent JM, and Tannock IF: Malignant properties of sublines from a human bladder cancer cell line that contains an activated c-Ha-*ras* oncogenes. *Cancer Res* 48: 4993-5000, 1988.
7. Grunewald K, Lyons J, Frohlich A, Feichtinger H, Weger R, Schwab G, Jassen J, and Bartram, C: High frequency of Ki-*ras* codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *Int J Cancer* 43: 1037-1041, 1989.
8. Carter BS, Eptsein JI and Issacs WB: *ras* gene mutation in human prostate cancer. *Cancer Res* 50: 6830-6832, 1990.
9. Anwar K, Nakakuki K, Shiraishi T, Naiki H, and Inuzuka M: Presence of *ras* oncogene mutation and human papillomavirus DNA in human prostate carcinomas. *Cancer Res* 52: 5991-

- 5996, 1992.
10. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC: p53 mutation in human cancers. *Science* 253: 49-53, 1991.
 11. Oliner JD: The role of p53 in cancer development. *Sci Amer (Science & Med) Sep/Oct*: 16-25, 1994.
 12. Bookstein R, MacGrogan DM, Hilsenbeck SG, Sharkey F and Allred DC: p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *53: 3369-3373*, 1993.
 13. Moyret-Lalle C, Marçais C, Jacquemier J, Moles J-P, Daver A, Soret J-Y, Jeanteur P, Ozturk M, and Theillet C: ras, p53 and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int J Cancer* 64: 124-129, 1995.
 14. Scheffener M, Werness B, Huibregtse JM, Levine AJ, and Howley P: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136.
 15. Dyson N, Howley PM, Munger K, and Harlow E: The papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937, 1989.
 16. McNicol PJ, and Dodd JG: High prevalence of human papillomavirus in prostate tissues. *J Urol* 145: 850-853, 1991.
 17. Widerroff L, Schottenfeld D, Carey TE, Beals T, Fu G, Sakr F, Sarkar A, Grossman HB, and Shaw MW: Human papillomavirus DNA in malignant and hyperplastic prostate tissue of black and white males. *Prostate* 28: 117-123, 1996.
 18. Bookes, DJ and Garewal HS: Measures of tumor proliferative activity. *Int J Clin Lab Res* 22: 196-200, 1992.
 19. Kwon Doo H, Lee Young H, Lee Dong H, Ch, Sang H, Choe Young K, Park Soon H, Choi, In S, Chung, Tae W: Detection of tumor-associated human papillomavirus infections using in situ hybridization and polymerase chain reaction in Korean women cervixes. *J Kor Soc Virol* 23: 27-38, 1993.
 20. Ting Y, Manos MM: Detection and typing of genital human papillomaviruses. p.356-357. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Ed), *PCR protocol*. Academic press, 1990.
 21. Weijerman PC, Konig JJ, Wong ST, Niesters HGM and Pechl DM: Lifectin-mediated immortalization of human prostatic epithelial cells of normal and malignant origin using human papillomavirus type 18 DNA. *Cancer Res* 54: 5579-5583, 1994.
 22. Zur Hausen H: Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184: 9-13, 1991.
 23. Suzuki A, Komiya A, Aida S, Ito H, Yatani R and Shimazaki J: Detection of human papillomavirus DNA and p53 gene mutations in human prostate cancer. *Prostate* 28: 318-324, 1996.
 24. Gissman L, Wolnik L, Ikelberg H, Koldovsky U, Schnurch HG, and zur Hausen H: Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 560-563, 1983.