

## Роль вируса папилломы человека (ВПЧ) при различных локализациях плоскоклеточного рака головы и шеи

Д. Смеетс<sup>1</sup>, К. Эртмер<sup>1</sup>, Т. Брауншвейг<sup>1</sup>, М.В. Болотин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт патологии клиники Университета RWTH, Аахен, Германия;

<sup>2</sup>Научно-практический центр медицинской помощи детям, Москва

**Контакты:** Михаил Викторович Болотин bolotin1980@mail.ru

*Вирус папилломы человека (ВПЧ) является главной причиной возникновения плоскоклеточного рака шейки матки. При опухолях головы и шеи роль ВПЧ-инфекции остается спорной. В наше исследование включено 39 больных инвертируемой папилломой, 17 больных плоскоклеточным раком ротоглотки и 8 — носоглотки. В качестве отрицательного контроля была использована лимфоэпителиальная ткань 10 пациентов. У 18 из 37 (49%) больных инвертируемой папилломой был выявлен положительный титр ВПЧ, причем в 6 случаях в комбинации с ВПЧ-6, в 12 в сочетании с другими подтипами ВПЧ высокого онкологического риска (18, 31) и у 2 пациентов (5%) в самостоятельном варианте. При плоскоклеточном раке ротоглотки положительный титр ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 18) был выявлен у 4 из 17 пациентов (24%). При раке носоглотки из 8 больных у 1 пациента выделен ВПЧ-16 и у 7 — вирус Эпштейна—Барр (ЭБВ). В контрольной группе у 1 больного — ВПЧ-11, причем вирус ЭБВ не был обнаружен ни у одного пациента. Рутинное определение ВПЧ при опухолях головы и шеи помогает выделить группу больных с хорошим прогнозом. И основной вопрос, который требует изучения в настоящее время, — будет ли вакцинация ВПЧ эффективна при опухолях головы и шеи?*

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, рак органов головы и шеи, плоскоклеточный рак, инвертируемая папиллома, рак носоглотки

### HPV in squamous epithelial lesions of the head and neck: different affection of different tumors

D. Smeets<sup>1</sup>, K. Ertmer<sup>1</sup>, T. Braunschweig<sup>1</sup>, M.V. Bolotin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pathology, University Clinic of the RWTH Aachen, Germany;

<sup>2</sup>Research and Practical Center for Medical Care to Children, Moscow

*Human papilloma virus (HPV) revealed to be the general cause of squamous cell carcinoma of the cervix uteri. The role of HPV infection in head and neck tumors remains controversial. We analyzed 39 cases of inverted papilloma, 17 cases of squamous cell carcinoma in the oropharynx, 8 cases of nasopharyngeal carcinoma. As a negative control lymphoepithelial tissue of 10 patients was included. In inverted papilloma, 18 out of 37 (49%) patients revealed positivity for HPV, in 6 cases in combination with HPV 6, in 12 cases in combination with other high-risk types (e. g. 18, 31); in two patients (5%) HPV was the single detected subtype. In invasive squamous cell carcinoma 4 out of 17 patients (24%) showed a positive reaction and a subtyping for high-risk HPV (16, 18). In nasopharyngeal carcinoma, of 8 patients 7 were positively tested for the Epstein—Barr virus (EBV) and 1 patient for HPV 16. In the control group no EBV could be detected; in one case HPV 11 was found. HPV is present in head and neck tumors and a routine detection could help in identifying patients with better outcome. If the HPV vaccination could have a positive effect on these tumors is matter of discussion these times.*

**Key words:** human papilloma virus, head and neck cancer, squamous epithelium, inverted papilloma, nasopharyngeal carcinoma

#### Введение

В 1974 г. публикации Harald zur Hausen совершили революцию в теории канцерогенеза. Было определено, что ДНК вируса, обнаруживаемого при кондиломах и раке шейки матки, принадлежит к вирусу папилломы [1]. Спустя 34 года ученый получил Нобелевскую премию по медицине за это открытие. В начале 80-х годов, после ряда исследований, подтвердивших наличие вируса папилломы человека (ВПЧ) при плоскоклеточном раке шейки матки [2, 3], он также в 36% случаев был выделен при раке гортани [4]. По данным литературы было показано, что для различных опухолей характерны определенные подтипы ВПЧ: при инвазивном плоскоклеточном раке (ИПР) шейки матки — тип 16, 18 [5], при остроконечной

кондиломе — тип 6 [6]. Такая же закономерность была выявлена для переходного-клеточной папилломы полости носа без признаков дисплазии, когда в 15–76% случаев выявлялся ВПЧ типов 6 и 11 [7, 8]. При доброкачественной инвертируемой папилломе без признаков дисплазии в 15–63% случаев определялся ВПЧ типа 6 и 11 [8–10], при дисплазии или озлокачествлении ВПЧ — 16 и 18 [11]. При исследовании нормальной слизистой оболочки носоглотки ВПЧ не был выявлен [12]. У больных инвертируемой папилломой с положительным титром ВПЧ риск возникновения рецидива был выше [10]. Эпштейна—Барр вирус (ЭБВ), выявляемый при лимфоме Беркитта и раке носоглотки [13], не был обнаружен при инвертируемой папилломе [14] и раке гортани [15]. При раке но-

сослотки ВПЧ был положительным в 15% случаев [16, 17]. Но эти показатели относились к группе больных плоскоклеточным раком носоглотки, где был выявлен ВПЧ 16-го типа при отрицательном титре ЭБВ, тогда как при недифференцированном раке носоглотки определялась экспрессия ЭБВ, а не ВПЧ [18, 19]. Роль ВПЧ при раке ротоглотки, гортани пока не до конца ясна. По данным различных авторов, процент выявляемости ВПЧ различен. При плоскоклеточном раке ротоглотки ВПЧ 16-го типа определяется более чем в 84% случаев, причем чаще всего у людей молодого возраста и при опухолях низкой степени дифференцировки [20, 21]. При плоскоклеточном раке гортани титр ВПЧ 16-го и 18-го типов положителен в 25% случаев [22].

В последние годы на основании изучения ретроспективного материала, данных эпидемиологических исследований 5-летняя выживаемость больных раком ротоглотки с высоким титром ВПЧ-16, получивших химиолучевое или хирургическое лечение с последующей лучевой терапией, значительно выше [23–25].

В литературе не так много исследований, посвященных определению зависимости наличия ВПЧ от стадии, локализации, дифференцировки опухоли и возраста больных. Только один автор отмечает взаимосвязь наличия ВПЧ при раке ротоглотки с молодым возрастом и низкой степенью дифференцировки опухоли [20].

При ВПЧ-инфекции происходит блокирование противоопухолевого действия белков p53 и Rb (продукт гена ретинобластомы) за счет продуктов вирусных онкогенов (E6 и E7). Функциональная инактивация белка Rb ведет, в свою очередь, к усилению синтеза белка p16. Как было впервые описано в 1995 г., белок p16, кодируемый геном-супрессором опухолевого роста *CDKN2* (см. рис. 1), становится нерегулируемым в случае ВПЧ-инфекции [26].



**Рис. 1.** Схема нарушения регуляции p16 от изменения уровней p53 и гена ретинобластомы в результате связывания или химической трансформации, вызванной двумя вирусными онкогенами (E6 и E7)

При злокачественных опухолях шейки матки отмечена повышенная экспрессия белка p16 [27], которая, так же как и при плоскоклеточном раке ротоглотки, влияет на прогноз заболевания [28].

### Материалы и методы

В нашей работе мы исследовали парафиновые блоки тканей, хранившиеся при комнатной температуре. Все образцы были подвергнуты гистологическому исследованию. Сбор и использование блоков тканей были одобрены Управлением по этике Совета университетской клиники RWTH Аахена. Исследование проходило в период 2005–2008 гг. Образцы были распределены на 3 группы: 1-я – образцы тканей больных инвертируемой папилломой и нормальных тканей области слизистой полости носа или хряща. Вторая группа – образцы тканей больных раком носоглотки и контрольная группа – блоки лимфоэпителиальной ткани, взятые в области миндалин или глотки. Третья группа – образцы тканей больных плоскоклеточным раком ротоглотки и гортани различной степени дифференцировки.

В 1-ю группу включены больные инвертируемой папилломой без признаков дисплазии. Из 39 пациентов 22 (56%) – мужчины и 17 – женщины (44%). У мужчин пик заболеваемости был зарегистрирован на 8-м десятке жизни (70 лет и старше), у женщин – на 7-м (60–69 лет). Стадия определялась согласно классификации Krouse для инвертируемой папилломы, предложенной в 2000 г. [29]. Более чем половина пациентов к началу лечения имели II стадию заболевания с вовлечением в процесс костно-мышечной системы, решетчатой и/или верхнечелюстной пазухи. И почти 30% имели IV стадию заболевания.

Во 2-ю группу включено 9 больных раком носоглотки: 5 (55%) женщин и 4 (45%) мужчины, средний возраст 54 года. У всех больных был недифференцированный плоскоклеточный рак I–II стадии без регионарных метастазов. При этом у 8 (89%) больных опухоль располагалась в носоглотке и у 1 пациента – в области миндалин. Для контроля были взяты 10 образцов тканей 5 женщин и 5 мужчин в возрасте 58 лет.

В 3-ю группу вошли 23 больных. Из них с плоскоклеточным раком ротоглотки – 19 и раком гортани – 4 больных (рис. 2a). Средний возраст больных составил 68 лет, 13 женщин (57%) и 10 мужчин (43%). При этом у 6 пациентов был низкодифференцированный плоскоклеточный рак, у остальных – умеренно дифференцированный.

Из каждого образца протеиназой K из тканей было экстрагирована ДНК с помощью QIAamp ДНК Mini Kit (Qiagen, Hilden, Германия). Извлеченные образцы были подвергнуты полимеразной цепной реакции (ПЦР).

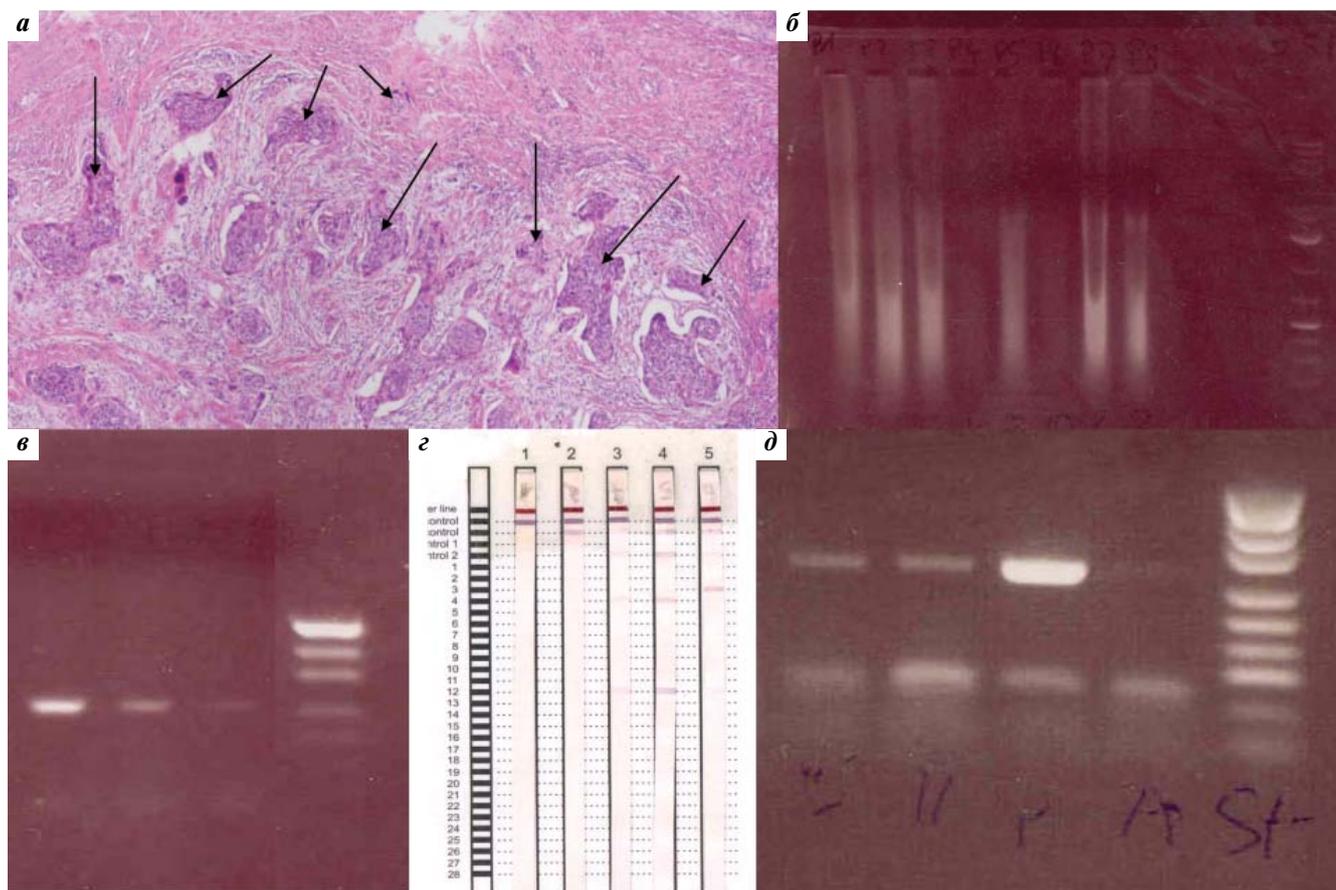


Рис. 2. Морфологическая картина плоскоклеточного рака:

а — световая микроскопия инвазивной плоскоклеточной карциномы (стрелки) боковой поверхности языка (20, окрашивание гематоксилин-эозином); б — выделенная геномная ДНК клеток инвертированной папилломы (агарозный гель); в — ПЦР-анализ ВПЧ в клетках инвертированной папилломы с положительными полосками (агарозный гель); г — INNO LiPa полоски инвертированной папилломы с уровнем связывания, положительный уровень для ВПЧ-16 (полоска 5), 16 и 18 (полоски 3 и 4); д — EBV ПЦР назофарингеальной карциномы с положительными полосками

В 1-й группе для классификации ВПЧ проводили или ПЦР с последующей PCR-ELISA, или генотипирование вируса методом обратной гибридизации (INNO LiPa HPV Genotyping CE Amp-Kit) (Innogenetics, Gent, Belgium). Для классификации на подтипы при проведении ПЦР для амплификации были применены специфические праймеры GP5 и GP6. Успешная амплификация β-глобина показали пригодность образцов для ПЦР. Амплифицированный препарат был разделен методом электрофореза на 2% агаре, окрашенном этидиум бромидом. После проведения стандартной ПЦР определялось наличие подтипов ДНК ВПЧ с помощью иммуносорбентного анализа (PCR-ELISA) с использованием меченого ДНК для ВПЧ-6, 11, 16, 18. Использовались платформы PCR-ELISA Dig Detection (Kit Roche, Mannheim, Germany).

Во 2-й группе определение подтипов проводилось с помощью генотипирования вируса методом обратной гибридизации (Inno LiPa) kit и ПЦР для ЭБВ, с использованием праймеров EBV3A и EBV4A.

В 3-й группе ВПЧ определялся на основании вышеописанной ПЦР с помощью праймеров GP5, GP6

и My09, My11. PCR-ELISA проводилась, как было описано выше.

### Результаты

ДНК была успешно извлечена из всех образцов тканей (рис. 2б).

В 1-й группе положительная ПЦР была у 20 из 39 больных (51%) (рис. 2в). PCR-ELISA и генотипирование вируса методом обратной гибридизации (Inno LiPa) показали наличие ВПЧ-16 в 18 образцах и ВПЧ-6 в 2 образцах (рис. 2г). ПЦР на ЭБВ была положительной у 7 из 8 больных раком носоглотки (рис. 2д) (2-я группа). В контрольной группе ПЦР на ЭБВ была отрицательной. Методом обратной гибридизации (Inno LiPa) был выявлен ВПЧ-16 у 1 больного 2-й группы и у 1 больного контрольной группы ВПЧ-11.

В 3-й группе больных плоскоклеточным раком ротоглотки у 9 из 23 (39%) пациентов присутствовала положительная реакция — на ВПЧ-16 и в 4 случаях на ВПЧ-18. Никакой зависимости от возраста не было выявлено. Средний возраст больных с положительным титром ВПЧ в среднем составил 71 год.

**Обсуждение**

Роль ВПЧ-инфекции при заболевании женских половых органов является неоспоримым фактом канцерогенеза. При опухолях головы и шеи ее роль до конца не ясна.

ВПЧ не всегда выявляется при инвертируемой папилломе, в нашем исследовании он был определен в 50% случаев (ВПЧ-16). По данным литературы, частота ВПЧ положительных больных составляет от 15 до 50% [30, 31]. Стадия, результаты лечения, частота рецидивирования и агрессивность течения заболевания не связаны с присутствием ВПЧ [30]. Так же как и этиология возникновения инвертируемой папилломы может быть связана с различными причинами и не обусловлена наличием ВПЧ.

Хорошо известна взаимосвязь рака носоглотки с ЭБВ [13]. Было показано, что при плоскоклеточном раке носоглотки ЭБВ определяется редко, в то время как ВПЧ обнаруживается довольно часто [19], при этом при недифференцированном раке носоглотки ВПЧ встречается очень редко [17, 19], но остается спорным вопрос, можно ли считать плоскоклеточный рак носоглотки классическим лимфоэпителиальным раком. Результаты наших исследований подтверждают высокий процент ЭБВ положительных больных, но при этом не выявляют никакой взаимосвязи с наличием ВПЧ.

В нашем исследовании при раке ротоглотки в 50% случаев был выявлен ВПЧ-16, 18. По данным литературы, процент выявляемости ВПЧ при раке ротоглотки сильно варьирует. В исследованиях с включением большого количества больных раком ротоглотки ВПЧ обнаруживается от 31% [32] до 57% [23] случаев, при малом количестве пациентов это количество достигает 77%, а при раке миндалины доходит до 92% [20, 21]. Возраст, по данным этих исследований, не является значимым. По данным других авторов, он играет роль у молодых ВПЧ-положительных пациентов с разницей в возрасте в 6 лет (54,4 года против 61,1 года) [20]. Что касается рака гортани, число больных было слишком мало в нашем исследовании. По данным литературы, при раке гортани ВПЧ выявляется в 25% случаев [22].

Слишком короткий период наблюдения в нашей работе недостаточен для определения статистической значимости ВПЧ в прогнозе развития рецидивов.

В настоящее время все исследования, посвященные ВПЧ области головы и шеи, сосредоточены на раке ротоглотки. Это обусловлено высокой заболеваемостью ВПЧ при раке ротоглотки и преобладанием подтипов высокого онкологического риска, таких как ВПЧ-16 и 18, что, вероятно, играет определенную роль в процессе канцерогенеза. При других локализациях, таких как гортань, носоглотка, полость носа и придаточные пазухи носа, ВПЧ обнаруживается реже. В данном случае большую роль играют курение, употребление алкоголя, плохая гигиена полости рта. Последние результаты исследований роли ВПЧ в определении прогноза заболевания являются чисто эмпирическими наблюдениями и требуют глубокого изучения. Исследования должны располагать возможностью включения специфических данных о больных и такой характеристики опухоли, как глубина инвазии [23]. Также следует сказать, что, по данным некоторых исследований, у больных с положительным титром ВПЧ отмечается более высокая безрецидивная выживаемость, но в то же время имеется обратная зависимость от T-стадии [25]. В нашем исследовании не хватает последовательности в интерпретации значения возраста. Высокий процент положительных ВПЧ-больных молодого возраста и лучшие результаты лечения наводят на мысль о более ответственном отношении этого контингента больных к ранней диагностике опухолей. В то же время у таких больных проводятся более агрессивное хирургическое лечение и послеоперационная лучевая терапия.

Необходимо дальнейшее исследование в этой области. Для уменьшения затрат в качестве предварительного теста на определение ВПЧ и p16 может быть применено иммуногистохимическое окрашивание [28].

Мы хотим выразить благодарность профессору Р. Knuechel-Clark, главе Института патологии, и профессору М. Westhofen, директору клиники ENT за поддержку нашей работы.

**ЛИТЕРАТУРА**

- Zur Hausen H., Meinhof W., Scheiber W., Bornkamm G.W. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974;13:650–6.
- Syrjanen K.J. Condylomatous lesions associated with precancerous changes and carcinomas of the uterine cervix. *Neoplasma* 1981;28:497–509.
- Stanbridge C.M., Mather J., Curry A., Butler E.B. Demonstration of papilloma virus particles in cervical and vaginal scrape material: a report of 10 cases. *J Clin Pathol* 1981;34:524–31.
- Syrjanen K., Syrjanen S., Pyrhonen S. Human papilloma virus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1982;44:323–34.
- Syrjanen K., Vayrynen M., Castren O., Mantjarvi R., Pyrhonen S., Yliskoski M. Morphological and immunohistochemical evidence of human papilloma virus (HPV) involvement in the dysplastic lesions of the uterine cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 1983;21:261–9.
- Gissmann L., zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer* 1980;25:605–9.
- Weber R.S., Shillitoe E.J., Robbins K.T., Luna M.A., Batsakis J.G., Donovan D.T., Adler-Storthz K. Prevalence of human papillomavirus in inverted nasal papillomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*

- 1988;114:23–6.
8. Kashima H.K., Kessis T., Hruban R.H., Wu T.C., Zinreich S.J., Shah K.V. Human papillomavirus in sinonasal papillomas and squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 1992;102:973–6.
9. Ishibashi T., Tsunokawa Y., Matsushima S., Nomura Y., Sugimura T., Terada M. Presence of human papillomavirus type-6-related sequences in inverted nasal papillomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1990;247:296–9.
10. Beck J.C., McClatchey K.D., Lesperance M.M., Esclamado R.M., Carey T.E., Bradford C.R. Presence of human papillomavirus predicts recurrence of inverted papilloma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:49–55.
11. Brandwein M., Steinberg B., Thung S., Biller H., Dilonzo T., Galli R. Human papillomavirus 6/11 and 16/18 in Schneiderian inverted papillomas. In situ hybridization with human papillomavirus RNA probes. *Cancer* 1989;63:1708–13.
12. Bryan R.L., Bevan I.S., Crocker J., Young L.S. Detection of HPV 6 and 11 in tumours of the upper respiratory tract using the polymerase chain reaction. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1990;15:177–80.
13. Uhlmann C., Krueger G.R., Sesterhenn K., Rose K.G., Ablashi D.V., Wustrow F. Nasopharyngeal and adjacent neoplasms: a clinico-pathologic and immunologic study. *Arch Otorhinolaryngol* 1978;218:163–77.
14. Gaffey M.J., Frierson H.F., Weiss L.M., Barber C.M., Baber G.B., Stoler M.H. Human papillomavirus and Epstein–Barr virus in sinonasal Schneiderian papillomas. An in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Clin Pathol* 1996;106:475–82.
15. De Oliveira D.E., Bacchi M.M., Macarenco R.S., Tagliarini J.V., Cordeiro R.C., Bacchi C.E. Human papillomavirus and Epstein–Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006;126:284–93.
16. Atula S., Auvinen E., Grenman R., Syrjanen S. Human papillomavirus and Epstein–Barr virus in epithelial carcinomas of the head and neck region. *Anticancer Res* 1997;17:427–33.
17. Mirzamani N., Salehian P., Farhadi M., Tehran E.A. Detection of EBV and HPV in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization. *Exp Mol Pathol* 2006;81:231–4.
18. Lo E.J., Bell D., Woo J., Li G., Hanna E.Y., El-Naggar A.K., Sturgis E.M. Human papillomavirus & WHO type I nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2010;120(Suppl 4):185.
19. Punwaney R., Brandwein M.S., Zhang D.Y., Urken M.L., Cheng R., Park C.S., Li H.B., Li X. Human papillomavirus may be common within nasopharyngeal carcinoma of caucasian americans: investigation of Epstein–Barr virus and human papillomavirus in eastern and western nasopharyngeal carcinoma using ligation-dependent polymerase chain reaction. *Head Neck* 1999;21:21–9.
20. Kingma D.W., Allen R.A., Moore W., Caughron S.K., Melby M., Gillies E.M., Marlar R.A., Dunn S.T. HPV genotype distribution in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma using seven in vitro amplification assays. *Anticancer Res* 2010;30:5099–104.
21. Attner P., Du J., Nasman A., Hammarstedt L., Ramqvist T., Lindholm J., Marklund L., Dalianis T., Munck-Wikland E. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer* 2010;126:2879–84.
22. Torrente M.C., Rodrigo J.P., Haigentz M., Jr., Dikkers F.G., Rinaldo A., Takes R.P., Olofsson J., Ferlito A. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck* 2010.
23. Shaw R., Robinson M. The increasing clinical relevance of human papillomavirus type 16 (HPV-16) infection in oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2010.
24. Cantu G., Riccio S., Colombo S., Pompilio M., Formillo P. Recent advances in managing human papillomavirus-positive oropharyngeal tumors. *F1000 Med Rep* 2010;2.
25. Sedaghat A.R., Zhang Z., Begum S., Palermo R., Best S., Ulmer K.M., Levine M., Zinreich E., Messing B.P., Gold D., Wu A.A., Niparko K.J., Kowalski J., Hirata R.M., Saunders J.R., Westra W.H., Pai S.I. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 2009;119:1542–9.
26. Kelley M.J., Otterson G.A., Kaye F.J., Popescu N.C., Johnson B.E., Dipaolo J.A. CDKN2 in HPV-positive and HPV-negative cervical-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1995;63:226–30.
27. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D., Ridder R., Rudy W., Petry U., Dallenbach-Hellweg G., Schmidt D., von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276–84.
28. Fischer C.A., Kampmann M., Zlobec I., Green E., Tornillo L., Lugli A., Wolfensberger M., Terracciano L.M. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol* 2010;21:1961–6.
29. Krouse J.H. Development of a staging system for inverted papilloma. *Laryngoscope* 2000;110:965–8.
30. Kim J.Y., Yoon J.K., Citardi M.J., Batra P.S., Roh H.J. The prevalence of human papilloma virus infection in sinonasal inverted papilloma specimens classified by histological grade. *Am J Rhinol* 2007;21:664–9.
31. Lu S.S., Xu J.W., Huang K.T., Liao Q.H. Relationship between the biological behavior of nasal cavity or sinonasal inverted papilloma and infection of human papillomavirus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007;87:1342–4.
32. Hocking J.S., Stein A., Conway E.L., Regan D., Grulich A., Law M., Brotherton J.M. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br J Cancer* 2011.