

VU Research Portal

Triage of HPV-positive women by methylation marker analysis

de Strooper, L.M.A.

2016

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

de Strooper, L. M. A. (2016). *Triage of HPV-positive women by methylation marker analysis*. [, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

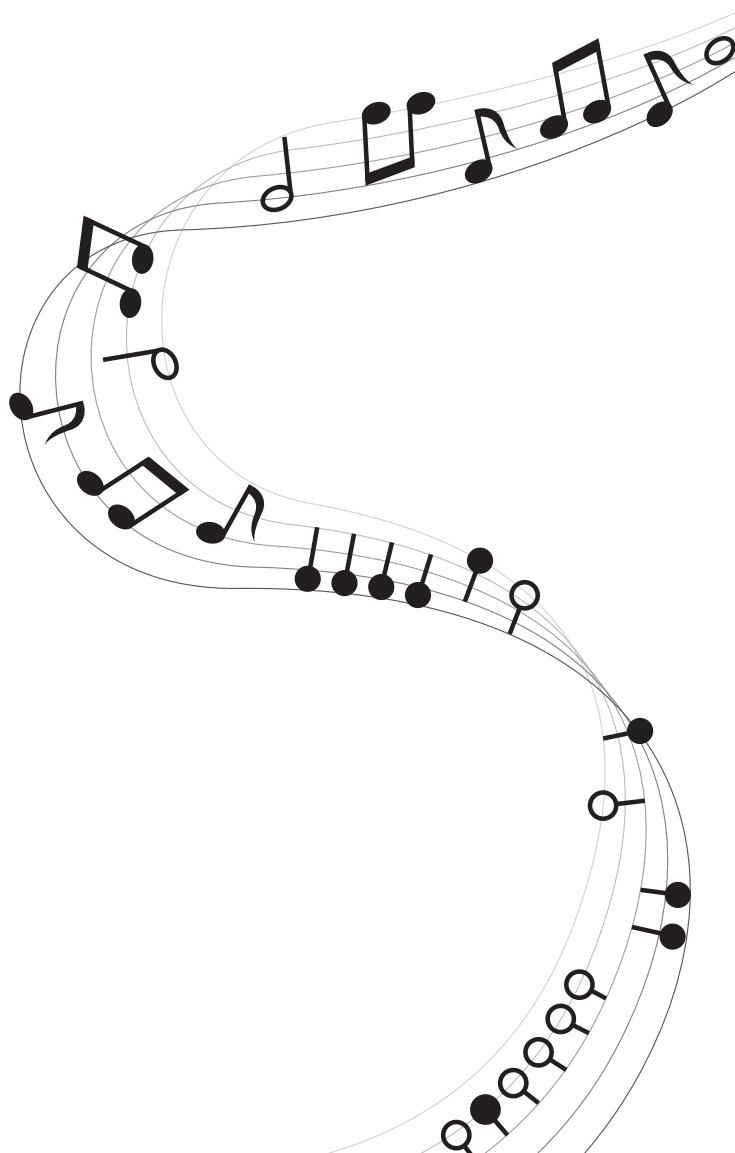
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Chapter 9

Nederlandse Samenvatting



SAMENVATTING

Baarmoederhalskanker is de vierde meest voorkomende kanker bij vrouwen wereldwijd. Deze ziekte wordt gedurende een periode van 10 tot 30 jaar voorafgegaan door niet-invasieve voorloperafwijkingen van de baarmoederhals, die effectief chirurgisch kunnen worden verwijderd. Dit biedt mogelijkheden voor secundaire preventie, namelijk het opsporen van deze afwijkingen in een screeningsprogramma (bevolkingsonderzoek) gevolgd door adequate behandeling, waardoor baarmoederhalskanker kan worden voorkomen. In Nederland worden vrouwen tussen de 30 en 60 jaar iedere 5 jaar uitgenodigd voor deelname aan het bevolkingsonderzoek. Hierbij worden uitstrijkjes van vrouwen beoordeeld op basis van cytologie (Pap test) waarbij afwijkende cellen en voorloperafwijkingen worden opgespoord. Deze voorloperafwijkingen worden ook cervicale intra-epitheliale neoplasieën (CIN) genoemd en kunnen worden onderverdeeld in de laaggradige CIN1 laesies en hooggradige CIN2/3 laesies.

In de laatste decennia is gebleken dat een persisterende infectie met een hoog-risico type van het humaan papillomavirus (hrHPV) noodzakelijk is voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. Uit verschillende grote, gerandomiseerde screeningsstudies is gebleken dat een hrHPV-test een hogere gevoeligheid heeft voor het detecteren van hooggradige voorloperafwijkingen (CIN2/3) van baarmoederhalskanker dan cytologie. Op basis daarvan zal in Nederland in 2016 een nieuw bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker worden ingevoerd, waarbij cytologie als primaire test vervangen zal worden door een hrHPV DNA test. Daarnaast kan, in tegenstelling tot cytologie, de hrHPV-test ook worden uitgevoerd op (cervico-)vaginaal materiaal dat door de vrouw zelf thuis kan worden afgenomen. Dit is drempelverlagend voor vrouwen die in eerste instantie niet zouden deelnemen aan het bevolkingsonderzoek. Daarom zal aan niet-deelnemers van het nieuwe bevolkingsonderzoek, zelf-afname worden aangeboden voor een hrHPV-test. Verwacht wordt dat een hogere gevoeligheid van de primaire screeningstest, samen met een verhoogde deelnamegraad door middel van zelf-afname, op termijn zal leiden tot een daling in incidentie van en sterfte aan deze ziekte.

Na een hrHPV-infectie is de ophoping van verschillende genetische en epigenetische afwijkingen noodzakelijk voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. Het aantal chromosomale en epigenetische afwijkingen neemt toe met de ernst en duur van de voorloperafwijkingen. Op basis van deze moleculaire, (epi)genetische afwijkingen kunnen bijgevolg gevorderde CIN2/3 afwijkingen met een hoog korte termijn progressie risico op kanker worden onderscheiden van laaggradige, productieve CIN afwijkingen en vroege CIN2/3 afwijkingen met een laag progressie risico.

Omdat de meeste hrHPV-infecties tijdelijk zijn en spontaan verdwijnen, is triage van hrHPV-positieve vrouwen noodzakelijk. Deze triage test moet ervoor zorgen dat alleen de vrouwen met klinisch relevante afwijkingen van de baarmoederhals worden verwezen naar de gynaecoloog voor verder colposcopisch onderzoek. Met deze triage test zal onnodige verwijzing en overbehandeling vermeden worden.

In het nieuwe bevolkingsonderzoek zullen hrHPV-positieve vrouwen getrieerd worden met de cytologie test. Omdat de gevoeligheid van cytologie voor hooggradige voorloperafwijkingen en kanker (CIN2+) echter suboptimaal is, zullen vrouwen met een normaal uitstrijkje na zes maanden opnieuw moeten worden getest. Dit brengt het risico met zich mee dat vrouwen niet terug komen waardoor belangrijke follow-up uitblijft. Daarnaast moeten vrouwen die hrHPV-positief testen op zelf-afgenomen materiaal, een extra bezoek aan de huisarts brengen voor het maken van een uitstrijkje om triage middels cytologie te kunnen uitvoeren. Tot slot, aangezien in het nieuwe bevolkingsonderzoek alleen hrHPV-positieve vrouwen een triage test ondergaan, bestaat de kans dat met voorkennis van hrHPV-aanwezigheid, er sneller een (vals-)positieve cytologie uitslag zal worden afgegeven. Dit zou het aantal vrouwen die onterecht worden verwezen voor colposcopie en vervolgens overbehandeld worden, aanzienlijk kunnen verhogen.

In dit proefschrift wordt de klinische toepasbaarheid van DNA methyleringsanalyse als mogelijke triage test voor hrHPV-positieve vrouwen beschreven. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat methylering van de promotor regio's van de tumor suppressor genen *CADM1*, *MAL*, *mir124-2*, en *FAM19A4* sterk geassocieerd is met het ontstaan van baarmoederhalskanker. Daarom hebben we de waarde van methyleringsanalyse van deze genen voor triage van hrHPV-positieve vrouwen verder bestudeerd. We hebben ons hierbij niet alleen gericht op uitstrijkjes, maar ook op zelf-afgenomen (cervico-)vaginaal materiaal. Daarnaast is gekeken of een methyleringstriage test ook gecombineerd zou kunnen worden met een andere test. Tot slot hebben we de relatie tussen methylering en zowel de ernst als de duur van voorloperafwijkingen van de baarmoederhals in kaart gebracht.

In **Hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie gegeven over de epidemiologie van baarmoederhalskanker, de moleculaire veranderingen die optreden bij de ontwikkeling ervan en de huidige en toekomstige strategieën voor baarmoederhalskankerpreventie.

In **Hoofdstuk 2** wordt stapsgewijs de ontwikkeling van een multiplex, kwantitatieve methylering-specifieke PCR (qMSP) beschreven, die de methyleringsstatus van verschillende genen evalueert in één enkele reactie. In de meeste studies die het gebruik van DNA methyleringsanalyse voor CIN3+ detectie hebben onderzocht, bleek het combineren van testen voor verschillende genen noodzakelijk om een optimale gevoeligheid voor CIN3+ te bereiken. Echter, het evalueren van de methyleringsstatus van verschillende genen in individuele (zogenaamde singleplex) testen is tijdrovend en vereist veel klinisch materiaal. Daarom werd een multiplex qMSP test ontwikkeld waarin de methyleringsstatus van

CADM1, *MAL*, en *mir124-2* genen samen met een interne controle, β -actin (*ACTB*), in één test kan worden bepaald. Zowel op verdunningsreeksen van reconstructies als op uitstrijkjes, bleek er een goede correlatie te bestaan tussen de uitkomst van deze multiplex qMSP en de singleplex qMSPs voor deze genen. Deze test heeft dezelfde gevoeligheid, specificiteit en reproduceerbaarheid als de individuele qMSP testen. Bijgevolg is multiplex qMSP een veelbelovende techniek om methylering van meerdere genen in één reactie te bepalen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de waarde van methyleringsanalyse van twee markers, *CADM1* en *MAL*, in vergelijking met cytologie op hrHPV-positieve uitstrijkjes. Daarnaast is de combinatie van methylering en cytologie geëvalueerd. *CADM1/MAL* methyleringsanalyse leverde dezelfde klinische gevoeligheid en specificiteit voor CIN3+ afwijkingen als cytologie. Opvallend was dat de methylering en cytologie testen niet exact dezelfde afwijkingen detecteren. Cytologie bleek relatief effectief in het detecteren van vroege, CIN2 afwijkingen en liet voor CIN3 en baarmoederhalskanker een kleine stijging in gevoeligheid zien. De gevoeligheid van de bi-marker *CADM1/MAL* methyleringstest was daarentegen aanmerkelijk lager voor CIN2, maar liet een sterk stijging zien met de ernst van de ziektegraad, en detecteerde 100% van de baarmoederhalskankers. Dit had als gevolg dat een combinatie van beide testen een aanmerkelijk hogere gevoeligheid voor ernstige afwijkingen liet zien dan cytologie alleen, ten koste van een kleine daling in specificiteit. De combinatie van cytologie en *CADM1/MAL* methyleringsanalyse kan daarom worden gezien als een interessant triage alternatief voor hrHPV-positieve vrouwen, waarbij zonder herhaalttest na zes maanden, het risico op het missen van baarmoederhalskanker en ernstige voorloperafwijkingen zeer klein is.

In **Hoofdstuk 4** analyseerden we de klinische waarde van methyleringsanalyse met een gestandaardiseerde *CADM1/MAL/mir124-2* multiplex qMSP test in een grote serie uitstrijkjes van vrouwen met baarmoederhalskanker en kanker van het baarmoederslijmvlies. We vonden dat met deze multiplex methyleringsanalyse alle (100%) uitstrijkjes van vrouwen met baarmoederhalskanker positief waren. Daarnaast bleek ook de meerderheid (76%) van de vrouwen met kanker van het baarmoederslijmvlies een methyleringspositief uitstrijkje te hebben. Bovendien toonde de analyse van uitstrijkjes van vrouwen zonder afwijkingen en vrouwen met premaligne aandoeningen (CIN2, CIN3) aan dat zowel het percentage aan methyleringspositieve testuitslagen als het aantal gemethyleerde genen toeneemt met de ernst van de ziekte.

In **Hoofdstuk 5** vergeleken we de klinische waarde van een nieuwe methyleringsmarker, namelijk *FAM19A4*, met cytologie voor de triage van vrouwen met een hrHPV-positief uitstrijkje. We vonden dat de *FAM19A4* methyleringstest een klinische gevoeligheid voor CIN3+ had van 75.8% (95% CI: 61.1-90.4) bij een klinische specificiteit van 67.0% (95% CI: 60.3-73.8) onder hrHPV-positieve vrouwen, wat vergelijkbaar was met de performance van cytologie triage. Daarnaast onderzochten we de waarde van de *FAM19A4* qMSP test voor het detecteren van baarmoederhalskanker en hooggradige voorloperafwijkingen (CIN2/3) waarvan bekend was hoe lang de HPV-infectie reeds aanwezig was. Er werd aangenomen

dat de duur van de HPV-infectie gerelateerd is aan de duur van het bestaan van de afwijking. Hierbij maakten we een onderscheid tussen zogenaamde vroege CIN2/3 afwijkingen (met een voorafgaande HPV-infectie van minder dan 5 jaar) en meer gevorderde CIN2/3 afwijkingen (met een voorafgaande HPV-infectie van 5 jaar of langer). We vonden dat *FAM19A4* methyleringsanalyse een positieve uitslag gaf bij alle carcinomen (22/22), terwijl cytologie een paar carcinomen miste (19/22 waren positief met cytologie). Daarnaast werden de gevorderde CIN2/3 afwijkingen beter gedetecteerd door *FAM19A4* methyleringsanalyse (100% (29/29)) dan cytologie (83% (24/29)), terwijl de vroege CIN2/3 afwijkingen beter werden gedetecteerd door cytologie (42% (8/19) versus 63% (12/19), respectievelijk). Methyleringsanalyse met de *FAM19A4* qMSP is dus een waardevolle triage test die beter carcinomen en gevorderde CIN2/3 afwijkingen detecteert dan cytologie.

In **Hoofdstuk 6** werden verschillende triage strategieën getest bij hrHPV-positieve vrouwen (leeftijd 18-66 jaar) uit een gynaecologische polikliniek die deelnamen aan een prospectieve cohort studie. Alle vrouwen ondergingen een *FAM19A4* methyleringstest en cytologie. We lieten zien dat de klinische performance van de methyleringstest significant werd beïnvloed door de leeftijd van de vrouwen. In vrouwen ouder dan 30 jaar werd aangetoond dat methyleringsanalyse van *FAM19A4* analyse even gevoelig is als cytologie voor de detectie van CIN3+ afwijkingen, met daarbij een aanmerkelijk hogere specificiteit. In vrouwen jonger dan 30 jaar was de klinische specificiteit van *FAM19A4* ook hoger dan die van cytologie, maar hier was de gevoeligheid van *FAM19A4* voor de detectie van CIN2/3+ aanzienlijk lager. Dit kan samenhangen met het feit dat jonge vrouwen vaak hrHPV-infecties hebben van voorbijgaande aard en voorloperafwijkingen die vaak spontaan verdwijnen. Op basis van de aanmerkelijk hogere specificiteit, zou *FAM19A4* methyleringsanalyse kunnen worden overwogen om overbehandeling van vroege afwijkingen te voorkomen. Hiermee zou de kans op ernstige bijwerkingen zoals een verhoogd risico op vroeggeboorte en vruchtbaarheidsproblemen kunnen teruggedrongen worden bij vrouwen met een kinderwens.

In **Hoofdstuk 7** evalueerden we de klinische waarde van *FAM19A4/mir124-2* methyleringsanalyse op hrHPV-positief zelf-afgenomen materiaal. We evalueerden materiaal dat was verzameld door voormalige niet-deelnemers van het bevolkingsonderzoek, waarbij zelf-afname is aangeboden in voormalige PROHTECT studies. Twee typen zelf-afgenomen materiaal zijn onderzocht: 1. vloeistof verkregen na een vaginale spoeling en 2. slijmvlies van de vaginawand verzameld met een borsteltje. We vonden dat methyleringsanalyse met *FAM19A4/mir124-2* dezelfde doeltreffendheid heeft in beide thuistest types. De klinische gevoeligheid voor opsporen van CIN3+ in vaginale spoelingen was 75.0% (95% CI: 61.6-88.4) bij een specificiteit van 68.8% (95% CI: 63.2-74.3). Voor de thuistesten verzameld met een borsteltje, waren deze percentages respectievelijk 72.1% (95% CI: 60.9-83.4) en 67.5% (95% CI: 62.1-72.9). Het combineren met HPV16/18 genotypering leverde nog een sensitiviteitsverhoging van ongeveer 15%. Uit ons onderzoek konden we opmaken dat de methyleringsanalyse met *FAM19A4/mir124-2*, al dan niet in combinatie met HPV16/18

genotypering, een universele marker is voor de triage van hrHPV-positief zelf-afgenomen materiaal. Directe moleculaire triage op deze materialen kan bijdragen tot een effectieve screening van vrouwen die geen bezoek aan de huisarts willen of kunnen brengen voor het maken van een uitstrijkje van de baarmoederhals.

In **Hoofdstuk 8** beschrijven we een algemene discussie van de studieresultaten en de voor- en nadelen van de huidige en alternatieve triage testen voor hrHPV-positieve vrouwen. Tot slot worden ook toekomstperspectieven voor screening besproken.

Samenvattend kunnen we stellen dat de studies die beschreven zijn in dit proefschrift, hebben geleid tot nieuwe inzichten in alternatieve triage strategieën voor hrHPV-positieve vrouwen. Triage van vrouwen met een hrHPV-positief uitstrijkje door middel van *CAD11/MAL* of *FAM19A4* methyleringsanalyse, bleek even gevoelig te zijn dan cytologie voor de detectie van CIN3+ afwijkingen. Bovendien detecteert methyleringsanalyse met name de meest gevorderde laesies en alle kankers, wat een groot voordeel is ten opzichte van cytologie triage. Daarnaast bleek *FAM19A4/mir124-2* methyleringsanalyse, even gevoelig te zijn in zelf-afgenomen materiaal verzameld met een vaginale spoeling als met een borsteltje. Deze moleculaire test die direct kan worden toegepast op het zelf-afgenomen materiaal, zal hiermee de diagnostiek van hrHPV-positieve vrouwen aanzienlijk kunnen versnellen. Hoewel methyleringsanalyse de meest ernstige voorloperafwijkingen en kankers opspoot, worden een deel van de CIN2 en een aantal CIN3 afwijkingen niet gedetecteerd. Dit zijn waarschijnlijk de minder ernstige laesies met een lager risico op progressie tot kanker. Voor clinici die ook vroege of incidente CIN2/3 laesies met een laag progressie risico op kanker willen detecteren, kan de gevoeligheid voor CIN3+ van triage aanzienlijk worden verhoogd door het combineren van methyleringsanalyse met cytologie (in het geval van uitstrijkjes) of HPV16/18 genotypering (in het geval van zowel uitstrijkjes als zelf-afgenomen monsters). Dit gaat echter ten koste van specificiteitsverlies en bijgevolg meer verwijzingen naar de gynaecoloog.