

Een positieve HPV-uitslag bij het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker: en nu?

Een positieve HPV-uitslag bij het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker: en nu?

Dr. William Leenders, Afdeling Biochemie, Radboud Instituut voor Moleculaire Levenswetenschappen

Dr. Willem Melchers, Afdeling Medische Microbiologie, Radboudumc

Inleiding

Baarmoederhalskanker

Baarmoederhalskanker is een zeer ernstige ziekte en de derde kanker-gerelateerde doodsoorzaak in vrouwen. Jaarlijks wordt wereldwijd bij meer dan een half miljoen vrouwen deze kanker vastgesteld, en meer dan een kwart miljoen vrouwen komt te overlijden aan deze ziekte.

Het bevolkingsonderzoek baarmoederhalskanker stelt zich ten doel om op basis van het testen van baarmoederhals uitstrijkjes vrouwen te identificeren die een beginstadium van baarmoederhalskanker hebben, zodat die beginstadia door de gynaecoloog verwijderd kunnen worden voordat er zich kanker ontwikkelt. In de landen waar zulke screening plaatsvindt, is de sterfte door baarmoederhalskanker sterk afgenomen.

Screening bestond in Nederland tot 2017 uit een zogenaamde PAP-test, waarin cellen in een uitstrijk beoordeeld worden op afwijkingen. Omdat vrijwel alle baarmoederhalskankers ontstaan door besmetting met de seksueel overdraagbare hoog-risico humane papilloma virussen (hrHPV), worden uitstrijken in het Nederlandse bevolkingsonderzoek sinds 2017 eerst getest op de aanwezigheid van een hrHPV met een moleculaire test. Deze test is zeer gevoelig en detecteert meer dan 98% van alle afwijkingen. Echter, de test is weinig specifiek: 80% van alle positieve HPV-testen betreft vrouwen zonder afwijkingen. Daarom wordt een PAP-test uitgevoerd op hrHPV-positief geteste uitstrijken, en alleen afwijkende PAP-testen worden doorverwezen voor nader onderzoek door de gynaecoloog. Vrouwen met HPV-positieve uitstrijken en een normale PAP uitslag worden na 6 maanden opnieuw getest (nieuwe uitstrijk, gevolgd door een PAP test).

Een algemeen erkend nadeel van deze opzet van het bevolkingsonderzoek is dat ongeveer 10% van alle gescreende vrouwen HPV positief testen en daarom vervolgonderzoek nodig hebben, terwijl meer dan 95% van deze groep vrouwen geen afwijkingen heeft en zich daarom onterecht zorgen maakt over een risico op baarmoederhalskanker. Een groot deel van deze groep wordt doorgestuurd naar de gynaecoloog voor een biopsie of behandeling terwijl er eigenlijk niets aan de hand is. Dit kan zelfs onnodige bijwerkingen geven (bijvoorbeeld vroeggeboortes bij toekomstige zwangerschappen).

Er is daarom grote behoefte aan testen die hoge gevoeligheid combineren met hoge specificiteit. Zo'n test moet alleen die vrouwen identificeren die echt risico op een ernstige afwijking hebben. Een hogere specificiteit kan bereikt worden door niet naar de aanwezigheid van hrHPV te kijken (wat de huidige HPV test doet), maar naar de kankerwekkende activiteit van het hrHPV virus.

Doel van de studie

In deze studie hebben we ons ten doel gesteld om betrouwbaardere biomarkers in uitstrijken te identificeren die voorspellen of een vrouw risico loopt om een baarmoederhalsafwijking te hebben of te ontwikkelen.

Gebruikte technologie

We hebben dit doel opgepakt met een nieuwe moleculaire test die doelgericht RNAs analyseert met next generation sequencing. Deze test kan in grote aantallen monsters tegelijk, grote aantallen verschillende RNAs van interesse aantonen.

Waarom is dat belangrijk in HPV-onderzoek? Voordat een hrHPV kanker kan veroorzaken, moet het virus langdurig in een cel aanwezig zijn en zich in het DNA van de baarmoederhals cel genesteld hebben. Alleen dan wordt het HPV-E6-7 oncogen actief dat betrokken is bij de eerste stap van kankervorming. Deze activiteit leidt tot de productie van E6-7 RNA. *RNA-analyse kan hierdoor onderscheid maken tussen ongevaarlijke en mogelijk gevaarlijke hrHPV infecties.*

We hebben dit concept al aangetoond in een gepubliceerde studie in operatief verkregen baarmoederhals weefsels (vd Heuvel, Modern Pathology 33, 748-757, 2020) waaruit bleek dat veel normale weefsels HPV DNA positief zijn, maar geen HPV RNA produceren, dit in tegenstelling tot baarmoederhalskankers die positief getest

Een positieve HPV-uitslag bij het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker: en nu?

worden op zowel HPV-DNA als -RNA. Deze studie bevestigde ook dat we met onze test direct informatie over de aanwezige hrHPV soorten verkrijgen. De vraag die we wilden beantwoorden in dit Ruby&Rose project was of we deze techniek ook kunnen toepassen op uitstrijken uit het bevolkingsonderzoek.

Resultaten

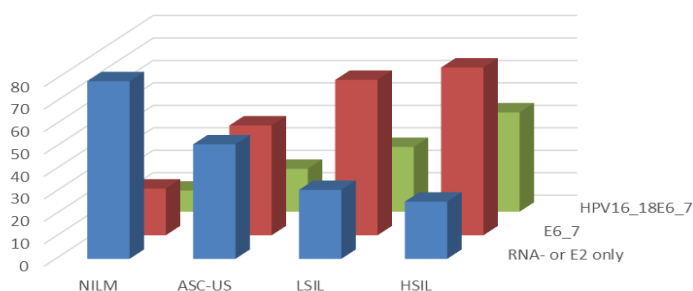
We hebben met toestemming van RIVM en onze ethische commissie in totaal honderden uitstrijken kunnen analyseren die in het bevolkingsonderzoek als HPV-DNA positief zijn getest. De analyses hebben we gekoppeld aan PAP score en, indien beschikbaar, aan klinische uitkomst (CIN-score). Tabel 1 toont de samenstelling van de de groep, en laat ook meteen zien dat ongeveer 70% van de HPV-positieve vrouwen geen afwijkingen in de cytologie hebben.

<i>cytology</i>	#	
NILM	254	69,2%
ASC-US	42	11,4%
LSIL	31	8,4%
HSIL	40	10.9%

Tabel 1: Verdeling van cytologie uitkomsten in hrHPV-DNA-positieve uitstrijken in ons cohort (n=367)

70% van de HPV-DNA positieve testen zijn overdiagnoses

We hebben in deze verzameling uitstrijken gekeken naar de aanwezigheid van HPV RNA. We hebben hierbij onderscheid gemaakt tussen RNA van de HPV E2 genen (actieve, ongevaarlijke infectie) en de HPV E6/7 genen (actieve, gevaarlijke infectie). In figuur 1 en tabel 2 is goed te zien dat naarmate de ernst van de afwijking toeneemt van normaal (NILM) naar hooggradig (HSIL) de aanwezigheid van E6/7 (rode kolommen) sterk toeneemt, hetgeen ook de verwachting was. De blauwe kolommen laten zien dat in 70% van de HPV-DNA positieve NILM uitstrijken geen enkel HPV RNA te vinden was, of alleen RNA van het ongevaarlijke E2 gen.



Figuur 1: HPV-RNA aanwezigheid in HPV-DNA positief-geteste uitstrijken. Cytologie scores op de x as staan voor: NILM=normaal, ASCUS= lichte afwijking, onbekende significantie, LSIL: laaggradige afwijking, HSIL: hooggradige afwijking.

	No hrHPV RNA	E2 RNA only	E6_E7 any hrHPV	HPV16_18 E6_E7	total
NILM	165 (67.3%)	29 (11.8%)	51 (20.8%)	23 (9.4%)	245
ASC-US	16 (34%)	8 (17%)	23 (48.9%)	9 (19.1%)	47
LSIL	10 (19.2%)	6 (11.5%)	36 (69.2%)	15 (28.8%)	52
HSIL	16 (16.8%)	8 (8.4%)	71 (74.7%)	42 (44.2%)	95

Tabel 2: hrHPV RNA-expressie in uitstrijken van verschillende cytologie scores

Een positieve HPV-uitslag bij het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker: en nu?

Deze bevindingen bevestigen de hypothese dat de specificiteit van uitstrijk testen om een afwijking te detecteren toeneemt wanneer we ons richten op HPV RNA ipv HPV DNA.

Met CiRNAseq kunnen we betrouwbaar HPV genotypes onderscheiden

Omdat onze test gebaseerd is op next generation sequencing, kunnen we precies identificeren met welke HPV genotypes we te maken hebben. In tabel 3 is een samenvatting gegeven van de bevindingen.

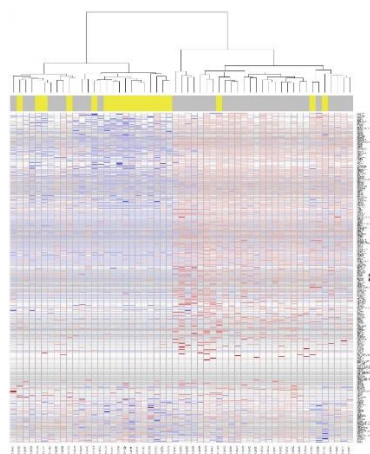
HPV subtype	16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	66	68
NILM	18.5%	10.9%	9.2%	1.7%	2.5%	5.0%	3.4%	8.4%	3.4%	2.5%	3.4%	2.5%	5.0%	1.7%
ASC-US	21.7%	4.3%	8.7%	0.0%	0.0%	8.7%	6.5%	4.3%	6.5%	13.0%	8.7%	2.2%	10.9%	4.3%
LSIL	26.9%	7.7%	13.5%	5.8%	0.0%	9.6%	5.8%	3.8%	5.8%	21.2%	9.6%	1.9%	3.8%	1.9%
HSIL	38.8%	15.3%	13.3%	9.2%	1.0%	5.1%	6.1%	5.1%	7.1%	3.1%	2.0%	2.0%	2.0%	1.0%

Tabel 3: verdeling van hrHPV genotypes per cytologie score.

Interessant is dat hrHPV genotypes 39,56,58 en 66 vooral in laaggradige, en veel minder in hooggradige afwijkingen voorkomen. Dit is een belangrijke bevinding die suggereert dat genotypering op zichzelf al bij zal dragen aan een risico-analyse. Soortgelijke bevindingen zijn al eerder gedaan (zie ook Schiffman M et al. Int J Cancer. 2016;139(11):2606–2615).

HPV-RNA analyse alleen is niet voldoende

Ook wanneer hrHPV E6/7 oncogenen gevonden worden, is dat zeker niet altijd geassocieerd met vorming van hooggradige afwijkingen (zie tabel 2). Om dit aspect verder te onderzoeken, hebben we een grootschalige studie gedaan op uitstrijken van vrouwen die in een later stadium colposcopie hebben ondergaan en in wie een CIN3 lesie of erger gevonden is, om de uitkomsten te vergelijken met uitstrijken die een uitkomst 'normaal' hadden. We hebben deze uitstrijken geanalyseerd met onze test waarin we naast HPV RNAs ongeveer 450 niet-HPV RNAs hebben gemeten die betrokkenheid kunnen hebben bij vorming van kanker (bijvoorbeeld genen die betrokken zijn bij celdeling). We hebben de gegevens ingevoerd in de computer om te zien of er patronen herkend worden die onderscheid maken tussen 'normaal' en 'CIN3'. In figuur 2 is te zien dat de computer deze groepen redelijk goed uit elkaar haalt, en dat er nog verbetering mogelijk is.



Figuur 2: onbevooroordeelde computeranalyse van RNA-profielen uit uitstrijken van vrouwen zonder (geel) en met (grijs) baarmoederhalsafwijkingen.

Een positieve HPV-uitslag bij het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker: en nu?

Met statistische procedures hebben we vervolgens een vergelijking gemaakt tussen de profielen 'normaal' en 'CIN3'. Hieruit hebben we inmiddels een aantal RNAs geïdentificeerd die in significant hogere hoeveelheden tot expressie komen in uitstrijken van vrouwen met een afwijking.

Samenvattend heeft onze studie zeer belangrijk proof of concept geleverd dat we met onze technologie op uitstrijken met 1 test de volgende informatie kunnen vergaren:

- HPV oncogen expressie
- HPV genotype
- Expressie van genen die aangaan op het pad naar kanker

Onze studie heeft natuurlijk ook problemen aan het licht gebracht die opgelost moeten worden. Dat betreft vooral de kwaliteit van RNA dat uit uitstrijken geïsoleerd kan worden. Omdat wij toestemming hebben gekregen voor gebruik van oudere monsters die al weken of zelfs maanden bij kamertemperatuur opgeslagen zijn geweest, laat deze kwaliteit soms te wensen over. Door een arbitraire kwaliteit controle in te bouwen, zijn we gekomen op een percentage van 20% uitstrijken waarvan we geen betrouwbare data konden krijgen. We zijn daarom nu bezig om andere protocollen voor RNA-isolatie en zuivering te testen.

We hebben ook gevonden dat sommige uitstrijken een fout-negatieve uitslag gaf doordat onze sequentie analyse software sommige geldige HPV-resultaten onterecht afkeurden. Inmiddels hebben we dit probleem opgelost door eigen analyse software te schrijven. Ook zijn we momenteel bezig om de procedure van next gen sequencing te optimaliseren en discrepanties te onderzoeken (bijvoorbeeld: zijn de CIN3 afwijkingen die we gevonden hebben, daadwerkelijk HPV-RNA negatief?)

Eindconclusie: We hebben met de subsidie van Ruby & Rose bijzonder belangrijk werk kunnen doen. We zijn er zodanig van overtuigd dat we met onze ciRNAseq technologie een enorme verbetering in baarmoederhalskanker screening programma's kunnen bewerkstelligen, dat we deze techniek breed beschikbaar willen maken. We hebben hiertoe het Radboudumc spin-off bedrijf Predica Diagnostics opgericht (zie www.predica-diagnostics.com).