

Methylatieanalyse als nieuwe diagnostische methode om baarmoederhalskanker op te sporen

Auteur E.R. Nijhuis

Trefwoorden bevolkingsonderzoek, cervixneoplasmie, hypermethylering, uitstrijkje

Samenvatting

Op 14 februari 2007 promoveerde mw. drs. E.R. Nijhuis aan de Rijksuniversiteit Groningen op het promotieonderzoek 'New prognostic and diagnostic options in cervical neoplasia'. Zij deed dit onder begeleiding van de promotoren prof. dr. A.G.J. van der Zee en prof. dr. H. Hollema en copromotoren dr. H.W. Nijman en dr. E. Schuurung.

Een van de doelen van het onderzoek was het ontwikkelen van een nieuwe diagnostische test voor het cervixcarcinoom, gebaseerd op een moleculaire verandering die optreedt tijdens de carcinogenese: DNA-methylering.

(*Ned Tijdschr Oncol 2007;4:87-9*)

Inleiding

In 1996 werd het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker in zijn huidige vorm in Nederland geïntroduceerd. Sindsdien is de incidentie van cervixcarcinoom in Nederland gedaald. In 2003 werden er in Nederland 584 nieuwe gevallen van cervixcarcinoom gediagnosticeerd, de laagste incidentie tot nu toe (*www.ikcnet.nl*). Het cervixcarcinoom is wereldwijd de op een na meest voorkomende kanker onder vrouwen en 83% van de gevallen wordt gediagnosticeerd in ontwikkelingslanden. Het wordt veroorzaakt door besmetting met het humaan papillomavirus (HPV). Besmetting met dit virus komt frequent voor, maar blijft subklinisch. Het HPV wordt doorgaans door het immuunsysteem geklaard. Het cervixcarcinoom kan daarom worden beschouwd als een zeldzame complicatie van een virusinfectie.¹

Cervixcarcinoom is een van de weinige soorten kanker die wordt voorafgegaan door een duidelijk voorstadium: cervicale intraepitheliale neoplasmie (CIN). CIN wordt onderverdeeld in een vroeg stadium, CIN I, dat meestal vanzelf weer over gaat en daarom niet behandeld hoeft te worden, en in late stadia, CIN II en CIN III, die indien onbehandeld in 20-45% van de gevallen overgaan in kanker.²

Nieuwe screeningsmethoden voor het cervixcarcinoom

Het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker is gebaseerd op een cytomorfoloogische beoordeling van uitstrijkjes. Als gevolg van fouten bij het afnemen of bij het beoordelen van het uitstrijkje, komen fout-positieve en fout-negatieve uitslagen voor. Er zijn al veel technieken getest om het aantal fout-positieve en fout-negatieve uitslagen terug te dringen, zoals de geautomatiseerde analyse van uitstrijkjes, immunocytochemische kleuringen van het uitstrijkje met behulp van proliferatiemarkers, vloeibare cytologie, het aantonen van 'loss of heterozygosity' (verlies van 1 van de 2 allelen van een gen), het meten van telomeraseactiviteit, methylatieanalyse en detectie van het HPV.³

Van deze nieuwe methoden is alleen de HPV-test al zo ver ontwikkeld, dat deze binnenkort zal worden geïmplementeerd in het huidige bevolkingsonderzoek. Omdat veel, vooral jongere, vrouwen besmet zijn met het HPV zonder dat er sprake is van (een voorstadium van) cervixcarcinoom, lijkt de HPV-test vooralsnog niet geschikt om het uitstrijkje volledig te vervangen. Wel is er mogelijk een rol voor de HPV-test als triage-instrument, om te bepalen welke vrouwen met een minimaal afwijkend uitstrijkje (Pap 2/Pap 3A: lichte dysplasie) zouden moeten worden doorverwezen voor nadere diagnostiek. In de Verenigde

Aanwijzingen voor de praktijk

1. Het huidige bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker, dat gebaseerd is op cytomorfologische beoordeling van uitstrijkjes, gaat gepaard met een substantieel aantal fout-positieve en fout-negatieve uitslagen.
2. Van alle nieuwe methoden om het bevolkingsonderzoek te verbeteren, is alleen de HPV-test in een zodanig vergevorderd stadium dat het zal worden geïmplementeerd in het huidige bevolkingsonderzoek. De laatste resultaten van gerandomiseerde studies volgen echter nog. De verwachting is dat de HPV-test met name zal worden toegepast als triage-instrument voor vrouwen met een licht afwijkend uitstrijkje.
3. Een nieuwe methode die gebaseerd is op methylatieanalyse is veelbelovend als nieuwe diagnostische test, met name omdat het een zeer hoge specificiteit heeft (100%). Er zal echter nog veel onderzoek moeten worden verricht voordat deze nieuwe methode klinisch toepasbaar is.
4. Ondanks de beperkingen van het uitstrijkje is er momenteel geen betere methode om baarmoederhalskanker in een vroeg stadium op te sporen. Het veroorzakende HPV is zo prevalent, dat elke vrouw risico loopt op het ontwikkelen van baarmoederhalskanker. Iedere vrouw zou daarom gehoor moeten geven aan de oproep tot deelname aan het bevolkingsonderzoek.

Staten is inmiddels een commercieel verkrijgbare HPV-test als triage-instrument bij vrouwen ≥ 30 jaar goedgekeurd als een extra test naast het uitstrijkje. De grote klinische onderzoeken met een lange follow-up die het nut van de HPV-test moeten aantonen, zijn momenteel echter nog niet afgerond.^{4,5} Een van de grootste nadelen van de HPV-test is dat een positieve testuitslag, zonder het hebben van een (voorstadium van) cervixcarcinoom, grote psychologische gevolgen kan hebben voor de betreffende vrouwen.

Methylatieanalyse als diagnostische test voor het cervixcarcinoom

Van de meer experimentele nieuwe methoden is methylatieanalyse, door middel van kwantitatieve methylatiespecifieke PCR (QMSP) het meest veelbelovend als nieuwe diagnostische test. Deze methode, gebaseerd op moleculaire veranderingen die optreden tijdens de cervixcarcinogenese, zou het huidige bevolkingsonderzoek kunnen verbeteren. Methylatie van CpG-eilanden, CG-rijke gebieden in de promotor-regionen van tumorsuppressorgenen, is een epigenetische verandering die al vroeg in de carcinogenese optreedt en die kenmerkend is voor kanker.⁶ Het veelvuldig optreden van methylatie in het promotor-gebied (DNA-hypermethylatie) maakt transcriptie van het gen meestal onmogelijk, waardoor het eiwit-

product niet kan worden gevormd.

Dit promotieonderzoek gaat met name over het gebruik van methylatieanalyse als diagnostische test om cervicale neoplasie op te sporen. In de pilotstudie waarin QMSP werd vergeleken met het reguliere uitstrijkje en de HPV-test, zijn 12 genpromotors onderzocht waarvan uit de literatuur bekend is dat ze vaak gemethyleerd zijn in kanker.⁷ Dit onderzoek werd uitgevoerd op uitstrijkjes van 19 gezonde vrouwen (controles) en 28 patiënten met een cervixcarcinoom (20 plaveiselcelcarcinomen en 8 adenocarcinomen). Met een panel bestaande uit 4 genpromotors (*ESRI*, *DAPK*, *APC* en *CALCA*) konden 89% van de cervixcarcinomen geïdentificeerd worden met een specificiteit van 100%. In dit onderzoek was de klinische sensitiviteit van QMSP (89%) vergelijkbaar met die van het reguliere uitstrijkje en de HPV-test, terwijl de specificiteit van QMSP (100%) hoger was vergeleken met de specificiteit van het reguliere uitstrijkje (83%) en de HPV-test (68%). Hoewel de resultaten van deze pilotstudie veelbelovend zijn voor QMSP als diagnostische test is meer onderzoek nodig met grotere aantallen patiënten, waaronder patiënten met voorstadia van een cervixcarcinoom. Dit om aan te tonen of QMSP op uitstrijkjes in staat is om het huidige bevolkingsonderzoek te verbeteren.

Patroon van hypermethylatie gedurende de cervixcarcinogenese

De laatste jaren zijn diverse studies verricht waarbij genpromotors zijn geïdentificeerd die specifiek gemethyleerd zijn in het cervixcarcinoom. De meeste van deze studies hebben echter geen CIN-laesies onderzocht. Om meer inzicht te krijgen in het proces van methylatie gedurende de carcinogenese van het cervixcarcinoom is in dit promotieonderzoek door middel van QMSP de methylatiestatus onderzocht van 9 genpromotors die specifiek gemethyleerd zijn in het cervixcarcinoom.⁸ In de pilotstudie waren al 5 van deze 9 genpromotors naar voren gekomen, de overige 4 genen waren geselecteerd op basis van literatuurgegevens. Van 20 gezonde vrouwen (controles), 20 CIN I-laesies, 20 CIN II- of CIN III-laesies, 20 adenocarcinomen en 40 plaveiselcelcarcinomen werden cervixbiopten (paraffineweefsel) onderzocht. Bij 6 genpromotors nam zowel de frequentie als de mate van methylatie toe gedurende de carcinogenese. Er werd echter ook methylatie gezien in enkele controles. Slechts 1 gen was nooit gemethyleerd in controles. Voor iedere genpromotor werd een afkapwaarde gekozen boven de hoogst gemethyleerde controle, waardoor de specificiteit op 100% werd gesteld. Methylatie in biopten boven deze drempel werd beschouwd als hypermethylatie. Het hoogste percentage hypermethylatie dat gezien werd voor 1 genpromotor was 90% (54 van de 60 cervixcarcinomen). Met een panel van 3 genpromotors werd hypermethylatie gevonden in 97% van de cervixcarcinomen, 35% van de CIN II- en CIN III-laesies en 10% van de CIN I-laesies.

Conclusie

Hoewel meer cervixcarcinoomspecifieke genpromotors moeten worden toegevoegd om de frequentie van hypermethylatie in met name CIN II- en CIN III-laesies te verhogen, wordt geconcludeerd dat QMSP veelbelovend is als diagnostische test voor de detectie van het cervixcarcinoom. Wanneer het ideale genpromotorpanel is geïdentificeerd moet de klinische sensitiviteit van QMSP worden bepaald in grote series uitstrijkjes van controles, CIN-laesies en cervixcarcinomen en moet QMSP worden vergeleken met het reguliere uitstrijkje en de HPV-test. Tevens moet voor iedere genpromotor in het panel een afkapwaarde worden vastgesteld. Hoewel de resultaten hoopgevend zijn, is de weg naar klinische toepasbaarheid van QMSP als diagnostische test nog lang.

Referenties

1. Helmerhorst TJ, Meijer CJ. Cervical cancer should be considered as a rare complication of oncogenic HPV infection rather than a STD. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:235-6.
2. Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet* 2004;364:249-56.
3. Nijhuis ER, Reesink-Peters N, Wisman GB, Nijman HW, Van Zanden J, Volders H, et al. An overview of innovative techniques to improve cervical cancer screening. *Cell Oncol* 2006;28:233-46.
4. U.S. Preventive Services Task Force. <http://www.aafp.org/afp/20030415/us.html> 2003.
5. Bulkman NW, Rozendaal L, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Boeke AJ, Zandwijken GR, et al. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. *Int J Cancer* 2004;110:94-101.
6. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:687-92.
7. Wisman GB, Nijhuis ER, Hoque MO, Reesink-Peters N, Koning AJ, Volders HH, et al. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2006;119:1908-14.
8. Nijhuis ER, Yang Nan N, Lendvai A, Ten Hoor KA, Volders HH, Van Zanden J, et al. Gene promoter methylation patterns in cervical carcinogenesis. *Manuscript in preparation.*

Ontvangen 15 februari 2007, geaccepteerd 5 maart 2007.

Correspondentieadres

Mw. dr. E.R. Nijhuis, AIOS gynaecologie

Stichting Deventer Ziekenhuis
Afdeling Obstetrie en Gynaecologie
Postbus 5001
7400 GC Deventer
Tel.: 0570 64 66 66
E-mailadres: e.r.nijhuis@dz.nl

Belangenconflict: geen gemeld.

Financiële ondersteuning: een deel van het beschreven promotieonderzoek werd financieel ondersteund door OncoMethylome Sciences S.A., Luik, België.