



Methylatiemarkers: op het spoor van HSIL naar anuskranker

F. Dias Goncalves Lima¹, R.D.M. Steenbergen², M.L. Siegenbeek van Heukelom³

Recent onderzoek heeft laten zien dat de behandeling van anuskrankervoorlopers het risico op anuskranker aanzienlijk kan verminderen. Echter, deze voorlopers worden vaak gevonden bij risicogroepen, terwijl anuskranker een zeldzame ziekte is. Dit betekent dat niet alle mensen met deze voorlopers kanker zullen krijgen als ze niet behandeld worden. Hier staat tegenover dat sommige mensen hardnekkige voorlopers hebben die ondanks behandeling niet weggaan en uiteindelijk kanker worden. Nieuwe methoden om gevaarlijke van ongevaarlijke voorlopers te onderscheiden zijn hard nodig om onnodige behandeling te voorkomen of zo nodig juist agressiever te behandelen. In dit artikel verkennen we de veelbelovende rol van methylatiemarkers in het identificeren van anuskrankervoorloper cellen met een hoog risico op progressie.

INLEIDING

De incidentie van anuskranker neemt zowel in Nederland als wereldwijd toe. [1] Hoewel het een zeldzame aandoening is in de algemene bevolking, lopen specifieke groepen een verhoogd risico op het ontwikkelen van anuskranker, waaronder mensen die leven met hiv, mannen die seks hebben met mannen, transgender vrouwen, individuen met een voorgeschiedenis van vulvaire (pre)maligniteiten en ontvangers van orgaantransplantaties. [2] Het merendeel van de gevallen van anuskranker betreft plaveiselcelcarcinomen die worden veroorzaakt door het humaan papillomavirus (HPV). Net als bij cervixcarcinoom wordt anuskranker voorafgegaan door anale hooggradige squameuze intra-epitheliale laesies (HSIL). Recent onderzoek toont aan dat het opsporen en behandelen van HSIL het risico op progressie naar anuskranker kan verlagen, zoals aangetoond in een gerandomiseerde gecontroleerde trial onder meer dan 4.000 patiënten, waarbij het risico daalde van 402 naar 173 gevallen per 100.000 persoonsjaren. [3]

In Nederland worden mannen die seks hebben met mannen en leven met hiv (MSMLWH) al jaren routinematig gescreend op HSIL vanwege hun 85-voudig verhoogde risico op anuskranker. [2,4] Deze screenings vinden plaats via hoge resolutie anoscopie (HRA), waarbij er met een sterk vergrotende binoculair in de anus wordt gekeken. Bij aanwezigheid van afwijkingen die wit oplichten na het aanbrengen van azijnzuur, worden biopsies afgenomen. Bij histopathologische bevestiging van HSIL wordt behandeling gestart, meestal met

elektrocoagulatie, waarbij het slijmvlies na lokale verdoving oppervlakkig wordt verschroeid. [5,6]

Het behandelen van HSIL met elektrocoagulatie is echter belastend, kostbaar en technisch uitdagend. [7] Bovendien heeft deze methode een beperkt slagingspercentage van 62% met een recidiefkans van 60% na een jaar. [3,6,8,9] Hoewel HSIL een hoge prevalentie van 30% heeft bij MSMLWH, zal slechts een kleine minderheid van hen daadwerkelijk progressie naar kanker vertonen, waardoor er sprake is van aanzienlijke overbehandeling. [3] Daar komt bij dat 30% van de HSIL na een jaar spontaan in regressie gaat. [3,8]. Ook is er zowel in Nederland als wereldwijd een tekort aan HRA-capaciteit. Recentelijk heeft de International Anal Neoplasia Society richtlijnen gepubliceerd die triage voor HRA aanbevelen met behulp van HPV-testen en cytologie. [10] Implementatie van dergelijke triage kan de HRA-capaciteit aanzienlijk vergroten, waardoor het wellicht mogelijk wordt om ook andere risicogroepen te screenen. Dit zal leiden tot een vroege detectie van HSIL in meerdere risicopopulaties en een betere preventie van anuskranker.

Gezien de variatie in het klinisch beloop van HSIL is er behoefte aan nieuwe tests die HSIL kunnen stratificeren op basis van hun risico op progressie naar kanker, om enerzijds overbehandeling van patiënten met laag-risico HSIL te verminderen en anderzijds indicaties te stellen voor intensievere behandeling van patiënten met hoog-risico HSIL.

¹ Arts-onderzoeker Dermatologie, Amsterdam UMC, locatie Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, afdeling Dermatologie, Amsterdam; Amsterdam UMC, locatie VU Medisch Centrum, Vrije Universiteit, afdeling Pathologie, Amsterdam; Cancer Centre Amsterdam, Imaging and Biomarkers, Amsterdam; Amsterdam Institute for Infection and Immunity (AI&II), Amsterdam.

² Moleculair bioloog, Amsterdam UMC, locatie VU Medisch Centrum, Vrije Universiteit, afdeling Pathologie, Amsterdam; Cancer Centre Amsterdam, Imaging and Biomarkers, Amsterdam.

³ Dermatoloog, Amsterdam UMC, locatie Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, afdeling Dermatologie, Amsterdam.

Ter illustratie worden hieronder twee ogenschijnlijk vergelijkbare casussen beschreven van patiënten met therapieresistente HSIL.

CASUS

Patiënt 1

Een man van 43 jaar werd op de HRA-polikliniek gezien voor reguliere screening op HSIL. Hij is sinds een jaar gediagnosticeerd met een hiv-1 infectie en zijn nadir CD4 was 520/mm³. De patiënt was goed ingesteld op combinatietherapie voor antiretrovirale middelen. Hij heeft seks met mannen.

Bij de eerste screening had patiënt geen klachten. Bij lichamelijk onderzoek was het rectaal toucher niet afwijkend en werden er tijdens HRA azijnzuurwitte gebieden met gepuncteerde vaattekening gezien, lacy metaplasia en enkele verruceuze papels. Er werden bipten afgenomen waarmee HSIL werd vastgesteld, waarna elektrocoagulatie werd uitgevoerd. Een aantal weken na het nemen van de bipten meldde patiënt zich met klachten van bloedverlies bij de ontlasting. Bij lichamelijk onderzoek werd een fissuur gezien, waarmee het bloedverlies werd verklaard.

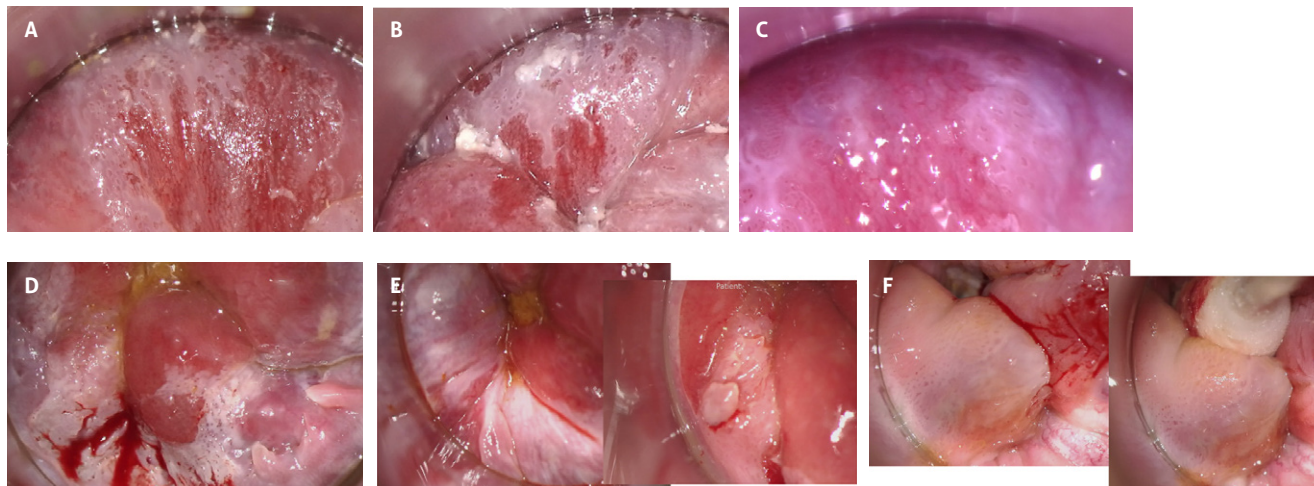
Na de behandeling persisteerde de HSIL, waarna opnieuw elektrocoagulatie werd uitgevoerd. Bij de daaropvolgende evaluatie bleef HSIL aanhouden (figuur 1A). Patiënt vond de behandelingen zeer belastend en verzocht een actief monitoringsbeleid.

Hij werd vervolgens zesmaandelijks gecontroleerd met HRA. De HSIL persisteerde bij twee opeenvolgende controles (figuur 1B).

Een jaar later leken de laesies echter af te nemen (figuur 1C). Histopathologisch onderzoek toonde enkel nog laaggradige laesies aan. Twee jaar later bleken deze laesies zonder behandeling in complete regressie te zijn gegaan.

Patiënt 2

Een 53-jarige man werd naar onze HRA-polikliniek verwezen vanwege uitgebreide HSIL. Hij heeft een voorgeschiedenis van een asymptomatische hiv-1-infectie die 12 jaar geleden werd vastgesteld, met een nadir CD4 van 350/mm³. De patiënt was gedurende 10 jaar ingesteld op combinatietherapie voor antiretrovirale middelen, waarbij zijn CD4-aantal al geruime tijd binnen de normale grenzen lag en zijn viral load niet detecteerbaar was. Hij heeft seks met mannen. Een jaar geleden werd bij reguliere screening in een perifeer dermatologisch centrum HSIL ontdekt, waarbij een laesie op het anterieure kwadrant van de anale transformatiezone werd geïdentificeerd als een atypische, verheven plaque die gemakkelijk bloedde. Hij werd doorverwezen naar de chirurg voor bipten onder narcose en behandeling van de laesie. Er werden echter geen afwijkingen waargenomen tijdens het onderzoek en derhalve werd er geen materiaal afgenomen of behandeling uitgevoerd. Vervolgens werd de patiënt doorverwezen naar ons centrum voor verdere diagnostiek en behandeling.



Figuur 1. Intra-anele foto's genomen tijdens hoge resolutie anoscopie
A: Patiënt 1 tijdens evaluatie na tweemaal te zijn behandeld met elektrocoagulatie. Het overgangsepitheel van anus naar rectum is zichtbaar. Aan de anterieure zijde (bovenin de foto) azijnzuurwitte lacy metaplasia wordt gezien, wat kenmerkend is voor HSIL.
B: Patiënt 1 een jaar na de evaluatie, ingesteld op een actief monitoring beleid. Op de foto is opnieuw het overgangsepitheel in beeld gebracht met anterieur opnieuw azijnzuurwitte lacy metaplasia, indicatief voor persistentie van de HSIL.
C: Patiënt 1 twee jaar na de evaluatie, nog steeds ingesteld op een actief monitoring beleid. Op de foto is weer de anterieure zijde van het overgangsepitheel te zien. Het epitheel kleurt echter nauwelijks aan door het azijn en de afwijkingen zijn voor het grootste deel niet meer zichtbaar, wat regressie indiceert.

D: Patiënt 2 tijdens presentatie. Het overgangsepitheel van anus naar rectum is in beeld gebracht. Rechts-posterieur (linksonder op de foto) is een beeld te zien van azijnzuurwitte metaplasia met een honingraatpatroon. De vaattekening is zichtbaar als grove punctaties met atypische vaten.
E: Patiënt 2 een jaar na presentatie, na tweemaal met elektrocoagulatie te zijn behandeld. Rechts-posterieur zijn de eerdere afwijkingen voor een groot deel verdwenen. Wel is er proximaal een verruceuze papel zichtbaar.
F: Patiënt 2 twee jaar na presentatie, na nogmaals tweemaal met elektrocoagulatie te zijn behandeld. Een grote, makkelijk bloedende papel is zichtbaar, verdacht voor anuskanker.

Bij presentatie vertoonde de patiënt geen anale klachten. Tijdens het lichamelijk onderzoek was het rectaal toucher niet afwijkend. Bij het HRA-onderzoek werd een uitgebreid beeld waargenomen van azijnzuurwitte, scherp begrensde verheven plaques op zowel het anterieure als het posterieure kwadrant van de transformatiezone, met een gepuncteerde vaattekening en enkele atypische vaten (figuur 1D). Er werden zes bipten afgenomen, waarvan vijf bij histopathologisch onderzoek als HSIL werden geassocieerd. Er werden geen aanwijzingen gevonden voor invasieve groei in het weefsel.

Volgens het protocol werd gestart met tweemaal elektrocoagulatie, met een tussenperiode van 3 maanden, gevolgd door evaluatie middels HRA 6 maanden na de tweede behandeling. Bij de evaluatie werd klinische verbetering waargenomen van de HSIL (figuur 1E), maar een aanzienlijk deel van de laesies bleef aanwezig, wat histopathologisch werd bevestigd. Daarom werd opnieuw gestart met tweemaal elektrocoagulatie.

Vlak voor de evaluatie na de laatste behandeling nam de patiënt contact op met de polikliniek vanwege klachten van anale pijn en bloedverlies. Tijdens de controle werd bij rectaal toucher een verharde zwelling van 3 cm doorsnede gevoeld, die drukpijnlijk was. Bij HRA werd op het rechts-posterieure kwadrant van de transformatiezone, waar eerder HSIL was vastgesteld, de zwelling geïdentificeerd en bipten genomen (figuur 1F). Er was een sterke klinische verdenking op anus-kanker. Histopathologisch onderzoek bevestigde invasieve groei. Na beeldvormend onderzoek werd bij de patiënt een T2N1M0 plaveiselcelcarcinoom van de anus vastgesteld, waar-na hij werd verwezen voor behandeling met chemoradiatie.

DISCUSSIE

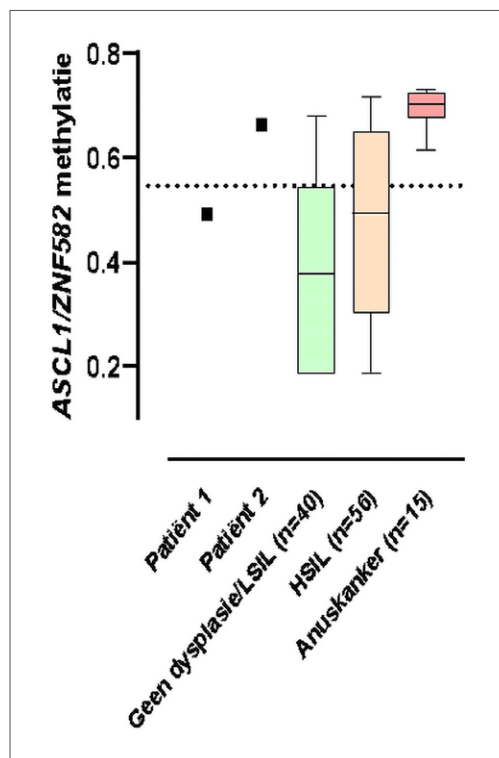
Deze twee casus laten zien dat twee patiënten met vergelijkbare HSIL en risicofactoren voor anus-kanker toch een zeer uiteenlopend ziektebeloop kunnen hebben. Idealiter was Patiënt 1 belastende behandelingen bespaard gebleven en was Patiënt 2 eerder met een intensieve of andere behandeling gestart. Dit illustreert de noodzaak voor nieuwe testen die HSIL indelen op risico op progressie naar kanker om doelgericht te kunnen behandelen.

Verhoogde DNA-methylatie van specifieke tumor onderdrukkende genen, waardoor deze genen niet wordt afgeschreven, is een indicator voor de ontwikkeling van kanker na een HPV-infectie. Deze gemethyleerde genen, of wel methylatiemarkers, kunnen met eenvoudige moleculaire technieken worden aangetoond in weefsel en anale swabs. [11] In eerder onderzoek zijn zes methylatiemarkers geïdentificeerd en gevalideerd voor het opsporen van HSIL en anaal plaveiselcelcarcinoom op anale bipten. [12] Een genenpaneel bestaande uit ZNF582 en ASCL1 detecteerde alle gevallen van anus-kanker en een deel van de HSIL, waarvan het klinische beloop kan variëren; regressie van HSIL komt veel vaker voor dan progressie naar kanker. [12,13] De associatie tussen verhoogde methylatie en progressie naar anus-kanker werd aangetoond in een longitudinale serie van HSIL bij patiënten die progressie kregen naar kanker. [12,13] Alle progressieve HSIL waren methylatie-positief.

Derhalve is het voorstel dat methylatietesten op anale bipten kunnen worden gebruikt voor de stratificatie van het kankerrisico van HSIL, waarbij HSIL wordt opgedeeld in 1) 'gevorderd HSIL' met een verhoogd risico op progressie naar kanker en derhalve een behandelindicatie en 2) 'laag-risico HSIL' met een laag risico op progressie naar kanker, waarbij behandeling veilig achterwege kan worden gelaten. [12,13]

De patiënten uit de casusbeschrijving hebben schriftelijk ingestemd met deelname aan een biobank-studie over methylatieanalyse waarin enkele van hun bipten en anale uitstrijken zijn geanalyseerd. In figuur 2 zijn de methylatielevels in van de bipten geplotted voor het ZNF582/ASCL1 marker paneel. Ter vergelijking zijn uitslagen van een eerder gepubliceerde cross-sectionele serie van HSIL en anus-kanker bipten ernaast geplotted. Er is te zien dat de methylatiewaarden van patiënt 1 veel lager zijn dan van patiënt 2. De waarden van patiënt 2 zijn vergelijkbaar met de kanker bipten.

Momenteel worden methylatiesmarkers klinisch gevalideerd in een prospectieve cohortstudie onder 200 MSMLWH met bewezen HSIL. Deelnemers zullen gedurende twee jaar actief worden gemonitord met zesmaandelijks HRA-controles, waarbij HSIL niet wordt behandeld. Het hoofddoel is om te



Figuur 2. Methylatiewaarden van patiënten 1 en 2 vergeleken met een eerder gepubliceerde cross-sectionele reeks van HSIL en kankerbipten. [13]

Methylatieswaarden voor het markerpaneel ASCL1/ZNF582 zijn uitgedrukt in predicted probabilities, zoals vastgesteld in een eerdere studie. [13] Een eerder voorgestelde grens voor het indelen van laesies in methylatie-positief en methylatie-negatief is aangegeven met een stippellijn.

bepalen of een methylatie-negatieve test kan voorspellen of HSIL spontaan in regressie zal gaan. De studie is om ethische redenen zo opgezet dat geen progressie naar kanker wordt verwacht; patiënten met HSIL op meer dan de helft van het anale omtrek of atypische kenmerken worden uitgesloten en krijgen behandeling aangeboden. HSIL dat nog aanwezig is aan het einde van de follow-up wordt ook behandeld.

SAMENVATTING

Recentelijk is aangetoond dat het behandelen van anale hooggradige squameuze intra-epitheliale laesies (HSIL) de kans op anuskanker kan halveren. Desalniettemin blijft de behandeling van HSIL belastend, kostbaar en complex. Ook persisteert HSIL geregeld na behandeling en komen recidieven vaak voor. Bovendien is er een tekort aan hoge resolutie anoscopisten. Slechts een klein percentage van de HSIL ontwikkelt zich tot kanker, wat leidt tot overbehandeling van veel patiënten. Daartegenover staat dat soms ondanks behandeling kanker zich toch bij sommige patiënten ontwikkelt. Er zijn nieuwe methoden nodig om HSIL met een hoog risico op progressie naar kanker te onderscheiden van HSIL met een laag risico, om zo gerichte behandelindicaties te kunnen stellen. Methylatiemarkers worden beschouwd als een veelbelovende benadering voor dit doel.

SUMMARY

Recently, it has been demonstrated that treatment of anal high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) can reduce the risk of anal cancer by half. However, the treatment of HSIL remains burdensome, expensive, and difficult to perform. Additionally HSIL often persists and recurrences are common. Moreover, there is a shortage of trained high-resolution anoscopists. Only a small percentage of HSIL progress to cancer, leading to overtreatment of many patients, while cancer may still develop in some despite treatment. Therefore, new methods are needed to

CONCLUSIE

Anuskanker kan worden voorkomen met behulp van opsporing en behandeling van HSIL. De behandeling is echter belastend en heeft een beperkte effectiviteit. Met een gerichte DNA methylatie test kunnen HSIL worden gestratificeerd op het risico op kanker en mogelijk daarmee helpen in de besluitvorming voor behandelen of actief monitoren. Heden worden de methylatiemarkers nog verder klinisch gevalideerd in een prospectieve studie.

distinguish HSIL with a high risk of progression to cancer from those with a low risk, in order to establish targeted treatment indications. Methylation markers are considered a promising approach for this purpose.

LEERPUNTEN

- Anale hooggradige squameuze intra-epitheliale laesies (HSIL) zijn voorstadiën van anuskanker.
- Het behandelen van anale HSIL vermindert het risico op anuskanker van 402 naar 173 gevallen per 100.000 persoonsjaren.
- Behandeling van HSIL is belastend en heeft een beperkte slagingspercentage van 62%.
- Anale HSIL gaat bij 30% van de gevallen in complete spontane regressie.
- Anale HSIL kan in zeldzame gevallen tijdens een behandeltraject in progressie gaan naar anuskanker.
- Methylatiemarkers zijn geassocieerd met carcinogenese en een veelbelovende manier voor het stellen van behandelindicatie.

TREFWOORDEN

Anuskanker - HSIL - methylatie - HIV - AIN

BELANGENVERSTRENGELING

RDMS is een minderheidsaandeelhouder van Self-screen B.V., een spin-off bedrijf van VUmc, dat patenten bezit op methylatiemarkers en HPV-detectie.

LITERATUUR

1. van der Zee RP, Richel O, de Vries HJ, Prins JM. The increasing incidence of anal cancer: can it be explained by trends in risk groups? *Neth J Med.* 2013;71(8):401-11.
2. Clifford GM, Georges D, Shiels MS, Engels EA, Albuquerque A, Poynten IM, et al. A meta-analysis of anal cancer incidence by risk group: Toward a unified anal cancer risk scale. *Int J Cancer.* 2021;148(1):38-47.
3. Palefsky JM, Lee JY, Jay N, Goldstone SE, Darragh TM, Dunlevy HA, et al. Treatment of anal high-grade squamous intraepithelial lesions to prevent anal cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(24):2273-82.
4. Siegenbeek van Heukelom ML, Marra E, de Vries HJC, Schim van der Loeff MF, Prins JM. Risk factors for anal high-grade squamous intraepithelial lesions in HIV-positive MSM: is targeted screening possible? *AIDS.* 2017;31(16):2295-301.
5. Hillman RJ, Cuming T, Darragh T, Nathan M, Berry-Lawthorn M, Goldstone S, et al. 2016 IANS international guidelines for practice standards in the detection of anal cancer precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2016;20(4):283-91.
6. Richel O, de Vries HJ, van Noesel CJ, Dijkgraaf MG, Prins JM. Comparison of imiquimod, topical fluorouracil, and electrocautery for the treatment of anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive men who have sex with men: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(4):346-53.
7. Siegenbeek van Heukelom ML, Richel O, Nieuwkerk PT, De Vries HJ, Prins JM. Health-related quality of life and sexual functioning of HIV-positive men who have sex with men who are treated for anal intraepithelial neoplasia. *Dis Colon Rectum.* 2016;59(1):42-7.
8. Goldstone SE, Lensing SY, Stier EA, Darragh T, Lee JY, van Zante A, et al. A randomized clinical trial of infrared coagulation ablation ver-

- sus active monitoring of intra-anal high-grade dysplasia in adults with human immunodeficiency virus infection: An AIDS malignancy consortium trial. *Clin Infect Dis.* 2019;68(7):1204-12.
9. Gaisa MM, Liu Y, Deshmukh AA, Stone KL, Sigel KM. Electrocautery ablation of anal high-grade squamous intraepithelial lesions: Effectiveness and key factors associated with outcomes. *Cancer.* 2020;126(7):1470-9.
 10. Stier EA, Clarke MA, Deshmukh AA, Wentzensen N, Liu Y, Poynten IM, et al. International Anal Neoplasia Society's consensus guidelines for anal cancer screening. *Int J Cancer.* 2024.
 11. Steenbergen RD, Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(6):395-405.
 12. van der Zee RP, Richel O, van Noesel CJM, Ciocanea-Teodorescu I, van Splunter AP, Ter Braak TJ, et al. Cancer risk stratification of anal intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-positive men by validated methylation markers associated with progression to cancer. *Clin Infect Dis.* 2021;72(12):2154-63.
 13. Rozemeijer K, Dias Goncalves Lima F, Ter Braak TJ, Hesselink AT, Prins JM, de Vries HJC, Steenbergen RDM. Analytical validation and diagnostic performance of the ASCL1/ZNF582 methylation test for detection of high-grade anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Tumour Virus Res.* 2023;17:200275.

CORRESPONDENTIEADRES

Fernando Dias Goncalves Lima

E-mail: f.diasgoncalveslima@amsterdamumc.nl