

Human Papillomavirus og planocellulært karcinom i urinblæren – DaBlaCa-10 studiet

Projektprotokol

Der ønskes belysning af en potentiel association mellem Human Papillomavirus og planocellulært karcinom i urinblæren

Baggrund

I Danmark diagnosticeres der over 1900 nye tilfælde af blærecancer hvert år. Blærecancer udgør blandt mændene 7,4% af alle kræfttyper og blandt kvinderne ligger tallet på 2,8%.¹ Omkring 95% af blærecancerne i Danmark er af typen urotheliale karcinomer. De resterende 5% udgøres af planocellulære karcinomer, adenokarcinomer eller mesenkymale tumorer.²

De vigtigste risikofaktorer for udvikling af blærecancer i de vestlige lande er rygning efterfulgt af erhvervsmæssige eksponeringer. I udviklingslandene er kronisk infektion med *Schistosoma hematobium* en af de hyppigste årsager.³ Viral infektion er en mulig karcinogen årsag til blærecancer. Her er specielt Human Papillomavirus (HPV) blevet overvejet.

HPV er en cirkulær dobbelt-strengt DNA virus som hører til Papillomaviridae familien.⁴

Nobelprisvinder i medicin, Harald zur Hausen påviste allerede i 1976 sammen med sit team, at der i fodvorter fandtes HPV med forskellige kløvningsmønstre, hvilket ledte ham frem til, at der måtte findes forskellige genotyper af virussen.⁵ Man har siden da fundet, at familien består af 29 slægter, der kan underinddeles i 120 til dato kendte subtyper som forekommer hos mennesket.⁴ Disse subtyper kan yderligere inddeles i lav- (LR) og højrisiko (HR) typer på baggrund af deres tilstedeværelse i maligne læsioner bl.a. i cervix uteri som er den bedst kendte association. 90% af cervicale cancere er associeret med HR typerne 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 58, m.m..⁶ De mest undersøgte LR HPV typer er 6 og 11 som er associeret med benigne læsioner.⁷

Udover at HPV er en ætiologisk agent for cervical cancer i uterus⁸ har flere studier påvist en sammenhæng ved andre maligniteter, så som anogenitale cancere, peniscancer, og oral cancer.^{6,9-11}

I nævnte cancerformer bemærkes at HPV specielt forekommer som planocellulære karcinomer, da virussen inficerer pladeepitel.^{6,7}

Studier, som undersøger en association mellem HPV og blærecancer, har noget divergerende resultater. Relativt få studier har separat fokuseret på HPV positivitet i planocellulære blærecancere. Her er resultaterne ikke mindre modstridende.

Når man læser artiklerne ud fra antal af undersøgte HPV genotyper, viser et studie bl.a. at der i 17,1% af patienterne med planocellulært karcinom kunne påvises HPV-DNA. Disse var alle af HPV-18 subtypen.¹² Et andet studie, som testede for de mest undersøgte HPV undertyper,

HPV16,-18, -31, -33 og -51, fandt ingen HPV-DNA i planocellulære blærecancerer fra deres forsøgsdeltagere.¹³

Flere studier undersøger både de urotheliale- og de planocellulære blærecancerer. Her konkluderede et studie at der ikke var nogen association mellem HPV og blærecancer.¹⁴ Altså ses der ikke noget entydigt billede af en sammenhæng mellem HPV og planocellulære blærecancerer, som kan be- eller afkræfte, om HPV kan være en årsagsmæssig agent for planocellulær karcinom i blæren.

Hypotese

Resultaterne fra studierne, som har undersøgt for sammenhængen mellem HPV og blærecancer, er divergerende. Der er både studier, som slet ikke har fundet HPV i blærecancerer, og studier som fandt op til 17,1% tilfælde af HPV i deres blærecancer cases.

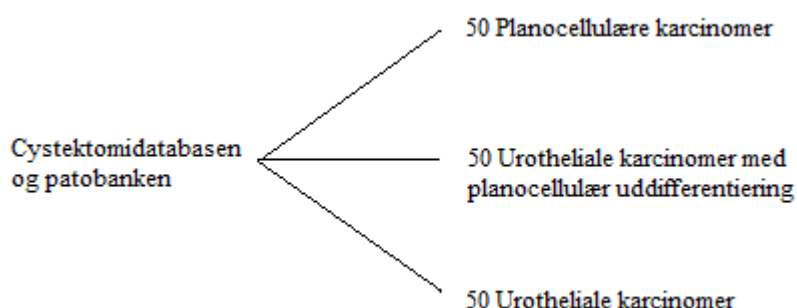
Vi vil undersøge, om vi kan påvise HPV i blærecancerer. Vi formoder, at vi kan gøre dette ved at undersøge for flere typer af HPV end tidligere studier har undersøgt for, da nuværende studier har fokuseret på relativt få subtyper. Vores foreløbige undersøgelser af enkelte patienter har påvist HPV undertyper i enkelte planocellulære cancerer. Vi vil derfor undersøge om dette er et generelt fænomen. Vi vil have fokus på blærecancerer af planocellulær typen, da man ved, at HPV har affinitet for pladeepitel.

Formål

Vi vil undersøge en større pulje af HPV undertyperne, for at finde ud af om der er andre undertyper som findes i de planocellulære blærecancerer og forsøge at være med til at belyse området om en potentiel årsagssammenhæng mellem HPV tilstedeværelse og planocellulær blærecancer.

Materiale og metode

Jeg vil via cystektomidatabaser på de fem danske cystektomicentre og patobanken udtrække i alt 150 patienter (Figur 1).



Figur 1: Inddeling af de 150 patienter

Eksklusionskriterierne er alder over 60 år, kateterbrugere og patienter med neurogen blære. Disse kriterier gælder også for kontrolgruppen med urotheliale tumorer med og uden planocellulær

uddifferentiering. Præparaterne vil være blandet cystektomi- og resektionspræparater udført ved cysteskopi.

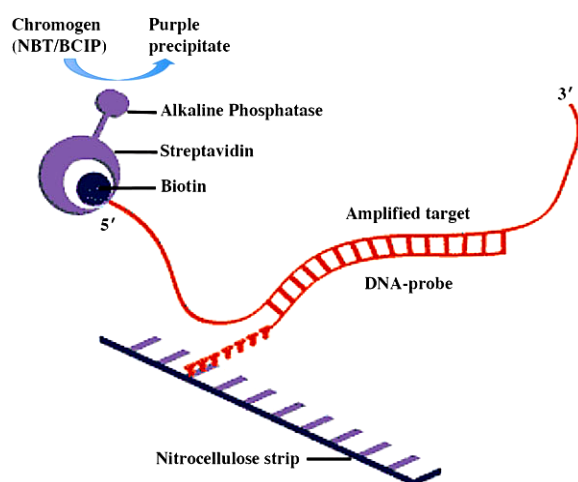
Tilstedeværelse af HPV-DNA og genotype bestemmelse, sker ved en nyere analyseteknik kaldet INNO-LiPA (Immunogenicity-Line Probe Assay) HPV Genotyping Extra. Fordelene ved INNO-LiPA er at den har en høj sensitivitet og specificitet. Ved hjælp af denne metode vil vi kunne undersøge for 28 forskellige HPV undertyper.¹⁵

Inddeling	Subtyper
HR HPV	16, 18, 26, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
LR HPV	6, 11, 40, 43, 44, 54, 70
Uklassificerede HPV	69, 71, 74

Tabel 1: Opdeling af de 28 HPV undertyper.¹⁵

Vi har derfor mulighed for at undersøge for et større interval af HPV undertyper i vores vævsprøver, end man har gjort i hidtidige forsøg.¹²⁻¹⁴

Ved selve forsøgsdelen vil der først køres en real-time PCR, med det meget specifikke SPF10 primer sæt. Denne del af forsøget vil blive udført af bioanalytikere. Herved er evt. HPV-DNA i prøverne blevet kvantitativt amplificeret. Jeg vil dernæst udføre resten af forsøget under vejledning af Overlæge Søren Høyer. Dette gøres ved Line Probe Assay, som bygger på revers hybridiseringsprincip. Herved vil tilstedeværelsen af HPV-DNA (Tabel 1) kunne detekteres og fortolkes visuelt (Figur 2).¹⁶



Figur 2: Skitsering af INNO-LiPA¹⁶

Til slut skal der undersøges for p16 tilstedeværelse. p16 er et onkogen som ofte ses positivt ved blærecancere. Jeg vil undersøge om der er forøget tilstedeværelse blandt blærecancere med HPV forekomst. p16 undersøges immunhistokemisk.¹⁶

Dataanalysen og bearbejdningen vil til slut blive udført med vejledning fra Overlæge, dr. med., professor Jørgen Bjerggaard Jensen og 1. reservelæge Ph.d. Jakob K. Jakobsen.

Perspektivering

Blærecancer af planocellulær type har en dårligere prognose end de urotheliale blærecancer. Mere viden inden for området kunne åbne op for andre behandlingsmuligheder af de planocellulære blærecancer. Hvis vores hypotese om en association mellem HPV og planocellulære blærecancer holder, kan resultatet være med i vurderingen af, om man skulle overveje at udvide målgruppen, som får nytte af en HPV-vaccine, med udviklingen af en vaccine som indeholder de relevante HPV subtyper.

Etiske overvejelser

Projektet skal godkendes af videnskabsetisk komité ved Region Midtjylland, samt datatilsynet ved Region Midtjylland.

En del af patienterne har underskrevet en aftale som gør at de indgår under MOB (molekylær biologi og blærecancer) registrering.

Deltagere

Forskningsårsstuderende:

Kit Riegels Jørgensen, stud.med., Aarhus Universitet, Health

E-mail: kit.riegels.joergensen@post.au.dk

Mobil: 21 22 94 46

Hovedvejleder:

Overlæge Jørgen Bjerggaard Jensen, dr.med., professor, Urinvejskirurgisk Afdeling K, Aarhus Universitetshospital, Skejby

E-mail: jb@skejby.net

Tlf: 78 45 26 17

Mobil: 26 13 37 90

Medvejledere:

Overlæge Søren Høyer, Patologisk Afdeling, Aarhus Universitetshospital, Skejby

1. reservelæge Jakob K Jakobsen, Ph.d., Urinvejskirurgisk Afdeling K, Aarhus Universitetshospital, Skejby

Studiet understøttes af den danske DMCG for blærecancer som DaBlaCa-10 studiet.

Mål

Både positive og negative resultater forventes offentliggjort. Resultatet forventes publiceret i et anerkendt tidsskrift.

Tidsplan

Projektet har en planlagt varighed af 12 måneder fra 1. februar 2016 til 31. januar 2017. Herefter vil en rapport på forsøget udformes og indsendes med efterfølgende forsvar.

Feb	Mar	Apr	Maj	Juni	Juli	Aug	Sep	Okt	Nov	Dec	Jan
Forsøgspersoner udtrækkes i cystektomi databasen og pato bank											
INNO-Lipa metoden indlæres											
INNO-Lipa: 50 Planocellulære karcinomer											
INNO-Lipa: 50 Urothelial karcinomer med planocellulær uddifferentiering											
INNO-Lipa: 50 Urothelial karcinomer											
Dataanalyse og -bearbejdning											
Rapport sammenskrivning											

Kursus deltagelse:

- Introduction to Research Training in health science
- Struktureret litteratursøgning
- Basic biostatistics

Budget:

Løn til forskningsårsstuderende	120.000 kr
- Ansøgt Novo Nordisk	
Udgifter til INNO-LiPA	150.000 kr
- Søgt projektstøtte fra A.P. Møller og Hustru Chastine Mc-Kinney Møllers Fond, Fonden til lægevidenskabens fremme	

Referencer

- 1 NORDCAN, A. o. t. N. C. R. <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/DK/StatsFact.asp?cancer=300&country=208>, (2015).
- 2 Ammundsen I N, K. E. <https://www.cancer.dk/blaerekraeft-blaerecancer/diagnose-blaere/>, (2012).
- 3 Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**, 69-90, doi:10.3322/caac.20107 (2011).
- 4 Bernard, H. U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**, 70-79, doi:10.1016/j.virol.2010.02.002 (2010).
- 5 Gissmann, L. & zur Hausen, H. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 1310-1313 (1976).
- 6 Narisawa-Saito, M. & Kiyono, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science* **98**, 1505-1511, doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x (2007).

- 7 Stanley, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology* **117**, S5-10, doi:10.1016/j.ygyno.2010.01.024 (2010).
- 8 Walboomers, J. M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* **189**, 12-19, doi:10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1<12::aid-path431>3.0.co;2-f (1999).
- 9 de Villiers, E. M., Schneider, A., Gross, G. & zur Hausen, H. Analysis of benign and malignant urogenital tumors for human papillomavirus infection by labelling cellular DNA. *Medical microbiology and immunology* **174**, 281-286 (1986).
- 10 D'Souza, G. *et al.* Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* **356**, 1944-1956, doi:10.1056/NEJMoa065497 (2007).
- 11 Parkin, D. M. & Bray, F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S3/11-25, doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.111 (2006).
- 12 Kim, S. H. *et al.* Detection of human papillomavirus infection and p16 immunohistochemistry expression in bladder cancer with squamous differentiation. *PloS one* **9**, e93525, doi:10.1371/journal.pone.0093525 (2014).
- 13 Westenend, P. J., Stoop, J. A. & Hendriks, J. G. Human papillomaviruses 6/11, 16/18 and 31/33/51 are not associated with squamous cell carcinoma of the urinary bladder. *BJU international* **88**, 198-201 (2001).
- 14 Alexander, R. E. *et al.* p16 expression is not associated with human papillomavirus in urinary bladder squamous cell carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **25**, 1526-1533, doi:10.1038/modpathol.2012.103 (2012).
- 15 Alberizzi, P., Spinillo, A., Gardella, B., Cesari, S. & Silini, E. M. Evaluation of the HPV typing INNO-LiPA EXTRA assay on formalin-fixed paraffin-embedded cervical biopsy samples. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **61**, 535-539, doi:10.1016/j.jcv.2014.10.016 (2014).
- 16 Micalessi, M. I., Boulet, G. A. & Bogers, J. A real-time PCR approach based on SPF10 primers and the INNO-LiPA HPV genotyping extra assay for the detection and typing of human papillomavirus. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1249**, 27-35, doi:10.1007/978-1-4939-2013-6_2 (2015).