

Cover Page



Universiteit Leiden

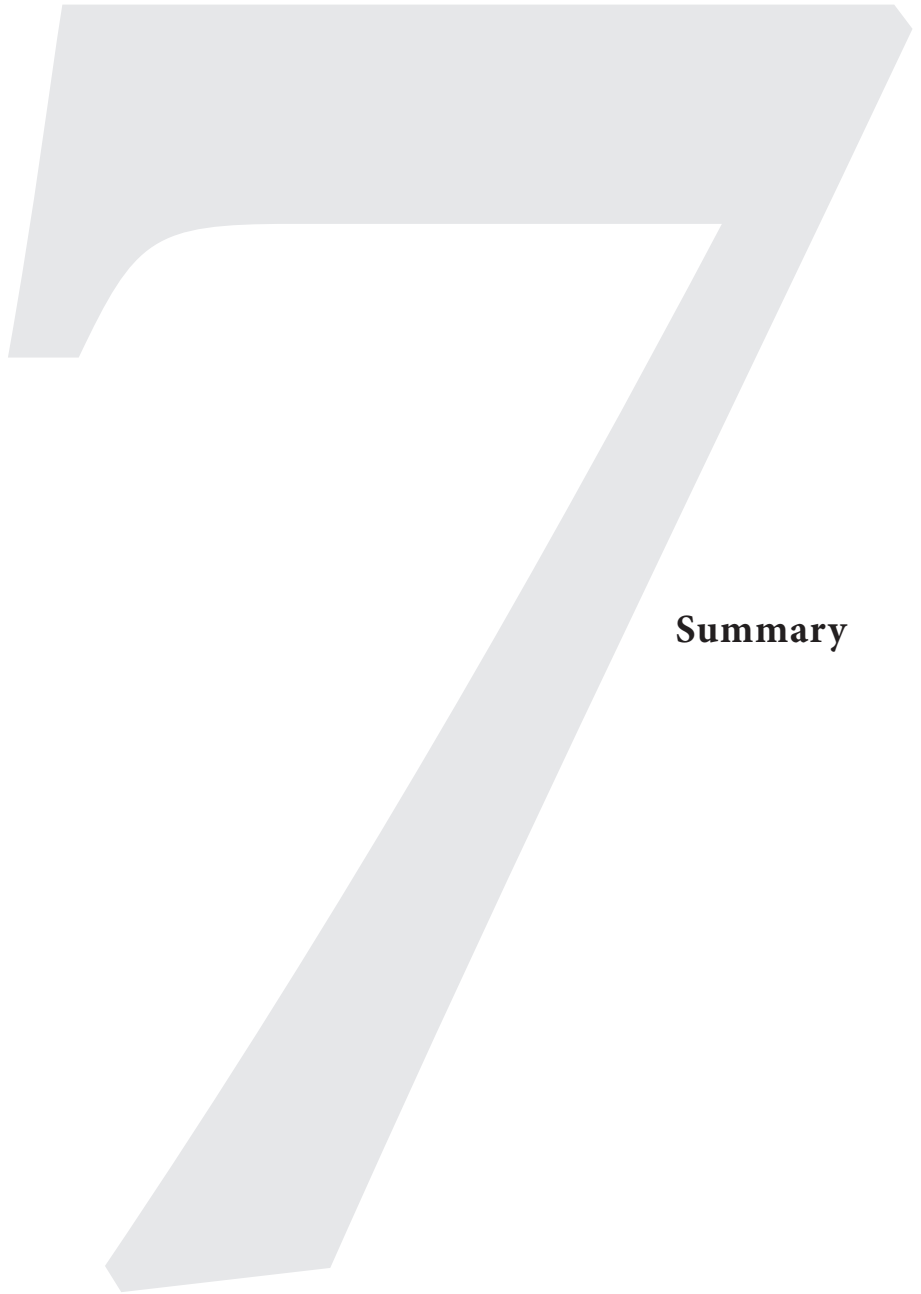


The handle <http://hdl.handle.net/1887/19037> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Hende, Muriel van den

Title: Human papillomavirus clade A9 specific cellular immunity during the natural course of disease

Date: 2012-05-31



Summary

Humaan papillomavirus (HPV) en (pre)maligne afwijkingen aan de baarmoederhals

Van alle vormen van kanker wereldwijd wordt 5% veroorzaakt door een infectie met het humaan papillomavirus (HPV). De meerderheid wordt gevormd door baarmoederhalskanker of het cervixcarcinoom en slechts in 0,7% van de gevallen betreft het een tumor van het hoofd/halsgebied, de schaamlippen, vagina of anus. Baarmoederhalskanker is na borst- en darmkanker de meest voorkomende vorm van kanker onder vrouwen, met 529.800 nieuwe gevallen in 2008. De hoogste incidentie (85%) wordt gezien in ontwikkelingslanden, met name door het gebrek aan screeningsprogramma's. In Nederland heeft het bevolkingsonderzoek een belangrijke rol gespeeld bij het terugdringen van baarmoederhalskanker. Vanaf het 30ste levensjaar worden vrouwen elke 5 jaar opgeroepen voor het uitstrijkje, gericht op de vroege detectie van voorstadia van baarmoederhalskanker. Toch worden in Nederland jaarlijks ongeveer 600 nieuwe gevallen van baarmoederhalskanker gediagnosticeerd, en sterven er ruim 200 vrouwen aan de gevolgen van de ziekte.

Eenpersisterende, langdurige infectie met HPV is door de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) aangeduid als de primaire oorzaak van baarmoederhalskanker. Het humaan papillomavirus behoort tot de DNA-virussen en de familie van de papillomaviridae. Op dit moment zijn al meer dan 100 verschillende HPV typen bekend, waarvan ongeveer 30 genitale HPV typen die de huid en slijmvliezen van de geslachtsorganen kunnen infecteren. Gebaseerd op epidemiologisch onderzoek wordt onderscheid gemaakt tussen zogenaamde laag risico- en hoog risico HPV (hrHPV) typen. Infecties met een laag risico HPV type veroorzaken goedaardige of benigne anogenitale wratten, terwijl infectie met een kankerverwekkend of oncogeen hrHPV type een causale rol speelt bij de ontwikkeling van premaligne en kwaadaardige of maligne afwijkingen aan de baarmoederhals.

Van de 15 oncogene of hoog risico HPV typen, zoals vastgesteld door de WHO, is HPV type 16 het meest voorkomende en meest oncogene type virus. In ongeveer 20 tot 44% van de premaligne afwijkingen (voorstadia) en bijna 55% van de gevallen van baarmoederhalskanker wordt dit HPV type aangetroffen. Genitale HPV typen behoren tot het genus van α -papillomavirussen, welke op basis van genetische kenmerken zijn gegroepeerd in 15 verschillende subgroepen of species. HPV16 behoort met HPV31, HPV33, HPV35, HPV52 en HPV58 tot de $\alpha 9$ species of "clade A9". Deze virussen zijn voor 71-89% genetisch identiek.

Genitale HPV infecties komen zeer veel voor, het is één van de meest voorkomende seksueel overdraagbare aandoeningen (SOA). Geschat wordt dat ongeveer 80% van alle mensen gedurende het leven geïnfecteerd raakt met een hrHPV type. De overgrote meerderheid van deze mensen is instaat om de virusinfectie binnen anderhalf tot twee jaar zelf onder controle te krijgen. Het immuunsysteem speelt hierbij een belangrijke rol. Echter, een hele kleine groep vrouwen (<1%) is hiertoe niet in staat. Deze groep

vrouwen blijft hierdoor langdurig met het virus geïnfecteerd en loopt hierbij het risico om baarmoederhalskanker te ontwikkelen. Tijdens een persisterende infectie integreert het virale DNA in het DNA van de gastheer- of geïnfecteerde cellen van de baarmoederhals. Dit leidt tot verhoogde productie of expressie van de (oncogene) eiwitten E6 en E7, die betrokken zijn bij de regulatie van de celcyclus, met als gevolg ongeremde groei en celdeling wat uiteindelijk kan leiden tot het ontstaan van (pre) maligne afwijkingen van de baarmoederhals.

Het afweersysteem

Het immuunsysteem of afweersysteem beschermt het lichaam tegen lichaamsvreemde en ziekmakende organismen, zoals onder andere virussen en kan ingedeeld worden in aangeboren immuniteit en verworven immuniteit.

De aangeboren of “innate” immuunrespons is aspecifiek en snel en werkt als eerste verdedigingsreactie tegen een infectie. Voorbeelden hiervan zijn de huid en slijmvliezen als natuurlijke barrière, een lokale ontstekingsreactie en macrofagen of fagocyten die het virus “opeten” (fagocyteren), in stukjes knippen en deze stukjes presenteren op de celmembraan (antigeen presentatie) en zo de “adaptieve” of verworven immuunrespons activeren.

Deze “adaptieve” of verworven, specifieke immuunrespons bestaat uit 2 componenten: een humorale en een cellulaire afweerreactie. Bij een humorale respons spelen de B cellen een belangrijke rol. Na activatie door een antigeen presenterende cel zullen deze B cellen antilichamen produceren die gericht zijn tegen het viruskapsel, met als doel het virus te neutraliseren en daarbij een infectie – het binnendringen van het virus in de cel – te voorkomen. Als het virus uiteindelijk toch de cel infecteert, is deze niet meer bereikbaar voor de antilichamen en verloopt de afweerreactie via T cellen, de cellulaire immuunrespons.

Cellulaire afweer is een immuunrespons gericht tegen intracellulaire micro-organismen, zoals virussen (HPV) en bacteriën, waarbij T cellen deze geïnfecteerde cellen kunnen herkennen en opruimen. Binnen de T cellen kunnen de volgende verschillende subtypes onderscheiden worden met elk een specifieke functie: CD8+ cytotoxische T cellen (CTL), CD4+ T helper (Th) cellen en CD4+ regulatoire T cellen (Treg). De CD4+ T cellen produceren verschillende signaalstoffen (cytokines) zoals interferon gamma (IFN γ) en interleukine (o.a. IL2, IL4, IL5, IL10) en hebben een regulerende functie in het opgang brengen en houden van zowel de cellulaire als humorale immuunrespons. De vele verschillende T helper cellen zijn elk verantwoordelijk voor een specifiek stukje van de afweerreactie, zoals activatie van B cellen, activatie van effector cellen van de “innate” immuunrespons (macrofagen) en activatie en “aantrekken” van de CD8+ cytotoxische T cellen welke in staat zijn de virus geïnfecteerde cellen en tumorcellen te herkennen en te doden. De regulatoire T cellen produceren ontstekingsonderdrukkende cytokinen en zijn daarmee in staat de andere cellen van het immuunsysteem te onderdrukken.

Zowel de B als T cellen vormen “geheugencellen” en daarom zal bij nieuw contact met dezelfde ziekteverwekker de specifieke afweer sneller en krachtiger reageren om zo infectie te voorkomen (het principe van vaccinatie).

Afweerreacties tijdens het natuurlijk beloop van een HPV infectie

Genitale HPV infecties komen zeer veel voor en de meerderheid van de vrouwen is in staat om de virus infectie onder controle te krijgen. Dit gaat gepaard met het verdwijnen van de afwijking aan de baarmoederhals. Intensief en jarenlang onderzoek van verschillende onderzoeksgroepen suggereerde dat de afweerreactie van T cellen hier een belangrijke rol in speelt. In *hoofdstuk 4* en *5* worden drie grote prospectieve cohort studies beschreven waarin wij de hypothese dat “klaring van een cervicale HPV infectie geassocieerd is met HPV specifieke T-cel immuniteit” hebben onderzocht. Hier wordt inderdaad bevestigd dat er een sterke correlatie (90%) bestaat tussen een persisterende HPV infectie of cervicale laesie en een falende HPV specifieke afweer: het lichaam is niet in staat deze infectie op te ruimen. Echter, anders dan verwacht, werd er geen positieve relatie aangetoond tussen het klaren van de virus infectie en de aanwezigheid van HPV specifieke immuun responsen. Analyse van immuun responsen en de klinische dan wel histologische uitkomst toonde interessant genoeg wel een zwak, maar statistisch significant verband tussen de HPV16 specifieke afweerreactie tegen het E2 eiwit en regressie van laaggradige afwijkingen aan de baarmoederhals (LSIL). Deze resultaten suggereren dat HPV specifieke cellulaire afweerreacties een belangrijke rol spelen bij het opruimen van histologisch bewezen afwijkingen van de baarmoederhals, maar niet noodzakelijk bij kortdurende of voorbijgaande infecties met HPV die geen afwijkingen van het epitheel van de baarmoederhals veroorzaken. Wij denken dat het aangeboren of “innate” immuunsysteem mogelijk deze infecties opruimt, voordat het virus de cellen van de basaal membraan kan infecteren en dus geen histologische afwijkingen kan veroorzaken. Hierdoor vindt er geen antigeen presentatie plaats aan de cellen van het adaptieve of cellulaire immuun systeem – het virus blijft “onzichtbaar” – en worden er geen T cellen geactiveerd.

HPV specifieke T cel immuniteit biedt geen kruisbescherming

Kruisbescherming of bescherming tegen infectie met nauw gerelateerde en genetisch verwante HPV typen is tot nu toe alleen beschreven voor humorale of B cel gemedieerde afweerreacties. Na vaccinatie met een profylactisch HPV vaccin (zowel Gardasil® als Cervarix®) worden kruis beschermende antilichamen gedetecteerd die zowel een infectie met HPV16 als HPV31 en HPV58 (clade A9) of HPV18 en HPV45

(clade A7) kunnen neutraliseren en voorkomen. Voor de T cel gemedieerde of cellulaire afweerreacties was dit tot nu toe niet bekend. Uitgebreide en gedetailleerde analyse van CD4+ “memory” T cel reacties tegen het E6 eiwit van HPV16 en de andere genetisch verwante HPV typen van clade A9 (HPV31, HPV33, HPV35, HPV52 en HPV58) in gezonde mensen heeft laten zien dat kruis reactieve T cellen bestaan, maar extreem zeldzaam zijn en alleen gevonden worden als het herkende stukje virus DNA nagenoeg identiek is (*hoofdstuk 2*). De immuun responsen tegen de verschillende HPV typen van clade A9 in patiënten met een HPV16 positieve afwijking van de schaamlippen (VIN3) die participeren in onze therapeutische vaccinatie trial met het HPV16SLP vaccin laten een zelfde patroon zien. Ter illustratie: één van de patiënten, met een complete remissie of verdwijnen van de HPV16 positieve afwijking aan de schaamlippen heeft na vaccinatie vervolgens een HPV31 positieve premaligne afwijking van de baarmoederhals ontwikkeld. Hieruit kan geconcludeerd worden HPV specifieke T cel responsen geïnduceerd door het therapeutisch HPV16SLP vaccin niet kruisreactief zijn en niet beschermen tegen een infectie met een ander, gerelateerd HPV type.

Immunologische behandeling van (persisterende) HPV infecties

Bij laaggradige of LSIL afwijkingen van de baarmoederhals is het beleid deze niet te behandelen, maar frequent cytologisch te controleren en te vervolgen. Een chirurgisch behandeling (lisexcisie) is wel geïndiceerd bij hooggradige afwijkingen (HSIL). De profylactische vaccins, gericht op het voorkomen van de HPV infectie, kunnen een bestaande virusinfectie niet opruimen of klaren en hebben geen therapeutisch effect. Gezien de goede klinische response in patiënten met voorstadia van schaamlipkanker (VIN3) na vaccinatie met het HPV16SLP vaccin, biedt dit wellicht in de toekomst mogelijkheden voor behandeling van voorstadia van baarmoederhalskanker.

De oncogene eiwitten E6 en E7 komen met name tot expressie bij HSIL laesies en worden gezien als “target” voor de immunotherapie. De significante correlatie tussen de HPV16E2 immuun respons en regressie van LSIL laesies (*hoofdstuk 5*), suggereert dat E2 een belangrijke rol speelt bij het opruimen van laaggradige afwijkingen.

Het te injecteren volume van het HPV16SLP vaccin, wat E6 en E7 peptiden bevat, is groot: bijna 3 ml, waarbij vele vervelende bijwerkingen van pijn en zwelling ontstaan. In het kader van de ontwikkeling van een huidtest om een HPV specifieke immuun respons aan te tonen is in *hoofdstuk 3* beschreven dat intradermale injectie van HPV16 specifieke peptiden leidt tot de migratie en influx van CD4- en CD8 specifieke T cellen in de huid en toename van HPV specifieke T cellen in het bloed. Deze injecties zouden beschouwd kunnen worden als een “lowdose” of intradermale vaccinatie.

Gezien deze overwegingen en gebaseerd op de resultaten zoals beschreven in dit proefschrift, zou de ontwikkeling van een therapeutisch vaccin ter behandeling van LSIL en HSIL afwijkingen, bestaande uit HPV16E2, E6 en E7 peptiden overwogen kunnen worden. Om de dosering te kunnen verlagen is het de moeite waard om alternatieve routes van vaccinatie (intra- of epidermaal) te exploreren. Aangezien kruisbescherming niet bestaat, pleit dit voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische type-specifieke vaccins, allereerst HPV18.

