

DOI: 10.13376/j.cbls/2020400

文章编号: 1004-0374(2021)01-0077-10

Glypican-3结构、生物学功能及其 肝细胞癌靶向治疗研究进展

江舒雅¹, 陈春², 付静^{3*}, 陈啸飞^{3,4*}

(1 海军军医大学基础医学院, 上海 200433; 2 上海交通大学附属第九人民医院药剂科, 上海 201999; 3 海军军医大学附属东方肝胆外科医院, 生物信号转导研究中心, 上海 200438; 4 海军军医大学药学院, 上海 200433)

摘要: 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一, 但现有治疗方法效果均不甚理想。磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (glypican-3, GPC3)是肝癌诊断的特异性生物标志物, 也是HCC靶向治疗的潜在靶标。近年来, 针对GPC3蛋白的靶向治疗包括抗体、抗体-药物偶联物(ADC)、免疫毒素、肿瘤疫苗、靶向肽、嵌合抗原受体、基因治疗等, 并且以其为靶点进行了大量药物的研发和细胞治疗研究, 其中有一些已经进入了临床试验, 如GPC3人源化单克隆抗体GC33、GPC3多肽疫苗、以GPC3为靶点的嵌合抗原受体修饰T细胞(CAR-T)等。可见, 基于GPC3的HCC靶向治疗已经成为目前的研究热点。该文将从GPC3的分子结构、生物学功能及靶向GPC3的HCC治疗方法三个方面进行综述, 以期对GPC3的功能研究与靶向HCC的治疗药物和策略研究提供思路。

关键词: 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3; 肝细胞癌; 靶向治疗

中图分类号: R730.2 文献标志码: A

Advances in structure, biological functions of glypican-3 and its targeted therapy for hepatocellular carcinoma

JIANG Shu-Ya¹, CHEN Chun², FU Jing^{3*}, CHEN Xiao-Fei^{3,4*}

(1 School of Basic Medicine, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2 Department of Pharmacy, Shanghai 9th People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201999, China; 3 Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200438, China; 4 School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant tumors, but the effect of existing treatment methods is not satisfactory. Phosphatidylinositol proteoglycan-3 (GPC3) is a specific biomarker for the diagnosis and a potential target molecule for targeted therapy of HCC. In recent years, targeted therapy for GPC3 protein, includes antibodies, antibody-drug conjugates (ADC) and immunotoxins, tumor vaccines, targeting peptides, chimeric antigen receptors, gene therapy, etc. And with it as the target, a large number of drugs have been developed, some of which have entered clinical trials, such as GPC3 humanized monoclonal antibody GC33, GPC3 polypeptide vaccine, chimeric antigen receptor modified T cells (CAR-T) targeting GPC3, etc. It can be seen that GPC3-based targeted therapy for HCC has become a research hotspot at present. In this review, we will summarize the molecular structure and the biological function of GPC3, and the treatment methods of HCC targeting GPC3.

Key words: glypican-3; hepatocellular carcinoma; targeted therapy

收稿日期: 2020-08-11; 修回日期: 2020-09-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973291); 上海市科委青年科技启明星计划(19QA1411500); 海军军医大学本
科创新孵化基地项目(PH2019101)

*通信作者: E-mail: fujing-724@163.com (付静); xfchen2010@163.com (陈啸飞)

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发病率在所有恶性肿瘤中居第五位, 是一种非常常见的原发性癌症^[1-2], 也是癌症相关死亡的第二大原因, 在撒哈拉以南的非洲和中国东部地区发病率较高^[3]。索拉非尼和瑞戈非尼是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的用于晚期HCC的治疗药物, 但使用这些酪氨酸激酶抑制剂治疗无法显著提高患者的生存率^[4]。即使HCC在早期被诊断, 采用肿瘤切除和肝移植的治疗手段5年生存率也只有47.9%和59.3%^[5]。近年来, 虽然肝细胞癌的治疗取得了一定的进展, 但复发和转移的发生率仍然很高, 患者预后差的情况并没有得到改善^[6]。因此, HCC特异性分子标记对HCC治疗有重要价值^[7]。磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (glypican 3, GPC3)是一种细胞膜锚定糖蛋白, 在HCC中特异性高表达, 是HCC诊断的临床生物标志物, 也是肿瘤靶向疗法的有效靶标。以GPC3为靶标的抗体疗法、疫苗疗法和嵌合抗原受体嵌合T细胞(CAR-T)疗法等治疗手段可能成为HCC靶向治疗的新方向^[8-9]。本文从GPC3的结构、生物学功能及其HCC靶向治疗研究进展等方面进行综述, 以期对GPC3靶向的HCC治疗药物和策略研究提供思路。

1 GPC3的结构

GPC3是硫酸乙酰肝素糖蛋白(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)家族成员之一, 是一种由糖磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜上的癌胚硫酸乙酰肝素(HS)糖蛋白, 其有4种亚型, 本文所述为GPC3 isoform 2。如图1所示, GPC3核心蛋白由580个氨基

酸组成, 相对分子质量为70 kDa。单链GPC3由furin蛋白酶在Arg358/Ser359键处加工, 生成成熟的GPC3, 该GPC3由一个40 kDa的N端亚基和一个30 kDa的C端亚基组成, 这些亚基通过二硫键相连^[10]。成熟的GPC3异二聚体在细胞表面以GPI (糖基磷脂酰肌醇)锚定蛋白的形式存在, 由14个保守的半胱氨酸残基来维持整体的三维结构, 两条HS链附着在靠近细胞膜的C末端区域。GPC3在胎盘和胎儿组织(例如肝、肺和肾)中大量表达。然而, 其表达在成年人器官中显著降低^[11-12]。GPC3是由蛋白质、脂质和糖三者共价连接形成的复杂糖复合物, 参与多种信号通路, 发挥重要生物学功能。基于GPC3的结构特点将其作为HCC治疗的靶点, 能够为HCC的靶向治疗带来希望。

2 GPC3的生物学功能

2.1 Wnt信号通路

大量研究表明, GPC3突变可导致细胞增殖和凋亡失去平衡, 激活Wnt/Frizzled/ β -catenin和FGF/PI3K/AKT通路, 这是HCC发生的重要原因之一^[14]。如图2所示, 典型的Wnt信号转导依赖于 β -catenin, 由Wnt结合两个共受体而引起, 相关共受体为: 七次跨膜G蛋白偶联受体(GPCR) Frizzled (FZD)和单跨膜受体低密度脂蛋白受体相关的蛋白5/6 (LRP5/6)^[15-16]。高表达的GPC3通过乙酰肝素侧链与Wnt蛋白及其受体FZD蛋白结合, 从而促进Wnt-FZD复合物的形成并稳定表达^[17]。2019年, 研究证实, 在GPC3的N端小叶(N-lobe)上有一段富含半胱氨酸的结构域, 能够与Wnt功能区结合, 表明

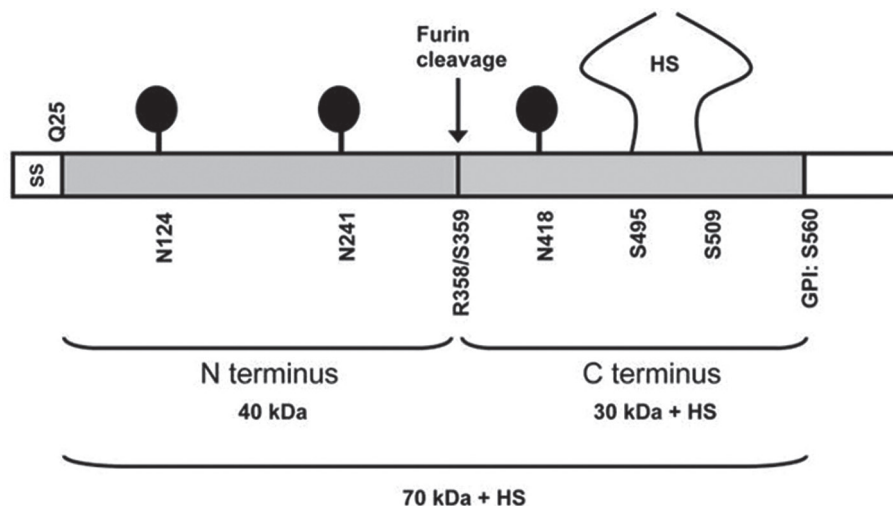


图1 GPC3蛋白分子结构示意图^[13]

GPC3是Wnt协同受体, 可调节HCC细胞中的Wnt/ β -catenin信号转导, 进而促进HCC发展^[18-19]。如图2A所示, 在没有GPC3时, Wnt可以独立激活FZD。当GPC3在HCC中上调时, GPC3充当Wnt协同受体, 通过其N端上的F41和疏水槽将Wnt吸引到细胞表面(图2B)。当FZD在HCC细胞中局部富集, 并且GPC3含量很高时, 可形成Wnt/GPC3/FZD复合物, 导致Wnt信号被放大^[19] (图2C)。

2.2 Hippo/YAP信号通路

研究表明, 在Yes相关蛋白(YAP)高表达的HCC中, GPC3也高表达^[20]。YAP是Hippo激酶途径的下游效应子^[21], Hippo/YAP信号通路被阻断后, YAP的上调可促进HCC的进展: GPC3通过与YAP相互作用, 参与调控Hippo通路^[19]。另外, 在HCC中, YAP的主要上游调节子Lats可以抑制YAP转入核内, 从而调节肝脏干细胞的增殖、分化和成熟^[22]。当敲除Hippo通路上游的肿瘤抑制因子后, YAP磷酸化水平降低, 大量的YAP聚集在细胞核内, 调控下游癌基因的表达, 最终在裸鼠肝脏中可观察到肿瘤的形成。因此, Hippo/YAP信号通路是HCC形成的关键调控机制, GPC3可通过YAP调控Hippo/YAP信号通路, 进而影响HCC发展^[20]。

2.3 生长因子

GPC3可与多种生长因子结合, 从而促进或抑

制细胞的增殖、分化、黏附和迁移等。GPC3富含脯氨酸的N端区域可与胰岛素样生长因子(IGF)-II和IGF-1R特异性结合。GPC3可以IGF-II依赖性方式刺激IGF-1R和下游信号分子细胞外信号调节激酶(ERK)的磷酸化, 敲低HCC细胞中的GPC3可降低IGF-1R和ERK的磷酸化。因此, GPC3通过IGF-II及其受体之间的相互作用以及随后的IGF信号通路的激活发挥促癌作用^[23]。在HCC中还发现, GPC3能够结合碱性生长因子, 例如成纤维细胞生长因子2 (FGF2)^[24]。硫酸酯酶2 (SULF2)在60%的HCC细胞中过度表达, 在体外和体内均可刺激HCC细胞增殖并诱导GPC3表达; 而GPC3可诱导FGF2与HCC细胞上的受体结合, 进而激活Wnt/B-catenin信号通路, 增强SULF2的致癌作用, 敲低GPC3的表达可抑制FGF2与受体的结合^[25]。该研究表明, FGF2和GPC3之间存在相互作用, 在HCC的发展中发挥重要作用。

2.4 RNA

长链非编码RNA (lncRNA), 如HOXA簇反义RNA2 (HOXA-AS2), 在HCC发生发展过程中发挥重要作用。Zhang等^[26]采用实时荧光定量PCR检测、生物信息学和荧光素酶报告基因检测法等研究发现, GPC3在HCC中表达上调, 并与miR-520c-3p表达呈负相关, 与HOXA-AS2表达呈正相关。该研

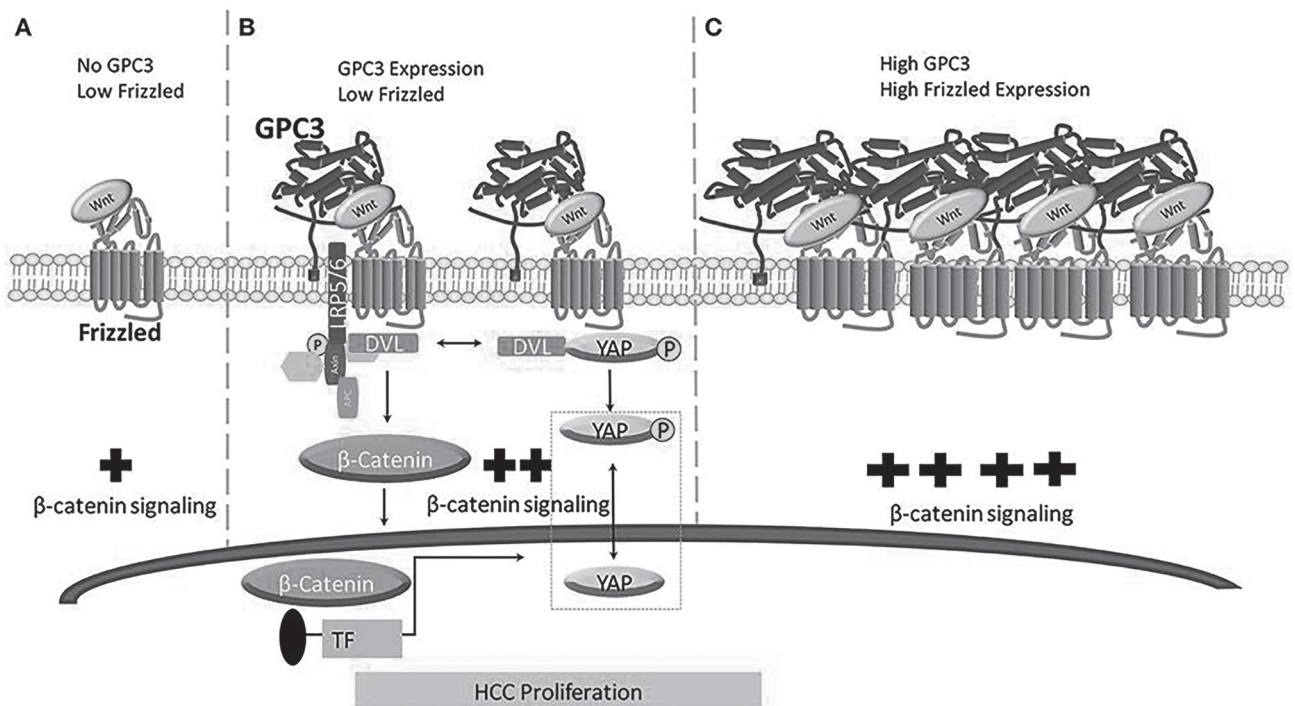


图2 GPC3在Wnt信号通路中的作用^[19]

究结果表明, HOXA-AS2/miR-520c-3p/GPC3轴可能在HCC进展的调节中发挥重要作用, 可作为HCC的生物标志物和治疗靶点。

microRNA (miRNA)在HCC发展中也发挥重要作用。Cartier等^[27]确定了10个新的可调控肝细胞中GPC3表达的microRNA, 其中miR-4510、miR-203a-3p、miR-548aa、miR-376b-3p和miR-548v可抑制GPC3的表达, 进而抑制肿瘤细胞的增殖。miR-4510的肿瘤抑制作用是通过直接靶向GPC3 mRNA和使Wnt/ β -catenin信号通路失调来实现的。此外, miR-4510上调了几个肿瘤抑制基因的表达, 同时降低了其他原癌基因的表达, 对抑制HCC进展起重要作用。

3 靶向GPC3的HCC治疗方法

3.1 抗体

近年来, 研究人员针对GPC3合成了多种类型的抗体, GC33 (Codrituzumab)是一种重组人源化单克隆抗体, 能与GPC3高亲和力结合^[28], 并与自然杀伤(NK)细胞中的受体CD16/Fc γ RIIIa相互作用, 诱导抗体依赖性细胞毒性作用(ADCC)^[29]。美国和日本科学家针对GC33进行了I期临床试验, 通过给晚期HCC患者每周静脉注射剂量递增的GC33 (2.5~20 mg/kg)/GC33 (5.0~20 mg/kg), 以确定GC33的最大耐受剂量, 从而指导进一步的研究。研究表明, GC33的耐受性高达20 mg/(kg·wk), 具有良好的安全性, 没有剂量限制毒性; 同时, 在血清样品中测量药代动力学特征, 发现与10.0 mg/kg和20.0 mg/kg的剂量水平相比, 5.0 mg/kg的剂量清除率更高、半衰期更短, 表明存在非线性消除^[30-31]。随后, 对先前全身治疗失败的晚期肝癌患者进行了随机、安慰剂对照、双盲、多中心II期临床试验, 虽然临床试验结果未达到预期目标, 没有发现GC33对肝癌有治疗效果, 但选择高剂量的GC33或表达高水平GPC3或CD16可能会改善预后^[32]。免疫组织

化学(IHC)分析结果显示, 缺少GPC3或CD16将导致治疗效果丧失^[33]。根据这一结果, 可以考虑更加精确地使用GC33以治疗肝癌患者: 将C-IBP (case-control Indian buffet process)方法应用于II期临床研究中, 找出在多种因素的干扰下, 能够对GC33治疗有反应的预测性和预后生物标记物, 以挑选出能够被有效治疗的患者^[34]。

如表1所示, 除GC33外, 目前还研发了其他几种结合GPC3的抗体。YP7是一种表位与GC33表位重叠的小鼠mAb (单克隆抗体)^[35], 其识别C端表位但不抑制Wnt信号转导。Phung等^[36]通过将合成肽法和高通量流式细胞术筛选相结合, 有效地分离到了杂交瘤细胞, 并通过实验证明YP7在裸鼠中表现出显著的抑制HCC异种移植肿瘤生长的作用。Feng等^[37]筛选了人重链可变域抗体HN3, 发现其对细胞表面的GPC3分子具有高亲和力($K_d = 0.6$ nmol/L)。HN3抑制了GPC3阳性细胞的增殖, 并在裸鼠中显著抑制HCC异种移植肿瘤的生长。HN3作用的潜在机制可能是通过YAP信号转导, 将细胞周期阻滞在G₁期。此外, GPC3的HS靶向抗体HS20可以抑制肝细胞生长因子(HGF), 通过调节HCC细胞的迁移和侵袭来治疗HCC。HS20抗体可识别GPC3上的HS链, 从而阻断Wnt/ β -catenin信号转导, 抑制裸鼠体内Wnt3a依赖性细胞增殖和HCC异种移植肿瘤生长, 在体内具有有效的抗肿瘤活性, 且无严重毒性^[38]。另外, 2017年, Ishiguro等^[39]研发的双特异性抗体ERY974已进入临床试验, ERY974的两条重链分别来自抗GPC3抗体(clone GC33)和抗CD3抗体(clone CE115), 可特异性结合GPC3和CD3, 从而特异性地抑制表达GPC3抗原的肿瘤生长。

3.2 抗体-药物偶联物(ADC)和免疫毒素(immunotoxin)

Fu等^[40]筛选了三种针对HCC细胞系的大型药物文库(>9 000种化合物), 发现最有效的药物是DNA破坏剂。选择倍癌霉素SA (Duocarmycin SA)和吡咯

表1 GPC3相关抗体研究

抗体	亲和力(nmol/L)	抗原	形式	NCT号	参考文献
GC33	0.67	C端 (524-563)	mAb	NCT01507168 NCT00976170 NCT00746317	[28]
HN3	0.60	整个蛋白	VH+hFc	-	[37]
YP7	10.00	C端 (511-560)	scFv+Fc	-	[36]
HS20	0.28	硫酸乙酰肝素	mAb	-	[38]
ERY974	0.67	GPC3 & CD3	双特异性抗体	NCT02748837	[39]

并苯并二氮杂二聚体(PBD)作为有效载荷, 构建两个GPC3特定的ADC: hYP7-DC和hYP7-PC。两个ADC在皮摩尔浓度下对一组GPC3阳性癌细胞系均具有抑制作用, 但对GPC3阴性细胞系则不具有抑制作用, 而且吉西他滨与hYP7-DC在体外和体内具有协同作用。此外, hYP7-PC单独治疗可在多种小鼠模型中诱导肿瘤消退, 为HCC提供了靶向GPC3的ADC治疗方法。

重组免疫毒素是抗体的抗原结合结构域与细菌毒素(如假单胞菌外毒素A)结合形成的融合蛋白, 抗GPC3免疫毒素治疗HCC代表了一种新的治疗方法。Gao等^[41]将HN3和YP7的抗体都融合到假单胞菌外毒素A (PE38)的片段上以产生免疫毒素。该研究发现, 免疫毒素可通过双重机制导致肿瘤消退: 通过抗体使癌症信号失活和通过毒素抑制蛋白质合成; 免疫毒素对GPC3阳性的细胞具有特异性细胞毒性, 而且HN3-PE38比YP7-PE38具有更好的抗肿瘤活性。

免疫原性和较短的血清半衰期可能会限制免疫毒素过渡到临床的能力。为此, Wang等^[42]构建了一种重组免疫毒素HN3-mPE24, 其在结构域III中设计了7个点突变以去除免疫原性。接受HN3-mPE24治疗的小鼠中有25%存活至研究结束, 即HCC肿瘤植入后105 d。研究结果表明, HN3-mPE24免疫毒素可导致肝肿瘤消退并延长生存期, 而且对小鼠无明显副作用。Fleming等^[43]将HN3-T20 (经过修饰以去除T细胞表位, 并包含截短的PE结构域II)、HN3-mPE24以及原始的具有野生型PE结构域的HN3-免疫毒素(HN3-PE38)进行了比较, 发现HN3-T20保留了73%的酶活性且有很强的抑制细胞增殖的能力。为了增强HN3-T20的血清半衰期, 他们添加了链球菌白蛋白结合域(ABD), 发现HN3-ABD-T20的血清半衰期比HN3-T20高45倍, 因此含有ABD的HN3-T20免疫毒素有望应用于HCC治疗。

3.3 肿瘤疫苗

GPC3肿瘤疫苗含有肿瘤抗原基因或肿瘤抗原肽, 通过诱导机体特异性细胞免疫和体液免疫, 来激活患者自身免疫反应, 从而攻击肿瘤细胞, 抑制肿瘤生长、转移和复发。Sawada等^[44]将疫苗接种作为HCC患者的辅助治疗, 进行了GPC3肽疫苗的II期临床研究。41例HCC患者接受了手术或射频消融(RFA)后, 又进行了10次疫苗接种, 同期仅接受手术治疗或射频消融的HCC患者作为对照。研究发

现, 接受手术和疫苗接种的25例患者患有GPC3阳性肿瘤, 与仅接受手术的21例GPC3阳性肿瘤患者相比, 该组的复发率显著降低[在1年和2年时分别为24% vs. 48% ($P = 0.047$)和52.4% vs. 61.9% ($P = 0.387$)]。2020年, Taniguchi等^[45]也跟踪了接种疫苗的患者组($n = 35$)和仅接受手术的未接种组($n = 33$)的GPC3免疫组化(IHC)染色、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)诱导和术后血浆GPC3的情况, 发现接种疫苗的患者手术后1年复发率降低了约15%, 5年和8年生存率分别提高了约10%和30%。GPC3 IHC染色阳性的患者更有可能诱发CTL, 并且60%的患者存活超过5年。疫苗作用效果也与血浆GPC3浓度呈正相关, 高浓度GPC3可将5年生存率提高到75%。因此, GPC3阳性的HCC患者进行GPC3疫苗接种可诱导CTL并显著改善预后。

另外, Chen等^[46]通过将XCL1趋化因子与GPC3融合, 构建了XCL1-GPC3融合分子HCC疫苗。与GPC3免疫小鼠相比, mXCL1-GPC3免疫小鼠的肿瘤形成和生长被显著抑制。在mXCL1-GPC3免疫后, 小鼠肝脏中IFN γ 、粒酶B、IL18、CCL5、CXCL19和XCL1增多, 并且对GPC3特异性CD8⁺T细胞、NK细胞和NKT细胞的浸润增加; 此外, 与抗PD-1联用可进一步增强这些免疫细胞的抗肿瘤作用。在3例HCC-PDX模型中的研究证实, hXCL1-GPC3可诱导抗HCC作用。因此, XCL1-GPC3可能是一种很有前景的疫苗, 可弥补HCC免疫治疗检查点阻断治疗方面的不足。

综上所述, GPC3肿瘤疫苗能在患者体内诱导GPC3特异性的免疫应答, 使其对GPC3肝癌细胞产生特异性杀伤作用, 有望成为一种新型的、安全有效的靶向治疗方法。另外, GPC3疫苗在肝癌高危人群中也有预防HCC的作用。Chen等^[47]研究的GPC3纳米疫苗LPMAN-GPC3/CL097可有效地靶向幼稚T细胞所在的引流淋巴结, 当产生癌前肝细胞时, 可诱导特异性T细胞免疫, 清除表达GPC3的肿瘤干细胞或肿瘤细胞。因此, 当肝硬化中出现恶性癌前病变结节时, 使用LPMAN-GPC3/CL097可以预防HCC的发展。

3.4 靶向肽

GPC3靶向肽不仅有助于诊断HCC, 还能在疾病的治疗方面发挥作用。Wang等^[48]开发了一种GPC3靶向肽L5 (序列: RLNVGGTYFLTRQ), 采用5-羧基荧光素(FAM)和18F-氟化物进行了标记。他们通过细胞结合测试、MicroPET/CT成像和体外

细胞摄取实验,发现FAM-L5和18F-AIF-NODA-MP-6-Aoc-L5可以与HepG2细胞牢固结合,从而在体外和体内选择性靶向高表达GPC3的HCC。18F-AIF-NODA-MP-C6-L5有望成为在体内清晰地观察HCC肿瘤组织的GPC3靶示踪剂。Zhang等^[49]设计了一种新型的GPC3靶向肽(序列: DYEMHL-WWGTEL, 表示为IPA),并通过研究发现,IPA相对于已报道的YP具有更高的结合能力,肽封闭和siRNA实验进一步证明了IPA的特异性;通过IPA在HepG2和Huh-7细胞膜上的局部锚定以及GPC3的过表达,以及对GPC3阳性(HepG2)和阴性(U87)异种移植小鼠进行观察,发现设计的IPA具有理想的GPC3靶向能力。

纳米靶向药物是提高药物输送效率的创新策略, Feng等^[50]成功地利用纳米载体和GPC3特异性肽来包封索拉非尼,显著提高了包封效率,促进了HCC异种移植肿瘤的消退,为靶向药物递送带来了希望。Mu等^[51]也开发了一种GPC3特异性的纳米药物载体,制备了GPC3靶向肽、索拉非尼和IR780共载脂质体(GSI-Lip),来探讨GPC3靶向策略对化疗-光热联合治疗的影响。

3.5 嵌合抗原受体(CAR)

CAR是经过工程改造的受体,可将定义的特异性移植到免疫效应细胞(通常为T细胞)上,并增强T细胞功能^[52]。第一代CAR将scFV区与激活抗原特异性T细胞的CD3 ζ 胞内信号区连接。第二代和第三代CAR-T细胞在第一代的基础之上加入了一个或两个共刺激分子,包括与嵌合CD3- ζ 融合的嵌合CD28信号域^[53]或以4-1BB作为共刺激信号^[54],从而增强CAR-T细胞的活化、增殖和生存能力。除了CD28和4-1BB,其他共刺激分子,诸如ICOS、OX-40、CD40、CD27,已经在多种临床前模型中进行测试^[55]。第四代CAR-T细胞保留了第三代的共刺激信号,还进一步增加了表达细胞因子(IL-12、IL-15等)的基因,被称为TRUCK (T cell redirected for universal cytokine-mediated killing) T细胞。虽然CAR-T细胞在治疗CD19阳性血液系统恶性肿瘤方面临床应用很成功^[56-58],但是对实体瘤的疗效依然有限。

为了开发针对实体瘤的CAR-T疗法, Gao等^[59]研究发现,靶向GPC3的CAR-T细胞具有强大的癌细胞清除能力,具有良好的HCC治疗前景。为了进一步增强GPC3-CAR-T的杀伤作用, Guo等^[60]研究发现, PD-1的阻断增强了CAR-T细胞对HCC的体内

抗肿瘤活性,改善了载瘤NSG小鼠体内CAR-T细胞的持久性和浸润性,增强了GPC3-CAR-T细胞对移植瘤相关基因表达的抑制作用。此外,将GPC3-CAR-T细胞和索拉非尼在免疫缺陷小鼠模型中联合使用,发现索拉非尼与针对HCC的GPC3靶向CAR-T细胞具有协同增效的治疗效果^[61]。Ma等^[62]提取了靶向GPC3的CAR-T细胞的膜,并将其包被于IR780负载的介孔硅纳米粒子上,该粒子可在激光照射下产生热量和荧光,体外和体内实验均证明其肿瘤靶向能力显著增强。Batra等^[63]通过优化GPC3-CAR-T中的协同刺激,选择了包含4-1BB共刺激内域(GBBz)的第二代GPC3-CAR-T进行开发,并增加了编码IL-15、IL-21的基因,结果表明IL-15和(或)IL-21的过表达增强了GPC3-CAR-T细胞对HCC的抗肿瘤特异性。2020年, Shi等^[64]初步证明了GPC3-CAR-T细胞治疗的安全性,并且将其应用于晚期肝癌患者后3年、1年和6个月的总生存率分别为10.5%、42.0%和50.3%,初步证明了其抗肿瘤作用。

截至2020年5月24日, <https://clinicaltrials.gov/>网站已注册13种针对GPC3的CAR-T疗法。如表2所示,其中11项研究提供了有关当前状态的信息:2项已经完成,6项正在进行中,2项正在准备中,1项已撤回。

虽然CAR-T疗法的作用在临床上已经被证实,但是其有一定副作用,如非靶点效应、细胞因子风暴等。嵌合抗原受体修饰的NK细胞代表了一种很有前途的治疗方法,已有多项研究证明了GPC3特异性NK细胞有优良的安全性和有效性^[65-66]。Yu等^[65]建立了NK-92/9.28.z细胞系,在具有高和低GPC3表达的多种HCC异种移植瘤中观察到了其有效的抗肿瘤活性,包括肿瘤细胞增殖减少和凋亡增加。另外,肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)在肿瘤进展、免疫逃逸和治疗抵抗中发挥重要作用,HCC疾病进展与免疫微环境有密切关系。GPC3还可通过直接接触或分泌来调节NK细胞功能,通过进一步研究GPC3,可将其作为改善免疫微环境从而治疗HCC的先导化合物^[67]。以上基于GPC3的靶向治疗方式简要总结为图3。

4 展望

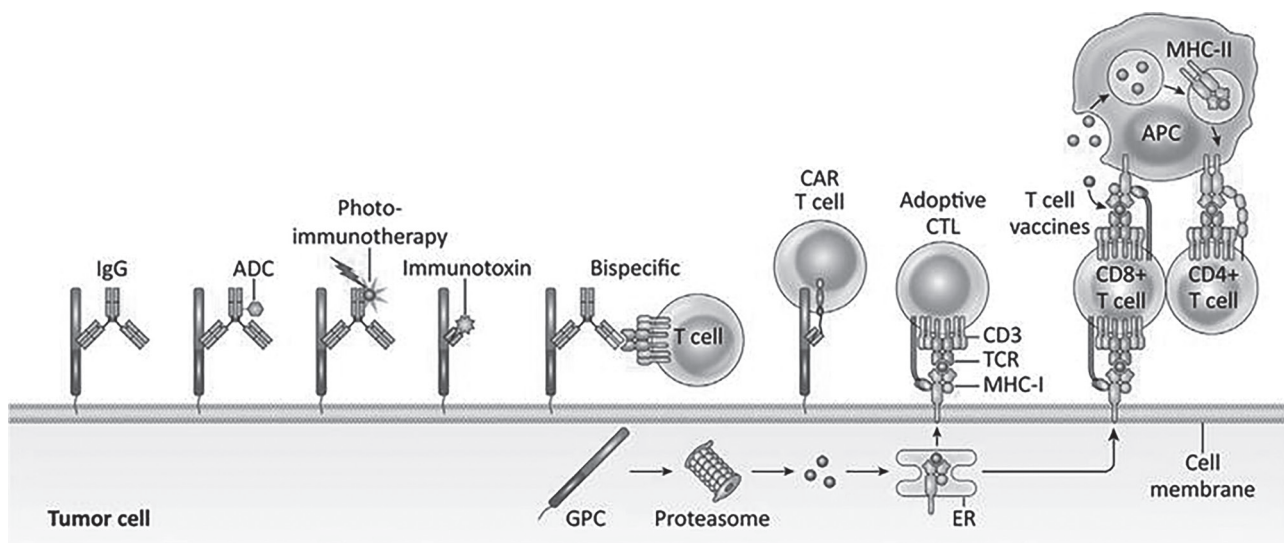
自1997年GPC3被发现并作为HCC的新标志物以来,其结构、生物学功能和靶向治疗方面已取得显著进展,但相关研究还不够深入。首先,在GPC3结构方面,其糖基化位点、结合区域、空间构象等

都需要进一步开展结构生物学方面的系统研究。其次, 在生物学功能方面, GPC3/Wnt/FZD信号通路、肿瘤抗原表达的异质性以及GPC3在HCC中的

可变剪接变体等尚未阐明^[19]; 而在临床上, GPC3的表达量、在膜上与胞内的分布和HCC预后的关系亟待深入研究, 其与HCC免疫微环境的相互作用及

表2 基于GPC3的CAR-T疗法

NCT号	题目	状态	疾病	分期	日期
1	NCT02723942 针对GPC3阳性HCC的CAR-T细胞免疫疗法	完成	肝细胞癌	I / II	2016年3月31日
2	NCT03198546 GPC3-T2-CAR-T细胞用于表达GPC3的癌症免疫治疗	招聘中	肝细胞癌 鳞状细胞肺癌	I	2017年6月26日
3	NCT04121273 靶向GPC3的CAR-T细胞治疗GPC3阳性的晚期HCC	招聘中	肝细胞癌	I	2019年10月9日
4	NCT03130712 基于肿瘤内注射治疗晚期HCC(GPC3-CART)研究GPC3 靶向T细胞	未知状态	肝细胞癌	I / II	2017年4月26日
5	NCT03084380 靶向GPC3的CAR-T治疗GPC3阳性晚期肝细胞癌(HCC)	尚未招聘	肝细胞癌	I / II	2017年3月20日
6	NCT02395250 靶向GPC3的CAR-T治疗晚期HCC患者	完成	肝细胞癌	I	2015年3月23日
7	NCT02715362 GPC3重定向自体T细胞治疗晚期HCC的研究	未知状态	肝细胞癌	I / II	2016年3月22日
8	NCT03884751 靶向GPC3的嵌合抗原受体T细胞	招聘中	肝细胞癌	I	2019年3月21日
9	NCT03980288 靶向GPC3的第四代嵌合抗原受体T细胞	招聘中	晚期肝细胞癌	I	2019年6月10日
10	NCT02905188 用于肝细胞癌(GLYCAR)的GPC3特异性嵌合抗原受体 T细胞	招聘中	肝细胞癌	I	2016年9月19日
11	NCT04377932 表达白细胞介素-15、靶向GPC3的特异性嵌合抗原受 体T细胞在小儿实体瘤的研究	尚未招聘	肝癌 横纹肌肉瘤 恶性横纹肌样瘤 脂肪肉瘤 肾母细胞瘤 卵黄囊肿瘤	I	2020年5月7日
12	NCT04093648 T细胞共表达第二代GPC3特异性嵌合抗原受体与细胞 因子白细胞介素-21和15作为肝癌患者的免疫疗法 (TEGAR)	撤回	肝细胞癌 肝母细胞瘤	I	2019年9月18日
13	NCT02932956 小儿实体瘤患者T细胞中表达的GPC3特异性嵌合抗原 受体(GAP)	招聘中	肝癌	I	2016年10月13日



ADC: 抗体-药物偶联物; CAR: 嵌合抗原受体; CTL: 细胞毒性T淋巴细胞; TCR: T细胞受体; MHC: 主要组织相容性复合体; APC: 抗原呈递细胞; ER: 内质网。

图3 基于GPC3的HCC靶向治疗方式^[8]

影响仍未阐明。最后,在靶向治疗方面,虽然部分抗GPC3抗体、肿瘤疫苗、CAR-T等已进入临床试验阶段,但仍需更深入的研究证实其安全性及临床应用价值,而且某些试验出现了失败,目前尚无上市药物报道。靶向GPC3基因的miRNA、shRNA及siRNA的基因治疗也仍处在探索中。现有的多肽都是探针或者靶向载体,具有治疗作用的小分子药物还未研发成功。现有研究也缺乏与PD-1免疫检查点的结合。因此,深入研究GPC3促进HCC发展的分子机制,阐释其在HCC免疫微环境中发挥的作用,并进一步推进基于GPC3的靶向治疗,发展新型的联合治疗策略或药物,可能会显著提升HCC患者的治疗效果与预后生存指标。

[参 考 文 献]

- [1] Galle PR, Forner A, Llovet JM, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2018, 69: 182-236
- [2] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2018, 391: 1301-14
- [3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 87-108
- [4] Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2017, 389: 56-66
- [5] Menahem B, Lubrano J, Duvoux C, et al. Liver transplantation versus liver resection for hepatocellular carcinoma in intention to treat: an attempt to perform an ideal meta-analysis. *Liver Transpl*, 2017, 23: 836-44
- [6] Dhir M, Melin AA, Douaiher J, et al. A review and update of treatment options and controversies in the management of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*, 2016, 263: 1112-25
- [7] Ren Z, Li A, Jiang J, et al. Gut microbiome analysis as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for early hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2019, 68: 1014-23
- [8] Li N, Gao W, Zhang Y, et al. Glypicans as cancer therapeutic targets. *Trends Cancer*, 2018, 4: 741-54
- [9] Fleming B, Ho M. Glypican-3 targeting immunotoxins for the treatment of liver cancer. *Toxins*, 2016, 8: 274
- [10] De Cat B, Muyldermans S, Coomans C, et al. Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell survival, Wnt signaling, and gastrulation movements. *J Cell Biol*, 2003, 163: 625-35
- [11] Filmus J, Capurro M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS J*, 2013, 280: 2471-6
- [12] Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biol*, 2008, 9: 224
- [13] Ho M, Kim H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*, 2011, 47: 333-8
- [14] Wang L, Yao M, Pan L, et al. Glypican-3 is a biomarker and a therapeutic target of hepatocellular carcinoma. *Hepatob Pancreat Dis*, 2015, 14: 361-6
- [15] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell*, 2017, 169: 985-99
- [16] Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 11-26
- [17] Capurro M, Martin T, Shi W, et al. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *J Cell Sci*, 2014, 127: 1565-75
- [18] Li N, Wei L, Liu X, et al. A frizzled-like cysteine-rich domain in glypican-3 mediates wnt binding and regulates hepatocellular carcinoma tumor growth in mice. *Hepatology*, 2019, 70: 1231-45
- [19] Kolluri A, Ho M. The role of glypican-3 in regulating Wnt, YAP and hedgehog in liver cancer. *Front Oncol*, 2019, 9: 708
- [20] Lu L, Li Y, Kim SM, et al. Hippo signaling is a potent *in vivo* growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 1437-42
- [21] Dong J, Feldmann G, Huang J, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell*, 2007, 130: 1120-33
- [22] Li H, Wolfe A, Septer S, et al. Deregulation of Hippo kinase signalling in human hepatic malignancies. *Liver Int*, 2012, 32: 38-47
- [23] Cheng W, Tseng C, Lin TTC, et al. Glypican-3-mediated oncogenesis involves the insulin-like growth factor-signaling pathway. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 1319-26
- [24] Ho M, Kim H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*, 2011, 47: 333-8
- [25] Lai JP, Sandhu DS, Yu C, et al. Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, 47: 1211-22
- [26] Zhang Y, Xu J, Zhang S, et al. HOXA-AS2 promotes proliferation and induces epithelial-mesenchymal transition via the miR-520c-3p/GPC3 axis in hepatocellular carcinoma. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50: 2124-38
- [27] Cartier F, Indersie E, Lesjean S, et al. New tumor suppressor microRNAs target glypican-3 in human liver cancer. *Oncotarget*, 2017, 8: 41211-26
- [28] Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, et al. Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer. *Cancer Res*, 2008, 68: 9832-8
- [29] Nakano K, Orita T, Nezu J, et al. Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378: 279-84
- [30] Ikeda M, Ohkawa S, Okusaka T, et al. Japanese phase I study of GC33, a humanized antibody against glypican-3 for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 2014, 105: 455-62
- [31] Zhu AX, Gold PJ, El-Khoueiry AB, et al. First-in-man

- phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 920-8
- [32] Abou-Alfa GK, Puig O, Daniele B, et al. Randomized phase II placebo controlled study of codrituzumab in previously treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2016, 65: 289-95
- [33] Chen G, Chen Y, Reis B, et al. Combining expression of GPC3 in tumors and CD16 on NK cells from peripheral blood to identify patients responding to codrituzumab. *Oncotarget*, 2018, 9: 10436
- [34] Zhang Y, Qiu D, Li R, et al. Preparation of a monoclonal antibody against the carcinoembryonic antigen, glypican3. *Mol Med Rep*, 2019, 19: 3889-95
- [35] Feng M, Ho M. Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer. *FEBS Lett*, 2014, 588: 377-82
- [36] Phung Y, Gao W, Man Y, et al. High-affinity monoclonal antibodies to cell surface tumor antigen glypican-3 generated through a combination of peptide immunization and flow cytometry screening. *MAbs*, 2012, 4: 592-9
- [37] Feng M, Gao W, Wang R, et al. Therapeutically targeting glypican-3 via a conformation-specific single-domain antibody in hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 4447-8
- [38] Gao W, Kim H, Feng M, et al. Inactivation of Wnt signaling by a human antibody that recognizes the heparan sulfate chains of glypican-3 for liver cancer therapy. *Hepatology*, 2014, 60: 576-87
- [39] Ishiguro T, Sano Y, Komatsu S, et al. An anti-glypican 3/CD3 bispecific T cell-redirecting antibody for treatment of solid tumors. *Sci Transl Med*, 2017, 9: 14291
- [40] Fu Y, Urban DJ, Nani RR, et al. Glypican-3-specific antibody drug conjugates targeting hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2019, 70: 563-76
- [41] Gao W, Tang Z, Zhang YF, et al. Immunotoxin targeting glypican-3 regresses liver cancer via dual inhibition of Wnt signalling and protein synthesis. *Nat Commun*, 2015, 6: 6536
- [42] Wang C, Gao W, Feng M, et al. Construction of an immunotoxin, HN3-mPE24, targeting glypican-3 for liver cancer therapy. *Oncotarget*, 2017, 8: 32450-60
- [43] Fleming BD, Urban DJ, Hall MD, et al. Engineered anti-GPC3 immunotoxin, HN3-ABD-T20, produces regression in mouse liver cancer xenografts through prolonged serum retention. *Hepatology*, 2020, 71: 1696-711
- [44] Sawada Y, Yoshikawa T, Ofuji K, et al. Phase II study of the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma patients. *Oncoimmunology*, 2016, 5: e1129483
- [45] Taniguchi M, Mizuno S, Yoshikawa T, et al. Peptide vaccine as an adjuvant therapy for glypican-3-positive hepatocellular carcinoma induces peptide-specific CTLs and improves long prognosis. *Cancer Sci*, 2020, 111: 2747-59
- [46] Chen K, Wu Z, Zhao H, et al. XCL1/glypican-3 fusion gene immunization generates potent antitumor cellular immunity and enhances anti-PD-1 efficacy. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8: 81-93
- [47] Chen K, Wu Z, Zang M, et al. Immunization with glypican-3 nanovaccine containing TLR7 agonist prevents the development of carcinogen-induced precancerous hepatic lesions to cancer in a murine model. *Am J Transl Res*, 2018, 10: 1736-49
- [48] Wang Z, Han Y, Huang S, et al. Imaging the expression of glypican-3 in hepatocellular carcinoma by PET. *Amino Acids*, 2018, 50: 309-20
- [49] Zhang Q, Han Z, Tao J, et al. An innovative peptide with high affinity to GPC3 for hepatocellular carcinoma diagnosis. *Biomater Sci*, 2018, 7: 159-67
- [50] Feng S, Zhou J, Li Z, et al. Sorafenib encapsulated in nanocarrier functionalized with glypican-3 specific peptide for targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 184: 110498
- [51] Mu W, Jiang D, Mu S, et al. Promoting early diagnosis and precise therapy of hepatocellular carcinoma by glypican-3-targeted synergistic chemo-photothermal theranostics. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 23591-604
- [52] Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21: 215-23
- [53] Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances *in vivo* persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res*, 2006, 66: 10995-1004
- [54] Song D, Ye Q, Carpenito C, et al. *In vivo* persistence, tumor localization, and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB). *Cancer Res*, 2011, 71: 4617-27
- [55] Zhao R, Cheng L, Jiang Z, et al. DNAX-activating protein 10 co-stimulation enhances the anti-tumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells. *Oncoimmunology*, 2019, 8: e1509173
- [56] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *New Engl J Med*, 2014, 371: 1507-17
- [57] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2015, 385: 517-28
- [58] Turtle CJ, Hanafi L, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺: CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*, 2016, 126: 2123-38
- [59] Gao H, Li K, Tu H, et al. Development of T cells redirected to glypican-3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2014, 20: 6418-28
- [60] Guo X, Jiang H, Shi B, et al. Disruption of PD-1 enhanced the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor T cells against hepatocellular carcinoma. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1118
- [61] Wu X, Luo H, Shi B, et al. Combined antitumor effects of sorafenib and GPC3-CAR T cells in mouse models of

- hepatocellular carcinoma. *Mol Ther*, 2019, 27: 1483-94
- [62] Ma W, Zhu D, Li J, et al. Coating biomimetic nanoparticles with chimeric antigen receptor T cell-membrane provides high specificity for hepatocellular carcinoma photothermal therapy treatment. *Theranostics*, 2020, 10: 1281-95
- [63] Batra SA, Rathi P, Guo L, et al. Glypican-3-specific CAR T cells coexpressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8: 309-20
- [64] Shi D, Shi Y, Kaseb AO, et al. Chimeric antigen receptor-glypican-3 T-cell therapy for advanced hepatocellular carcinoma: results of phase I trials. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 3979-89
- [65] Yu M, Luo H, Fan M, et al. Development of GPC3-specific chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Mol Ther*, 2017, 26: 366-78
- [66] Wang W, Zhou G, Zhang W. NK-92 cell, another ideal carrier for chimeric antigen receptor. *Immunotherapy*, 2017, 9: 753-65
- [67] Ben-Shmuel A, Biber G, Barda-Saad M. Unleashing natural killer cells in the tumor microenvironment--the next generation of immunotherapy? *Front Immunol*, 2020, 11: 275