

## 教育セミナー：プロテオミクス熊の巻 2015 総説

### 培養細胞を起点としたバイオマーカー探索と診断応用

荒川憲昭<sup>\*1,2</sup>, 平野 久<sup>1,2</sup>

\*E-mail: arakawa@yokohama-cu.ac.jp

<sup>1</sup>横浜市立大学大学院生命医科学研究科：230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29

<sup>2</sup>横浜市立大学先端医科学研究センター：236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9

(受付 2016 年 4 月 28 日, 改訂 2016 年 5 月 27 日, 受理 2016 年 5 月 30 日)

がんは主要な死因の一つである。近年、プロテオミクス技術が飛躍的に発展しており、がんを早期に検出するための新しい血液バイオマーカーの発見が切望されている。しかし、臨床応用されたバイオマーカーはほとんどない。血清あるいは血漿サンプルのプロテオーム解析は難しく、肝臓が産生するタンパク質が豊富に存在する複雑な生体試料中から、がん細胞が産生する微量タンパク質を同定することは容易でない。一方、がん細胞の培養上清は、「セクリトーム」と呼ばれる、がん細胞が分泌・放出するタンパク質や膜タンパク質の断片などを豊富に含んでおり、バイオマーカー探索研究に役立つと期待されている。ところが、セクリトーム解析を行う際にも、サンプル調製から、候補タンパク質の絞り込み、測定系構築に至って様々な工夫が必要である。本論文では、特に、培養細胞を起点としたバイオマーカー探索のための技術的な側面と、利点や欠点についても焦点を当てながら、がん細胞株のセクリトーム解析を通して培われてきた知見を紹介する。

#### 1 序論

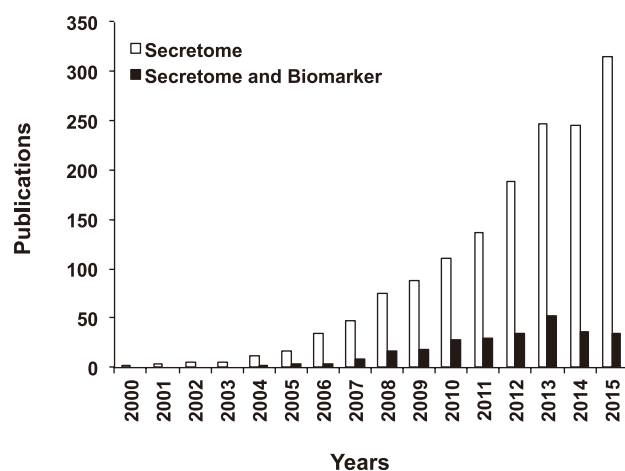
国内外を問わず、がんは主要な死因の一つであり、がんによる死亡数は今後も増え続けると予想される。がんの有効な治療法は少ないが、がんを早期に発見できれば生存率が高まることが期待されることから、がんの早期検出が可能で新しい診断法や検査法の開発が必要とされている。

血液バイオマーカーを用いた検査は患者への侵襲性が低く、がん患者の診断や管理に重要である。近年の質量分析装置とその周辺技術の飛躍的な発達により、微量タンパク質の解析が可能となり、新しいバイオマーカーの探索研究が世界中で盛んに行われている。しかし、日常検査に適応可能な感度と特異度に優れた診断マーカーは極めて少なく、ここ 20 年において、新しく実用化された腫瘍バイオマーカーは多くない<sup>1)</sup>。バイオマーカーは患者の血液サンプルから探索するのが最も効率的であると思われるが、血清や血漿のプロテオーム解析は容易ではない。血液には肝臓から作られるタンパク質が豊富に存在し、血液サンプルに含まれるタンパク質の 99% がアルブミンやグロブリンを代表とするたった 22 種類のタンパク質により占められる<sup>2)</sup>。残り 1% の中ががん細胞が産生するタンパク質が含まれると考えられるが、がん細胞から産生されたタンパク質は、体内におよそ 6 リットル存在する血液中で希釈され、その結果、肝臓由来タンパク質とがん由来のマーカー

タンパク質の間には 10 桁以上の濃度差が生まれる<sup>2)</sup>。この濃度差が血漿や血清のプロテオーム解析を困難にしており、膨大なコピー数で存在する肝臓由来のタンパク質群の中から、がん細胞が産生する微量タンパク質を直接質量分析装置で検出することは困難である。

一方、がん細胞の培養上清は、「セクリトーム (secretome)」と呼ばれる、がん細胞が分泌・放出するタンパク質や膜タンパク質の断片などを豊富に含んでおり、また血液サンプルとは異なり様々な組織からの分泌物が混在しないことから、バイオマーカー探索に有用であると期待されている。Fig. 1 は、PubMed 上でヒットする “secretome” という単語を使った論文発表件数を示している。2015 年までに合計 1689 件もの報告例が存在する。セクリトームという言葉は、2000 年の Tjalsma ら<sup>3)</sup> の *Butillus subtilis* の分泌タンパク質の研究から使われ始めた。今日までに微生物からヒト培養細胞まで、セクリトーム研究は年々増加しており、その一部はバイオマーカー研究に利用されている。セクリトームという言葉は、小胞体ーゴルジ体の経路を介して細胞外に放出される可溶性タンパク質だけでなく、細胞外基質タンパク質や膜タンパク質の切断片なども含めた総称として使われている<sup>4)</sup>。

私達は、これまでに卵巣明細胞腺がんのバイオマーカーを探索する目的で培養細胞株や血清のプロテオーム解析から疾患に特徴的なタンパク質をいくつか見いだしたもの



**Fig. 1** Number of secretome publications over the year

Prior to 2016, 1689 and 284 articles were published in PubMed containing the term “secretome” and “secretome and biomarker”, respectively, in the title or abstract.

の<sup>5,6)</sup>, 血清検体を解析すると診断マーカーとしての有用性は低いものばかりであった。これらのタンパク質の特徴を調べてみると, 細胞から効率良く血流に乗るのかどうか疑わしいものであったり, 健康人の血液中にもある程度の量で存在するようなものだったりすることがわかり, これらの知見から, 血液検査に適さないタンパク質の基準を定めることができた。そこで, がん培養細胞株のセクリトームに焦点を当てることとし, ようやく臨床応用を期待できる感度と特異度を備えたバイオマーカー候補タンパク質を同定することができた<sup>7)</sup>。

卵巣がん, 肝細胞がん, あるいは前立腺がんの細胞株培養上清からは, cancer antigen 125 (carbohydrate antigen 125, CA125), alpha fetoprotein (AFP), prostate specific antigen (PSA) といった各組織がんの代表的マーカータンパク質が特徴的に検出される。したがって, がん細胞培養上清には, 既存マーカーに代わる, あるいは既存マーカーの弱点を補完するような新しいマーカーがまだまだ存在すると期待される。しかし, セクリトーム解析から血液検査に有用なタンパク質を見いだすには, サンプル調製, 候補タンパク質の絞り込み, 測定系構築など様々な工夫が必要である。本論文では, これまで行われてきたがん細胞株のセクリトーム解析における技術的な工夫点を紹介し, それらの利点, 欠点について述べる。

## 2 セクリトーム解析のための細胞培養

臨床検体とは異なり, 細胞株の培養上清は持続的にサンプルを回収することが可能である。セクリトーム解析では, 血中高濃度タンパク質に阻害されることなく, 細胞が分泌する微量タンパク質を再現良く分析することが可能になるが, いくつかの注意点が存在する。

がん細胞を培養する際には, 一般的にウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) を培地に添加するが, セクリトーム解析では FBS が混在すると分泌タンパク質の解析が困難になることから, 無血清培地で細胞培養を行う。しかし, 細胞にとっては培地中の血清は重要な役割を果たしており, 血清飢餓の状態では, 細胞の代謝活性は停止方向に向かい, 増殖速度の低下, 場合によってはアポトーシス経路の活性化を引き起こす。そのため, セクリトーム解析を行う前には, 使用する細胞を注意深く観察しながら, なるべく細胞にストレスのかからない無血清培養の条件を検討しなければならない。

多くのがん細胞のセクリトーム研究では, あらかじめ 10% FBS を含む推奨培地中で 60–80% コンフルエントに到達するまで細胞を増殖させた後に, リン酸緩衝生理食塩水もしくは無血清培地で細胞を洗浄して FBS を除去し, 無血清培養に切り替えることを行っている。無血清培養の期間は 24 時間から 72 時間程度であることが多く, その間に細胞死が起きていないか注意深く観察する必要がある。Mbeunkui ら<sup>8)</sup> は, がん細胞の無血清培養上清中の  $\beta$ -アクチンおよび  $\beta$ -チューブリンを測定することで, 細胞の自己溶解をモニタリングし, 当該細胞株の無血清培養における時間の最適化を行っている。Gunawardana ら<sup>9)</sup> や Sardana ら<sup>10)</sup> は, 動植物の抽出物を含まない, CHO 細胞用の無タンパク質化学培地 (Chemically-defined CHO medium) を用いて, 卵巣がんや前立腺がんの細胞株を培養し, 代表的な分泌タンパク質であるカリクレイン類 (kallikrein [KLK] 3, KLK5, KLK6, および KLK10) の量と, 細胞死の指標である乳酸デヒドロゲナーゼの活性を調べ, これらの比率から無血清培養の条件を最適化し, セクリトーム解析を行っている。

私達は, 4 nM の上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) を添加した無血清培地を用いて卵巣がん細胞株のセクリトーム解析を行った。卵巣がん細胞株では, 無血清培養における細胞の増殖低下は EGF 添加によって抑制され, さらに得られるタンパク質量も増加した (Fig. 2)。この条件で培養した培養上清からは, CA125 や cytokeratin 19 fragment (CYFRA), KLK6 といった既存の卵巣がんマーカーの分泌発現が確認できた<sup>7)</sup>。私達が新規卵巣がんマーカー候補タンパク質として同定した tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) や growth and differentiation factor 15-derived propeptide (GDDP) は, FBS 濃度を下げると分泌量も低下するが, EGF を添加することで大幅な低下が抑えられる (Fig. 2)。セクリトーム解析を行う際には, 血清の代わりとなる増殖因子を添加することも検討すべき項目であると考えられる。

Colzani ら<sup>11)</sup> の乳がん細胞株のセクリトーム解析では, 代謝標識法を用いて分泌タンパク質を分析している。重水

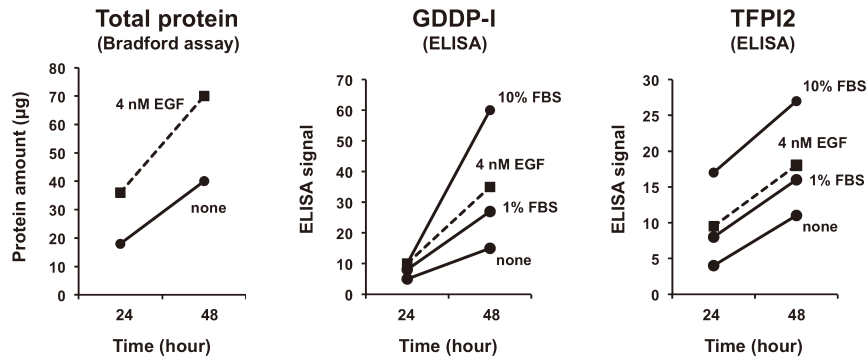


Fig. 2 Effect of serum and growth factor on protein level in the cell culture medium

Ovarian cancer cell line OVISE was cultured in a medium containing the indicated concentration of FBS or EGF for 24 or 72 hr. The total amount of proteins and the concentrations of the biomarker candidates were measured by the Bradford protein assay and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), respectively.

素化バリンの培地を用いることで、10% FBS 存在下で細胞培養を行うことが可能になり、検出されるペプチドが安定同位体標識されているかどうかを見ることで、それが細胞由来なのか、あるいは FBS 由来なのかを識別することができる。

### 3 分泌タンパク質の濃縮法

細胞から分泌・放出されたタンパク質は培地中で大幅に希釈されることから、セクリトーム解析ではタンパク質濃縮は重要なステップである。よく使われている方法は、沈殿、凍結乾燥、限外ろ過の3種類である。

Chevallet らは<sup>12)</sup>、マウスマクロファージの無血清培養上清を用いて、限外ろ過、珪藻土や疎水性ビーズへの吸着法、フェノール抽出やトリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) 沈殿法のタンパク質回収率を二次元電気泳動にて比較検討している。これら方法の中では、TCA 沈殿が回収率が最も高く、それも微量の N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (NLS) 存在下で TCA 沈殿を行うことが重要であると報告している。この方法を用いて、Makridakis らは<sup>13)</sup>、膀胱がん細胞株のセクリトーム解析を実施しており、secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) や tissue type plasminogen activator (tPA), clusterin といった膀胱がんの活動性に関与するタンパク質を同定している。

Diamandis らは、がん細胞のセクリトーム解析を精力的に行っており、彼らを用いている濃縮方法は凍結乾燥である<sup>10)</sup>。培養上清を重炭酸アンモニウム溶液に対して透析を行うことで脱塩およびバッファー置換した後、凍結乾燥させたものを解析する。この方法を用いて、前立腺がん<sup>10)</sup>、卵巣がん<sup>9)</sup>、膵臓がん<sup>14)</sup> などのがん細胞セクリトーム解析を行い、バイオマーカー候補タンパク質を同定している。

私達が、無血清培養した卵巣がん細胞株の培養上清中のタンパク質を濃縮するために、アセトン沈殿法 (培養上清

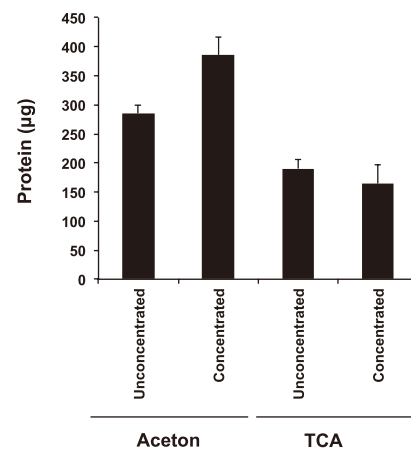


Fig. 3 Comparison of precipitation methods for proteins in cell culture medium

Serum-free medium was harvested after OVISE cells were cultured for 72 hr. TCA precipitation or acetone precipitation was performed against an unconcentrated medium and 10-fold concentrated medium by lyophilization. Prior to conducting the protein assay, the resultant precipitated protein was resolved with urea. Bars represent the mean  $\pm$  Standard Error of three experiments.

の3倍量のアセトンを添加) と TCA 沈殿法 (培養液に終濃度 10% の TCA を添加) を比較した結果、アセトン沈殿の方が回収率が高かった (Fig. 3)。さらに、培養上清を凍結乾燥後、4 M 尿素溶液で再懸濁した 10 倍濃縮培養液に対してアセトン沈殿を行うと、廃液量を減らすことができるとともに、タンパク質回収率もより高くなることがわかった。私達はこの方法を用いて卵巣がんのセクリトーム解析を実施し、4 種類の卵巣明細胞腺がん細胞株から約 1900 種類のタンパク質を同定することができた<sup>7)</sup>。

これらの他にも、限外ろ過カラム<sup>15)</sup> やホロファイバー<sup>16)</sup>、レクチンを使って濃縮する方法<sup>17)</sup> もある。

### 4 バイオマーカー候補タンパク質の選別

細胞株の培養上清中からは、患者血液中にも分泌・放出

される可能性があるタンパク質が数多く検出される。しかし、この中で臨床検査に適応できるタンパク質はきわめて少ない。また、がんは複雑で組織ヘテロジェナイティーの高い疾患であり、腫瘍微小環境などの生体内の病変組織の特性を全て保存している細胞株は存在しないことも考慮しなければならない。したがって、血液検査に有用なバイオマーカーを開発するためには、複数の細胞株を解析することはもちろんのこと、がん組織や、腹水、髄液なども分析したり、トランスクリプトーム解析データを利用したりして、培養細胞やプロテオーム解析手法の欠点を補完することが重要であると考えられる。私達は、細胞培養上清中に検出されるタンパク質の中から、以下の基準を満たすタンパク質をマーカー候補として選別することにしている。

- 1) Gene ontology 解析を行い、「分泌タンパク質」あるいは「膜タンパク質」として分類されるタンパク質。
- 2) 患者組織検体を用いた RT-PCR 解析を行い、組織でも

疾患特異的な発現が認められるタンパク質。

- 3) 健常人の血液中における存在濃度が低いと予想されるタンパク質。

健常人の血液中濃度は、バイオマーカーが持つ早期がんの検出感度と深く関係すると考えられ、血液マーカーとしての性能を左右する重要な条件であるだろう。新規バイオマーカーを開発するためには、研究例の少ないタンパク質が研究対象になることもあり、その場合、候補タンパク質の血中濃度は未知であることが多い。私達は、公共データベースを用いることで、候補タンパク質の血中濃度のある程度予想できると考えている。Table. 1 は、現在の臨床検査で利用されている心疾患マーカーおよび腫瘍マーカーの基準値と公共データベース情報を示している。これら既存マーカーの基準値は、数十 pg/mL から数十 ng/mL で設定されており、各マーカータンパク質あるいはペプチドの推定分子量からモル濃度に換算すると、ほとんどが pM レベ

**Table 1** The cutoff values, tissue and plasma expression profiles of the biomarker proteins used in general clinical fields

| Disease                            | Biomarker   | Gene    | Cutoff value       |     | Gene expression (*1) |              | Plasma expres-<br>sion (*2) | Comment   |
|------------------------------------|---|---------|--------------------|-----|----------------------|--------------|-----------------------------|---|
|                                    |   |         | ng/mL              | pM  | Liver                | Other tissue | # Unique peptides           |   |
| Cardiac disease                    | Troponin T  | TNNT2   | 0.014              | 0.4 | no                   | Heart        | 0                           |   |
| Cardiac disease                    | B-type natriuretic peptide (BNP)                                | NPPB    | 0.02               | 5.7 | no                   |              | 0                           |   |
| Lung cancer (small cell carcinoma) | Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP)                          | GRP     | 0.046              | 2.8 | no                   |              | 4                           | cleaved peptide                                     |
| Ovarian cancer, chorionic cancer   | Human chorionic gonadotropin beta (hCG beta)                    | CGB1    | 0.1                | 4.9 | no                   |              | 0                           |   |
| Cardiac disease                    | N-terminal proBNP (NT-proBNP)                                   | NPPB    | 0.1                | 12  | no                   |              | 0                           |   |
| Prostate cancer                    | Prostatic acid phosphatase (PAP)                                | ACPP    | 3                  | 62  | no                   | Prostate     | 0                           |   |
| Lung cancer, ovarian cancer, etc.  | Cytokeratin 19 fragment (CYFRA)                                 | KRT19   | 3.5                | 79  | no                   | Colon        | 11                          | cleaved peptide                                     |
| Prostate cancer                    | Prostate specific antigen (PSA)                                 | KLK3    | 4                  | 139 | no                   | Prostate     | 1                           |   |
| Digestive system cancers           | Carcinoembryonic antigen (CEA)                                  | CEACAM5 | 5                  | 65  | no                   |              | 0                           |   |
| Hepatic cancer                     | Alpha fetoprotein (AFP)   | AFP     | 10                 | 146 | no                   |              | 1                           |   |
| Thyroid cancer                     | Human thyroglobulin (hTG)                                       | TG      | 33.7               | 51  | no                   | Thyroid      | 0                           |   |
| Ovarian cancer                     | Cancer antigen 125 (CA125)                                      | MUC16   | unknown (35 U/mL)  | —   | no                   |              | 0                           |   |
| Hepatic cancer                     | Protein induced by vitamin K absence or antagonist-2 (PIVKA-II) | F2      | unknown (40 mU/mL) | —   | yes                  |              | 118                         | modified protein ( $\gamma$ -Carboxy glutamic acid) |

\*1: representative tissues that abundantly express the biomarker proteins and genes were listed on the basis of the information in the Human Protein Atlas and Gene Cards databases.

\*2: information in the Peptide Atlas database.

ルであることがわかる。すなわち、健康人の血清中で pM 以下で存在することが、血液検査に有用なバイオマーカーの条件の一つであると思われる。次に、Gene Cards (<http://www.genecards.org>) や、Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>) などの公共データベースの情報から、これら既存マーカーの発現プロファイル調べてみると、肝臓がんマーカー protein induced by vitamin K absence or antagonist-2 (PIVKA-II) を除けば、全てが肝臓での発現は極めて低く、発現している組織は限定的であり、組織特異性が非常に高いタンパク質が多い。加えて、Peptide Atlas (<http://www.peptideatlas.org>) 上の登録情報を調べると、血漿中で検出された既存マーカータンパク質のユニークペプチド数は極めて少なく、質量分析装置では容易に検出できない濃度で存在していることが伺える。Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) や CYFRA, PIVKA-II については例外的に検出数が多いが、これらは翻訳産物そのものではなく、疾患特異的な分解や修飾を受けた形態の分子種である。したがって、マーカー候補タンパク質を選別する際には、組織特異性の高いタンパク質に注目することで、高精度なバイオマーカーを効率的に絞り込むことができると考えられ、Peptide Atlas 上にある血漿中での検出例の多いタンパク質については、研究対象から除外するか、分解産物や翻訳後修飾体を対象にするなどの工夫が必要になると思われる。

私達は、このバイオマーカー選別基準を用いて、セクリトーム解析により新規卵巣がんマーカー候補タンパク質を同定した。胎盤特異的な細胞外基質タンパク質として知られている TFPI2 が、卵巣明細胞腺がん由来の細胞株の培養上清に共通して同定され、本バイオマーカーの検査系を構築して検証した結果、健康人や子宮内膜症の患者と比べて卵巣明細胞腺がん患者の血清中で高値であることを見いだした<sup>7)</sup>。さらに、前向きおよび後向きに収集した血清検体を用いて検証した結果、いずれのサンプルセットにおいても、明細胞腺がんの患者血清中で TFPI2 濃度は有意に高く、適正なカットオフ値を設定すれば、その他の組織型の卵巣がんや子宮内膜症を含めた良性腫瘍、子宮体がん、子宮頸がんなどの他の婦人科腫瘍の患者検体の大部分を陰性判別できる、CA125 とは異なる特性を持った新しい卵巣がんマーカーであることがわかった(論文投稿中)。現在、卵巣がんに加えて、前立腺がんや腎細胞がんのセクリトーム解析から同定した様々なバイオマーカー候補タンパク質の血清中濃度を免疫沈降-multiple reaction monitoring 法を用いて臨床評価を進めているが、健康人とがん患者との間で濃度差が小さいタンパク質は、上述した基準から外れる傾向にあり、健康人の血清中濃度は数百 pM 以上と比較的高い傾向にあった。一方、健康人に比べてがん患者で濃度が高く、患者識別能が高かったタンパク質は、健康人血清

中では 70 pM 以下の低い濃度域で存在しており、上述した条件に当てはまった。

## 5 結論

細胞培養上清中で見られる分泌タンパク質や膜タンパク質の断片は、血中にも発現するという仮説をもとに、がん細胞のセクリトーム解析によるバイオマーカー探索研究が繰り返されている。培養上清は血清や血漿などと比較すると複雑性の低いサンプルであり、低コストで再現よく微量タンパク質を解析することが可能である。しかし、セクリトーム解析には培養細胞ならではの制限があり、同定されたタンパク質をいきなり血液検体にて検証すると失敗してしまうことも多い。そのため、組織、腹水、動物モデル、公共データベース情報、文献情報などを駆使して、マーカー候補タンパク質を効率よく絞り込む様々な努力がなされている<sup>4),18)</sup>。

一方で、今回紹介したバイオマーカー選別方法には、バイアスが掛かっていることを忘れてはならない。多くのセクリトーム解析では、分泌タンパク質や膜タンパク質として分類されるタンパク質に焦点を当てているが、細胞から漏洩する細胞内タンパク質や核タンパク質にも注目する価値があるのかもしれない。培養上清中で検出されるタンパク質の中で、gene ontology 情報に基づいて「分泌タンパク質」あるいは「膜タンパク質」として分類できるタンパク質は、30-40%程度である<sup>7),9),10)</sup>。N 末端シグナルペプチドを有するタンパク質は、classical pathway と呼ばれる小胞体-ゴルジ体を通る経路により分泌されるが、シグナルペプチドを持たないタンパク質であっても non-classical pathway と呼ばれる別の経路によって分泌されることが知られている。また、エキソソームによって細胞外に運ばれるタンパク質も存在し、これらのタンパク質は今回紹介したマーカー候補タンパク質の選別基準からは外れてしまう可能性がある。

これまでに、がん細胞のセクリトーム解析から、様々な組織がんの新規血液診断マーカー候補タンパク質が見つかり、多数の論文発表がなされている<sup>4)</sup>。これらの中には、少数の検体を用いた検証実験においては、健康人とがん患者の間に明瞭な濃度差が認められているものも多い<sup>9),10),19),20)</sup>。しかしながら、次の開発ステージである、臨床応用を視野に入れた多施設多数検体を用いた試験に進んだ例は少ない。臨床応用されるマーカーが少ない理由として、Diamandis<sup>21)</sup> は、実用化研究を進める際の適切な検証方法が定義されていないことを問題提起しており、最近、新規マーカーの探索から臨床応用に至るまでの重要事項が欧州のグループから提言された<sup>1)</sup>。バイオマーカーが臨床応用されるまでには、1) 測定法の基本性能試験、2) 当該測定法と臨床検体を用いた事前検証と 3) 臨床性能試験、4)

臨床応用への法的な承認の4つのステージをクリアしなければならない。がん細胞のセクリトーム研究は新規バイオマーカー探索に有効的であるが、それは臨床応用のための長い道のりに入るか入らないかの最初の入り口であることを心に留めておかなければならないだろう。

### 謝 辞

本論文で紹介した内容は、文部科学省イノベーションシステム整備事業の支援の下に行われた研究の中で培った経験やノウハウに基づくものである。増石有祐、木村鮎子、大竹則久、明庭昇平、井野陽子、宮城悦子、上村博司、矢尾正祐（敬称略）をはじめとする共同研究者に感謝する。

著者らに開示すべき利益相反状態は無い。

### 文 献

- Duffy MJ, Sturgeon CM, Soletormos G, Barak V, Molina R, Hayes DF, Diamandis EP, Bossuyt PM. Validation of new cancer biomarkers: a position statement from the European group on tumor markers. *Clin Chem*. 2015;61:809–820.
- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:845–867.
- Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijk JM. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64:515–547.
- Makridakis M, Vlahou A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *J Proteomics*. 2010;73:2291–2305.
- Morita A, Miyagi E, Yasumitsu H, Kawasaki H, Hirano H, Hirahara F. Proteomic search for potential diagnostic markers and therapeutic targets for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Proteomics*. 2006;6:5880–5890.
- Masuishi Y, Arakawa N, Kawasaki H, Miyagi E, Hirahara F, Hirano H. Wild-type p53 enhances annexin IV gene expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *FEBS J*. 2011;278:1470–1483.
- Arakawa N, Miyagi E, Nomura A, Morita E, Ino Y, Ohtake N, Miyagi Y, Hirahara F, Hirano H. Secretome-based identification of TFPI2, a novel serum biomarker for detection of ovarian clear cell adenocarcinoma. *J Proteome Res*. 2013;12:4340–4350.
- Mbeunkui F, Fodstad O, Pannell LK. Secretory protein enrichment and analysis: an optimized approach applied on cancer cell lines using 2D LC-MS/MS. *J Proteome Res*. 2006;5:899–906.
- Gunawardana CG, Kuk C, Smith CR, Batruch I, Soosapillai A, Diamandis EP. Comprehensive analysis of conditioned media from ovarian cancer cell lines identifies novel candidate markers of epithelial ovarian cancer. *J Proteome Res*. 2009;8:4705–4713.
- Sardana G, Jung K, Stephan C, Diamandis EP. Proteomic analysis of conditioned media from the PC3, LNCaP, and 22Rv1 prostate cancer cell lines: discovery and validation of candidate prostate cancer biomarkers. *J Proteome Res*. 2008;7:3329–3338.
- Colzani M, Waridel P, Laurent J, Faes E, Ruegg C, Quadroni M. Metabolic labeling and protein linearization technology allow the study of proteins secreted by cultured cells in serum-containing media. *J Proteome Res*. 2009;8:4779–4788.
- Chevallet M, Diemer H, Van Dorssealer A, Villiers C, Rabilloud T. Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome. *Proteomics*. 2007;7:1757–1770.
- Makridakis M, Roubelakis MG, Bitsika V, Dimuccio V, Samiotaki M, Kossida S, Panayotou G, Coleman J, Candiano G, Anagnou NP, Vlahou A. Analysis of secreted proteins for the study of bladder cancer cell aggressiveness. *J Proteome Res*. 2010;9:3243–3259.
- Karagiannis GS, Pavlou MP, Saraon P, Musrap N, Xie A, Batruch I, Prassas I, Dimitromanolakis A, Petraki C, Diamandis EP. In-depth proteomic delineation of the colorectal cancer exoproteome: Mechanistic insight and identification of potential biomarkers. *J Proteomics*. 2014;103:121–136.
- Kramer M, Pierredon S, Ribaux P, Tille JC, Petignat P, Cohen M. Secretome Identifies Tenascin-X as a Potent Marker of Ovarian Cancer. *Biomed Res Int*. 2015;2015:208017.
- Chiu KH, Chang YH, Liao PC. Secretome analysis using a hollow fiber culture system for cancer biomarker discovery. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834:2285–2292.
- Zhang Y, Tang X, Yao L, Chen K, Jia W, Hu X, Xu LX. Lectin capture strategy for effective analysis of cell secretome. *Proteomics*. 2012;12:32–36.
- Kulasingam V, Pavlou MP, Diamandis EP. Integrating high-throughput technologies in the quest for effective biomarkers for ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:371–378.
- Sarkissian G, Fergelot P, Lamy PJ, Patard JJ, Culine S, Jouin P, Rioux-Leclercq N, Darbouret B. Identification of pro-MMP-7 as a serum marker for renal cell carcinoma by use of proteomic analysis. *Clin Chem*. 2008;54:574–581.
- Vathipadiakal V, Wang V, Wei W, Waldron L, Drapkin R, Gillette M, Skates S, Birrer M. Creation of a Human Secretome: A Novel Composite Library of Human Secreted Proteins: Validation Using Ovarian Cancer Gene Expression Data and a Virtual Secretome Array. *Clin Cancer Res*. 2015;21:4960–4969.
- Diamandis EP. Cancer biomarkers: can we turn recent failures into success? *J Natl Cancer Inst*. 2010;102:1462–1467.

## Cell Culture-based Biomarker Discovery and Clinical Applications

Noriaki Arakawa\*<sup>1,2</sup>, Hisashi Hirano<sup>1,2</sup>

\*E-mail: arakawa@yokohama-cu.ac.jp

<sup>1</sup>Department of Medical Life Science, Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University,  
1-7-29, Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

<sup>2</sup>Advanced Medical Research Center, Yokohama City University, 3-9, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan.

(Received: April 28, 2016; Revised: May 27, 2016; Accepted: May 30, 2016)

Cancer is a leading cause of death. Although recent advances in proteomics technologies have inspired hope that new blood-based biomarkers for early cancer detection will be discovered, few have been introduced to the clinic. Biomarker discovery using plasma or serum is challenging. Detecting cancer cell-derived proteins is extremely difficult in highly complex biological fluids that include an abundance of proteins produced from the liver. On the other hand, a conditioned medium of cultured cancer cells containing an abundance of proteins secreted or released from the cells and those shed from the cell surface, which is referred to as the “secretome”, is a promising source of biomarker discovery. However, obstacles in secretome analysis include sample preparation, effective selection of biomarker candidates, and assay system development. Herein we introduce findings determined via secretome analysis with an emphasis on methodologies developed for biomarker discovery based on culture cell lines and their advantages and disadvantages.

**Keywords:** biomarker; cancer; cell culture; mass spectrometry; secretome.