

Heat shock protein 70 is involved in malignant behaviors and chemosensitivities to cisplatin in uterine cervical squamous cell carcinoma cells.

子宮頸部扁平上皮癌の悪性化およびシスプラチン感受性における
Heat Shock Protein 70 の関与

吉富 恵子

山口大学大学院医学系研究科
情報解析医学系専攻 生殖・発達医科学領域 産科婦人科学分野

平成 25 年 12 月

目次

要旨	3
研究の背景	4
目的	5
方法	5
結果	8
考察	12
結語	14
謝辞	14
参考文献	15

【要旨】

[目的] ヒト子宮頸部扁平上皮癌における発現蛋白をプロテオーム解析した結果、癌で発現が増加している蛋白の1つとして、我々はHeat Shock Protein 70 (HSP70) を同定した。今回、我々は子宮頸癌の悪性化とシスプラチン (CDDP) に対する感受性における HSP70 の役割を検討した。

[方法] ヒト子宮頸癌細胞株 SiHa、SKG II を用い、siRNA 法により HSP70 の発現を抑制したうえで、遊走能、浸潤能、増殖能および細胞周期、アポトーシスを検討した。また CDDP 添加によるアポトーシス誘導における HSP70 の影響を検討した。

[結果] HSP70 発現抑制により増殖能、遊走能、浸潤能は有意に抑制された。HSP70 の発現抑制により細胞周期は S 期および G₂/M 期に停止が認められ、SiHa においてはアポトーシス細胞の割合が有意に増加した。次いで、CDDP 添加下によって誘導されるアポトーシス細胞の割合を検討したところ、SiHa では HSP70 の発現抑制により CDDP の濃度依存性にアポトーシス細胞の割合が有意に増加した。SKG II においては、CDDP 5 μ g/ml でアポトーシス細胞の割合が増加した。さらに、CDDP 5 μ g/ml の添加に加えて HSP70 の発現を抑制することで、アポトーシス細胞の割合は有意に増加した。

[結論] 子宮頸部扁平上皮癌において HSP70 は癌の進展に促進的な役割を果たしており、また HSP70 の発現抑制はシスプラチンに対する化学療法感受性を増強させることが示唆された。

【研究の背景】

我々は最近、ヒト子宮頸部扁平上皮癌および正常扁平上皮における発現蛋白をプロテオーム解析した結果、癌で発現が増加している蛋白を 3 種類同定した [1]。その 1 つが Heat Shock Protein 70 (HSP70, GenBank accession number NM 005345) であった。HSP ファミリーは分子シャペロン蛋白に属している。非ストレス下においては、HSP70 の発現は低いかあるいは検出不能である組織が多いが、種々の物理的・化学的ストレス下ではその発現が増加することが知られている [2]。HSP70 はストレス下では新生タンパクの正しい折りたたみやストレスの蓄積した変性タンパクを補助し、それらの凝集を防ぎ、分子シャペロンとして細胞生存に必要不可欠な役割を担っている [3]。

HSP70 は子宮頸癌を含め、多くの癌種でその発現が増加していることが報告されている [1, 2, 4-7]。また、HSP70 の高発現は膀胱癌や乳癌においては予後不良と相関すると報告されている [7, 8]。よって、HSP70 は悪性腫瘍の進展に機能的な役割を果たしていること示唆される。膵臓癌において HSP70 は細胞増殖を促進、アポトーシスを抑制し [9]、乳癌においてはマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性化によって細胞遊走や細胞浸潤を促進させる [10]。しかしながら、子宮頸癌においては HSP70 は癌の悪性化にどのように関与しているかは分かっていない。

シスプラチン (CDDP) は子宮頸癌に対する化学療法において key drug である。CDDP はミトコンドリアのアポトーシス経路を介してアポトーシスを誘導する [11-13]。HSP70 はミトコンドリアを介したアポトーシス経路のいくつかの段階を抑制していることが報告されており [3, 11-17]、CDDP に対する化学療法抵抗性に HSP70 が関与していることが示唆される。また、HSP70 は直接システイン-カテプシン活性を阻害し、あるいは間接的にリソソームの膜透過性を阻害することで、システイン-カテプシンを介する細胞死から癌細胞を保護することも報告されている [18-20]。よって、子宮頸癌において CDDP によって誘導されるアポトーシスを HSP70 が抑制するかどうかは興味深い。アポトーシスを抑制可能ならば、HSP70 の発現抑制とともに CDDP による治療を行うことは子宮頸癌治療、特に CDDP 抵抗性の患者に対する新しい治療戦略となる可能性がある。以上より、我々は子宮頸癌の悪性化における HSP70 の役割を検討するとともに、HSP70 の発現抑制は CDDP によって誘導されるアポトーシスを増加させるか検討した。

【目的】

ヒト子宮頸部扁平上皮癌における発現蛋白をプロテオーム解析した結果、癌で発現が増加している蛋白の 1 つとして我々は Heat Shock Protein 70 (HSP70) を同定した。今回、子宮頸癌の悪性化とシスプラチン (CDDP) に対する感受性に対する HSP70 の役割を検討した。

【方法】

培養細胞

ヒト子宮頸部扁平上皮癌細胞株である SiHa は、医用細胞資源センター(東北大学、仙台、日本)から得た。SKG II はヒューマンサイエンス振興財団(大阪、日本)から得た。SiHa は不活化した 5 % 胎仔牛血清 (FCS)、ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 100 mg/ml を Eagle's minimal essential medium (Sigma) に添加し用い、37 °C、5 % CO₂ 加湿の環境で培養した。SKG II は不活化し 5 % FCS、ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 100 mg/ml を Ham's F 12 (Sigma, Saint Louis, USA) に添加し用い、同様の環境で培養した。SiHa と SKG II は他の子宮頸癌細胞株 (SKG I, SKG IIIa, BOKU, ME180) と比較し、HSP70 の発現がより高かったため、実験に使用した。

siRNA 法による HSP70 の発現抑制

HSP70 に特異的な siRNA (HSP70-siRNA) とコントロール siRNA (NT-siRNA) は Thermo Scientific Dharmacon 社 (Lafayette, CO, USA) より購入した。使用した HSP70-siRNA は HSP70 遺伝子に対し配列デザインの異なる 4 種類の siRNA が混合されて製造されており、それぞれの配列は以下の通りである。5' - GAGAUCGACUCCCUGUUUG - 3'、5' - GAUCAACGACGGAGACAAG - 3'、5' - GCGCUGAACCCGAGAACA - 3'、5' - GCUCCGACCUGUCCGAAG - 3'。NT-siRNA はヒトの遺伝子において相同性が無い事が確認されている配列で、異なる配列をもった 4 種類の siRNA から製造されており、コントロールとして使用した。

siRNA のトランスフェクションには OPTI-MEM I 培養液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と Lipofectamin™ iMAX reagent (Invitrogen) を使用し、プロトコールに従って実施した。まず、6 well の培養プレートに 1 well 当たり 2×10^5 個の細胞を撒き、30 - 50 % コンフルエントになるまで培養した。250 μ l の OPTI-MEM I 培養液に Lipofectamin™ iMAX reagent を加え、5 分間室

温で静置した。別の 250 μ l の OPTI-MEM I 培養液にそれぞれ HSP70-siRNA と NT-siRNA を加えた。その後、前記 2 種の培養液を混合し 20 分間室温で静置した。トランスフェクション試薬と siRNA の混合物は OPTI-MEM I 培養液を 1.5 ml 含んだ培養プレートに加え、最終 siRNA 濃度を 5 nM とした。これらの細胞は 4 時間培養し、その後培養液を交換した。HSP70 の発現抑制は Western blotting 法で確認した。

Western blotting 法による解析

siRNA 法による HSP70 の発現抑制について検討するために、我々が以前に報告した Western blotting 法により解析した [21]。12.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで同量の総蛋白を電気泳動し、終了後に semi-dry type blotting system で PVDF 膜 (ATTO、東京、日本) に泳動蛋白を転写した。転写した PVDF 膜をブロッキング溶液 [5 % skim milk, 0.1 % Tween-20, Tris-buffer saline (pH 7.5)] にてブロッキングした後、ブロッキング液で希釈した一次抗体 [抗 HSP70 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)] とともに転写膜をインキュベートした。次にブロッキング液で希釈した HRP 標識した二次抗体とともに転写膜をインキュベートした。プロトコールの手順に従って、ECL Western blotting detection system (GE Healthcare) hyperfilm ECL (GE Healthcare) を使用し、E hyperfilm ECL (GE Healthcare) を用いて発現を確認した。

Scratch assay

Scratch assay によって細胞の水平方向の移動能を検討した。siRNA をトランスフェクションし、24 時間後、トリプシン処理した細胞を 24 well の培養プレートに 1 well 当り 2×10^5 個の細胞を培養開始した。細胞は増殖による影響を最小化するために FCS 無添加の培地で 24 時間培養した。黄色のピペットチップを用いて細胞層に引っ掻き傷をつけ、そのあと FCS 無添加の培養液で 3 回洗浄した。その後、細胞は FCS 無添加の培養液で 24 時間培養し、移動した細胞を位相差顕微鏡でモニターした。写真は引っ掻き傷の同じ部位で 0 時間と 24 時間後に撮影し、引っ掻き傷の幅を計測した。平均距離は 3 回の異なる実験から得た。

Invasion assay

我々が以前に報告した手順で Invasion assayを行い、細胞浸潤能を検討した [22]。24 well の培養プレートを使用し、各 well に insert を設置し、上層と下層にわけた。Insert の底は、8 μm の孔を有するポリカーボネート膜でできており、その表面はマトリゲルでコーティングされたものと、されていないものを準備した (Becton Dickinson BioCoat, NJ, USA)。上層に 1 well 当り 5×10^4 個の細胞を撒き、上層は FCS 無添加の培養液で細胞培養し、下層は 5% FCS 添加の培養液を加え培養を行った。SKG II は 19 時間、SiHa は 24 時間後、insert の上面の細胞を綿棒で除去し、フィルターは DiffQuick (Sysmex, Kobe, Japan) で固定し、染色した。そして、insert の下面に浸潤した細胞は 150 倍で拡大し、6 視野で細胞数を評価した。なお、マトリゲルでコーティングされていない insert については、insert の下面の細胞を遊走細胞として細胞数を評価した。浸潤の割合は、浸潤細胞数/遊走細胞数で計算し、3 回の異なる実験を施行し、平均を求めた。

Cell proliferation assay

6 well の培養プレートに SiHa と SKG II を 1 well 当り 1×10^5 個となるように細胞を撒き、翌日 siRNA をトランスフェクションした。48 時間後と 96 時間後に培養細胞をトリプシン処理し、Vi-CELL™ XR (Beckman Coulter, Tokyo, Japan) を用いて細胞数を評価した。

フローサイトメーターによる細胞周期とアポトーシスの評価

siRNA をトランスフェクションし、96 時間後に細胞をトリプシン処理して、70 % 冷エタノールで 30 分間固定した。PBS で 3 回洗浄し、 1×10^6 個/ml になるように PBS で調節した後、RAase 5 μl (QIAGEN, Tokyo, Japan) と propidium iodide (PI) 5 μl を加え、フローサイトメーター (BD FACS Calibur; Becton Dickinson, NJ, USA) で測定した。細胞周期の各段階 (G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期) は BD CellQuest Pro (Becton Dickinson) を用い評価した。

アポトーシス細胞は Annexin V-FLUOS Staining Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて細胞表層に露出した phosphatidylserine (PS) を測定した。プロトコールに従って以下の手順で実施した。siRNA をトランスフェクションし、96 時間後にトリプシン処理の上、細胞を回収し、PBS で洗浄した。5 分間遠心分離し、binding buffer 100 μl で再懸濁し、Annexin V 2 μl と

PI 2 μ l を加え、15 分間室温で静置した。1 万個の細胞をカウントし、Annexin V 陽性細胞をフローサイトメーターで測定した。なお、Annexin V 染色は、核変化を検出する方法よりもより早期にアポトーシスを評価することができると思われており、Annexin V 陽性で PI 陰性の細胞をアポトーシス細胞とした。

シスプラチン添加条件下でのアポトーシス

siRNA をトランスフェクションし、72 時間後にシスプラチン (CDDP : Wako, Tokyo, Japan) を 0, 1, 5 μ g/ml の各濃度で細胞に添加しアポトーシスを誘導した。アポトーシス細胞数はシスプラチン添加後 (SiHa では 24 時間後、SKG II では 48 時間後) に、フローサイトメーターで評価した。添加した CDDP の濃度は他の論文で報告されていた濃度を基にして決定した [23, 24]。

解析

統計学的有意差はグループ間の検討では Tukey-Kramer test を用い、2 群間の比較検討では student unpaired t-test を用いた。すべての検討は SPSS を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

HSP70 発現抑制

SiHa と SKG II における siRNA 法による HSP70 の発現抑制は Western blotting 法で確認した。SiHa (図 1 a) および SKG II (図 1 b) とともに NT-siRNA と比較し、HSP70-siRNA では HSP70 の発現は明らかに抑制された。

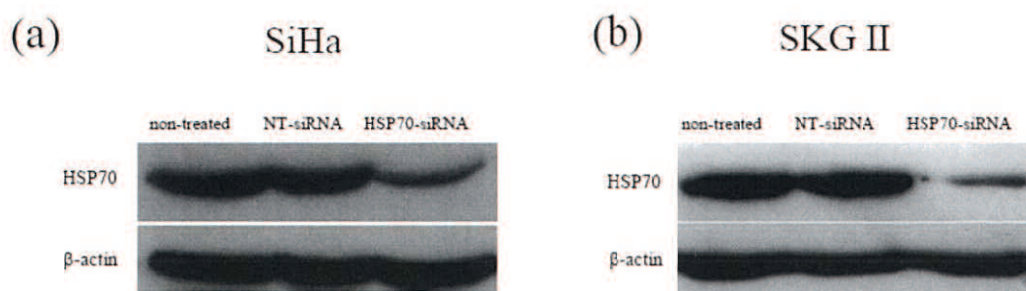


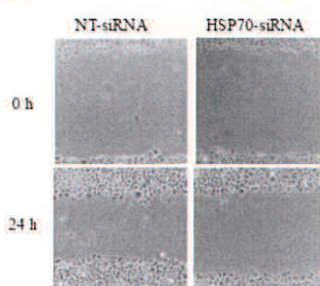
図 1. SiHa (a) と SKG II (b) における siRNA 法による HSP70 の発現抑制
細胞に HSP70-siRNA とコントロールとして NT-siRNA をトランスフェクションし Western blotting 法で確認した。なお、 β -actin は内部コントロールと

して使用した。

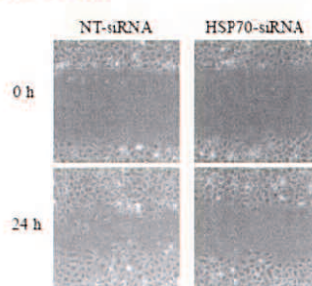
HSP70 発現抑制が細胞遊走、細胞浸潤に与える影響

SiHa (図 2 a) と SKG II (図 2 b) における scratch assay の代表的な写真を示す。SiHa (図 2 c) および SKG II (図 2 d) とともに NT-siRNA と比較し、HSP70-siRNA では遊走能は有意に抑制された。

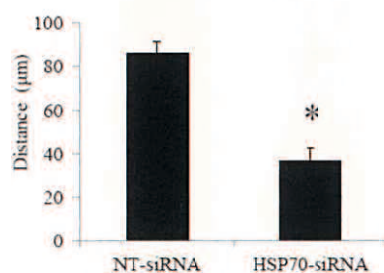
(a) SiHa



(b) SKG II



(c) SiHa



(d) SKG II

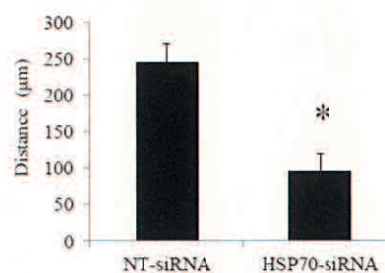


図 2. SiHa (a, c) と SKG II (b, d) において HSP70 の発現抑制が細胞遊走に及ぼす影響

細胞に HSP70-siRNA と NT-siRNA をトランスフェクションし、引っ掻き傷をつけた時 (0 時間) と 24 時間後の各々の写真を上段示す。遊走能は細胞の移動距離で評価した。平均値 ± SD で表し、3 回の異なる実験を行った。*; $p < 0.01$ vs NT-siRNA。

SiHa (図 3 a) と SKG II (図 3 b) における invasion assay の代表的な写真を示す。SiHa (図 3 c) および SKG II (図 3 d) とともに NT-siRNA と比較し、HSP70-siRNA では浸潤能は有意に抑制された。

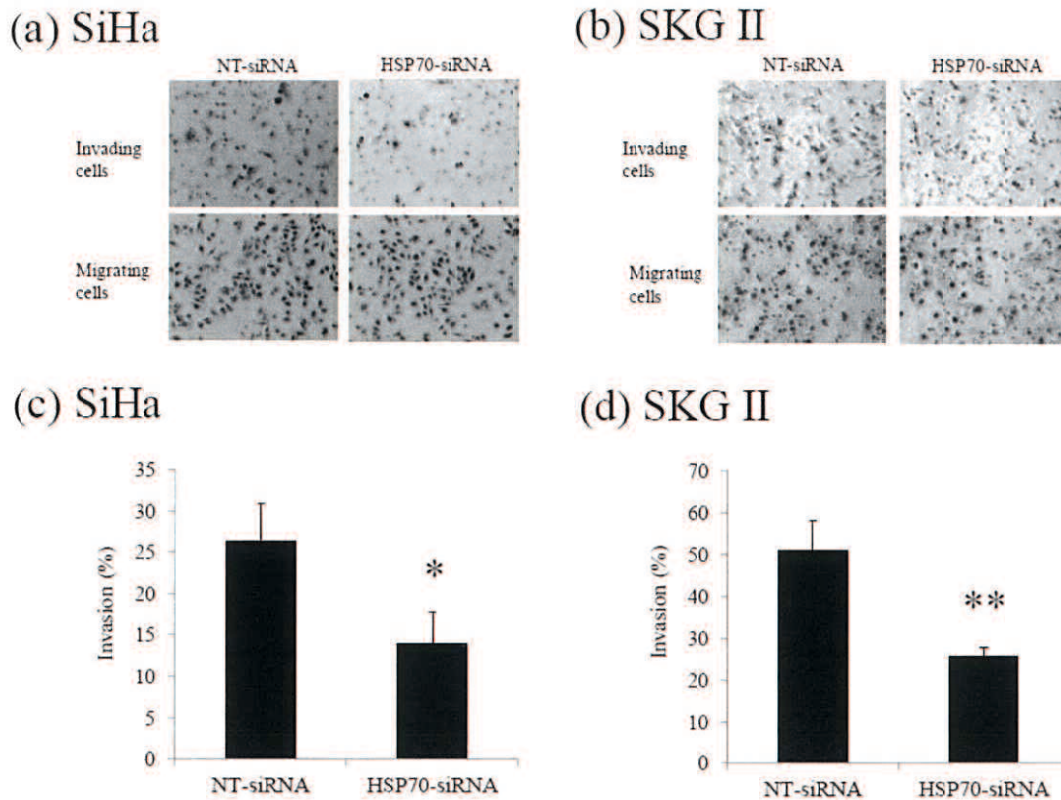


図 3. SiHa (a, c) と SKG II (b, d) において HSP70 の発現抑制が細胞浸潤に及ぼす影響

細胞に HSP70-siRNA および NT-siRNA をトランスフェクションし、細胞をトリプシン処理し、撒きかえてから 24 時間後 (SiHa) あるいは 19 時間後 (SKG II) の各々の写真を上段示す。浸潤能は $N1 / N2$ で評価した ($N1$: マトリゲルを浸潤した細胞数、 $N2$: 遊走した細胞数)。平均値 \pm SD で表し、3 回の異なる実験を行った。*; $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs NT-siRNA。

HSP70 発現抑制が細胞増殖、細胞周期、アポトーシスに及ぼす影響

siRNA をトランスフェクションした後、96 時間まで細胞数を評価して、細胞増殖能を検討した。SiHa (図 4 a) および SKG II (図 4 b) において NT-siRNA と比較し、HSP70-siRNA では増殖は有意に抑制された。このメカニズムを検討するために、細胞周期とアポトーシスをフローサイトメーターで検討した。細胞周期は、NT-siRNA と比較し、HSP70-siRNA では S 期と G_2/M 期の割合が増加し、 G_0/G_1 期の割合が減少した (表 1)。よって、HSP70 の発現抑制は細胞周期の停止によることが示唆された。HSP70 を発現抑制することによってアポトーシ

ス細胞の割合が有意に増加したが、SKG II では有意差を認めなかった(表 1)。

(a) SiHa

(b) SKG II

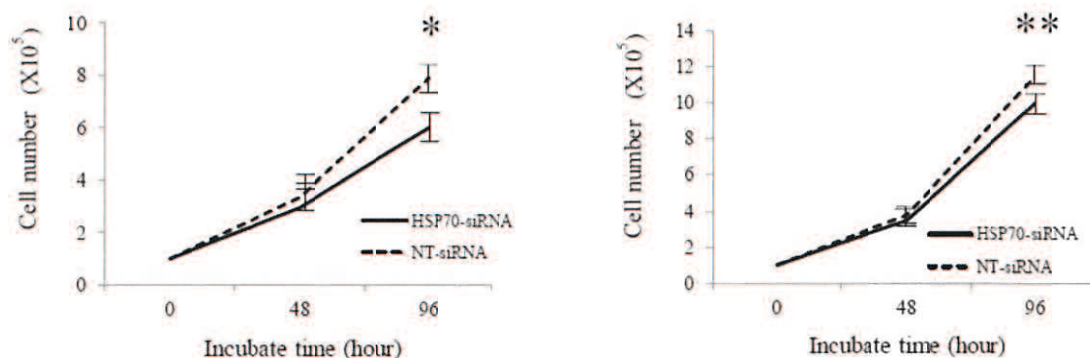


図 4. SiHa (a) と SKG II (b) において HSP70 の発現抑制が増殖能に及ぼす影響

細胞数は siRNA あるいは NT-siRNA をトランスフェクションし、96 時間まで評価した。平均値±SD で表し、3 回の異なる実験を行った。*; p < 0.05、**; p < 0.01 vs NT-siRNA。

表 1. SiHa と SKG II において HSP70 の発現抑制が細胞周期とアポトーシスに及ぼす影響

	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)	Apoptotic cells (%)
SiHa				
NT-siRNA	71.4±1.8	5.7±0.3	16.7±1.3	6.5±0.8
HSP70-siRNA	64.9±3.2 *	7.6±0.4 **	19.9±0.3 *	11.2±1.3 **
SKG II				
NT-siRNA	70.5±2.3	9.9±0.6	14.9±0.9	5.3±0.7
HSP70-siRNA	64.5±2.0 *	11.8±0.5 *	17.8±0.8 *	5.6±1.3

細胞に siRNA をトランスフェクションし、96 時間培養した。G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期の割合と、アポトーシス細胞の割合を表に示した。平均値±SD で表した。*; p < 0.05、** ; p < 0.01 vs NT-siRNA。

CDDP 添加下で HSP70 の発現抑制がアポトーシスに与える影響

CDDP 添加下 (0-5 μg/ml) でのアポトーシス細胞の割合を検討したところ、SiHa (図 5 a) においては NT-siRNA ではアポトーシス細胞の割合に変化は認

めなかったが、HSP70-siRNA ではアポトーシス細胞の割合は濃度依存性に有意に増加した。よって HSP70 は CDDP によって活性化されるアポトーシス経路を抑制することが示唆された。また、SKG II (図 5 b) においては、CDDP 5 μ g/ml でアポトーシス細胞の割合が増加し、HSP70-siRNA では有意にアポトーシス細胞の割合が増加した。よって、HSP70 の発現抑制は CDDP の感受性を増強させることが示唆された。

(a) SiHa

(b) SKG II

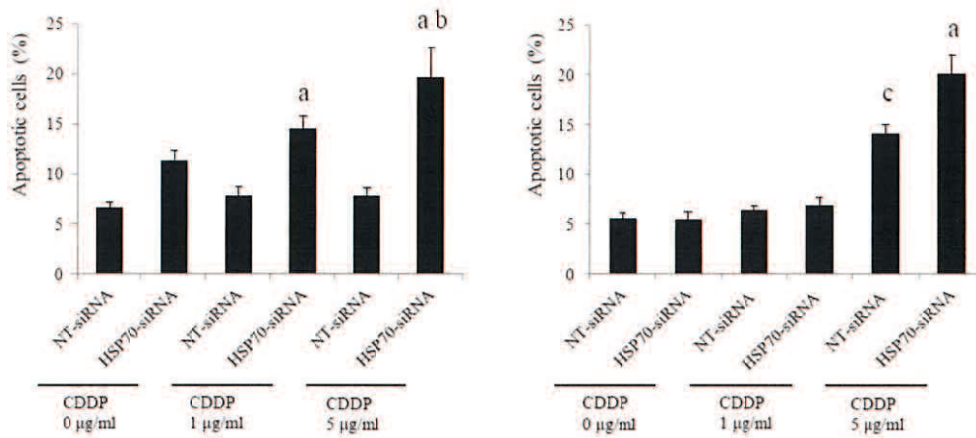


図 5. SiHa (a) と SKG II (b) において CDDP 添加下で HSP70 の発現抑制がアポトーシスに及ぼす影響

CDDP を添加し 24 時間後 (SiHa) あるいは 48 時間後 (SKG II) にアポトーシス細胞の割合を評価した。平均値 \pm SD で表した。a; $p < 0.01$ vs NT-siRNA (各 CDDP 濃度間)、 b; $p < 0.05$ vs HSP70-siRNA (CDDP 0 μ g/ml)、 c; $p < 0.01$ vs NT-siRNA (CDDP 0 μ g/ml)。

【考察】

CDDP は子宮頸癌の化学療法において key drug である。残念なことに、進行癌や CDDP による化学療法後の再発癌においては、CDDP に抵抗性を示すことがある。化学療法抵抗性は、治療奏効に対する大きな障害となる。従って、CDDP に抵抗性を示す患者に対する新しい治療戦略が早急に必要である。しかしながら、化学療法抵抗性の分子機構は多岐にわたり、いまだ十分に分かっていない。我々の実験では、HSP70 の発現抑制は CDDP によるアポトーシス誘導を増強させる

ことを示した。これは、子宮頸部扁平上皮癌細胞において CDDP に対する化学療法感受性を増強させることを示している。CDDP に抵抗性を示す子宮頸癌患者においては CDDP 治療に HSP70 の発現抑制を組み合わせることは、新しい治療戦略となりうる可能性がある。

ミトコンドリアを介したアポトーシス経路の活性化によって CDDP は細胞死を誘導することがよく知られている [11-13]。ミトコンドリアの膜透過性は、CDDP を含む多くの抗癌剤によって誘導されるアポトーシス経路の初期段階である [11, 25, 26]。このアポトーシス経路は Bax によってコントロールされており、cytochrome c、Smac、apoptosis-inducing factor (AIF) 等のアポトーシス関連蛋白の放出を促進する [11-13]。HSP70 はミトコンドリアの膜透過性に関与し、細胞質からミトコンドリア内への Bax の輸送を阻害し [11, 16]、あるいはアポトーシス蛋白やアポトーシス誘導因子と相互作用することによりアポトーシスを抑制することが報告されている [11, 12]。従って、HSP70 の高発現は化学療法抵抗性に関与していることが考えられる [11-14]。近年、HSP70 はシステイン、カテプシン活性を直接阻害することやリソソーム膜透過性を間接的に阻害することで、システイン - カテプシンを介する細胞死から癌細胞を守る事が報告されている [18-20]。子宮頸癌細胞においても HSP70 と CDDP に対する化学療法抵抗性との間には密接な関連があるかもしれない。

本実験において、HSP70 は細胞周期およびアポトーシスの調節によって癌細胞の増殖に関与していることが示唆された。HSP70 の高発現は癌細胞の増殖促進やアポトーシス耐性獲得に関連していることは報告されている [9, 27]。また最近の報告では HSP70 の発現抑制は、S 期または G₂/M 期で細胞周期を停止させることによって、細胞増殖を抑制することが報告されている [2, 27, 28]。よって HSP70 は子宮頸癌の細胞増殖促進に関与することが示唆された。

子宮頸癌において、HSP70 の発現抑制は細胞遊走と細胞浸潤を抑制することが本実験で示され、諸家の報告と一致する。Sims らは、HSP70 は MMP 活性を増加させることで細胞遊走と浸潤を促進すると報告している [10]。Zhou らは、HSP70 は癌の進行において重要な役割を果たしている上皮間葉転換 (EMT) を阻害することを報告している [29]。しかしながら、我々の実験では HSP70 の発現を抑制しても E カドヘリンの発現増加や MMP-2 の分泌減少には有意な差みられなかったことより (未発表データ)、MMP-2 や E カドヘリンとは別のメカニズムが関与しているかもしれない。Nylandsted らは、HSP70 はリソソームの

取り込みを介して、カテプシンとともに細胞膜に輸送され、癌の浸潤に関与するカテプシンの分泌を促進していると報告している [18]。よって、HSP70 の発現抑制が細胞遊走や浸潤を抑制するメカニズムについては更なる研究が必要であると考えられる。

近年、HSP70 は免疫系を活性化し、抗癌ワクチンの開発に使用されていることが報告されている。HSP70 シャペロンペプチドは受容体を介して単球、マクロファージ、樹状細胞、B 細胞を含む抗原提示細胞に取り込まれ、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の MHC class I 分子によって抗原として提示される [20, 30]。従って、HSP70 は新しい癌免疫療法において活用することができる可能性がある。

本研究においては、CDDP 存在下での HSP70 の発現抑制によるアポトーシス誘導効果は、SKG II に比べ SiHa でより明らかであった。また HSP70 の発現抑制単独でのアポトーシス誘導は SiHa でのみで観察された。これらの違いは細胞の種類によるかもしれないが、細胞の種類によって HSP70 の発現抑制が異なる影響を及ぼしたことについては更なる研究が必要であると考えられる。

【結語】

我々は、プロテオーム解析により子宮頸部扁平上皮癌において HSP70 の発現が増加していることを見出した。本研究では、HSP70 が子宮頸部扁平上皮癌の進展に機能的な役割を果たしていることが示された。また HSP70 の発現抑制は CDDP の感受性を増強させることが示唆された。CDDP による治療に HSP70 の発現抑制を組み合わせることは扁平上皮癌に対する細胞障害性のさらなる増加が期待される。HSP70 の発現抑制を目的とした新規分子標的治療につながり、子宮頸部扁平上皮癌の新たな治療戦略となるかもしれない。

【謝辞】

本研究は文部科学省の基盤研究 (c-2) 2051950、20591949、23592452 によって資金提供されている。

【参考文献】

1. Fukushima C, Murakami A, Yoshitomi K, Sueoka K, Nawata S, Sugino N. Comparative proteomic profiling in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Proteomics Clin Appl* 2011; 5: 133-140.
2. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* 2005; 19: 570-582.
3. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 15-27.
4. Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, et al. Proteomic analysis of autoantibodies in patients with hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2006; 6: 3894-3900.
5. Chen J, He QY, Yuen AP, Chiu JF. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: The involvement of multiple pathways in tumorigenesis. *Proteomics* 2004; 4: 2465-2475.
6. Ralhan R, Kaur J. Differential expression of Mr 70,000 heat shock protein in normal, premalignant, and malignant human uterine cervix. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1217-1222.
7. Syrigos KN, Harrington KJ, Karayiannakis AJ, et al. Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer. *Urology* 2003; 61: 677-680.
8. Thanner F, Sutterlin MW, Kapp M, et al. Heat shock protein 70 as a prognostic maker in node-negative breast cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 1057-1062.
9. Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, et al. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 616-625.
10. Smis JD, McCready J, Jay DG. Extracellular Heat Shock Protein (Hsp) 70 and Hsp90 α assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PloS One* 2011; 6: e18848.
11. Yang X, Wang J, Zhou Y, Wang Y, Wang S, Zhang W. Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Let* 2012; 321:137-143.
12. Zhu Q, Xu YM, Wang LF, et al. Heat shock protein 70 silencing enhances apoptosis inducing factor-mediated cell death in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 792-798.
13. Yang X, Fraser M, Abedini MR, Bai T, Tsang BK. Regulation of apoptosis-inducing factor-mediated, cisplatin-induced apoptosis by Akt. *Br J Cancer* 2008; 98: 803-808.
14. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock protein 27 and 70. Anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell cycle* 2006; 5: 2592-2601.
15. Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1053: 74-83.
16. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 2005; 280: 38729-38739.
17. Behnsawy HM, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Small interfering RNA targeting heat shock protein 70 enhances chemosensitivity in human bladder cancer cells. *Urol Oncol* 2013; 31: 843-848.
18. Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher U, Lademann U, Hoyer-Hansen M. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* 2004; 200: 425-435.
19. Kirkegaard T, Jaattela M. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim*

- Biophys Acta 2009; 1793: 746-754.
20. Sherman M, Multhoff G. Heat shock proteins in cancer. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1113: 192-201.
 21. Nakagawa T, Murakami A, Torii M, Nawata S, Takeda O, Sugino N. E-cadherin increases squamous cell carcinoma antigen expression through phosphatidylinositol-3 kinase-Akt pathway in squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Reports* 2007; 28: 175-179.
 22. Kotaro S, Nawata S, Nakagawa T, et al. Tumor-associated serpin, squamous cell carcinoma antigen stimulates matrix metalloproteinase-9 production in cervical squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2005; 27: 1345-1353.
 23. López PG, Dorantes MR, Cardenas EP, Cerbón M, Betancourt AM. Synergistic effects of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer chemother Pharmacol* 2004; 53: 533-540.
 24. Jung HS, Erkin OC, Kwon MJ, et al. The synergistic therapeutic effect of cisplatin with human papillomavirus E6/E7 short interfering RNA on cervical cancer cell lines in *vitro* and in *vivo*. *Int J Cancer* 2012; 130: 1925-1936.
 25. Ip SW, Wu SY, Yu CC, et al. Induction of apoptotic death by curcumin in human tongue squamous cell carcinoma SCC-4 cells is mediated through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways. *Cell Biochem Funct* 2011; 29: 641-650.
 26. Visagie MH, Joubert AM. 2-Methoxyestradiol-bis-sulphamate refrains from inducing apoptosis and autophagy in a non-tumorigenic breast cell line. *Cancer Cell Int* 12: 37, 2012.
 27. Xiang TX, Li Y, Jiang Z, Huang AL, Luo C, Zhan B, Wang PL, Tao XH. RNA interference-mediated silencing of the Hsp70 gene inhibits human gastric cancer cell growth and induces apoptosis in vitro and in vivo. *Tumori* 2008; 94: 539-550.
 28. Yanglom JA, Gabai VL, Sherman MY. High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res* 2007; 67: 2373-2381.
 29. Zhou Y, Mao H, Li S, et al. HSP72 inhibits Smad3 activation and nuclear translocation in renal epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 598-609.
 30. Calderwood S, Ciocca DR. Heat shock proteins: Stress proteins with Janus-like properties in cancer. *Int J Hyperthermia* 2008; 24: 31-39.