

温熱負荷による日光老化の予防

— 熱ショック蛋白質 (HSP70) は、皮膚線維芽細胞の過酸化水素障害を軽減するか —

西田昌司^{*1} 野出絵里^{*2}

Prevention of Skin Aging Caused by the Exposure to Sunlight through Hyperthermia
Can Heat Shock Protein 70 Reduce Injury of Cultured Skin Fibroblasts Induced by Hydrogen Peroxide?

NISHIDA Masashi^{*1} NODE Eri^{*2}

*1 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 教授

*2 神戸女学院大学 人間科学研究科 修了生

連絡先：西田昌司 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
mnishida@mail.kobe-c.ac.jp

要 旨

日光に含まれる紫外線A波は、真皮まで到達して水分を分解し、活性酸素を発生する。発生した活性酸素は、真皮の線維芽細胞を構成する脂質や蛋白質、核酸に障害を与え、細胞死をもたらす。その結果、皮膚の構造が乱れ、シワが生じ、日光老化と呼ばれる病態を発症する。

温熱負荷が熱ショック蛋白質70 (HSP70) を誘導することによって紫外線による細胞障害を軽減するかなかを、線維芽細胞の過酸化水素負荷モデルに熱ショックを適用して検討した。マウス真皮由来の3T6線維芽細胞に0~10mMの H_2O_2 を添加すると、細胞を構成する脂質の酸化、タンパク質の変性、さらにネクローシスとアポトーシスによる細胞死が引き起こされた。一方、3T6に42℃、1時間の熱ショックを負荷すると、細胞保護機能を持つHSP70が発現した。このような熱ショック条件下に H_2O_2 を添加すると、3T6の脂質酸化、タンパク質変性、細胞死が抑制された。

以上のように熱ショックが H_2O_2 による線維芽細胞障害を減弱したことから、温泉やサウナ、日々の入浴で身体に温熱を負荷することにより、紫外線による日光老化が予防される可能性が示唆された。

キーワード：温熱負荷、ヒートショック、細胞死、紫外線、真皮

Summary

Ultraviolet A wave in sunlight reaches dermis and produces reactive oxygen by degradation of water in extracellular fluid. Reactive oxygen species produced in dermis interacts with lipids, proteins and nucleic acids composing dermal fibroblast and causes cell death, which results in a disturbance of the dermal structure, affects the aging of skin, and induces wrinkles.

We examined whether skin damage caused by ultraviolet can be reduced through the induction of heat shock protein 70 by hyperthermia using a heat shock model of cultured fibroblasts exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2). H_2O_2 (0~10mM) induced lipid oxidation, protein denatures and two types of cell death, necrosis and apoptosis, in cultured 3T6 cells derived from mouse dermis. However, when 3T6 were exposed to heat shock at 42℃ for 1 hour prior to the addition of H_2O_2 , the damages of cellular lipid and protein were suppressed and the extent of cell death was reduced by nearly 50%.

These results suggest that hyperthermia by hot spring and sauna bathing can prevent dermis from ultraviolet induced aging through the induction of HSP70 by heat shock.

Keywords：hyperthermia, heat shock, cell death, ultraviolet, dermis

1 背景

1.1 皮膚の構造と機能

皮膚は体表を覆う最大の臓器であり、表皮、真皮の二層から構成される。表皮は、角化細胞の幹細胞が盛んに分裂する最深部の基底層、有棘層、顆粒層、淡明層、最浅層の角質層の五層で構成された重層扁平上皮で出来ている。外界と直接接する場所に位置するが、このような構造上の特徴から、化学物質や細菌などの外界の異物が体内に進入するのを防いだり、逆に体内の水分や生体高分子が蒸発したり漏れ出たりするのを防ぐバリアとして機能している。

一方、真皮を作る細胞は線維芽細胞である。線維芽細胞は小胞体やゴルジ体に富んでおり、コラーゲン、エラスチンなどのタンパク質やヒアルロン酸、グルコサミンなどの糖タンパク質の合成を活発に行っている。これらの生体高分子化合物は線維芽細胞から分泌され、真皮の細胞間を埋める細胞外基質となる。この内、コラーゲンやエラスチンは線維状に再構成され、組織に強度や弾性を与える。ヒアルロン酸やグルコサミンは親水基を多く持つため、水分を保持して潤いや弾力を保つ。また、このような線維芽細胞の代謝を維持し、表皮の角化細胞への栄養を補給するために、真皮には血管が多く存在している¹⁾。

したがって、皮膚が健康な状態を保つためには、表皮の重層扁平上皮によるバリア機能とともに、それを支える真皮の線維芽細胞が健常に機能することが重要である。しかし、食生活や喫煙、運動などの生活習慣、紫外線や乾燥、排気ガスなどの生活環境、精神的ストレスなどの様々な刺激は、最外層の表皮に障害を与えるのみならず真皮の線維芽細胞も障害し、皮膚の強度や弾性、潤いや弾力を低下させ、しわやたるみといった老化現象を引き起こす²⁾。

1.2 紫外線による皮膚障害

このような皮膚老化³⁾の原因として、太陽光に含まれる紫外線が重要である。紫外線は波長が320～400nmのA波、290～320nmのB波、290nm以上のC波の三種に分類される。このうちC波はオゾン層で吸収されるため、地表まで到達するのは紫外線A波とB波である。紫外線B波は皮膚に到達すると表皮層の角化細胞や色素細胞で吸収される。一方、紫外線A波は真皮まで到達し、細胞外基質や線維芽細胞に障害を与える。この際、紫外線がDNAや蛋白質などの標的分子に直接的に障害を与える場合と、紫外線が生体物質と作用することにより生じた障害物質が、二次的に標的分子に作用する間接的な障害とがある。

紫外線A波によって生じる障害物質としては、生体内に豊富に存在する水分子に紫外線が作用することで生じる活性酸素が代表的である。水分子由来の主な活性酸素としては、不対電子を持つためにフリーラジカルと呼ばれるスーパーオキシド (O_2^{\cdot}) と水素ラジカル (HO^{\cdot})、不対電子を持たないためにフリーラジカルほどの反応性は持たないが細胞膜を自由に透過できる過酸化水素 (H_2O_2) の三種が挙げられる。これらの活性酸素は通常的环境下では微量しか生成されないが、細胞の持つ有機物質と反応すると連鎖的に細胞成分と反応し、障害を与える

ことが知られている^{4),5)}。

活性酸素の標的となる生体分子には、細胞膜や内膜系を構成するリン脂質、細胞内の構造・機能分子であるタンパク質、遺伝情報の担い手である核酸の三つがある。活性酸素による障害は軽度であれば修復可能であるが、障害が蓄積すると様々な細胞傷害を惹起する。脂質との反応により過酸化脂質を生じると、細胞膜のバリア機能が失われる⁶⁾。タンパク質と反応すると、酵素機能や細胞骨格の異常から細胞の構造・機能障害が生じる⁷⁾。さらに DNA 鎖の切断や塩基の修飾は、遺伝情報の変化（遺伝子変異）を起こる⁸⁾。このような障害が蓄積して恒常性が維持できなくなると、細胞はアポトーシスやネクローシスによる細胞死に至る。

1.3 温熱負荷と HSP

このように紫外線などの細胞外からのストレスは様々な障害を細胞に与えることが知られているが、逆に細胞に有益なストレス耐性をもたらす環境刺激も知られている。例えば温泉やサウナなどの温熱負荷は「身体に良い」、「美肌効果がある」、「精神的なリラクセスが得られる」などの健康効果を持つとされており、日々の入浴に留まらず温泉施設に足を運ぶ機会も増加している。また、医療行為としての温熱療法も知られており、赤外線や蒸気、電磁波などを用いて全身あるいは局所的に温熱負荷を加えることで、筋肉疲労や腰痛、関節痛、心不全に効果があるとされている。これらの温熱負荷や温熱療法は、温泉水に含まれる化学物質や体温上昇による血行・発汗の促進、リラクセス効果などによって効果を発揮するとされてきた。

一方、温熱刺激自体が細胞に直接作用して、細胞レベルでのストレス耐性をもたらすことも明らかとなりつつある。熱刺激（ヒートショック）は原核細胞から真核細胞にわたる多くの細胞で、ストレスタンパク質の一種である熱ショック蛋白（Heat Shock Protein：HSP）を誘導することが知られている⁹⁾。HSP には細胞内に広く分布する常在型 HSP と、温熱や紫外線、活性酸素などのストレス負荷によって発現が促進される誘導型 HSP が存在する。常在型 HSP は mRNA から翻訳されて間もない不安定な蛋白質に結合し、正しい立体構造を持つように介添役（シャペロン）として振る舞う¹⁰⁾。

誘導型 HSP は細胞の保護効果を持つことが知られており、分子量70kDa の HSP70がその代表である¹¹⁾。細胞に温熱などのストレスが加わると、HSF1と呼ばれる転写因子が HSP70遺伝子プロモーターの HSE に結合し、HSP70が誘導される。HSP70のペプチド結合ドメインは、変性したタンパク質の露出した疎水性アミノ酸と結合し、変性蛋白の凝集を防ぐとともに立体構造の再構築を行う。しかし、温熱負荷が線維芽細胞に HSP70を誘導し、紫外線負荷などによる細胞傷害に対する保護効果を発揮するかは、明らかになっていない。

2 目的

本研究では、温熱負荷が真皮の線維芽細胞に働いて HSP70を誘導し、紫外線による細胞障害を減弱するか否かを、培養線維芽細胞を用いて以下の3つの観点から検討した。

1) 熱ショックによる HSP70誘導の検討

人体に温熱負荷を加えた際の真皮の状態を再現するため、培養皮膚線維芽細胞に熱ショックを負荷し、HSP70が誘導されるかを検討する。

2) 過酸化水素による細胞障害モデルの作成

日光照射による紫外線の間接的な真皮障害を模擬するため、培養皮膚線維芽細胞に過酸化水素を曝露し、細胞障害を検討する。

その際、①細胞膜の脂質障害、②核の DNA 障害、③細胞質の蛋白質変性、およびその結果としての④細胞死の4つを細胞障害の指標とする。

3) 熱ショックによる細胞保護効果の検討

1) で検討した熱ショックを加える事により、2) で検討した過酸化水素による細胞障害が軽減されるかを検討する。

3 熱ショックによる HSP70 誘導の検討

本研究では、線維芽細胞としてマウス胎児由来線維芽細胞株 3T6 を用い、対数増殖を経てコンフルエントに至った状態を、正常の真皮線維芽細胞の状態とした。また CO₂ インキュベーター内に培養メディアウムの入った 6 穴プレートを置き、熱電対によって器内と培養液の温度を測定したところ、設定温度を 43℃ とすると器内温度は 5 分後、液中温度は 45 分後に 42℃ に到達し、以後 120 分までは温度変化が見られなかった。従って 43℃ に設定した CO₂ インキュベーターに細胞を 1.5 時間器内に入れることで、42℃ の熱ショックを 1 時間負荷することとした (Fig. 1)。

熱ショックが線維芽細胞に HSP70 を誘導するか否かを、ウェスタンブロッティング法で検討した。3T6 を 37℃ の CO₂ インキュベーター内でコンフルエント状態まで増殖させた後、設

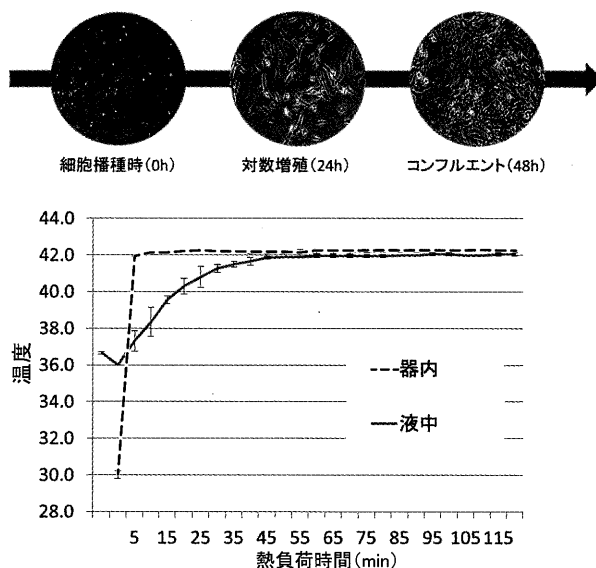


Fig. 1 細胞の培養モデルの作成と熱ショック負荷条件の決定

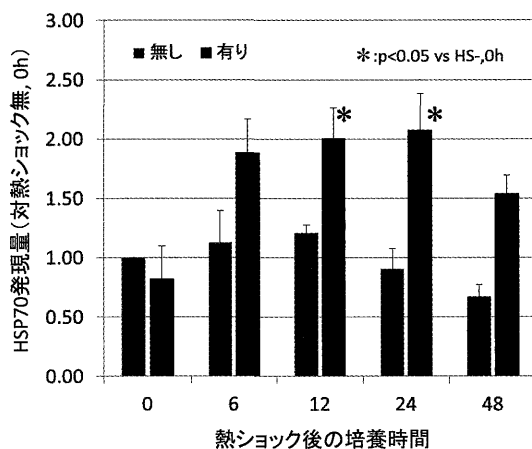


Fig. 2 熱ショックによる HSP70 誘導

定温度を43℃に変更して温熱負荷をかけた。1.5時間後に培養温度を37℃に戻し、以後48時間、細胞からタンパク質を回収した。回収した蛋白質は、SDS-PAGE 電気泳動で分子量別に分離した後、ウェスタンブロッティング法でメンブレンに転写し、抗 HSP70抗体を用いて検出したタンパク質を画像解析により定量した。

37℃で培養した線維芽細胞でも細胞内に HSP70発現を認めたが、培養時間による有意な HSP70発現の変化を認めなかった。一方42℃の熱ショックを負荷した線維芽細胞では、負荷後6時間から HSP70の発現量が増加し、12時間から24時間にかけて、負荷直後と比べて有意な HSP70発現の増加を認めた。しかし48時間後には発現量は低下し、42℃、1時間の熱ショックの効果は、48時間後には減少していることが分かった (Fig. 2)。従って今後の細胞障害の実験では、熱ショック24時間後まで37℃の CO₂ インキュベーターで培養した細胞に、障害を生じさせることで HSP70誘導の影響を検討することとした。

4 脂質障害に及ぼす HSP70 誘導の影響

膜脂質障害の検討には、脂質が酸化されて生じるマロンジアルデヒド (MDA) を指標として使い、MDA を 2-チオバルビツール酸と反応させて生じる MDA-TBA 付加物を測定することにより定量した。また、紫外線による細胞障害モデルとしては、紫外線が細胞内外の水と反応して生じる過酸化水素 (H₂O₂) の負荷を用いた。

線維芽細胞の MDA 産生量は H₂O₂ の添加3時間後から上昇し、6時間後にピークを示した後、24時間後には減少した。また添加する H₂O₂ 濃度を 0 mM から10mM まで増加させると、添加3時間と6時間後には添加量依存性に MDA 産生量も増加した。しかし24時間後には、H₂O₂ の添加量にかかわらず MDA 産生量は低値を示した。これらの結果より、最も MDA 産生量の多かった10mM の H₂O₂ を6時間反応させる条件を細胞膜障害モデルとした (Fig. 3a)。

次に、42℃、1時間の熱ショックを負荷後に12時間培養して HSP70を誘導した線維芽細胞に、10mM の H₂O₂ を6時間反応させて細胞膜障害に対する HSP70の影響を検討した。H₂O₂ を添加していない細胞では MDA 産生が増加せず、熱ショック自体は細胞障害を惹起しない

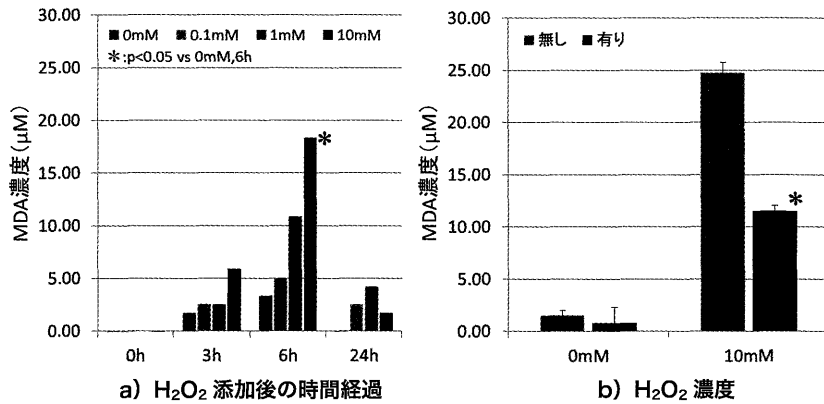


Fig. 3 脂質酸化に及ぼす熱ショックの影響

ことがわかった。一方、10mMのH₂O₂を添加すると、熱ショックを加えない場合はMDA濃度が約20倍に増加するが、42℃、1時間の熱ショックによってMDA産生が50%以上抑制された (Fig. 3b)。従って、熱ショックはHSP70誘導を介し、脂質酸化による細胞膜障害から線維芽細胞を防御している可能性が示された。

5 DNA 障害に及ぼす HSP70 誘導の影響

紫外線によるDNA障害は、DNA中のデオキシグアニンが活性酸素によって酸化障害を受けて生成する8-ヒドロキシデオキシグアニン (8-OHdG) を、特異的な標識抗体を用いて検出することにより検討した。しかし、脂質障害の検討に用いたH₂O₂の濃度 (~10mM) および反応時間 (24h) では8-OHdG濃度の増加は見られず、障害モデルを作成することはできなかった。DNA損傷は修復不可能な致命的な障害となるため、細胞外からのH₂O₂添加では速やかに分解や修復、除去が行われ、8-OHdGが検出できなかったと考えられる。培養液中でH₂O₂とFe²⁺やCu²⁺などの金属イオンを反応させ、より反応性の高い水酸ラジカル (HO[•]) を生成させるなどの必要があると考えられる。

6 蛋白質変性に及ぼす HSP70 の影響

紫外線によるタンパク質変性の指標としては、タンパク質の酸化によって生じるカルボニル化合物を用いた。カルボニル化により生じたアルデヒド基と2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を反応させ、生じたヒドラゾン化合物の吸光度を370nmで測定することで、タンパク質変性を定量した。

H₂O₂添加による3T6のタンパク質変性は、添加3時間後からカルボニル化蛋白質濃度が増加し、6時間後にはピークに達した。また、添加するH₂O₂濃度に依存して、添加3時間後、6時間後においてはカルボニル化蛋白質濃度が増加したが、24時間後では最も高濃度の10mMのH₂O₂によるカルボニル化蛋白質濃度が低値を示した (Fig. 4a)。得られた結果より、1mMのH₂O₂を6時間反応させる条件をタンパク質障害モデルとした。

次に、42℃、1時間の熱ショックが蛋白質変性に及ぼす影響を検討した。熱ショックはH₂

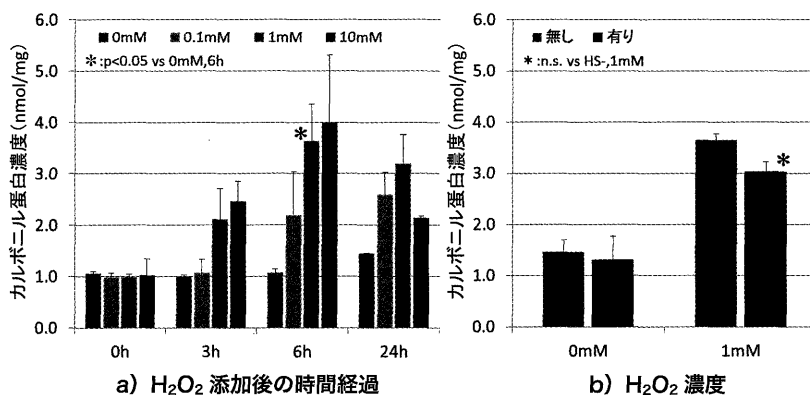


Fig. 4 蛋白質変性に及ぼす熱ショックの影響

O₂を添加していない条件下ではカルボニル化蛋白質濃度を増加させなかったことから、熱ショック自体はタンパク質障害を起こさないことを確認した。一方、1 mMのH₂O₂を添加すると、温熱負荷を加えない場合はカルボニル化蛋白質濃度が約2倍に増加するが、熱ショックを加えるとカルボニル化蛋白質産生を約20%抑制することができた (Fig. 4b)。従って、熱ショックによって誘導されたHSP70が酸化変性を受けたタンパク質と結合し、修復、あるいは分解によって変性タンパク質量を減少させている可能性が考えられる。

7 細胞死に及ぼすHSP70の影響

紫外線照射によって細胞内外に生じた活性酸素による分子レベルでの脂質や核酸、タンパク質の障害は、最終的には細胞死へと至る不可逆的な破綻をもたらす。熱ショックによる分子レベルでの細胞保護効果が細胞レベルでの細胞死を軽減するか否かを、H₂O₂の曝露によって3T6に生じる2つの細胞死、ネクロシスとアポトーシス、に対する熱ショックの効果として検討した。ネクロシス細胞はLDHアッセイ、アポトーシス細胞はHoechst33342による核染色の観察によって測定した。

0 mMのH₂O₂を添加した細胞のネクロシスを0%、界面活性剤のTween20を添加した細胞のネクロシスを100%とし、0~10mMのH₂O₂を添加した細胞のネクロシスを検討すると、H₂O₂の添加濃度、添加時間依存性にネクロシスが増加し、10mMのH₂O₂を添加した細胞では、添加3時間後に20%、6時間後には60%、24時間後には約90%の細胞がネクロシスを起こしていた (Fig. 5a)。以上の結果より、10mMのH₂O₂を6時間反応させたネクロシスに対する熱ショックの影響を検討した。H₂O₂負荷により、熱ショックを加えない細胞では40%の細胞がネクロシスを起こしたが、熱ショックはネクロシス細胞を約20%に減少させた。さらに、ポジティブコントロールであるTween20によるネクロシスも、熱ショックは約35%減少させた (Fig. 5b)。

Hoechst33342を用い、同様の条件でH₂O₂によるアポトーシスを検討した結果、添加3時間後まではH₂O₂の濃度依存的にアポトーシスの増加が見られた。1 mMまでのH₂O₂は反応時間依存性にアポトーシスを生じたが、10mMH₂O₂とTween20を添加した細胞では、添加6

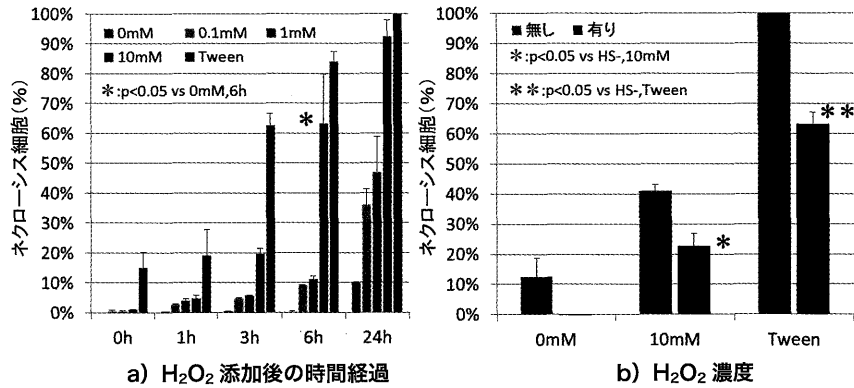


Fig. 5 ネクローシスに及ぼす熱ショックの影響

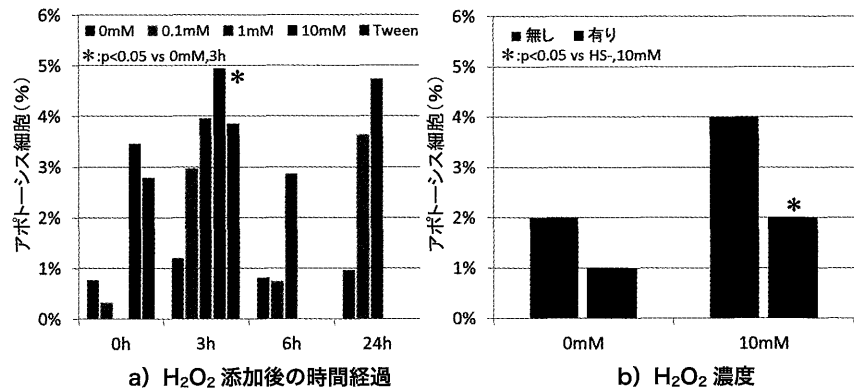


Fig. 6 アポトーシスに及ぼす熱ショックの影響

~24時間後にはアポトーシス細胞は確認できなかった (Fig. 6a)。以上の結果より、10mMのH₂O₂を3時間反応させて生じるアポトーシスに対する熱ショックの影響を検討した。熱ショックを加えない細胞では、0mMH₂O₂で2%、10mMH₂O₂で4%のアポトーシスが認められた。熱ショックを加えると、前者では1%、後者では2%の細胞がアポトーシスを生じた。従って、熱ショックはアポトーシスによる細胞死も抑制した (Fig. 6b)。

8 総括

日光照射は、紫外線や二次的に産生される活性酸素を介して真皮線維芽細胞を障害し、しわなどの皮膚老化をきたす。一方、温泉やサウナによる温熱負荷は生体に対して保護的に働き、皮膚に対しても保護効果をもたらすことが知られている。本研究では、温熱負荷が真皮の線維芽細胞に直接的に作用して紫外線による細胞障害を減弱することが出来るか否かを、培養線維芽細胞のH₂O₂負荷モデルを用いて検討した。培養線維芽細胞に42℃、1時間の熱ショックを加えると、細胞保護機能を持つHSP70が誘導された。それに伴い、H₂O₂負荷による脂質障害とタンパク質変性が抑制され、線維芽細胞のネクローシスとアポトーシスによる細胞死が減少することが示された。

8.1 日光老化と温熱負荷の細胞モデル

紫外線は組織中の水と反応して活性酸素を発生させ、二次的に細胞の酸化障害をもたらす。本研究では、紫外線の代替刺激として10mM までの H_2O_2 を用いたが、細胞内の H_2O_2 濃度は10nM といわれており、その1000倍の濃度を用いている。細胞内では他の金属と反応し、より活性の高い水酸ラジカルなどを産生するが、 H_2O_2 自体はフリーラジカルではないために反応性は低く、培養細胞に添加するモデルに用いる濃度としては一般的である。

また、培養細胞を用いる熱ショックの実験では、細胞を42℃のウォーターバスに30分～1時間程度浸水したり、培養プレートをヒーターの上に直接設置したりすることで負荷する方法が用いられている。本実験では、より均一に温熱負荷を行うために CO_2 培養器を用い、液相と気相の温度平衡、器機の表示温度と液温の誤差を実証的に校正し、より正確で定量的な温熱負荷を細胞に加えた。しかし、熱ショックの用量依存性の検討は行っておらず、さらに詳細な負荷温度や負荷時間の検討、さらには熱ショックの反復などの検討が必要と考えられる。

8.2 温熱負荷の作用機序

今回の検討では、温熱負荷が HSP70 を誘導すること、また温熱負荷が細胞障害を軽減することは明らかになったが、温熱による HSP70 の発現亢進が細胞障害抑制の直接の原因となっているかは明らかではない。因果関係を明らかにするためには、HSP70 の発現や機能を阻害したり、温熱によらずに強制的に活性化したりする実験を行う必要がある。KNK437 は HSP70 の発現阻害を起し、また PES は発現した HSP70 に結合することで HSP70 の機能を阻害するが知られている。従って、これらが温熱負荷による細胞障害の抑制効果に対してどのような影響を発揮するかを確認すれば、HSP70 の役割を確定することが出来ると考えている。

さらにマウスの HSP70 過剰発現モデルにおいても紫外線による表皮角化細胞障害が抑制されることから、病態改善因子としての HSP70 の役割が示唆される¹²⁾。しかし、温熱負荷は HSP70 以外の様々なストレス蛋白質を細胞内に誘導することが知られており、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼ、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) などの抗酸化酵素が H_2O_2 を分解することで酸化障害を抑制した可能性も否定出来ない。

8.3 HSP70 の作用機序

HSP70 が膜脂質の酸化障害を抑制する機序として、膜修復や過酸化脂質の分解を行う酵素の変性を防ぐことにより、障害された膜の分解や修復を行っている可能性が考えられる^{13),14)}。このような HSP70 による蛋白質の酸化障害抑制に関しては、変性タンパク質の疎水性部分との結合、解離を繰り返すことによって立体構造を修復する可能性や、プロテアソームに運搬して分解する可能性が示されている¹⁵⁾。

その結果として、細胞骨格蛋白や細胞膜の変性、崩壊によるネクローシスを抑制したり、ミトコンドリアや DNA の障害に続発するアポトーシスを抑制したりすることにより、線維芽細胞の細胞死を防ぎ、健康な真皮を維持することが可能になると考えられる^{16),17)}。一方、今回は検討を行わなかったが、線維芽細胞の産生するコラーゲンは、同じく熱ショックタンパク質

である HSP47によって正常な立体構造が保たれている¹⁸⁾。従って、熱ショックは細胞外基質の構造を保つことにより、紫外線による真皮の構造異常を抑制する可能性も考えられる。

以上のように、熱ショックが真皮線維芽細胞の酸化障害を減弱したことより、温泉やサウナ、日々の入浴で身体に温熱負荷を加える事により、皮膚の日光老化を予防できる可能性が示唆された。

なお、本研究の一部は、神戸女学院大学研究助成を受けて行ったものである。

注

- 1) 清水宏 あたらしい皮膚科学 (2009) 中山書店 13-16
- 2) 宮地良樹 美容皮膚科学 (2009) 南山堂 31-39, 42
- 3) 井出利憲 老化研究がわかる (2006) 羊土社 69-77
- 4) Shasha Gao et al. Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H₂O₂-induced oxidative damage in human lens epithelial cells (2011) *Mol Vis* 17:3180-90
- 5) 吉川敏一 フリーラジカルの科学 (1999) 講談社 5-14, 15-19
- 6) Yasir Hasan Siddique et al. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes (2012) *Dose Response* 10:1-10
- 7) 永田和弘 タンパク質の一生 (2008) 岩波新書 57-99
- 8) Lan JORNOT et al. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions (1998) *Biochem J* 335:85-94
- 9) Wang S et al. Kinetics Study of Endogenous Heat Shock Protein 70 Expression (2003) *J Biomech Eng* 125:794-797
- 10) 水島徹 HSPと分子シャペロン (2012) 講談社 84-90
- 11) Juliann G. Kiang et al. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology (1998) *Pharmacol Ther* 80:183-201
- 12) Minoru Matsuda et al. Prevention of UVB Radiation-induced Epidermal Damage by Expression of Heat Shock Protein 70 (2009) *J Biol Chem* 285:5848-5858
- 13) Jesper Nylandsted et al. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization (2004) *J Exp Med*. 200:425-35
- 14) Motoi Okada et al. Thermal Treatment Attenuates Neointimal Thickening With Enhanced Expression of Heat-Shock Protein 72 and Suppression of Oxidative Stress (2004) *Circulation* 109:1763-1768
- 15) Thomas Kirkegaard et al. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology (2010) *Nature* 463:549-553
- 16) Afshin Samali et al. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis (1998) *Cell Stress Chaperones* 3:228-36
- 17) Cecilia Bivik et al. HSP70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome-c in human melanocytes (2007) *Carcinogenesis* 28:537-544
- 18) AK Verrico et al. Expression of the collagen-related heat shock protein HSP47 in fibroblasts treated with hyperthermia or photodynamic therapy (1997) *Br J Cancer*. 76:719-24

(原稿受理日 2015年2月19日)