

必須脂肪酸欠乏時における皮膚障害発症のメカニズムの解明

お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系

市 育 代

Essential fatty acids (EFA) and their downstream long-chain polyunsaturated fatty acid (PUFA) are localized to cell membranes as phospholipid esters and play critical roles in regulating membrane structure, dynamics, and permeability. It is reported that EFA deficiency state causes the disruption of the skin barrier. Therefore, changes of fatty acids during EFA deficiency might participate in pathologic changes in the skin. In EFA deficiency animals, 5,8,11-eicosatrienoic acid (Mead acid, C20:3n-9) is endogenously synthesized from oleic acid, and is detected in the plasma and tissues. Mead acid is thought to be used in biological membranes as a substitute for other PUFAs. In this study, we investigated the change of Mead acid in inflammation and the influence of the decrease of Mead acid on the skin barrier function during EFAD state.

To study change of fatty acid metabolism in the skin by inflammation, we investigated the change of Mead acid in human keratinocyte HaCaT cells of EFAD state. The mRNA of inflammatory cytokine, such as IL-1 β and IL-6 were significantly increased by the stimulation of TNF- α . The mRNA of filaggrin and involucrin, which proteins correlate with barrier function, were decreased by TNF- α , suggesting that the barrier function was disrupted in HaCaT cells by inflammatory. The Mead acid composition in the cells with treatment of TNF- α was reduced 33% of the level in control cells, but other fatty acid compositions did not changed significantly. These results suggested that Mead acid synthesis was suppressed in EFAD keratinocytes by inflammation.

Next, we examined the influence of the inhibition of Mead acid synthesis on barrier function in human keratinocyte HaCaT cells. The level of Mead acid was significantly decreased by the addition of 50 μ M Δ 6 desaturase inhibitor sc26196. The mRNA level of filaggrin and involucrin was significantly decreased by the addition of sc26196. Moreover, we investigated the influence of Mead acid reduction on inflammatory response and ER stress. Although the IL-1 β and IL-6 mRNA were unchanged by treatment of sc26196, the mRNA levels of ER stress marker genes, such as CHOP and GRP78 were significantly increased. These results suggested the possibility that inhibition of Mead acid synthesis induced the skin barrier dysfunction via up-regulation of ER stress.

1. 緒 言

必須脂肪酸は生体膜の構成成分であるだけでなく、生体機能の恒常性維持にも重要な物質である。哺乳動物において必須脂肪酸が欠乏すると、成長異常や生殖機能の障害、皮膚の水分・バリア機能損失などの障害がみられることが知られている^{1,2)}。皮膚のバリア機能において、セラミドやコレステロール、遊離脂肪酸から成る細胞間脂質は重要な役割を果たしており、皮膚における脂質の変化とバリア機能の異常との関連が指摘されている³⁾。必須脂肪酸欠乏時の脂質の変化と皮膚バリア機能異常については、必須脂肪酸欠乏モデル動物の皮膚のセラミドにおいて、リノール酸含有アシルセラミドが減少し、代わりにオレイン酸含有アシルセラミドが増加すること、そしてその脂質の変化が経皮水分蒸散量の増加に関与している可能性が示唆されている⁴⁾。しかしながら、必須脂肪酸欠乏時の脂肪酸の変化と皮膚障害に関する知見は乏しい。

必須脂肪酸欠乏時には、生体内でミード酸 (C20:3n-9) という多価不飽和脂肪酸がオレイン酸から産生されることが知られており⁵⁾、我々は必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸に関して産生遺伝子と産生経路を明らかにしている⁶⁾。ミード酸はアラキドン酸 (C20:4n-6) と同じ Δ 5位に二重結合を有するなど構造が類似している。アラキドン酸はプロスタグランジンやロイコトリエンなど炎症性代謝物の前駆体であり、代謝物は関節リウマチ⁷⁾や気管支喘息⁸⁾などの様々な炎症性疾患に関与していることが知られている。ミード酸に関してもロイコトリエン様の化合物が同定されているが⁹⁾、ミード酸やその代謝物の生理機能はよくわかっていない。そこで本研究では、皮膚細胞におけるミード酸の生理作用を明らかにするにあたり、必須脂肪酸欠乏時のミード酸の産生抑制が皮膚のバリア機能に及ぼす影響を検討した。

また、皮膚において必須脂肪酸は重要な構成成分であり、必須脂肪酸などの多価不飽和脂肪酸は生体膜のリン脂質に多く存在している。生体膜リン脂質には、飽和脂肪酸から多価不飽和脂肪酸まで様々な脂肪酸が結合しており、多くの分子種が存在するが、ホスファチジルイノシトール (PI) はホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルエタノールアミン (PE) などの他のリン脂質と異なり、sn-1位にステアリン酸 (C18:0)、sn-2位にアラキドン酸を有する分子種がその殆どを占めている。我々は以前、必須脂肪酸欠



The clarification of the mechanism of skin lesions in essential fatty acid deficiency states

Ikuyo Ichi

Natural Science Division, Faculty of Core Research, Ochanomizu University

乏マウスのPIにおいてミード酸が圧倒的に多く分布することを見出している。このように必須脂肪酸欠乏時のPIでは、減少したアラキドン酸の代わりに同じΔ5位に二重結合を持つミード酸が選択的に取り込まれた可能性がある。PIは細胞内シグナル伝達において極めて重要な役割を持つ物質であり、様々な生命現象に関与するが、PIが他のリン脂質に比べて特徴的な脂肪酸鎖が必要である生物学的意義は分かっていない。最近、PIの脂肪酸鎖を規定する遺伝子で、sn-2位にアラキドン酸を導入するアシル基転移酵素lysoPI acyltransferase 1 (LPIAT1) が同定された¹⁰⁾。LPIAT1欠損マウスは脳の形態形成に異常があり、生後間もなく死に至る。しかし、必須脂肪酸欠乏時の皮膚においてリン脂質の脂肪酸鎖の変化が皮膚のバリア異常とどのように関わっているかは不明である。そこで本研究では、必須脂肪酸欠乏の皮膚細胞においてPIの特異的な脂肪酸組成がどのような意義を有しているか検討を行った。

2. 実験

2.1. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞株HaCaT細胞およびマウス線維芽細胞株NIH3T3細胞は、10%FBSと1%PS (Penicillin-Streptomycin) と1%ピルビン酸ナトリウムを含むDMEM培地で、37℃、5%CO₂条件下で培養した。

2.2. Δ6位不飽和化酵素の阻害剤によるミード酸の産生抑制

必須脂肪酸欠乏状態にあるHaCaT細胞において、細胞播種の48時間後にミード酸産生酵素であるΔ6位不飽和化酵素の阻害剤sc26196を2, 10, 50 μM添加し、24時間後に細胞を回収した。

2.3. TNF-αによる炎症誘導の条件

HaCaT細胞において、細胞播種48時間後にTNF-αを5ng/mLおよび20ng/mL添加し、24時間後に細胞を回収した。

2.4. siRNAによる発現抑制

LPIAT1のsiRNAにはstealth RNAi (MSS246502 invitrogen) を使い、コントロールにはstealth RNAi Negative Control Duplexeを用いた。NIH3T3細胞において、細胞播種24時間後に20nMのLPIAT1のsiRNA (stealth RNAi; MSS246502 invitrogen) をLipofectamine RNAiMAXを用いて導入し、72時間後に細胞を回収した。LPIAT1の発現抑制効率は定量PCRを用いて確認した。

2.5. ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)による脂肪酸の分析

細胞はBligh & Dyer法にて脂質を抽出後、硫酸-メタ

ノールによるメチルエステル化を行い、GC-MS (GCMS-QP2010 Ultra, 島津製作所)にて脂肪酸を解析した。

3. 結果

3.1. HaCaT細胞におけるミード酸の産生抑制がストレス因子に及ぼす影響

我々は、必須脂肪酸欠乏時のミード酸がΔ6位不飽和化酵素を介して、オレイン酸(C18:1n-9)から産生されることを明らかにしている⁵⁾。そこで、Δ6位不飽和化酵素の阻害剤sc26196を用いて、ミード酸の産生を抑制した際の細胞機能や炎症性因子に及ぼす影響を調べた。

必須脂肪酸欠乏状態にあり、ミード酸が存在するヒト表皮角化細胞HaCaTへの50 μMのsc26196添加によって、ミード酸は15%程度まで減少した(図1)。しかしながら、他の多価不飽和脂肪酸の変化はみられなかった。また、MTT assayにより、sc26196添加による細胞死について調べたところ、50 μMのsc26196添加では細胞死はみられなかった(図2)。

次に、必須脂肪酸欠乏におけるミード酸の産生抑制が皮

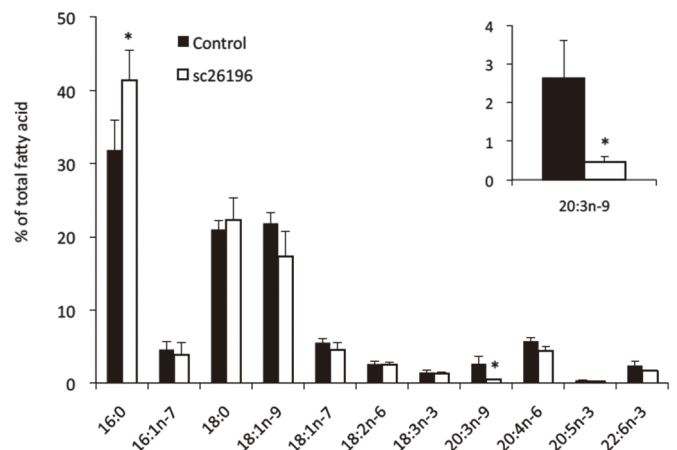


図1 Δ6不飽和化阻害剤によるHaCaT細胞の脂肪酸組成の変化
細胞播種の48時間後に、50 μMのsc26196を添加し、24時間後に細胞を回収した。Mean ± SE (n=3), *: p<0.05 vs Control

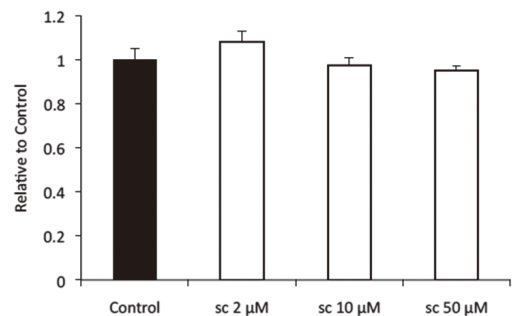


図2 Δ6不飽和化阻害剤添加が細胞死に及ぼす影響
細胞播種の48時間後に、50 μMのsc26196を添加し、24時間後に細胞を回収した。Mean ± SE (n=3), *: p<0.05 vs Control

皮膚のバリア機能関連タンパク質であるフィラグリンやインボルクリンの遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。表皮は約95%が角化細胞で構成され、分化度の異なる角化細胞が重層化した構造をしているが、バリア機能は主に最外層である角層が担っていることが知られている。角層におけるバリア機能に関与する代表的なタンパク質として、フィラグリンとインボルクリンが挙げられる。フィラグリンは、角化細胞骨格を形成するケラチン線維を束ね、角層構造を強固に保つとともに、分解産物である天然保湿因子は、角層の水分保持に関与している¹¹⁾。また、インボルクリンは角層の細胞膜の内側に存在する不溶性タンパク質膜の主成分となり強靱な細胞構造を形成している¹²⁾。必須脂肪酸欠乏のHaCaT細胞へのsc26196添加によってフィラグリンやインボルクリン遺伝子発現は有意に減少した(図3)。したがって、表皮角化細胞におけるミード酸の産生抑制は

皮膚バリア機能の低下を誘導する可能性が示唆された。

皮膚におけるバリア機能の異常に、皮膚細胞の炎症性因子¹³⁾や小胞体ストレス¹⁴⁾の増加が関与しているという報告がある。ミード酸産生を抑制したHaCaT細胞では、炎症性サイトカインのIL-6やIL-1 β が増加し(図4a)、小胞体ストレスマーカーであるCHOPやGRP78の遺伝子発現も有意に増加した(図4b)。これらの結果より、ミード酸の産生抑制によるHaCaT細胞の皮膚バリア機能の低下には、炎症性サイトカインや小胞体ストレスの増加が関与している可能性が示唆された。

3.2. HaCaT細胞における必須脂肪酸欠乏時の炎症誘導がミード酸産生に及ぼす影響

我々は以前、必須脂肪酸欠乏状態のマウスマクロファージ細胞株Raw264.7細胞への炎症刺激によってミード酸

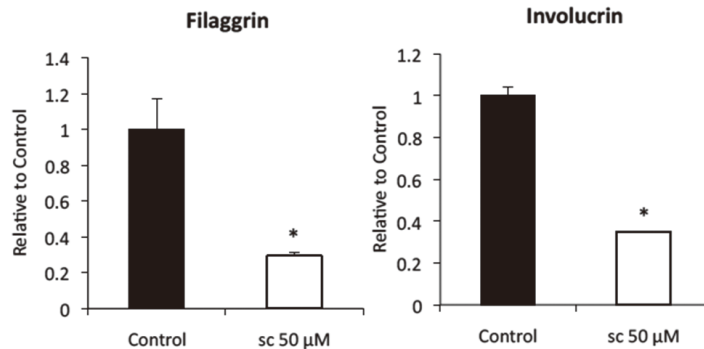


図3 ミード酸産生抑制が皮膚バリア機能関連因子発現へ及ぼす影響
細胞播種の48時間後に、50 μ Mのsc26196を添加し、24時間後に細胞を回収した。Mean \pm SE (n=3), *; p<0.05 vs Control

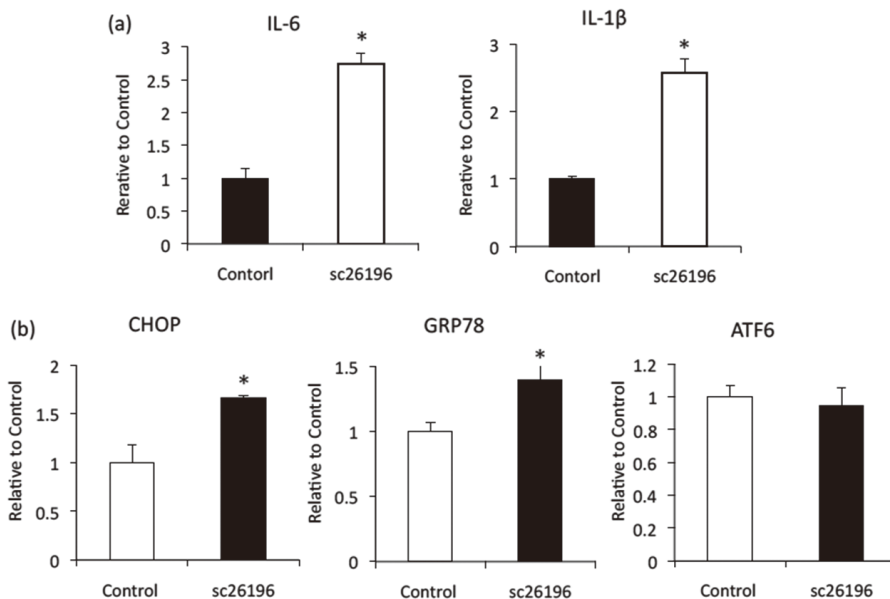


図4 ミード酸の産生抑制が炎症因子や小胞体ストレスに及ぼす影響
細胞播種の48時間後に、50 μ Mのsc26196を添加し、24時間後に細胞を回収し、(a)炎症性サイトカインと(b)小胞体ストレスのmRNAを測定した。
Mean \pm SE (n=3), *; p<0.05 vs Control

の産生が抑制されることを明らかにしている(未発表)。必須脂肪酸欠乏時の皮膚細胞において炎症誘導が脂肪酸代謝に及ぼす影響は不明であることから、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞を用いて、必須脂肪酸欠乏時の TNF- α による炎症誘導が脂肪酸代謝に及ぼす影響を検討した。

必須脂肪酸欠乏状態の HaCaT 細胞において、5 ng/mL 及び 20 ng/mL の TNF- α 添加では細胞生存率に変化はみられなかったことから、以降の実験は 20 ng/mL の TNF- α を用いて行った。まず、炎症性サイトカインの IL-6 や IL-1 β の遺伝子発現は TNF- α による炎症誘導時に増加し

ていた(図 5a)。次に、皮膚バリア機能関連タンパク質のフィラグリンやインボルクリンの遺伝子発現を調べたところ、TNF- α 添加によってこれらの遺伝子発現は有意に減少しており(図 5b)、HaCaT 細胞への炎症刺激によってバリア機能低下が誘導されている可能性が示唆された。そこで、TNF- α による炎症誘導時の脂肪酸組成の変化を比較したところ、ミード酸は Control の 33% まで減少した。しかし、その他の脂肪酸組成に大きな変化はみられなかった(図 6)。したがって、炎症誘導によるミード酸の減少が皮膚のバリア機能の破綻に関与している可能性が示唆された。

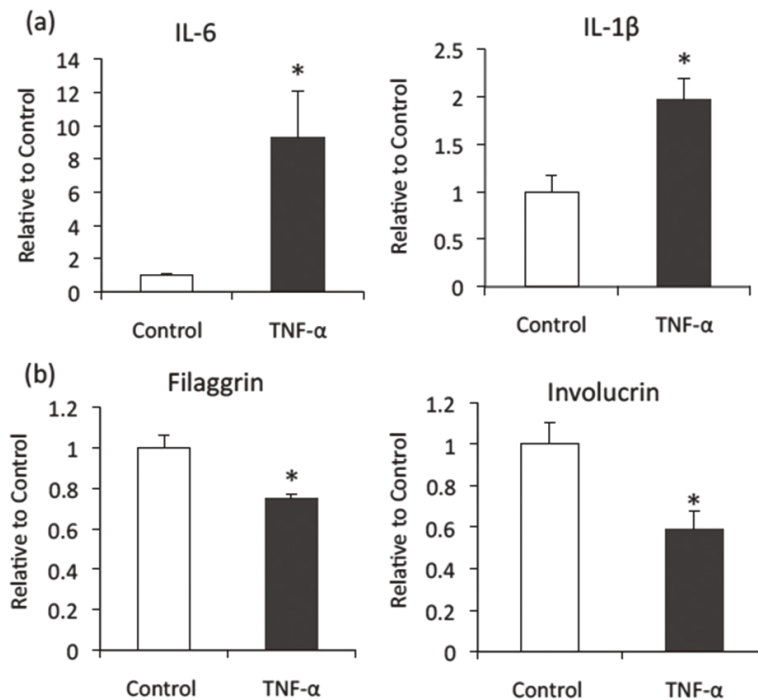


図 5 TNF- α による炎症誘導と皮膚バリア機能関連因子への影響
細胞播種の 48 時間後に 20ng/mL の TNF- α と 50 μ M を添加し、24 時間後に細胞を回収した。Mean \pm SE (n=3), *; p<0.05; 異なる文字間で有意差あり

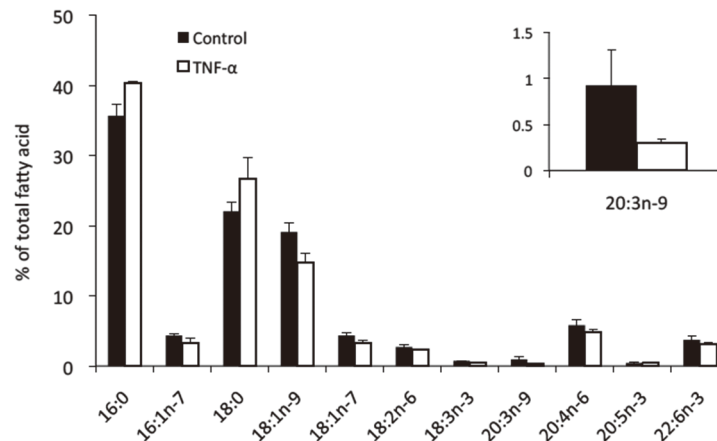


図 6 HaCaT 細胞における TNF- α の炎症誘導による脂肪酸組成の変化
細胞播種 48 時間後に 20ng/mL の TNF- α を添加し、24 時間後に細胞を回収した。Mean \pm SE (n=3), *; p<0.05 vs Control

しかしながら、皮膚細胞におけるミード酸の抗炎症作用については、ミード酸の添加実験を行うなどして明らかにする必要がある。

3. 3. 線維芽細胞におけるリン脂質のミード酸減少が細胞機能に及ぼす影響

先の研究より、必須脂肪酸欠乏マウスにおいてミード酸はリン脂質の中でもPIでの増加が著しいことを報告している。必須脂肪酸欠乏時のミード酸は、PIのsn-2位にアラキドン酸を導入するアシル転移酵素LPIAT1によって導入される可能性があることから、LPIAT1の発現抑制によってPIのミード酸が減少する可能性がある。そこで本研究では、培養細胞の中でもミード酸が多く分布するマウス線維芽細胞NIH3T3を用いて、LPIAT1の発現抑制によるリン脂質の脂肪酸組成の変化を調べた。LPIAT1の発

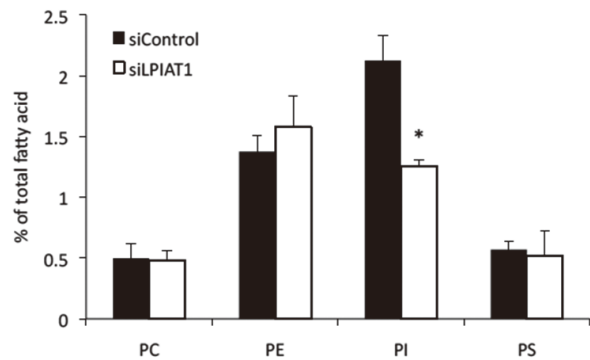


図7 LPIAT1発現抑制細胞のリン脂質におけるミード酸の変化
細胞播種24時間後の細胞に50nMのLPIAT1のsiRNAをトランスフェクションし、72時間後に細胞を回収した。リン脂質を分画後、各リン脂質のミード酸を比較した。Mean±SE (n=3), *, p<0.05 vs siControl

現抑制細胞ではmRNAが20%程度まで減少しており、この添加濃度でLPIAT1の発現抑制が十分に行われていることを確認した。これらの細胞の各リン脂質のミード酸を比較したところ、LPIAT1の発現抑制細胞ではPIでのみミード酸の減少がみられ、ホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)での減少はみられなかった(図7)。

そこでこれらの細胞を用いて、PIにおけるミード酸の減少が細胞増殖やストレス応答に及ぼす影響を調べた。まず、siLPIAT1細胞において細胞増殖が亢進している可能性が示された(図8)。

次に、LPIAT1遺伝子発現抑制による小胞体ストレスや炎症性因子の遺伝子発現の変化を調べた。その結果、LPIAT1の発現抑制細胞でこれらのストレスマーカーに変化はみられなかった(図9)。したがって、PIにおけるミード酸の減少によって細胞増殖は促進するが、ストレス因子には影響を及ぼさないことがわかった。

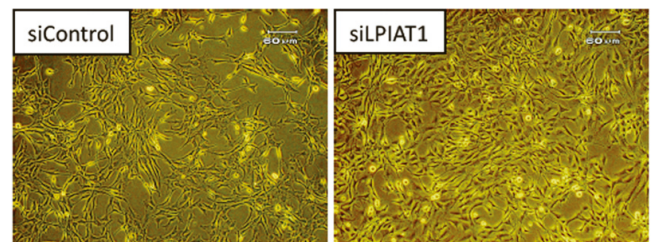


図8 LPIAT1の発現抑制が細胞増殖に及ぼす影響
細胞播種24時間後の細胞にLPIAT1のsiRNAをトランスフェクションし、72時間後に細胞を回収した。Mean±SE (n=3), *, p<0.05 vs siControl

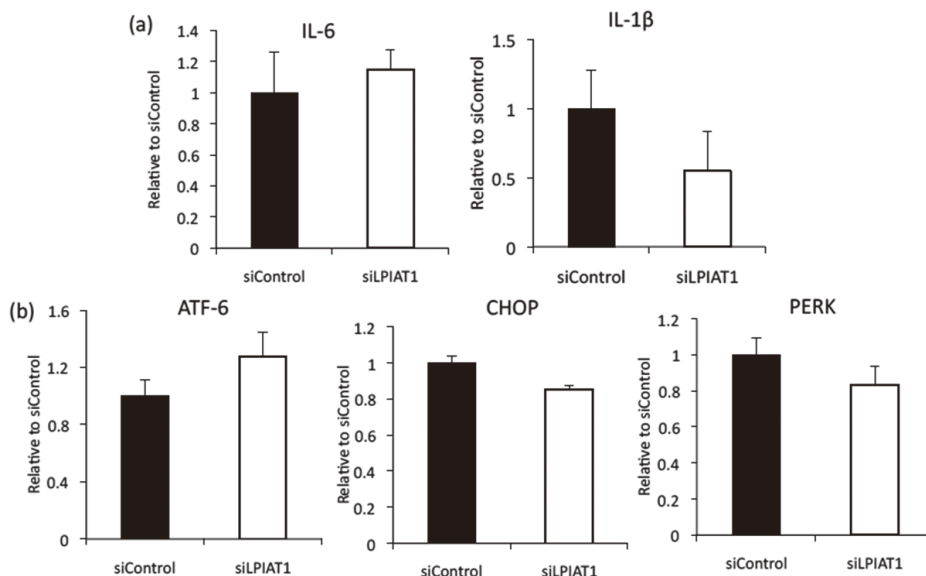


図9 LPIAT1の発現抑制が小胞体ストレス及び炎症因子に及ぼす影響
細胞播種24時間後の細胞にLPIAT1のsiRNAをトランスフェクションし、72時間後に細胞を回収した。小胞体ストレスのマーカーとしてATF-6、CHOP、PERKを、炎症性のマーカーとしてIL-6とIL-1βのmRNAを測定した。Mean±SE (n=3), *, p<0.05 vs siControl

4. 考 察

わが国において、通常の食生活で必須脂肪酸が欠乏することは殆どないが、クローン病など脂質の吸収阻害がみられる場合や長期にわたって中心静脈栄養を行っている患者では、必須脂肪酸欠乏症が生じることがある。近年、高齢者における栄養不良が増加しており、また高齢者では脂質吸収能の低下もみられることから、今後栄養不良に伴う必須脂肪酸欠乏の高齢者などが増加する可能性がある。皮膚における脂質やタンパク質はバリア機能に重要な役割を果たしていることが知られているが、皮膚における脂肪酸の生理作用に関する報告は少なく、また必須脂肪酸欠乏時の皮膚における脂肪酸代謝に関する知見はない。そこで本研究では必須脂肪酸欠乏状態の培養細胞を用いて、必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸の減少による「炎症性因子」変化や、ミード酸の産生抑制による皮膚バリア機能の異常を調べることで、ミード酸の皮膚における生理的意義について検討した。

まず、必須脂肪酸欠乏時のミード酸の産生抑制によって、皮膚のバリア機能因子であるフィラグリンとインボルクリンの遺伝子発現が減少し、バリア機能の異常が引き起こされている可能性が示唆された。in vitroの実験において、炎症刺激や小胞体ストレスによってフィラグリンやインボルクリンの発現が減少することが報告されていることから^{13,14)}、炎症因子や小胞体ストレス因子への影響を調べたところ、必須脂肪酸欠乏時のミード酸の産生抑制によってCHOPやGRP78などの小胞体ストレス因子の遺伝子発現の増加がみられた。必須脂肪酸欠乏時には魚鱗癬様の皮膚障害がみられるが、魚鱗癬の症状がみられる先天性の皮膚疾患患者ではCHOPのタンパク質発現が増加しており、小胞体ストレスの上昇が皮膚機能の異常を誘導している可能性が示唆されている¹⁴⁾。本研究において、HaCaT細胞におけるミード酸の産生抑制によりCHOPやGRP78の遺伝子発現が増加したことから、小胞体ストレスが誘導されバリア機能異常が誘導された可能性があるが、今後この要因については詳細に検討する必要がある。

また、我々は以前にマクロファージ様のRaw細胞を用いて、抗炎症作用のあるEPA（エイコサペンタエン酸）に比べて弱いながらも、ミード酸が抗炎症作用を有する脂肪酸であることを示している（未発表）。今回、必須脂肪酸欠乏時のミード酸の産生抑制によって、炎症性サイトカインであるIL-6やIL-1 β も有意に増加していたことから、必須脂肪酸欠乏時のミード酸は炎症反応に対して抑制的に作用し、皮膚のバリア機能維持を担っている可能性が考えられる。

必須脂肪酸欠乏時のミード酸はリン脂質の中でホスファチジルイノシトール(PI)に多く分布することが報告されて

いる。生体膜リン脂質には、飽和脂肪酸から多価不飽和脂肪酸まで様々な脂肪酸が結合しており、多くの分子種が存在するが、PIはsn-1位にステアリン酸、sn-2位にアラキドン酸の分子種がその殆どを占めている。PIにおける脂肪酸鎖の特性の意義は不明であるが、必須脂肪酸欠乏時にPIでミード酸が増加したのは、減少したアラキドン酸の代わりに同じ $\Delta 5$ 位に二重結合を持つミード酸が選択的にPIに取り込まれたことが考えられる。LPIAT1の遺伝子発現抑制では、PIでのみミード酸が減少し、細胞増殖が増加する傾向がみられた。siLPIAT1ノックアウトマウスではPIのアシル基が1本少ないLysoPIが増加することが報告されているが¹⁵⁾、LysoPIは癌化したラット甲状腺上皮細胞において、細胞増殖を活性化させることが報告されている¹⁶⁾。したがって、本研究でみられたLPIAT1発現抑制細胞における細胞増殖の亢進は、LysoPIの増加が関与している可能性が考えられる。

一方、PI由来のセカンドメッセンジャーであるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP3) や、ジアシルグリセロール (DAG) の産生には、ホスホリパーゼC (PLC) という酵素が関与しており、PLCには6種類のアイソザイムが存在する。PLCのアイソザイムのうち、PLC $\delta 1$ 欠損マウスでは、表皮の肥厚や分化異常がみられたり¹⁷⁾、PLC $\gamma 1$ の発現抑制によりインボルクリンの発現が抑制されたりするなど¹⁸⁾、PIの代謝異常によって皮膚機能に異常がみられることが報告されている。必須脂肪酸欠乏症でも表皮細胞の異常による皮膚障害がみられるが、その発症メカニズムは不明である。必須脂肪酸欠乏では本来生理的に重要なアラキドン酸を持つPIの代わりに、ミード酸を持つPIが増加することが、必須脂肪酸欠乏症の皮膚障害の要因であることも考えられる。今回、LPIAT1の発現を抑制することでPIにおけるミード酸の減少はみられたが、炎症性サイトカインなどのストレス因子に対する影響はみられなかった。本研究においてPIにおけるミード酸の特異的な増加がもつ意義を明らかにすることはできなかったが、今後も必須脂肪酸欠乏時のミード酸の変化と皮膚の異常との関連について研究を進めることで、皮膚における脂肪酸の新たな機能を解明したいと考えている。

(引用文献)

- 1) George OB, Mildred MB, : A new deficiency disease produced by the right exclusion of fat from the diet, J. Biol. Chem., 82, 345-67, 1929.
- 2) Innis SM, : Essential fatty acids in growth and development, Prog. Lipid Res., 30, 39-103, 1991.
- 3) Lavrijsen AP, Bouwstra JA, Gooris GS, Weerheim A, Boddé HE, Ponc M, : Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization

- in patients with lamellar ichthyosis, *Invest. Dermatol.*, 105, 619-24, 1995.
- 4) Melton JL, Wertz PW, Swartzendruber DC, Downing DT, : Effects of essential fatty acid deficiency on epidermal O-acylsphingolipids and transepidermal water loss in young pigs, *Biochim. Biophys. Acta*, 921, 191-7, 1987.
 - 5) Mead JF, : The metabolism of the essential fatty acids, *Am. J. Clin. Nutr.*, 6, 656-61, 1958.
 - 6) Ichi I, Kono N, Arita Y, Haga S, Arisawa K, Yamano M, Nagase M, Fujiwara Y, Arai H, : Identification of genes and pathways involved in the synthesis of Mead acid (20:3n-9), an indicator of essential fatty acid deficiency, *Biochim. Biophys. Acta*, 1841, 204-13, 2014.
 - 7) Robinson DR, McGuire MB, Levine L, : Prostaglandins in the rheumatic diseases, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 256, 318-29, 1975.
 - 8) Sally E, Wenzel MD, : Arachidonic Acid Metabolites: Mediators of Inflammation in Asthma, *Pharmacotherapy*, 3S-12S, 17, 1997.
 - 9) Jakschik BA, Morrison AR, Sprecher H, : Products derived from 5,8,11- eicosatrienoic acid by the 5-lipoxygenase-leukotriene pathway, *J Biol Chem.*, 258, 12797-800, 1983.
 - 10) Lee HC, Inoue T, Sasaki J, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, Tanaka F, Udagawa O, Kono N, Itoh T, Ogiso H, Taguchi R, Arita M, Sasaki T, Arai H, : LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice, *Mol. Biol. Cell*, 23, 4689-700, 2012.
 - 11) Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA, : Stratum corneum moisturization at the molecular level, *J. Invest. Dermatol.*, 103, 731-41, 1994.
 - 12) Eckert RL, Green H, : Structure and evolution of the human involucrin gene, *Cell*, 46, 583-9, 1986.
 - 13) Kim BE, Howell MD, Guttman-Yassky E, Gilleaudeau PM, Cardinale IR, Boguniewicz M, Krueger JG, Leung DY, : TNF- α downregulates filaggrin and loricrin through c-Jun N-terminal kinase: role for TNF- α antagonists to improve skin barrier, *J. Invest. Dermatol.*, 131, 1272-9, 2011.
 - 14) Dahlqvist J, Törmä H, Badhai J, Dahl N, : siRNA silencing of proteasome maturation protein (POMP) activates the unfolded protein response and constitutes a model for KLICK genodermatosis, *PLoS One*, e29471, 2012.
 - 15) Anderson KE, Kielkowska A, Durrant TN, Juvin V, Clark J, Stephens LR, Hawkins PT, : Lysophosphatidylinositol-acyltransferase-1 (LPIAT1) is required to maintain physiological levels of PtdIns and PtdInsP(2) in the mouse, *PLoS One*, 8, e58425, 2013.
 - 16) Falasca M, Silletta MG, Carvelli A, Di Francesco AL, Fusco A, Ramakrishna V, Corda , : Signalling pathways involved in the mitogenic action of lysophosphatidylinositol. *Oncogene*, 10, 2113-24, 1995.
 - 17) Kanemaru K, Nakamura Y, Sato K, Kojima R, Takahashi S, Yamaguchi M, Ichinohe M, Kiyonari H, Shioi G, Kabashima K, Nakahigashi K, Asagiri M, Jamora C, Yamaguchi H, Fukami K, : Epidermal phospholipase C δ 1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice, *Nat Commun.*, 3, 963, 2012.
 - 18) Xie W, Samoriski GM, McLaughlin JP, Romoser VA, Smrcka A, Hinkle PM, Bidlack JM, Gross RA, Jiang H, Wu D, : Genetic alteration of phospholipase C beta3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10385-90, 1999.