心臓由来幹細胞研究から想定される心臓拍動持続促進因子

川口奈奈子^{1,2)}, 松岡瑠美子^{2,3)}, 中西 敏雄¹⁾東京女子医科大学循環器小児科¹⁾,東京女子医科大学国際統合医科学インスティテュート²⁾, 若松河田クリニック³⁾

Keywords :

cardiac stem cell, GATA4, IGF-1, cardiomyocyte, apoptosis

Cardiac Myocyte Contraction Sustaining Enhancing Factor
Predicted from Cardiac Stem Cell ResearchNanako Kawaguchi^{1,2)}, Rumiko Matsuoka^{2,3)}, Toshio Nakanishi¹⁾¹⁾Department of Pediatric Cardiology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan,²⁾International Research and Educational Institute for Integrated Medical Science (IREIIMS), Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan³⁾Wakamatsu Kawada Clinic, Tokyo, Japan

We isolated cardiac stem cells (CSCs), named CSC-4A, from adult rats that revealed high GATA4 expression levels. When the primary cardiomyocytes from the adult rat heart were co-cultured with CSC-4A with or without inserts (the filter that separates these two types of cells to avoid direct contact), the cardiomyocytes sustained the contraction compared with the cardiomyocytes cultured alone or those cultured with fibroblasts or GATA4 low CSCs. The medium from the co-cultures of CSC-4A and cardiomyocytes contained higher IGF-1 concentrations. CSC-4A did not release IGF-1 or expressed IGF-1 mRNA. Therefore, CSC-4A may express some soluble factors that enhance IGF-1 expression in co-cultured cardiomyocytes. Identification of such soluble factors would enable us to develop the appropriate drugs or regeneration materials or a combination of both, which are key to the development of more efficient regenerative medical tools in the future.

要 旨

心筋梗塞後に低下した心機能回復のための治療に、胚性幹細胞, induced pluripotent stem cell (iPS 細胞), 体性幹細胞などを用いた幹細胞医療が注目されている。胚性幹細胞および iPS 細胞は、体性幹細胞と比較して、効率良く心筋細胞に分化するので、iPS 細胞を心筋細胞に分化させ、死滅した心筋細胞に代わって機能回復を図る再生医療の確立が期待される。一方、体性幹細胞を用いる再生医療の開発も進められている。われわれは、心臓にある c-kit 陽性細胞を分離培養し、転写因子 GATA4 発現が高い心臓幹細胞を分離した (CSC-4A)。GATA4 発現が高い細胞は troponin 陽性細胞に分化しやすい傾向があり、かつ、共存培養心筋細胞の拍動持続時間を延長させる効果が観察され、再生医療に有用な性質と考えられた。われわれの研究から、心筋細胞と CSC-4A との共存培養液では、insulin-like growth factor (IGF)-1 の濃度が上昇しており、一方、CSC-4A 自体は IGF-1 を発現しないことから、CSC-4A が未知のサイトカイン (心臓拍動持続促進因子) を放出して心筋細胞の IGF-1 発現を上昇させ、拍動持続を促進する可能性が示唆された。このサイトカインの正体が明らかになれば、単独、あるいは iPS 細胞由来心筋細胞との併用による再生医療の開発につながることを期待される。

はじめに

心筋梗塞は今や世界中で主要な死因の一つとされている¹⁻³⁾。心筋梗塞は、心筋細胞の壊死により発症する²⁾。iPS 細胞が作製され、これを心筋細胞に分化させ、死滅

した心筋細胞に代わって機能回復を図る治療法の開発は非常に有効であることは間違いなく⁴⁻⁸⁾、また、遺伝子変異による先天性心疾患や小児の心筋症に対しても、正常遺伝子導入後に iPS 細胞を作製すれば正常な心筋細胞を作製することができ、治療法としても有用

2013 年 12 月 5 日受付 別刷請求先: 〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1

2014 年 8 月 5 日受理

東京女子医科大学循環器小児科 川口奈奈子

であると考えられる。それだけではなく、小児の心筋症病態モデルを作製でき、診断法の開発ならびに、治療薬の評価にも使うことが可能である。患者由来 iPS 細胞を心筋分化させた in vitro 病態モデルとして、QT 延長症候群⁹⁻¹³⁾、LEOPARD 症候群¹⁴⁾の心筋細胞が報告されている。

こういった直接心筋細胞を作製する方法のほかに、これまでの心臓幹細胞の研究から、サイトカインを用いて心筋細胞のアポトーシスを抑制して、心筋細胞の拍動をより長い時間持続させることが可能であると考えられている¹⁵⁻¹⁸⁾。このようなサイトカインを明らかにし、将来再生医療に用いられる iPS 細胞由来心筋細胞に作用させ、拍動の持続性が高い iPS 細胞由来心筋細胞を作製し、治療に用いられる可能性がある。本稿では、特に、IGF-1 に注目する。IGF-1 は、インスリンに類似したポリペプチドで、個体の成長、発達、代謝に大きく関与する¹⁹⁾。細胞膜上の受容体(IGF-IR)を介して、フォスファチジルイノシトール三リン酸(Phosphatidylinositol 3-kinase : PI3-K)、Akt を介して、細胞のアポトーシスの抑制と細胞の肥大(hypertrophy)を起こすことが知られている(Fig. 1)^{19, 20)}。IGF-1 は、Ras, Raf, MAP kinase のシグナル伝達系を活性化し、さらに microRNA による制御も受ける²¹⁾。Akt の下流では FOXO(forkhead transcription factors)などの転写因子が細胞周期停止、アポトーシス、酸化ストレス、糖新生酵素の活性化を起こす。最近では、Akt により mTOR(mammalian target of rapamycin)が制御を受けて、細胞の成長、アポトーシス、オートファジーが制御されることも明らかになってきた¹⁹⁾。また、Akt の下流には、一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase : NOS)もあり、血管内皮細胞においては、血圧調節、血管リモデリング、血管新生を促進する。このように、IGF-1 は、心臓や血管に関して重要な制御を行っていることが知られている²²⁾。

2003 年、c-kit や sca-1 など、幹細胞のマーカーを発現する細胞が心臓にも存在することが報告された²³⁾。これらの幹細胞は、体細胞系幹細胞であり、主に心臓系の細胞(平滑筋、心筋、血管内皮細胞)に分化すると考えられた。そこでわれわれも、成体ラット心臓から c-kit 陽性心臓由来幹細胞を 11 回分離培養し(CSC-1 ~ CSC-11)、その性質決定を行った¹⁵⁾。その結果、心臓系細胞のみならず間葉系の細胞にも分化し、遺伝子発現パターンも一様ではなく、さまざまであった²⁴⁻³⁰⁾。心臓、心筋細胞の形成に大きく関わることで知られる、結合転写因子 GATA-4 の遺伝子発現に注目し、われわれが分離した細胞(CSC-1 ~ CSC-11)について継代数を重ねるごとに GATA4 の発現パターンを調べたとこ

Fig. 1 IGF-1 signaling pathway.

ろ、CSC-4 で、継代数の増加とは無関係に非常に高い発現を保つことが観察された。CSC-4 からクローン化した細胞(CSC-4A)も高い GATA4 の遺伝子発現が Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)法により確認され、高いタンパク質発現がウェスタンブロット、免疫染色により確認された。GATA-4 発現が高い細胞は、CSC-4A 以外のクローン細胞も含めて、心筋細胞特異的に発現するトロポニン陽性細胞に分化しやすく、共存培養した成体ラット由来心筋細胞に対して、その拍動を有意に促進した^{15, 18)}。

1. CSC-4A 細胞の心筋細胞拍動に対する作用について

Fig. 2 に心筋細胞(Myocyte : Myo と記す)と線維芽細胞(Fibroblast : Fibro と記す)の共存培養(Fibro + Myo と記す)、心臓幹細胞クローンと心筋細胞の共存培養(CSC1A + Myo, CSC3C + Myo, CSC4A + Myo)の 7, 14, 21 日培養時に拍動する心筋細胞を計数した結果を示す。CSC-4A のみに共存心筋細胞の拍動を促進する効果がみられた。そこで、CSC-4A がどのようなメカニズムで心筋細胞の拍動を促進するのかをさらに検討した。幹細胞と心筋細胞をフィルター(0.22 μ m のポアサイズ)で隔離しても、心筋細胞単独あるいはラット線維芽細胞と共存培養した場合よりも、共存培養 3 日後、1 カ月後の拍動心筋細胞数は有意に上昇した(約 8 倍)。この時、培養液中のサイトカインをいくつか ELISA で測定したところ、IGF-1 が共存培養で 3 倍から 8 倍上

Fig. 2 Co-culture of GATA-4 high expressing c-kit positive CSCs with adult cardiomyocytes improves cardiomyocyte attachment and contractility.

A-B. The number and percent of attached and beating cardiomyocytes from 7-21 days culture alone (Myo alone) or coculture with either fibroblasts (Fibro+Myo), GATA-4 low expressing CSCs (CSC1A+Myo, CSC3C+Myo) or GATA-4 high expressing c-kit positive CSCs (CSC4A+Myo).

C-D. The number and percent of attached and beating cardiomyocytes from 7-21 days culture Myo alone, Fibro+Myo, CSC1A+Myo, CSC3C+Myo or CSC4A+Myo, using cell culture inserts to separate contact between the CSCs and cardiomyocytes.

* P,0.05 vs. Myo alone, Fibro+Myo, CSC1A+Myo, CSC3C+Myo. Data are mean $\pm$ SD for 3 wells/condition and analyzed using ANOVA. (Figure from ref 18)

昇し、IGF-1 濃度と拍動心筋細胞数に正の相関が認められた (Fig. 3)。さまざまな細胞の増殖や分化を制御することで知られる Transforming growth factor (TGF)- β や、血管形成を促進する vascular growth enhancing factor (VGEF) には、このような相関は見られなかった。また、CSC-4A においては、caspase-3 の発現が低下しており、すなわち、心筋細胞のアポトーシスが抑制されていた。IGF-1 の抗体を共存培養液に加えると、拍動促進効果が抑制された¹⁸⁾。したがって、心筋拍動持続効果には、IGF-1 が関与することが示唆された。

心筋拍動持続効果は、当初は、CSC-4A が IGF-1 を分泌する効果によると考えていた。しかしながら、CSC-4A の培養液に血清 (fetal bovine serum: FBS) を加えても、加えなくても、ELISA 法で IGF-1 タンパク質の発現は観察されなかった (Fig. 4A)。むしろ CSC-3C で、有意に IGF-1 の発現は高かった (Fig. 4A)。RT-PCR 法でも、IGF-1 遺伝子の発現はラット線維芽細胞 (Rat1) には

観察されたが、CSC-4A には観察されなかった (Fig. 4B)。培養心筋細胞に、CSC-4A の conditioned medium を 50% 添加しても、IGF-1 の発現レベルは増加せず、また、CSC-4A に培養心筋細胞の conditioned medium を 50% 添加しても、IGF-1 の発現は観察されなかった (Fig. 4C)。以上の結果から、心筋細胞の IGF-1 発現上昇は、CSC-4A が常に放出する未知のサイトカイン (心筋拍動持続因子と呼ぶ) によって起こり、心筋細胞の IGF-1 が上昇することで、アポトーシスが抑制されると考えられる。

心筋細胞の拍動持続効果には、IGF-1 が関与することが明らかになったが、GATA4 高発現 CSC との関係については、依然として明らかではない。しかしながら、心筋拍動持続因子を明らかにすれば、心筋細胞にのみ IGF-1 を誘導することができる利点がある。

Fig. 3 Increased IGF-1 concentration in the GATA-4 high expressing CSC/cardiomyocyte co-culture medium.

A. VEGF concentration following 21 days of cardiomyocyte culture alone (Myo alone) or co-cultured with fibroblasts (Fibro + Myo), GATA-4 low expressing cloned CSCs (CSC1A + Myo, CSC3C + Myo) or GATA-4 high CSCs (CSC4A + Myo). * P,0.05 vs. Myo alone, Fibro + Myo, CSC4A + Myo. Mean 6 SD of 3 assays (with 3 triplicates/assay) and analyzed using ANOVA.

B. TGF-β1 concentration following 21 days of cardiomyocyte culture Myo alone, Fibro + Myo, CSC1A + Myo, CSC3C + Myo or CSC4A + Myo. * P,0.05 vs. all. Data are mean 6 SD of 3 assays (with 3 triplicates/assay) and analyzed using ANOVA.

C. IGF-1 concentration following 21 days of cardiomyocyte culture Myo alone, Fibro + Myo, CSC1A + Myo, CSC3C + Myo or CSC4A + Myo. * P,0.05 vs. Myo alone, †P,0.05 vs. Fibro + Myo, CSC1A + Myo, CSC3C + Myo. Data are mean 6 SD of 3 assays (with 3 triplicates/assay) and analyzed using ANOVA.

D. IGF-1 concentration correlated with cardiomyocyte contractility. Correlation was determined using Pearson Product Moment Correlation coefficient. (Figure from ref 18)

2. IGF-1 と GATA4 の関連性について

われわれは、GATA4 発現細胞からの心筋拍動持続因子を介して心筋細胞から IGF-1 が誘導される経路があると考えている。一般には、GATA4 と IGF-1 が直接関連すると考えられている。IGF-1 は、個体の成長、新生児以降の発達に大きく関与しており³¹⁾、IGF-1 が心筋細胞の肥大化を起こすことや、心筋細胞の生存を促進したり、収縮を促進することが報告されている^{32, 33)}。また、心臓の形態形成に伴って発現し、機能することが知られている³⁴⁾。GATA4 遺伝子標的破壊(targeted gene disruption)により GATA4 の発現が野生型の半分であるマウスにおいても同様の心臓の肥大化などの所見がある³⁵⁻³⁷⁾ことから、GATA4 と IGF-1 が関連する可能性が指摘されてきた。

最近、IGF-1 の下流に GATA4 が位置する、すなわち、IGF-1 によって GATA4 の Ser105 がリン酸化され、標的遺伝子への結合が強くなることがラット新生仔心筋細胞を用いて示された³⁸⁾。phenylephrine と IGF-1 は、ともに GATA4 をリン酸化させ、標的遺伝子への結合能を上昇させる。しかしながら、phenylephrine による心筋細胞肥大化には GATA4 が必要とされるのに対し、IGF-1 による肥大化には GATA4 が必要とされなかった。一方、卵巣において黄体形成を行う顆粒膜細胞を用いて、GATA4 の標的遺伝子をマクロアレイによりスクリーニングしたところ、IGF-1 が同定された³⁹⁾。GATA4 および GATA6 は、黄体形成に関与することが知られており、cAMP を介する。そこで、この細胞において GATA4 および GATA6 を RNAi によって欠損さ

Fig. 4 Low IGF-1 protein and gene expression level in CSC4A.

A. ELISA analysis showed low IGF-1 protein expression level compared with CSC4A and with CSC3B.

* P,0.05 vs.CSC3B.

B. RT-PCR analysis showed CSC4A had low IGF-1 message level, compared to rat fibroblasts (Fibro), skeletal muscle cells (SkM) and cardiomyocytes (CaM).

C. RT-PCR analysis showed that IGF-1 gene expression level in fibroblasts (Fibro) and CSC4A is not altered through 7 days of culture in conditioned medium from adult cardiomyocytes (CM (CaM)). Also, IGF-1 gene expression level in cultured cardiomyocytes (CaM) is not altered through culture for 7 days with CSC4A conditioned medium (CM (CSC4A)).

Fig. 5 Hypothetical scheme of myocyte contraction sustaining enhancing factor function.

せて cAMP を作用させ、コントロールと比較して発現に差があった遺伝子が検索された。その結果、IGF-1 が cAMP により約 11 倍発現上昇したが、GATA4、GATA6 発現欠損細胞においては全く上昇しなかった。また、IGF-binding protein (IGFBP) の発現が変化し、IGF-1 の GATA 結合部位 (GATAB) に GATA4、GATA6 が結合することが明らかになった。

以上の結果から、GATA4 と IGF-1 は互いに上流にも下流にもなり制御し合っていることが考えられ⁴⁰⁾、われわれの実験結果から図のように考察した (Fig. 5)。われわれと同様に、GATA4 の過剰発現により、細胞の生存を促進する因子が放出され、IGF-1 や VEGF により心臓の細胞の生存を促進するとの報告もある⁴¹⁾。Li らは、GATA4 を過剰発現させた間葉系幹細胞が paracrine 因子により、心筋梗塞後の angiogenesis を促進し、細胞の生存も促進することを報告している。この結果は、われわれの結果と同様に、GATA4 の過剰発現によって心臓拍動持続促進因子が分泌される可能性を支持する。

さらに、最近、IGF-1 (cardiac specific) 過剰発現マウスに高脂肪食あるいは普通食の餌を与えて、IGF-1 が *in vivo* で心臓にどのように影響するか調べた報告がある⁴²⁾。IGF-1 過剰発現高脂肪食マウスの心筋細胞では、コントロール高脂肪食マウスの心筋細胞と比較してアポトーシスが抑制され、心筋の拍動を制御する細胞内カルシウムイオン濃度の減少がみられなかった。すなわち、IGF-1 を常に心臓に作用させることで、高脂肪食による心臓機能の低下を防止できることが示された。IGF-1 の血中濃度が高い場合、浮腫や関節痛などの副作用が報告されているが⁴³⁾、心臓に高濃度に IGF-1 が存在しても、心不全予防にはなっても有害ではないことが示唆された。

したがって、GATA4 高発現細胞 (CSC-4A) から分泌されると考えられる心臓拍動持続因子を同定すれば、心臓にだけ高い IGF-1 の発現が誘導されるような薬剤の開発につながる可能性がある。ヒトの心筋細胞に対する作用の検討も必要である。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞が容易に作製できるようになり、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に対する作用を検討すればヒト心臓への効果についても予測できる。さらに、iPS 細胞を用いた再生医療にも、この因子を利用することが考えられる。すなわち、GATA4 発現が高い幹細胞を単独あるいは iPS 細胞と併用して再生医療に利用することは、有効な治療法となる可能性がある。

【参考文献】

- 1) Braunwald E, Bristow M: Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* 2000; **102**: IV14-IV 23
- 2) Braunwald E, Pfeffer M: Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am J Cardiol* 1991; **68**: 1D-6D
- 3) Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al: on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics – 2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013; **127**: e6-e245
- 4) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663-676
- 5) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al: Induction of pluripotent stem cells from human adult fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861-872
- 6) Park I-H, Zhao R, West JA et al: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2007; **451**: 141-147
- 7) Yoshida Y, Yamanaka S: iPS cells: A source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **50**: 327-332
- 8) Kawaguchi N, Hayama E, Furutani Y, et al: Prospective in vitro disease model for cardiomyopathies. *Stem Cell Int* 2012; **2012**: 439219
- 9) Moretti A, Bellin M, Welling A et al: Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2010; **363**: 1397-1409
- 10) Zhang H, Zou B, Yu H et al: Modulation of hERG potassium channel gating normalizes action potential duration prolonged by dysfunctional KCNQ1 potassium channel. *Proc Natl Acad Sci* 2012; **109**: 11866-11871
- 11) Itzhaki I, Maizels L, Huber I et al: Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; **471**: 225-229
- 12) Matsa E, Rajamohan D, Dick E et al: Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur Heart J* 2011; **32**: 952-962
- 13) Malan D, Friedrichs S, Fleischmann BK, et al: Cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells with long-QT syndrome 3 recapitulate typical diseasespecific features in vitro. *Circ Res* 2011; **109**: 841-847
- 14) Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'souza SL et al: Patientspecific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 2010; **465**: 808-812
- 15) Miyamoto S, Kawaguchi N, Ellison G, et al: Characterization of long-term Cultured Cardiac Stem Cells (CSCs) Derived from Adult Rat Hearts. *Stem Cells Dev* 2010; **19**: 105-116
- 16) Kawaguchi N, Nakanishi T: Cardiomyocyte regeneration

- using stem cells *Cells* 2013; **2**: 1: 6782; doi: 10.3390/cells 2010067
- 17) Kawaguchi N: Adult cardiac-derived stem cells: differentiation and survival regulators. *Vitam Horm* 2011; **87**, 111-125
 - 18) Kawaguchi N, Smith A, Waring C, et al: c-kitpos GATA-4 high rat cardiac stem cells foster adult cardiomyocyte survival through IGF-1 paracrine signalling. *PLoS One* 2010; **5**: e14297
 - 19) Yakar S, Adamo ML: Insulin-like growth factor-1 physiology: Lessons from mouse models. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2012; **41**: 231-247
 - 20) Maillet M, van Berio JH, Molkentin JD: Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 38-48
 - 21) Wang J, Xang X: The function of miRNA in cardiac hypertrophy. *Cell Mol Life Sci* 2012; **69**: 3561-3570
 - 22) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B et al: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; **399**: 601-605
 - 23) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; **114**: 763-776
 - 24) Kawaguchi N: Stem cells for cardiac regeneration and possible roles of the Transforming growth factor (TGF)- β family. *Biomol Concepts* 2012; **3**: 99-106
 - 25) Machida M, Takagaki Y, Matsuoka R, et al: Proteomic comparison of floating spherical aggregates and dish-attached cells of cardiac stem cells. *Int J Cardiol* 2011; **153**: 296-305
 - 26) Kawaguchi N, Yamaguchi M, Nakao R, et al: Ogawa D and Matsuoka R (2010) TGF- β Superfamily regulates a switch that mediates differentiation either into adipocytes or myocytes in left atrium derived pluripotent cells (LA-PCs). *Biochem Biophys Res Com* 2010; **396**: 615-625
 - 27) Hasan MK, Komoike Y, Tsunesumi S, et al: Myogenic differentiation in atrium-derived adult cardiac pluripotent cells and the transcriptional regulation of GATA4 and myogenin on ANP promoter. *Genes Cells* 2010; **15**: 439-453
 - 28) Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Hattori S, et al: Matsuoka R and Kawaguchi N (2010) Micro and nano-scale in vitro 3D culture system for cardiac stem cells. *J biomed mat res A* 2010; **94A**: 1-8
 - 29) Kawaguchi N, Hatta K, Nakanishi T: 3D-Culture System for Heart Regeneration and Cardiac Medicine, *BioMed Res Int* 2013; Article ID 895967, 6 pages, 2013. doi: 10.1155/2013/895967
 - 30) Kawaguchi N, Machida M, Hatta K, et al: Cell Shape and Cardiosphere differentiation: A revelation by proteomic profiling. *Biochem Res Int* 2013; Article ID 730874, 9 pages, 2013. doi: 10.1155/2013/730874
 - 31) Conlon I, Raff M: Size control in animal development. *Cell* 1999; **96**: 235-244
 - 32) Condorelli G, Drusco A, Stassi G, et al: Akt enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 19: 12333-12338
 - 33) Fontana L, Vinciguerra M, Longo VD: Growth factors, nutrient signaling, and cardiovascular aging. *Circ Res* 2012; **110**: 1139-1150
 - 34) Pikkariainen S, Tokola H, Kerkela R, et al: GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res* 2004; **63**: 196-207
 - 35) Xin M, Davis CA, Molkentin JD, et al: A threshold of GATA4 and GATA6 expression is required for cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **103**: 11189-11194
 - 36) Bisping E, Ikeda S, Kong SW, et al: Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **103**: 14471-14476
 - 37) Aries A, Paradis P, Lefebvre C et al: Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 6975-6980
 - 38) Bisping E, Ikeda S, Sedej M, et al: Transcription factor GATA4 is activated is not required for insulin-like growth factor 1 (IGF1)-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 2012; **287**: 9827-9834
 - 39) LaVoie HA, Kordus RJ, Nguyen JB et al: GATA depletion impacts insulin-like growth factor 1 mRNA and protein levels in luteinizing porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 2010; **83**: 1015-1026
 - 40) Foncea R, Andersson M, Ketterman A, et al: Insulin-like growth factor-1 rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19115-19124
 - 41) Li H, Zuo S, He Z, et al: Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; **299**: H1772-H1782
 - 42) Zhang Y, Yuan M, Bradley KM, et al: Insulin-like growth factor 1 alleviates high-fat diet-induced myocardial contractile dysfunction: Role of insulin signaling and mitochondrial function. *Hypertension* 2012; **59**: 680-693
 - 43) Wang PH: Roads to survival: Insulin-like growth factor-1 signaling pathways in cardiac muscle. *Circ Res* 2001; **88**: 552-554