

—総説—

特集：加齢と生殖

生殖とメラトニン —卵巣加齢と生殖補助医療（ART）への応用—

Potential clinical applications of melatonin in ovarian aging and assisted reproductive technology

田村 博史

Hiroshi Tamura

山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学 〒755-8505 宇部市

Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minamikogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

要旨：松果体から分泌されるメラトニンは、神経内分泌ホルモンとしての受容体を介した作用に加えて、受容体を介さない直接的な強力な抗酸化作用をもつ。活性酸素は排卵過程などの生殖機能において重要な役割を担うが、一方で過剰な活性酸素は酸化ストレスとして卵子に悪影響を与え不妊症の原因にもなる。メラトニンは卵胞液中に高濃度に含まれており、卵子や顆粒膜細胞を活性酸素から保護している可能性がある。不妊症患者にメラトニンを併用して体外受精を行うと、受精率や胚発育が向上することから、卵子の質や妊娠率の向上を期待した臨床応用が試みられている。また、メラトニンと加齢現象や種々の疾患との関係が明らかとなり、アンチエイジングホルモンとしても注目され、卵巣加齢への関与の可能性も高い。この総説では、メラトニンの卵巣機能への関与、生殖補助医療の成績向上を目的とした臨床応用、卵巣加齢の予防効果を期待した試みについて概説したい。
キーワード：メラトニン、卵巣加齢、活性酸素、酸化ストレス

Abstract: Melatonin is a neuroendocrine hormone secreted by the pineal gland. In addition to its receptor-mediated actions, melatonin also has strong antioxidant activities, scavenging free radicals such as reactive oxygen species (ROS), and its direct free radical scavenging actions are receptor-independent. ROS play crucial roles in reproductive functions such as the ovulatory process; however, in excess, they may adversely affect oocytes through oxidative stress causing infertility. Melatonin present in follicles may possibly protect oocytes from ROS via its antioxidant activity. Melatonin supplementation improves the outcomes of *in vitro* fertilization programs for infertile patients by improving oocyte quality, and in general aging, the main cause of ovarian aging is considered to be oxidative stress caused by ROS. Melatonin is receiving attention as an anti-aging hormone, and it may be useful for preventing aging of the ovary. This review describes the relationship between melatonin and human reproductive function, as well as the clinical applications of melatonin which are expected to improve the outcomes of assisted reproductive technology such as IVF, and also discusses the possibilities for melatonin in preventing ovarian aging.

Key words: Melatonin, Ovarian aging, Reactive oxygen species, Oxidative stress

はじめに

(受付 2022年4月30日／受理 2022年6月29日)

別刷請求先：〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1

山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学

e-mail: hitamura@yamaguchi-u.ac.jp

近年の生殖補助医療（ART）のめざましい進歩にもかかわらず、卵巣加齢に伴う妊孕能の低下に対する有効な対策は確立されていない。着床前診断やさまざまな臨床研究の試みが行われているが、卵子・胚提供といった第三者の関与

する生殖補助医療も今後は選択肢の1つになると考えられる。一方で、低下した卵子の質を改善させる方法、あるいは卵巣の加齢を予防する方法の可能性について検討・模索することの意義は明らかであり、我々の研究しているメラトニンはその貴重な候補の1つと考える。

松果体から分泌されるメラトニンは、光刺激によってその分泌が制御されており夜間のみ分泌される。神経内分泌ホルモンとして視床下部の受容体を介して生体内リズムを調節する作用をもつ一方で、強力な抗酸化作用も併せもち、受容体を介さず直接的に活性酸素を消去するフリーラジカルスカベンジャーとして加齢現象や種々の疾患との関連が注目されている。活性酸素は排卵過程などの生殖機能において重要な役割を担うが、過剰な活性酸素は酸化ストレスとして卵子に悪影響を与え不妊症の原因にもなる。卵胞内にも存在するメラトニンはその抗酸化作用で活性酸素から卵子を保護している可能性があり、卵子の成熟・受精・胚発育におけるメラトニンの役割が多くの基礎的な研究から明らかになりつつある。また、ヒトへの臨床応用として不妊症患者にメラトニンを投与することで、体外受精胚移植を代表とする生殖補助医療の成績を向上させる試みが行われている。さらに、メラトニンはその抗酸化作用からアンチエイジングホルモンとして加齢現象、アルツハイマー病、パーキンソン病との関係について臨床研究が行われており、卵巣加齢に対する予防効果の可能性にも注目している。

卵巣加齢に伴う妊孕能低下

女性の年齢が高くなるにつれて妊孕性は低下する。近年の女性の社会進出に伴う晩婚化や挙児希望年齢の上昇によって、卵巣加齢に起因する高齢婦人の不妊症が生殖領域において最も重要な課題となっている。実際に日本における体外受精胚移植を代表とする生殖補助医療 (ART) を受ける女性の年齢のピークは40歳を超え、ARTの成績は35歳以降で妊娠率は低下し、流産率は上昇する¹⁾。妊娠が継続して生児を得る生産率は30歳後半では10%程度であり、さらに40歳を超えると急速に低下してしまう。このように加齢に伴う不妊治療成功率の低下には、卵巣加齢が重要な要因と考えられている。卵巣の加齢は、卵子数の減少と卵子の質の低下の2つの問題がある。出生時に女性は100~200万個の卵子数を卵巣内にもって生まれるが、卵子は新たにつくられることはなく、常に一定数が消失している。月経の始まる思春期には10~30万個に減少するが、30歳後半、特に37歳以降で急速にその数が減少することが知られている。排卵誘発をした場合に発育卵胞数が減少したり、体外受精時に採取できる成熟卵子が減少することは、高齢婦人で不妊治療成績が低下する要因になる (図1)。

加齢に伴い、卵子数が減少するのみならず、個々の卵子の質も低下する。卵母細胞の減数分裂は胎生期にすでに開始しており、減数分裂を休止した状態で出生し、排卵前に再開されて卵子となる。つまり、卵子は何十年という長い間、年齢に依存して様々な影響を受け、卵子細胞に傷害が加わる

ことで、ミトコンドリアや核といった細胞内小器官の機能不全のため受精や胚発育が円滑にすすまなくなる。また、卵母細胞は減数分裂によって染色体数を半分に減らして成熟卵子となるが、減数分裂の過程で染色体が不均等に分離し、染色体異数性の頻度は加齢に伴い上昇する²⁾。このような加齢に伴う卵子や受精卵 (胚) の染色体数異常の頻度の増加は、ARTの妊娠率の低下や流産率の上昇の主要な要因である (図1)。卵子の質が低下する機序は十分に解明されていないが、活性酸素による酸化ストレスが、加齢に伴う卵細胞内のミトコンドリアや核の機能不全に関与すると考えられており、加齢に伴う抗酸化機構の低下と卵子の質の低下との関係も報告されている^{3,4)}。卵子の質の低下を予防する試みや、低下した卵子の質を改善させる試みが行われているが、有効な方法は現状では確立されていない。

活性酸素と生殖機能

活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) は、酸素分子が活性化して発生した反応性の高い化合物の総称であり、その細胞障害性のため、さまざまな疾患や発癌、老化現象の原因となると考えられている。フリーラジカルはROSの一種であり、1つの軌道に電子が1個しか存在しない不対電子を持つ分子と定義される。1つの軌道に2個ずつ対をなした電子を収容する分子に比べて、フリーラジカルはエネルギー的に不安定な状態であり、周囲の分子から電子を奪い取り自身は安定し (還元)、相手の分子は電子を失い不安定な状態となる (酸化)。ROSの発生要因には、ミトコンドリア内で酸素からエネルギーを産生する細胞呼吸、紫外線・化学物質といった環境因子、ストレス・喫煙・食生活といった生活因子がある。細胞呼吸では、スーパーオキシド (O_2^-) や過酸化酸素 (H_2O_2) といったROSが生じるが、スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase: SOD) やカタラーゼなどの抗酸化酵素により無毒化される。しかし、 H_2O_2 が生体内の鉄分子と反応した場合、最も細胞障害性の強いROS、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) が発生する。ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) は生体内で発生するROSの7割を占め、細胞内外で蛋白分子やDNAの損傷および細胞膜の過酸化を惹起する。ROS産生量とROS消去系としての抗酸化酵素や抗酸化物質などの抗酸化能のバランスが破綻して、ROSが過剰となった状態が酸化ストレスである。

ROSは、卵胞発育や卵子成熟、排卵、受精、着床、胚発育などの生殖機能にも重要な役割を果たしている⁵⁾。排卵過程では、排卵を誘発するLH (luteinizing hormone) サージ後、卵胞内の血管新生促進に伴い血管内皮細胞やマクロファージから多量のROSが発生する。この卵胞内で発生するROSは、卵成熟や卵胞破裂に必要な刺激となるが、過剰な活性酸素種は細胞障害性も持ち合わせている。一方、活性酸素種に対する防御機構として、卵胞内には抗酸化酵素や抗酸化物質が存在し、酸化ストレスから卵や顆粒膜細胞を保護している。両者のバランスが崩れれば、卵や顆粒膜細胞は容易に酸化ストレスを受け、卵子を傷害し質の低下につながる可能性

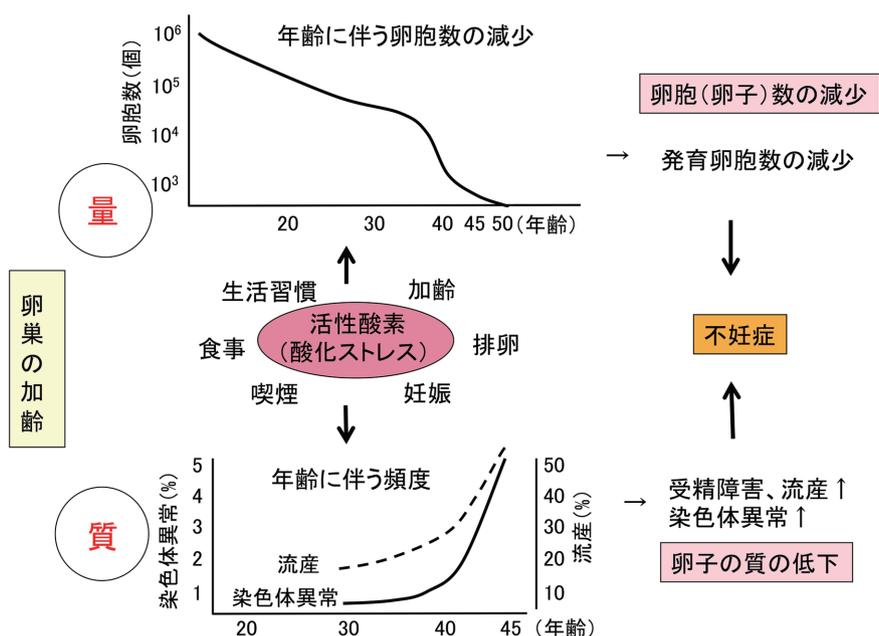


図1 卵巣の加齢と不妊症

がある。実際に、pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) で過排卵刺激を行い human chorionic gonadotropin (hCG) で排卵を誘発したマウスでは、排卵前の卵胞内でDNA損傷マーカーである8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) や過酸化脂質マーカーであるHexanoyl-lysine (HEL) の濃度増加が認められた⁶⁾。ヒトにおいても、変性卵(卵子の状態が不良)の割合が多い体外受精患者では卵胞液中の8-OHdG濃度が高く、また、卵胞液中8-OHdG濃度が高い卵胞から採取された卵子は受精率が低い⁷⁾。したがって、排卵過程で発生する活性酸素は卵胞内の卵子や顆粒膜細胞の酸化ストレスの原因となり、卵子の質の低下、ひいては不妊症の一因になると考えられる。

卵巣加齢においても活性酸素は主要な原因と考えられており、活性酸素による酸化ストレスが顆粒膜細胞のアポトーシス、卵胞閉鎖、ミトコンドリア機能不全によるエネルギー産生低下、DNA損傷や染色体異常を誘導することで、卵胞数減少に伴う卵巣予備能の低下を引き起こす主要な原因であると考えられている^{8, 9)}。長年に渡り卵子に蓄積した細胞傷害(慢性酸化ストレス)に加えて、卵胞発育や排卵過程で急性酸化ストレスが加わることによって卵子の質が低下する(図2)。不妊治療では、患者さんの卵子にそれまでに蓄積した酸化ストレスを除去することはできないため、不妊治療の際に卵胞発育や排卵過程で新たに加わる酸化ストレスを軽減することで卵子の質の低下を少しでも軽減できれば妊娠の可能性が上昇するかもしれない。

また、抗酸化剤を長期間投与することで慢性酸化ストレスを軽減し、ミトコンドリア機能改善やDNA損傷軽減によって卵巣加齢を予防できる可能性も考えられている¹⁰⁾。

メラトニンの抗酸化作用

メラトニンは第三脳室の後壁にある松果体より産生されるインドールアミン誘導体(分子量232.3)である。その分泌は夜に多く、日中にはほとんど分泌されないというリズムをもっており、明暗周期(日照時間)や光刺激によって支配される。メラトニンの分泌リズムは体温、種々のホルモン分泌、睡眠・覚醒など生体概日リズム(サーカディアンリズム)の形成、調節に重要な役割をもつ。メラトニンは脂溶性かつ水溶性であり、細胞膜を容易に通過できる特徴がある。血中のみならず脳脊髄液や卵胞液、精液などの体液中にも存在している。また、メラトニン受容体は全身の様々な器官に存在しており、生体内リズムの他、各種ホルモン分泌、免疫機能、脂質・糖代謝、骨代謝など多様な作用を有し、加齢や発癌、種々の疾病との関係も明らかになりつつある¹¹⁾。近年、メラトニンは活性酸素種などのフリーラジカルを消去する強い抗酸化能をもつことが明らかとなり、受容体を介した神経内分泌作用に加え、受容体を介さない直接的な抗酸化作用がその作用の多様性を生み出している。

1993年にReiter研究室の発見によってメラトニンは新たな展開を迎える。彼らはメラトニンが非常に強力な抗酸化作用を有することを証明した¹²⁾。メラトニンは直接的なfree radical scavengerであり、その力価はビタミンC、Eやマンニトール、グルタチオンといった抗酸化物質よりも強力であることが報告された。メラトニンは脂溶性かつ水溶性であり細胞膜を容易に通過できるため、細胞質内のみならずミトコンドリア、核内にも高濃度に存在している。そして細胞内局所で発生する活性酸素種、活性窒素種いずれに対し

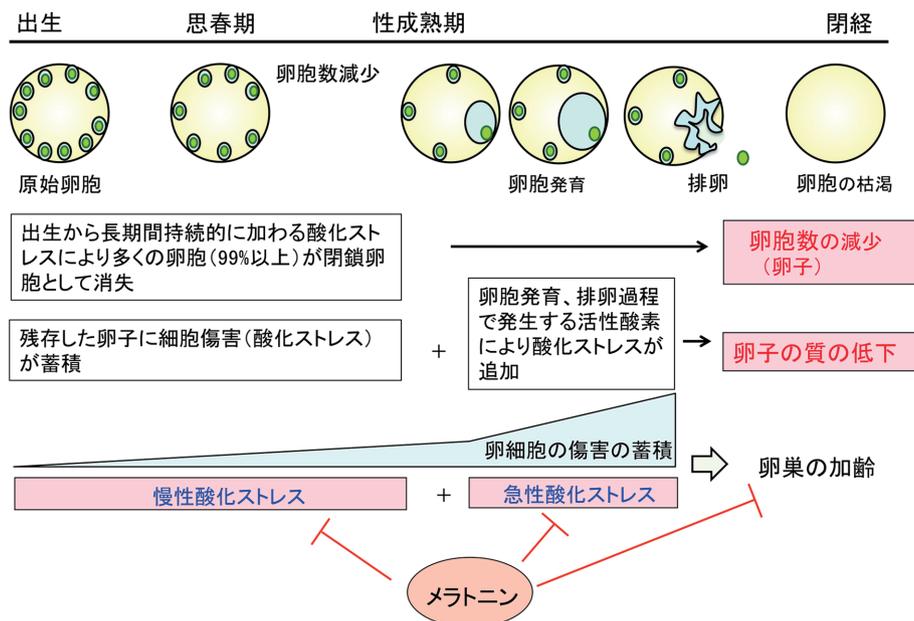


図2 加齢に伴う卵巣の変化 (酸化ストレス)

ても scavenger として働き、DNA や細胞成分を保護している可能性がある。メラトニンの抗酸化作用はスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、一重項酸素 (1O_2)、 H_2O_2 、次亜塩素酸 ($HOCl$)、一酸化窒素 (NO)、ペルオキシナイトライト ($ONOO^{\cdot-}$) など、非常に幅広い¹³⁾。特に、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) に対して強い消去作用を有する貴重な物質である。メラトニンはフリーラジカルを消去すると cyclic 3-hydroxymelatonin (C3OHM)、N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK)、N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) といった代謝産物となる。これらの代謝産物もメラトニン同様、強力な抗酸化作用を有することが証明されている¹⁴⁾。またメラトニンは間接的に SOD や glutathione peroxidase (GPx) などの抗酸化酵素の活性を増強する作用があり、メラトニンの膜受容体 (MT1, MT2) を介して、抗酸化酵素の活性や mRNA 発現を増加させるものと考えられる¹⁵⁾。

メラトニンと生殖機能

メラトニンが直接的に卵巣に作用している可能性が明らかになりつつある。ヒトの卵胞液中にはメラトニンが高濃度に存在しており、卵胞の発育に比例して増加する¹⁶⁾。メラトニンをネコに投与し組織移行を検討した報告では、他の臓器に比べて卵巣に高濃度に集積がみられることから、卵胞発育につれて卵胞内にメラトニンが取り込まれるメカニズムが存在すると思われる¹⁷⁾。なぜメラトニンが卵胞内に取り込まれ、高濃度で存在するのかその生理的意義は長い間不明であった。排卵現象は炎症類似の現象と捉えられており、卵胞内で発生する ROS に対する防御機構として、抗酸化酵

素や抗酸化物質が存在し ROS から卵子や顆粒膜細胞を保護している。メラトニンは卵胞内で抗酸化物質として重要な役割を果たしている可能性が高い。体外受精胚移植 (IVF-ET) を施行した女性より採卵時に採取した卵胞液の研究では、DNA 損傷マーカーである 8-OHdG 濃度と抗酸化酵素 Cu, Zn-SOD, グルタチオン濃度には有意な相関は認めないが、メラトニン濃度と 8-OHdG 濃度には有意な負の相関を認めた。さらに、メラトニン錠 (3 mg/日, 22:00 服用) を内服した患者では、卵胞液中のメラトニン濃度はメラトニン非投与周期に比較し有意に増加し、8-OHdG 濃度は有意に低下した⁷⁾。これらの結果から、メラトニンが卵胞液内において、その抗酸化作用で酸化ストレスを減少させ、卵子や顆粒膜細胞を保護している可能性が示唆される。そこで、マウスの顆粒膜細胞および卵子を用いた基礎的実験を行った。

マウスの成熟卵胞より顆粒膜細胞を採取し、活性酸素として H_2O_2 (0.1~10 mM) を培養液へ添加し、メラトニン (100 $\mu g/ml$) 存在あるいは非存在下で培養した¹⁸⁾。DNA 損傷の評価として、8-OHdG, DNA の 2 本鎖断裂マーカー ($\gamma H2AX$) に対する抗体を用いた蛍光免疫染色を施行したところ、 H_2O_2 添加によって増加がみられた核内 8-OHdG および $\gamma H2AX$ の発現強度は、メラトニン添加によって低下を認めた。活動性ミトコンドリアマーカーの Mito Tracker Red (MTR) での染色では、 H_2O_2 添加によって低下がみられた MTR 発現強度は、メラトニン添加によって増加を認めた。 H_2O_2 添加によって増加がみられた細胞膜の HEL 濃度は、メラトニン添加によって低下を認めた。また、 H_2O_2 添加では、アポトーシス細胞およびカスパーゼ 3/7 (Csp3/7) 活性が増加し、メラトニン投与で低下を認めた (図 3)。

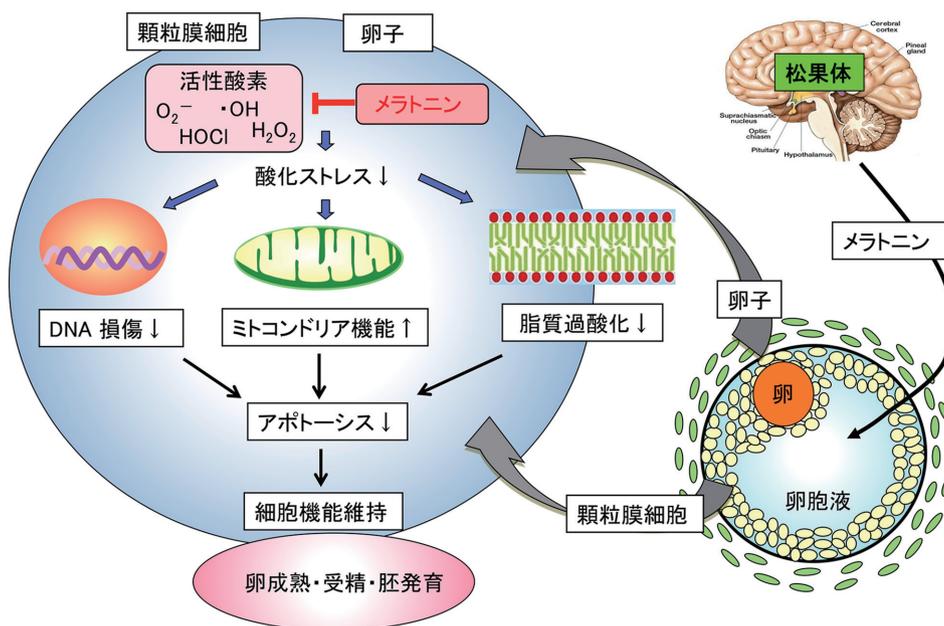


図3 卵胞内におけるメラトニンの卵子、顆粒膜細胞保護作用(抗酸化作用)

また, PMSGで過排卵刺激したマウスより卵核胞(geminal vesicle: GV) 期卵子を採取し, 活性酸素として H_2O_2 を培養液中に添加して卵培養を行った^{6, 7, 19, 20}。卵の成熟過程では第一減数分裂が再開し, 第一極体の放出がみられるため, 12時間培養後の第一極体放出の割合は H_2O_2 では濃度依存性に低下した。一方で, H_2O_2 と同時にメラトニンを添加すると第一極体の放出は有意に改善した。すなわち, 酸化ストレスにより卵子の成熟が障害され, これをメラトニンは防御することが明らかとなった。さらにメラトニンが卵細胞内においても抗酸化作用を発揮しているかどうかを検討するため, 活性酸素と反応し蛍光発色する色素dichlorofluorescein (DCF-DA)を添加して卵培養を行い, 蛍光顕微鏡にて卵細胞内の発色を観察した。 H_2O_2 非添加の卵子では発色を認めないが, H_2O_2 を添加した卵子では強く蛍光発色し, メラトニンを同時添加すると発色は有意に抑制された。したがって, メラトニンは卵細胞内の活性酸素を減少させる抗酸化作用をもつことが明らかとなった。これらの結果より, 松果体で産生され血中に分泌されたメラトニンは, 卵胞内に取り込まれ, 卵胞局所において活性酸素を消去し, 酸化ストレスを軽減することで, 卵子や顆粒膜細胞を保護し, 卵成熟や顆粒膜細胞の黄体化に貢献しているものと思われる(図3)。

a. 生殖補助医療(ART)におけるメラトニン

これまで示したように, 卵胞液中にはメラトニンが高濃度に存在し, 卵胞の発育に比例して増加すること, 排卵過程にある卵胞内で酸化ストレスが卵子の質の低下に関与していること, メラトニンが酸化ストレスを抑制し卵成熟を促進していることが明らかになった。そこで, 卵子の質が不

良である不妊症患者にメラトニンを投与することで卵胞内のメラトニン濃度が上昇し, 酸化ストレスが抑制され, 卵子の質が向上し受精率, 妊娠率が上昇する可能性を考えた。前回の体外受精胚移植(IVF-ET)が不成功に終わり受精率が50%未満であった症例を対象とし, 次回のIVF-ETを採卵まで1ヶ月間メラトニン錠(3 mg/日)を内服した群(メラトニン群n=56)と内服なし群(コントロール群n=59)で施行したところ, 受精率はメラトニン群で $50.0 \pm 38.0\%$, コントロール群で $22.8 \pm 19.0\%$, 妊娠率はメラトニン群で19.6(11/56)%, コントロール群で10.2(6/59)%とIVF-ETの成績向上を認めた⁷⁾。この報告の後, メラトニン投与がIVF-ETの臨床成績を向上させるかどうかを検討した報告が散見され, メラトニンを併用して体外受精胚移植を施行すると, 成熟卵子数, 受精率, 良好胚数の増加が報告されており²¹⁻²⁴⁾, メラトニンの生殖医療に対する臨床応用が期待される(図4)。

b. 卵成熟, 胚発育とメラトニン

培養液へのメラトニン添加によって, 体外培養した卵子の成熟が促進され, さらに受精後の胚発育(胚盤胞)も促進されることがマウス, ウシ, ブタといった多種の動物の卵子を用いた研究で報告されている。体外培養では生体内に比較して酸素濃度が高いため, 培養中に発生する活性酸素による酸化ストレスが卵子の成熟や胚発育に悪影響を与える。培養液にメラトニンを添加することで, 活性酸素を消去し酸化ストレスを軽減することで卵子や顆粒膜細胞を保護する可能性がある(図4)。マウスやブタの卵子を用いた卵子培養では, メラトニン添加によって卵子の酸化ストレスおよ

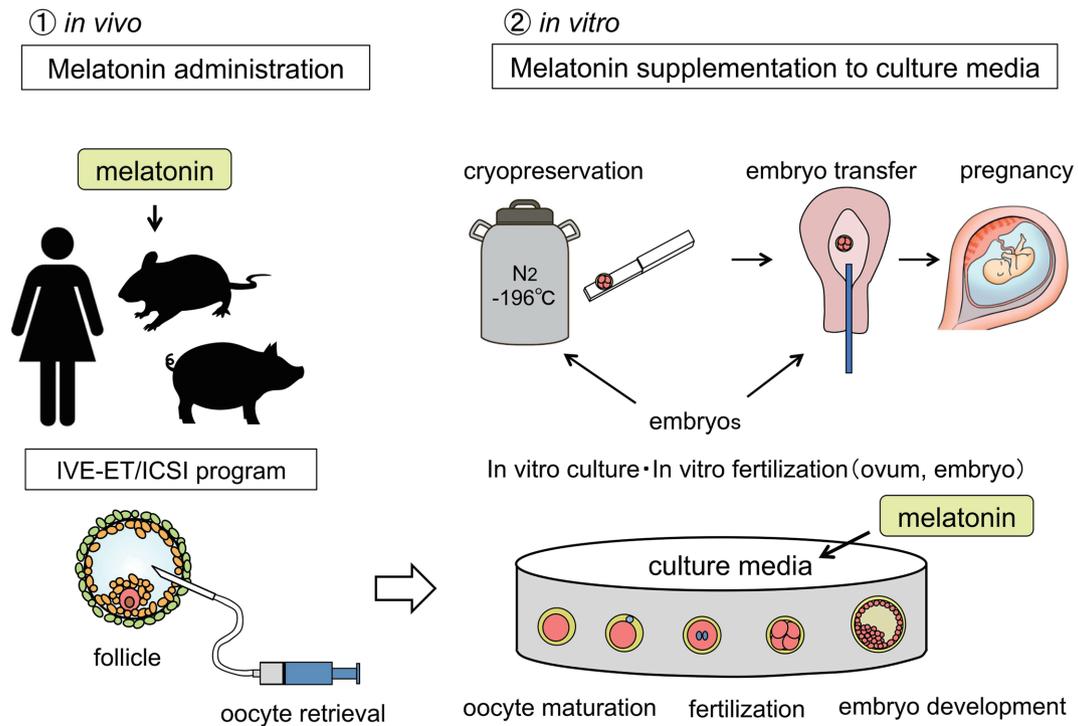


図4 生殖補助医療 (ART) に対するメラトニン応用の可能性

びアポトーシスを軽減し、ミトコンドリア機能を促進することで、卵子の成熟や受精率、胚盤胞率（胚盤胞の細胞数）を向上させる²⁵⁻²⁷。また、Bisphenol A (BPA)やAflatoxin B1 (AFB1)といった活性酸素を発生する物質が誘発する酸化ストレスによる卵子への影響を、メラトニンの添加によって軽減することもできる^{28, 29}。このようなメラトニンの作用は、直接的な抗酸化作用として活性酸素、酸化ストレスを軽減することを期待したものである。一方で、卵子の抗酸化酵素活性、アポトーシス関連因子の発現、卵子成熟や胚発育に関与する遺伝子発現、DNAメチル化やヒストンアセチル化といったエピゲネティックな変化も、メラトニンの培養液添加でみられることが報告されている³⁰⁻³²。このようなメラトニンの細胞膜受容体 (MT1, MT2) や核内受容体 (RORα) を介した、間接的なメラトニンの作用も卵子の成熟や胚発育において重要なものと考えられる。メラトニン膜受容体 (MT1, MT2) は、卵子、顆粒膜細胞にも存在しており、詳細な細胞内シグナルを検討した報告もみられる^{31, 33}。直接的な抗酸化作用に加えて、受容体を介したメラトニンの詳細な卵子、顆粒膜細胞に対する機序を解明することが今後の重要な課題と考える。

メラトニンのアンチエイジング作用 (卵巣加齢)

抗酸化作用からメラトニンはアンチエイジングホルモンとして注目されている。夜間のメラトニン分泌は、生後3歳頃までが最も多く、思春期以降、加齢とともに減少していき、

70歳を超えるとピーク時の10分の1以下になる。この夜間メラトニン分泌の減少と加齢現象が密接に関わっていることが明らかになっている。認知症の約半数を占めるアルツハイマー病患者では、血中と脳脊髄液中のメラトニン濃度が低いことが報告されており、アルツハイマー病の発症や進行に関与する脳内アミロイドの産生を抑える作用が、メラトニンにあることが基礎的な研究で証明されている^{34, 35}。また、アルツハイマー病の発症予防や治療薬としてメラトニンを使用する臨床研究も行われている^{34, 36}。その他、パーキンソン病、骨代謝、糖尿病、脂質代謝や動脈硬化など様々な加齢に伴う病態や疾患とメラトニンとの関係が明らかとなりつつある¹¹。

一般加齢と同様に、卵巣加齢も活性酸素種による酸化ストレスが重要な因子と考えられており、30歳後半から急激に卵子数、卵子の質は低下し、減数分裂や受精時の染色体異常の頻度が増加、受精率・胚盤胞到達率・着床率が低下、流産率が上昇する。抗酸化作用およびアンチエイジング作用を持つメラトニンは、卵巣加齢にも有用かもしれないと考えマウスを用いた基礎的研究を行った³⁷。10週齢のマウスに43週齢までメラトニンを長期間投与（メラトニン水を飲水）した。これは、ヒトでは20歳くらいから40歳すぎまでメラトニンを投与した実験モデルになると考えている。メラトニン投与後に排卵数、体外受精の受精卵数、胚盤胞数、卵巣組織の卵胞数を計測した。また、メラトニンの詳細な作用機序を調べるために、卵巣内の遺伝子発現の変化を

マイクロアレイ法、PCR法にて検討し、メラトニンを投与しなかったコントロール群と比較した。加齢マウス(43週)において、コントロール群では卵巣内のすべての発育段階の卵胞(原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞)が減少したが、メラトニン投与群ではコントロール群に比較して多く卵胞が残存していた。過排卵刺激および排卵誘発して排卵数を調べたところ、メラトニン投与群では排卵数が多く、加齢に伴う卵子数の減少が軽減された。採取した卵子を用いてオスの精子と体外受精を行ったところ、コントロール群では、受精卵数、胚盤胞数は加齢に伴い減少したが、メラトニン投与群ではコントロール群に比較して多く、卵子の質の低下を軽減する効果もメラトニンは併せ持つと考えられる。さらに卵巣内の遺伝子発現の変をマイクロアレイ法で解析した。加齢に伴い低下し、かつ、メラトニン投与によって発現が増加した77遺伝子が抽出された。これらの遺伝子のうち約半数の40遺伝子がリボゾーム機能に関与するものであった。また、パスウェイ解析では、リボゾームにおける蛋白合成(翻訳)の正確性を維持する eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)シグナルが抽出された。メラトニンは、リボゾーム機能を維持し、遺伝子の翻訳、蛋白合成の正確性を維持することで加齢を予防する効果があるものと考えられる。パスウェイ解析では、DNA修復やチェックポイント機能に関するシグナル(GADD45 signaling)も上位で抽出され、DNA損傷の修復機構を増強させる作用がメラトニンにあるものと考えられる。また、ネットワーク解析では、抗酸化機構を賦活するネットワークが抽出され、メラトニンは自身の直接的な抗酸化作用に加えて、他の抗酸化酵素の活性

や発現を増強する作用があることが伺われる。さらに加齢に関係するテロメア長や長寿遺伝子サーチュイン(sirtuins 1, 3)の発現は、メラトニン投与群ではコントロール群に比較して有意に高く、メラトニンは、これらの多様な機序で、卵巣、卵子の加齢を予防する効果があるのではないかと考えている。

我々の報告と同様に、マウスに6~12か月間メラトニンを投与した研究では、メラトニン投与によって加齢に伴う卵胞数の減少、産仔数の減少、胚盤胞率の低下が抑制され、さらにミトコンドリア機能の向上(ROS産生の減少、酸化ストレス減少、ATP産生増加、アポトーシス減少、抗酸化酵素増加)によって卵巣加齢を軽減するメラトニンの可能性について報告している³⁸⁾。さらに最新の研究では、メラトニンの卵巣加齢遅延作用について、卵子のメラトニン受容体(MT1)を介した細胞内シグナリング(MT1/AMPK pathway)の重要性が報告されている³⁹⁾。

このように、メラトニンの卵巣加齢の予防効果については、動物を使用した基礎的な研究段階である。ヒトに対する臨床応用は今後の課題であるが、パーキンソン病やアルツハイマー病に対するアンチエイジング効果を期待した臨床応用のみならず、生体リズム異常、糖・脂質代謝異常、免疫調節、抗癌作用など様々な領域においてメラトニンの臨床研究が進行しており、良好な成績が得られている。卵巣加齢を予防する有効な方法や薬剤が確立していない現状においては、メラトニン投与は有力な候補の1つであると考えられる(図5)。

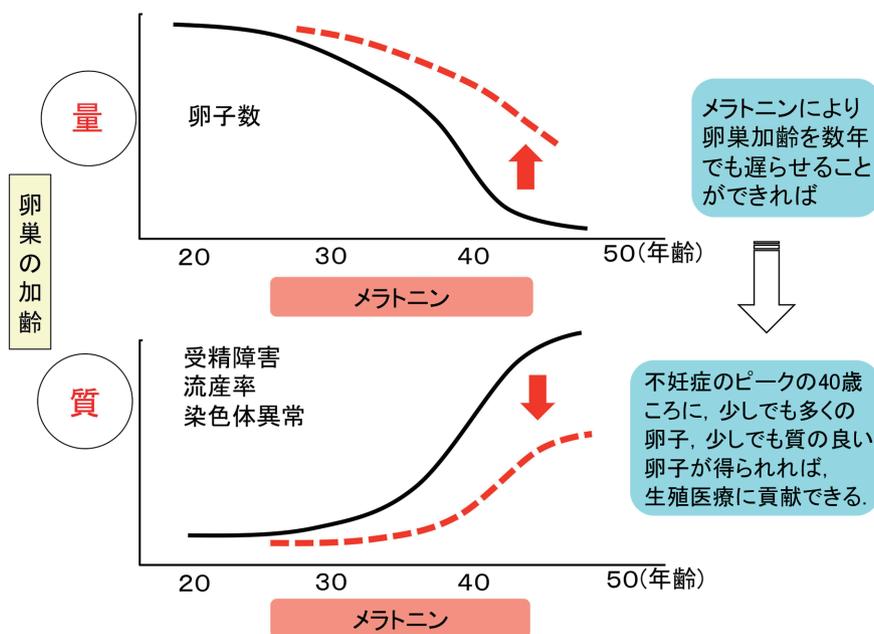


図5 ヒトにおけるメラトニン投与の可能性(卵巣加齢予防効果)

文 献

- 1) Katagiri, Y., Jwa, S.C., Kuwahara, A., Iwasa, T., Ono, M., Kato, K., Kishi, H., Kuwabara, Y., Harada, M., Hamatani, T. and Osuga, Y. (2022): Assisted reproductive technology in Japan: A summary report for 2019 by the Ethics Committee of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. *Reprod. Med. Biol.*, 21, e12434.
- 2) Pellestor, F., Andreo, B., Arnal, F., Humeau, C. and Demaille, J. (2003): Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum. Genet.*, 112, 195–203.
- 3) Lim, J. and Luderer, U. (2011): Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol. Reprod.*, 84, 775–782.
- 4) Zhang, T., Xi Q., Wang, D., Li, J., Wang, M., Li, D., Zhu, L. and Jin, L. (2019): Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress involved in oocyte aging: an analysis using single-cell RNA-sequencing of mouse oocytes. *J. Ovarian Res.*, 12, 53.
- 5) Kala, M., Shaikh, M.V. and Nivsarkar, M. (2017): Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reprod. Med. Biol.*, 16, 28–35.
- 6) Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Asada, H., Yamagata, Y. and Sugino, N. (2012): The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J. Ovarian Res.*, 5, 5.
- 7) Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R.M. and Sufino, N. (2008): Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J. Pineal Res.*, 44, 280–287.
- 8) Meldrum, D.R. (2013): Aging gonads, glands, and gametes: immutable or partially reversible changes? *Fertil. Steril.*, 99, 1–4.
- 9) Yuan, S., Wen, J., Cheng, J., Shen, W., Zhou, S., Yan, W., Shen, L., Luo, A. and Wang, S. (2016): Age-associated up-regulation of EGR1 promotes granulosa cell apoptosis during follicle atresia in mice through the NF- κ B pathway. *Cell Cycle*, 15, 2895–2905.
- 10) Bentov, Y. and Casper, R.F. (2013): The aging oocyte--can mitochondrial function be improved? *Fertil. Steril.*, 99, 18–22.
- 11) Majidinia, M., Reiter, R.J., Shakouri, S.K. and Yousefi, B. (2018): The role of melatonin, a multitasking molecule, in retarding the processes of ageing. *Ageing Res. Rev.*, 4, 198–213.
- 12) Poeggeler, B., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D. and Manchester, L.C. (1993): Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J. Pineal Res.*, 14, 151–168.
- 13) Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester L.C., Lopez-Burillo, S., Sainz, R.M. and Mayo, J.C. (2003): Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 527, 539–548.
- 14) Tan, D.X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J. and Reiter, R.J. (2007): One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.*, 42, 28–42.
- 15) Moniruzzaman, M., Ghosal, I., Das, D. and Chakraborty, S.B. (2018): Melatonin ameliorates H₂O₂-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/NF κ B pathway. *Biol. Res.*, 51, 17.
- 16) Nakamura, Y., Tamura, H., Takayama, H. and Kato, H. (2003): Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil. Steril.*, 80, 1012–1016.
- 17) Wurtman, R.J., Axelrod, J. and Potter, L.T. (1964): The uptake of H³-melatonin in endocrine and nervous tissues and the effects of constant light exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 143, 314–318.
- 18) Tanabe, M., Tamura, H., Taketani, T., Okada, M., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Asada, H., Yamagata, Y. and Sugino, N. (2015): Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *J. Reprod. Dev.*, 61, 35–41.
- 19) Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Asada, H., Yamagata, Y. and Sugino, N. (2013): Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr. J.*, 60, 1–13.
- 20) Tamura, H., Nakamura, Y., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D.X., Sugino, N. and Reiter, R.J. (2009): Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil. Steril.*, 92, 328–343.
- 21) Batioglu, A.S., Sahin, U., Gurlek, B., Ozturk, N. and Unsal, E. (2012): The efficacy of melatonin administration on oocyte quality. *Gynecol. Endocrinol.*, 28, 91–93.
- 22) Eryilmaz, O.G., Devran, A., Sarikaya, E., Aksakal, F.N., Mollamahmutoglu, L. and Cicek, N. (2011): Melatonin improves the oocyte and the embryo in IVF patients with sleep disturbances, but does not improve the sleeping problems. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 28, 815–820.
- 23) Jahromi, B.N., Sadeghi, S., Alipour, S., Parsanezhad, M.E. and Alamdarloo, S.M. (2017): Effect of Melatonin on the Outcome of Assisted Reproductive Technique Cycles in Women with Diminished Ovarian Reserve: A Double-Blinded Randomized Clinical Trial. *Iran. J. Med. Sci.*, 42, 73–78.
- 24) Nishihara, T., Hashimoto, S., Ito, K., Nakaoka, Y., Matsumoto, K., Hosoi, Y. and Morimoto, Y. (2014): Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Gynecol. Endocrinol.*,

- 30, 359–362.
- 25) Keshavarzi, S., Salehi, M., Farifteh-Nobijari, F., Hosseini, T., Hosseini S., Ghazifard, A., Ghaffari, Novin, M., Fallah-Omrani, V., Nourozian, M. and Hosseini, A. (2018): Melatonin Modifies Histone Acetylation During In Vitro Maturation of Mouse Oocytes. *Cell J.*, 20, 244–249.
 - 26) Lin, T., Lee, J.E., Kang, J.W., Oqani, R.K., Cho, E.S., Kim, S.B. and Il, Jin, D. (2018): Melatonin supplementation during prolonged in vitro maturation improves the quality and development of poor-quality porcine oocytes via anti-oxidative and anti-apoptotic effects. *Mol. Reprod. Dev.*, 85, 665–681.
 - 27) Marques, T.C., da Silva, Santos, E.C., Diesel, T.O., Leme, L.O., Martins, C.F., Dode, M., Alves, B.G., Costa, F., de Oliveira, E.B. and Gambarini, M.L. (2018): Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.*, 53, 226–236.
 - 28) Cheng, L., Qin, Y., Hu, X., Ren, L., Zhang, C., Wang, X., Wang, W., Zhang, Z., Hao, J., Guo, M., Wu, Z., Tian, J. and An, L. (2019): Melatonin protects in vitro matured porcine oocytes from toxicity of Aflatoxin B1. *J. Pineal Res.*, 66, e12543.
 - 29) Park, H.J., Park, S.Y., Kim, J.W., Yang, S.G., Kim, M.J., Jegal, H.G., Kim, I.S., Choo, Y.K. and Koo, D.B. (2018): Melatonin Improves Oocyte Maturation and Mitochondrial Functions by Reducing Bisphenol A-Derived Superoxide in Porcine Oocytes In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.*, 19.
 - 30) An, Q., Peng, W., Cheng, Y., Lu, Z., Zhou, C., Zhang, Y. and Su, J. (2019): Melatonin supplementation during in vitro maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. *J. Cell Physiol.*, 234, 17370–17381.
 - 31) Lee, S., Jin, J.X., Taweechaipaisankul, A., Kim, G.A., Ahn, C. and Lee, B.C. (2017): Melatonin influences the sonic hedgehog signaling pathway in porcine cumulus oocyte complexes. *J. Pineal Res.*, 63.
 - 32) Pang, Y., Zhao, S., Sun, Y., Jiang, X., Hao, H., Du, W. and Zhu, H. (2018): Protective effects of melatonin on the in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Anim. Sci. J.* 2018, 89, 648–660.
 - 33) Fang, Y., Zhang, J., Li, Y., Guo, X., Li, J., Zhong, R. and Zhang, X. (2019): Melatonin-induced demethylation of antioxidant genes increases antioxidant capacity through RORalpha in cumulus cells of prepubertal lambs. *Free Radic. Biol. Med.*, 131, 173–183.
 - 34) Cardinali, D.P. (2019): Melatonin: Clinical Perspectives in Neurodegeneration. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 480.
 - 35) Vincent, B. (2018): Protective roles of melatonin against the amyloid-dependent development of Alzheimer's disease: A critical review. *Pharmacol Res.*, 134, 223–237.
 - 36) Wang, Y.Y., Zheng, W., Ng, C.H., Ungvari, G.S., Wei, W. and Xiang, Y.T. (2017): Meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials of melatonin in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 32, 50–57.
 - 37) Tamura, H., Kawamoto, M., Sato, S., Tamura, I., Maekawa, R., Taketani, T., Aasada, H., Takaki, E., Nakai, A., Reiter, R.J. and Sugino, N. (2017): Long-term melatonin treatment delays ovarian aging. *J. Pineal Res.*, 62.
 - 38) Song, C., Peng, W., Yin, S., Zhao, J., Fu, B., Zhang, J., Mao, T., Wu, H. and Zhang, Y. (2016): Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. *Sci. Rep.*, 6, 35165.
 - 39) Zhang, L., Zhang, Z., Wang, J., Lv, D., Zhu, T., Wang, F., Tian, X., Yao, Y.O., Ji, P. and Liu, G. (2019): Melatonin regulates the activities of ovary and delays the fertility decline in female animals via MT1/AMPK pathway. *J. Pineal Res.*, 66, e12550.