

— 総説 —

特集：加齢と生殖

# 母体加齢による卵子の減数分裂の異常とIVMによる 卵質の改善に有効な抗酸化剤、抗老化剤

## Oocyte meiosis abnormalities associated with maternal aging and antioxidants and anti-aging agents effective at improving oocyte quality in IVM

名古 満<sup>1,3</sup>・久保埜 花乃<sup>1</sup>・木村 直子<sup>1,2\*</sup>

Mitsuru Nago<sup>1,3</sup>, Kanon Kubono<sup>2</sup> and Naoko Kimura<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>岩手大学大学院連合農学研究科 動物生殖学・動物発生工学分野 〒997-8555 鶴岡市

<sup>2</sup>山形大学農学部バイオサイエンスコース動物機能調節学分野 〒997-855 鶴岡市

<sup>3</sup>田園都市レディースクリニック 〒225-0011 横浜市

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Reproduction, United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, 1-23 Wakaba-machi, Tsuruoka, Yamagata 997-8555, Japan.

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agricultural Science, Yamagata University, 1-23 Wakaba-machi, Tsuruoka, Yamagata 997-8555, Japan

<sup>3</sup>Denentoshi Ladies Clinic, 1-5-1 Azamino, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa 225-0011, Japan.

要旨：正常産子の生産能は卵子の品質に強く依存していることから、卵子が受ける様々なストレスや老化現象の分子機構の解明、卵子のアンチエイジング法や品質が低下した卵子のレスキュー培養法などの研究・開発は、高度生殖補助医療、産業動物の生産性、希少動物資源の保全などに汎用性の高い課題と認識される。本総説では実験モデルであるマウスを中心に、母体加齢に伴う卵子の異数性の増加と紡錘体の形態変化、それらの要因となる減数分裂進行の変化と染色体分離を制御する因子の発現異常を概説するとともに、卵子の質の改善アプローチとして、体外成熟培養 (IVM) を利用して抗酸化剤、抗老化剤の効果を検証した最近の報告例についても紹介する。

キーワード：卵子、母体加齢、減数分裂、異数性、体外成熟 (IVM)

**Abstract:** Maternal ability to produce normal offspring heavily depends on the quality of the oocytes. Therefore, the elucidation of the molecular mechanisms of the various stresses and aging phenomenon that oocytes are subjected to, and technological innovations for anti-aging or the rescue of poor quality oocytes, would contribute to advanced assisted reproductive technologies and livestock productivity, and would also permit the preservation of endangered species. In this paper, we review the literature and evaluate studies that have investigated maternal age-related increases in oocyte aneuploidy and morphological changes in the spindle assembly, the changes in meiotic progression that cause them, and changes in expression of factors that control chromosome segregation focussing on mice, an experimental animal model. We also introduce recent studies that have focused on the improvement of aged oocyte quality (effects of antioxidants and anti-aging agents) using *in vitro* maturation (IVM).

**Key words:** Oocyte, Maternal aging, Meiosis, Aneuploidy, *In vitro* maturation (IVM)

(受付 2022年8月11日 / 受理 2022年9月22日)

別刷請求先：〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町1-23

山形大学大学院農学研究科動物調節学分野

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: naonao@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

### はじめに

哺乳類の雌では、母体加齢による「卵巢内の原始卵胞プールの縮小」と「卵子の質の低下」が、正常産子の生産性のボトルネックとなり得ることは広く知られている。加齢によ

る卵子の質の低下には、母体と同齢である卵母細胞の老化に加え、原始卵胞プールの縮小を伴う発育卵胞数の減少が優性卵胞の選択性を低下させている可能性も考えられているが、詳細は明らかにされていない。母体加齢による卵子の質の低下は、細胞形態学・遺伝学的解析から、減数分裂過程の紡錘体の形態異常<sup>1)</sup>や、染色体異数性の増加<sup>2)</sup>、ミトコンドリアの機能低下<sup>3)</sup>、DNA損傷の増加<sup>4)</sup>、透明帯の構造変化と硬化<sup>5)</sup>など様々な報告がなされており、それらの複合的要因により、卵成熟能、受精能や初期胚発生能の低下、着床能の低下、流産率の増加に繋がるものと考えられている。卵子の老化現象の指標と評価法、それらを制御する分子の探索や制御機構の解明については、日々新知見が更新されている。

本総説では、母体加齢に伴う卵子の減数分裂過程の異常に焦点を当てて、実験モデルであるマウスを中心に概説するとともに、卵子の質の改善アプローチとして、体外成熟培養 (IVM : *In vitro* maturation) を利用して抗酸化剤、抗老化剤の効果を検証した最近の報告例についても紹介する。

## 1. 母体の加齢に伴う卵子の異数性の増加と紡錘体の形態変化

卵子の老化現象の研究の実験モデルとして、マウスが使用されることが比較的多い。マウスの齢とヒトの齢の関係性については、マウスの10～14か月齢がヒトの中年期 (Middle age) とされ、顕著な老化バイオマーカーは検出されないものの、雌マウスではこの時期の上限で生殖機能が概ね消失することを指標とされている<sup>6, 7)</sup>。女性の平均閉経年齢が51～52歳前後とされていることから、卵子の老化現象の研究では、12か月齢以降のマウス卵子を女性の40歳前後以降の年齢に外挿している報告例が大半であることが、本総説の引用文献からもうかがえる。

母体加齢に伴う卵子の老化現象の1つとして、染色体異常の増加が知られている。染色体異常は数的異常と構造的異常に大別されるが、ここでは数的異常について述べる。マウスでは、過排卵処理により得た第二減数分裂中期 (MII期) 卵子の染色体異数性頻度は、3か月齢で12%、12か月齢で30%<sup>1)</sup>、別報では1か月齢で3%、15か月齢で60%<sup>8)</sup>などが報告されている。ヒトでは、Kulievらが2万個超のMII期卵子の極体の染色体スクリーニングにより、異数性頻度は35歳で約20%、43歳以上で60%弱と報告している<sup>9)</sup>。アレイCGH (Comparative genomic hybridization) を使用したFragouliらの解析では、異数性頻度は34～37歳のMII期卵子では47%、38～47歳では78%と報告されている<sup>10)</sup>。マウスの系統や過排卵処理法など対象サンプルの条件の違いは考慮すべきだが、母体加齢に伴う卵子の異数性の増加は、このほか複数の報告において実証されている。減数分裂過程での卵母細胞の染色体分離エラーには、2対の相同染色体の不分離あるいは姉妹染色分体の早期分離のいずれかが考えられており、マウスおよびヒトでの細胞遺伝学的研究から、第一減数分裂過程での姉妹染色分体の早期分離を主因

とする報告が複数みられる<sup>11)</sup> (図1)。一方最近、母体加齢に伴うマウス卵母細胞の第二減数分裂過程での染色体分離エラーの報告もみられ<sup>12)</sup>、今後、加齢に伴う染色体分離エラーの分子機構の詳細な解明が必要である。

卵母細胞の染色体分離エラーによる異数性頻度と連動する指標として、紡錘体の形態異常やM期中期板への染色体の不整列が報告されている。マウスでは、過排卵させたMII期卵子の紡錘体の形態異常と染色体不整列は、3か月齢でそれぞれ10%未満と約15%に対し、12か月齢でいずれも60%超であった<sup>1)</sup>。またIVM後のMII期卵子の紡錘体の形態異常は、11～12か月齢で約60%<sup>13)</sup>、14か月齢で60%<sup>14)</sup>などと報告されている。IVM後のMII期卵子の染色体不整列は、約1.5か月齢で4%、15～17か月齢で49%<sup>15)</sup>、別報では1か月齢で20%、12か月齢で23%、18か月齢では61%<sup>16)</sup>などがある。一方ヒトでは、IVM後のMII期卵子の紡錘体の形態異常はLiuらの38～45歳の患者で80%超<sup>13)</sup>、IVM後のMII期卵子の染色体不整列はLiuらの38～45歳の患者で80%超<sup>13)</sup>、Al-Zubaidiらの36 ± 4.8歳の患者で約60%<sup>16)</sup>などと報告されている。以上、いずれも対象サンプルの条件や形態学的評価法の違いはあるが、少なくともマウスではMII期卵子の紡錘体の形態異常と染色体不整列異数性頻度の増加は、染色体異数性頻度に連動していることが示されている。我々は、C57BL/6系マウスのIVM後のMII期卵子の紡錘体サイズを評価したところ、短径に差はみられなかったものの、長径は2か月齢で18.8 μmに対し13～15か月齢で17.3 μmと有意に減少していたことから、紡錘体長径の短縮化も加齢の指標になり得ると考えている (図2)。紡錘体の形成や安定性は、加齢のほか、Tubulinのアセチル化、酸化ストレス、IVM環境、凍結保存などによっても影響を受けることから、卵子の質の評価指標として、比較的広く用いられている<sup>17)</sup>。

## 2. 母体の加齢に伴う卵子の減数分裂進行の変化と関連因子

ここでは、1.で述べた卵子の異数性の増加と紡錘体の形態異常と、減数分裂進行の変化を関連付けた報告、また減数分裂進行に影響を及ぼす卵母細胞-体細胞のコミュニケーションの加齢による変化に関する報告を紹介する。

卵母細胞は、第一減数分裂前期のレプトテン期、サイゴテン期、パキテン期の各段階を経てディプロテン期の段階で停止した後、核小体を持つ大きな核 (卵核胞GV : Germinal vesicle) を持ち、排卵周期の開始まで維持される。実験動物や産業動物 (ウシやブタなど) では、このGV期から受精可能なMII期までをIVMで行う方法が比較的確立されている。IVM下では、マウス卵母細胞では2か月齢と比較し、12か月齢では卵核胞崩壊 (GVBD : Germinal vesicle break down) が30分間程度早期化し、さらにGVBDからMII期までの移行時間も短くなり、減数分裂進行全体が早期化することが報告されている<sup>18)</sup>。進行の早期化により、染色体分配前の異常の修正や姉妹染色分体の早期分離の抑制がなされず、染

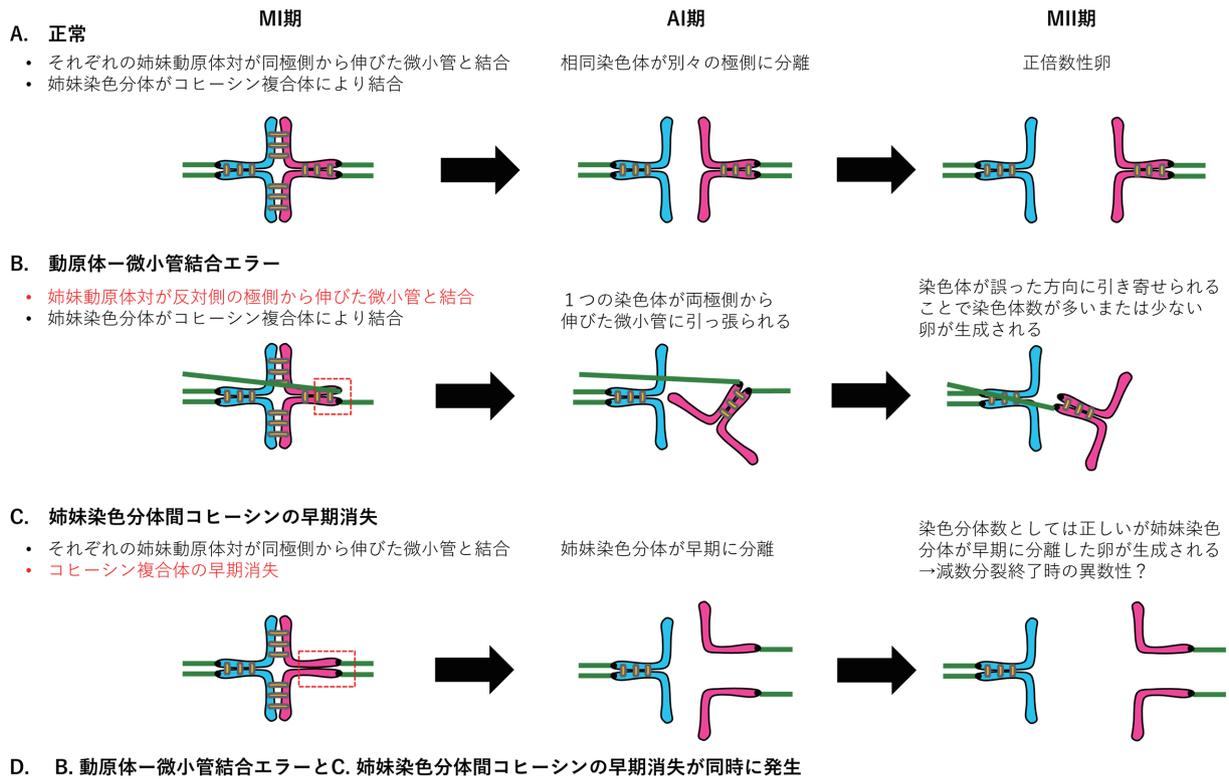


図1 第一減数分裂で想定される染色体分離異常の発生パターン

A : 通常, 第一減数分裂では, 姉妹染色分体がコヒーシン複合体により結合された状態で動原体-微小管結合が確立される. その後, 染色体腕のコヒーシンが解離し極体側と卵細胞質側に染色体が分離することで正倍数性を有するMII期卵が生成される. B : 姉妹動原体対が別の極側から伸びた微小管と結合した場合, 1つの染色体が両極側から伸びた微小管に引っ張られる. その結果, 染色体が誤った方向に引き寄せられると染色体数が多いまたは少ないMII期卵が生成される. C : 姉妹染色分体間コヒーシンの早期に消失した場合, 染色体数としては正しいが姉妹染色分体が早期に分離したMII期卵が生成される. D : BとCの複合的異常, 染色体数が多いまたは少ないMII期卵が生成される.

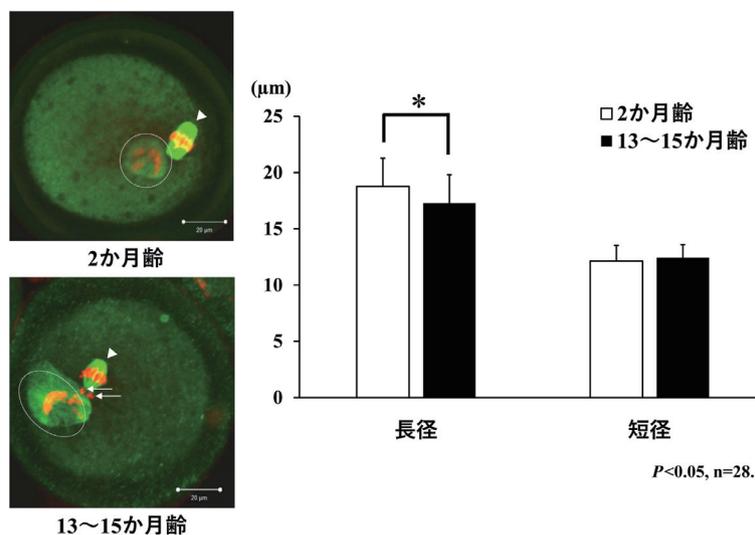


図2 C57BL/6系マウスのIVM後のMII期卵子紡錘体の $\alpha$ -tubulinによる蛍光免疫染色像(写真)と長径および短径(グラフ) 2か月齢マウス由来のMII期卵母細胞と比較し, 13~15か月齢マウス由来のMII期卵母細胞では紡錘体長径が有意に短く, 中期板に整列しない染色体が高頻度で観察される. 白矢じり: MII期紡錘体, 白矢印: MII期紡錘体の中期板に整列していない染色体, 点線丸: 第一極体, 赤: 染色体, 緑:  $\alpha$ -tubulin.

色体異数性を引き起こすと考察されている。一方で、老齢のマウス由来卵母細胞は、GVBDおよびMII期到達までの進行時間に変化はないとする報告もある<sup>19,20</sup>。

卵母細胞におけるGV期での減数分裂停止機構は、卵丘細胞と卵母細胞間のギャップ結合を介したcAMPおよびcGMPの制御が重要であることが知られている<sup>21,22</sup>。卵丘細胞におけるcAMPは、アデニル酸シクラーゼ(AC: Adenylate cyclase)を介してATPから産生された後、ギャップ結合を介して卵母細胞内に輸送される。卵母細胞内cAMP濃度が高く保たれている場合、cAMP依存的なプロテインキナーゼの働きによって卵成熟促進因子(MPF: Maturation promoting factor)の活性が阻害されるため、卵母細胞の減数分裂はGV期で停止する<sup>23</sup>。また、卵母細胞特異的ホスホジエステラーゼであるPDE3AはLHサージ後に活性化され、卵母細胞内のcAMPを分解することで減数分裂再開を誘導するが、卵丘細胞で生成されたcGMPはギャップ結合を介して卵母細胞内に輸送され、PDE3Aを抑制して減数分裂停止を維持している<sup>24</sup>。従って、適切なGV期での停止およびGVBDへの進行は、卵母細胞単独ではなく、卵母細胞を取り囲む周囲の細胞とのコミュニケーションが重要となる。

卵母細胞-顆粒膜細胞間のコミュニケーションは、顆粒膜細胞から卵母細胞へと伸長する突起(TZP: Transzonal projection)によって媒介される。TZPはさまざまな代謝物および転写物の卵母細胞への移行と蓄積を促進する<sup>25</sup>。先行研究では、老齢マウス由来卵母細胞における卵母細胞-顆粒膜細胞間のコミュニケーションの低下が報告されている。El-Hayekらは、3か月齢の若齢マウス由来顆粒膜細胞と比較し、13か月齢の老齢マウス由来顆粒膜細胞ではTZPの主要な構成成分に関連する遺伝子*Daam1*, *Fscn1*, および*Myo10*のmRNA発現量が60~70%減少し、TZPの数が40%減少したことを報告した<sup>26</sup>。また、Zhangらも2か月齢の若齢マウス由来顆粒膜細胞と比較し、12~13か月齢の老齢マウス由来顆粒膜細胞では、*Daam1*, *Fscn1*, および*Myo10*のmRNA発現量およびTZPの数の減少がみられたことを報告している<sup>27</sup>。顆粒膜細胞におけるTZP形成の調節は、卵母細胞によって生成されるパラクリン因子の1つであるGDF9によって促進されるが、この分子についても加齢を伴う発現低下が報告されている。Parkらは10週齢のマウス卵巣組織と比較し、20, 30, 40週齢のマウス卵巣組織でGDF9 mRNA発現量が有意に低下することを報告している<sup>28</sup>。また、Gongらは、卵巣機能低下症患者では、加齢に伴い顆粒膜細胞GDF9の発現が低下し、卵母細胞の質に影響を及ぼすことを報告している<sup>29</sup>。以上のように、GV期からGVBD期への進行の制御には、卵母細胞-顆粒膜細胞間のコミュニケーションも重要であり、関連因子の加齢に伴う発現変化が減数分裂進行に異常をきたし、卵母細胞の質の低下に寄与している可能性がある。

### 3. 母体の加齢に伴う卵子の染色体分離を制御する因子の発現異常

ここでは、1.で述べた卵子の異数性の増加と紡錘体の形態異常に影響を及ぼす染色体分離を制御する因子の加齢による動態変化に関する報告を紹介する。卵母細胞の減数分裂過程における染色体分離は、紡錘体形成チェックポイント(SAC: Spindle assembly checkpoint)<sup>48</sup>や、染色体パッセンジャー複合体(CPC: Chromosomal passenger complex)<sup>49</sup>、コヒーシン複合体<sup>50</sup>などセントロメア、動原体、染色体腕に局在する因子により適切に制御されているが(図3)<sup>51</sup>、母体加齢を伴う卵母細胞では、これらの発現動態が変化することが報告されている。上記因子に発現異常が生じた場合、動原体-微小管結合エラーや姉妹染色分体間コヒーシンの早期消失に起因する誤った染色体分離が進行し、結果として異数性卵子を生成する可能性がある(図1)。

SACは動原体に微小管が正しく結合するまでの間、後期促進複合体(APC/C)に結合し染色体分配開始を抑制する細胞周期制御機構であり、これにより正確な染色体分配が行われている。SACを構成する因子としては、Mad2, BubR1, Bub3, Bub1などが知られており、これらの因子の発現動態が母体加齢を伴う卵母細胞において変化すると報告がなされている(表1, 2)。Mad2はCdc20のもつAPC/C活性化能を抑制するSACの主要構成因子であるが、老齢のヒトおよびマウス由来卵母細胞両方において、発現が低下することが報告されている<sup>40,44</sup>。BubR1とBub3は、複合体を形成したのちにMad2-Cdc20複合体と結合することでAPC/C活性化を抑制するが、BubR1は老齢のヒトおよびマウス由来卵母細胞において発現が低下し<sup>39,41-43</sup>、Bub3は老齢ヒト由来卵母細胞において発現が低下することが報告されている<sup>42</sup>。Bub1は、Mad2, BubR1, Bub3など他のSAC構成因子を動原体にリクルートするために機能していると考えられているが、老齢マウス由来卵母細胞では、その発現が増加することが報告されている<sup>39</sup>。一方、老齢ヒト由来卵母細胞では、その発現が低下することが示されている<sup>40,41</sup>。

細胞分裂の際、複製した染色体を2つの娘細胞に均等に分配するためには、対をなす姉妹染色分体のそれぞれが各姉妹染色分体側の極から伸びた微小管によって捕らえられる必要がある。しかし、1本の染色分体が両側からのスピンドル微小管によって捕えられるなど、誤った結合が生じる場合がある。CPCは分裂期に姉妹動原体の間に位置するセントロメア領域に局在し、これら間違った結合を特異的に不安定化することで染色体が正しい方向からの捕捉をサポートしている。有糸分裂細胞におけるCPCは、INCENP, Survivin, BorealinおよびAurora Bによって構成されるが、卵母細胞においては、Aurora B機能を補うことのできるAurora Cが高いレベルで発現しており、2つの形態のCPCが存在することが知られている<sup>52</sup>。老齢マウス由来卵母細胞においては、INCENP<sup>39</sup>、リン酸化型Aurora Cの発現が低下する一方で<sup>44</sup>、Aurora Bの発現は増加することが報告

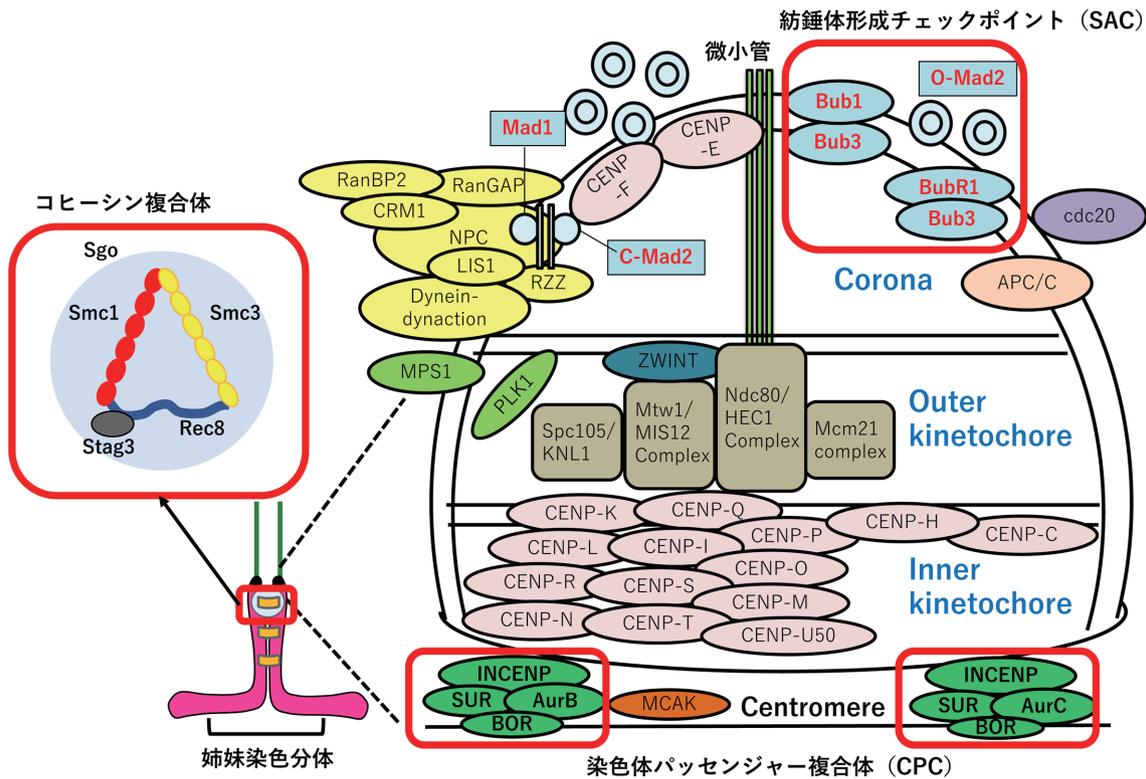


図3 染色体分離に関わるセントロメア・動原体・染色体腕局在因子

卵母細胞の減数分裂過程における染色体分離は、紡錘体形成チェックポイント (赤枠内) や、染色体パッセンジャー複合体 (赤枠内)、コヒーシン複合体 (赤枠内) などセントロメア、動原体、染色体腕に局在する因子により適切に制御されている。

されている<sup>39)</sup>。

減数分裂過程における姉妹染色分体の結合は、Stag3, Smc1 $\beta$ , Smc3およびRec8から構成されるコヒーシン複合体およびこれを保護するシュゴシンタンパクにより適切に制御されている。これら因子の発現低下は、姉妹染色分体の早期分離を引き起こすが、この表現型は母体加齢を伴う卵母細胞で観察される異数性パターンの主たるものである。コヒーシン複合体構成因子のうち、Smc1 $\beta$ およびRec8は、老齢のヒトおよびマウス由来卵母細胞の両方において発現が低下する<sup>45-47)</sup>。一方、Smc3の発現動態は、ヒトおよびマウス卵母細胞両方において、母体加齢に伴う大きな変化がみられないことが報告されている<sup>45)</sup>。また、コヒーシン複合体を保護するシュゴシンタンパク質の1つであるSgo2の発現は、老齢マウス由来卵母細胞において低下することが報告されている<sup>20, 44)</sup>。しかし、Yunらは老齢マウス由来卵母細胞におけるSgo2の発現低下は、CD-1マウスを用いた実験で観察されたが、C57BL6/Jマウスを用いた実験では観察されなかったことを報告しており<sup>44)</sup>、研究に用いるマウス系統の違いが染色体分離機構に影響を及ぼす可能性が示唆されている。以上のことより、母体加齢を伴う卵母細胞における染色体分離制御因子の発現動態は、最近明らかになら

つつあるものの、いまだ不明瞭な部分も多く、この領域のさらなる解明が期待される。

#### 4. IVM下で母体加齢に伴う卵子の質の改善が 検証された抗酸化剤, 抗老化剤など

実験動物や産業動物 (ウシやブタなど) においてIVMは、GV期から受精可能となるMII期までに成熟培養する技術で、卵巣内の閉鎖前の卵胞の卵母細胞を生物資源として活用可能とする重要な技術である。卵子の質の改善アプローチには、一定期間、抗酸化剤などのサプリメントを摂取・投与する生体レベルでの制御法があるが<sup>53)</sup>、IVMを利用し、卵子-卵丘細胞複合体へピンポイントに効果を発揮できれば、生体への影響を考慮する必要は低くなり、また中動物・大動物では薬剤などの投与コストの問題もクリアーできる。現状では、IVMは生体内成熟卵子と比較し、産子生産能がやや低く<sup>54)</sup>、現在も最適なIVM法の開発が行われている。

臨床においてIVMは、卵巣刺激のためのゴナドトロピン注射を必要としない、もしくは極少量しか必要としないため、卵巣刺激の副作用である卵巣過剰刺激症候群の発症リスクが高い多嚢胞性卵巣の患者にとっては治療法の1つになり得ると考えられている一方、IVMの安全性や効果的適

表1 染色体分離制御因子とノックアウトマウスの表現型

染色体分離 制御機構	因子	ノックアウトマウスの報告	
		妊孕性	表現型
紡錘体形成 チェックポイント	Bub1 (McGuinness BE <i>et al.</i> , 2009) <sup>30)</sup>	不妊	キアズマの解離および第一極体放出の早期化 第一減数分裂過程での染色体不整列および染色体誤分離の増加 第一減数分裂過程での姉妹セントロメア間結合の早期喪失
	BubR1 (Touati SA <i>et al.</i> , 2015) <sup>31)</sup>	記載なし	第一極体放出の早期化 第一減数分裂過程での染色体誤分離の増加
染色体パッセン ジャー複合体	Aurora A (Blengini CS <i>et al.</i> , 2021) <sup>32)</sup>	不妊	第一減数分裂中期での停止 第一減数分裂中期紡錘体形態異常(紡錘体体積、紡錘体長、双極紡錘体形成率の低下)
	Aurora B (Nguyen AL <i>et al.</i> , 2018) <sup>33)</sup>	産子数の低下	第二減数分裂中期での異数性の増加 第二減数分裂中期での早期染色体分離の増加
	Aurora C (Schindler K <i>et al.</i> , 2012) <sup>34)</sup>	産子数の低下	第一減数分裂中期での染色体不整列の増加 第一極体放出率の低下 第一極体放出までの時間延長
	Aurora C (Nguyen AL <i>et al.</i> , 2018) <sup>33)</sup>	産子数の低下	
	Survivin (Jiang ZZ <i>et al.</i> , 2014) <sup>35)</sup>	不妊または 産子数の低下	第一減数分裂後期への早期移行 第一極体放出率の低下 第二減数分裂中期での染色体不整列の増加 第二減数分裂中期紡錘体形態異常の増加
コヒーシン複合体 および関連因子	Smc1 $\beta$ (Revenkova E <i>et al.</i> , 2004) <sup>36)</sup>	不妊	染色体腕およびセントロメアでの姉妹染色分体間結合の早期消失
	Rec8 (Xu H <i>et al.</i> , 2005) <sup>37)</sup>	不妊	5dppの新生児の卵巣における卵母細胞および卵胞の喪失 16.5~18.5 dpcの卵母細胞で姉妹染色分体間の結合の喪失
	Sgo2 (Llano E <i>et al.</i> , 2008) <sup>38)</sup>	不妊	第二減数分裂中期での姉妹染色分体の早期分離

用については、現在も慎重に検証されている<sup>55)</sup>。近年、IVM培地への抗酸化剤または抗老化剤の添加が、母体加齢を伴う卵母細胞の質の低下に対する改善法として有用である可能性が示されている<sup>56, 57)</sup>。

メラトニンは、松果体細胞および松果体外細胞から産生・分泌されるインドールアミン系ホルモンで、ヒトの概日リズムのタイミングや睡眠・覚醒周期の調節に重要な役割を担っている。さらにメラトニンは強力な脂質親和性抗酸化作用とフリーラジカル除去作用を持つことが実証されている<sup>58)</sup>。Nasheedらは6か月齢の老齢マウス由来のGV期卵母細胞を採取し10  $\mu$ Mメラトニンを含んだ培地でIVMを行ったところ、非添加群と比較して、過剰な活性酸素種(ROS)や酸化的損傷から細胞を保護する作用を示すSIRT1、オートファジーマーカーであるLC3の発現量および卵母細胞内のATP含有量を増加させること、また、培地の総抗酸化能(TAC)が増加し、卵母細胞内の活性酸素種量が低下したと報告している<sup>59)</sup>。このことからメラトニンのIVM培地への添加は、SIRT1発現量、オートファジー、ATP含有量の増加によりミトコンドリア機能を改善し、結果的に老齢個体由来卵母細胞内のミトコンドリアの質を向上させることが期待される。

レスベラトロールはブドウ、ワイン、ピーナッツ、大豆に

含まれる天然ポリフェノールであり、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドラジカル、金属誘導ラジカルなどの活性酸素種(ROS)のスカベンジャーとしての抗酸化作用が知られている<sup>60)</sup>。Liuらは顕微授精施行周期の38~45歳の女性から採取したGV期の未成熟卵母細胞をレスベラトロール1.0  $\mu$ Mを添加した培養液を用いてIVMを行った群では、非添加群と比較して第一極体放出率およびMII期でのミトコンドリア機能が上昇し、異常な紡錘体形態および染色体不整列の割合が低下すること、また12~13か月齢の老齢マウスから採取したGV期の未成熟卵母細胞をレスベラトロール1.0  $\mu$ M添加した培養液でIVMを行った場合、非添加群と比較して、第一極体放出率、受精率、胚盤胞到達率が上昇し、MII期での紡錘体形態、染色体整列およびミトコンドリア機能が改善し、抗酸化遺伝子であるSIRT1、SOD、GPX4、CATのmRNA発現が増加すると報告している<sup>13)</sup>。またこの報告では、レスベラトロール0.1  $\mu$ Mと10  $\mu$ Mの低濃度、高濃度での添加ではSIRT1、SOD、GPX4、CATのmRNA発現が非添加群と変化がないことから、レスベラトロールのIVM培地への添加の最適濃度は1.0  $\mu$ Mであることも示されている。このことからレスベラトロール1.0  $\mu$ Mを老齢個体由来卵母細胞のIVM培地に添加することで、紡錘体形態、染色体整列、ミトコンドリア機能が改善し、抗酸化遺伝子の発

表2 加齢母体由来卵子における染色体分離制御因子の発現変化

染色体分離制御機構	因子	加齢母体由来卵子における発現レベル	
		マウス	ヒト
紡錘体形成チェックポイント	Bub1	↑ (Pan H <i>et al.</i> , 2008) <sup>39)</sup>	↓ (Steuerwald N <i>et al.</i> , 2001) <sup>40)</sup> (Lagirand-Cantaloube J <i>et al.</i> , 2017) <sup>41)</sup>
	Bub3		↓ (Steuerwald NM <i>et al.</i> , 2007) <sup>42)</sup>
	BubR1	↓ (Pan H <i>et al.</i> , 2008) <sup>39)</sup>	↓ (Steuerwald NM <i>et al.</i> , 2007) <sup>42)</sup> (Riris S <i>et al.</i> , 2014) <sup>43)</sup> (Lagirand-Cantaloube J <i>et al.</i> , 2017) <sup>41)</sup>
	Mad2	↓ (Yun Y <i>et al.</i> , 2014) <sup>44)</sup>	↓ (Steuerwald N <i>et al.</i> , 2001) <sup>40)</sup>
染色体パッセンジャー複合体	Aurora B	↑ (Pan H <i>et al.</i> , 2008) <sup>39)</sup>	
	Aurora C	↓ (pAurora C) (Yun Y <i>et al.</i> , 2014) <sup>44)</sup>	
	INCENP	↓ (Pan H <i>et al.</i> , 2008) <sup>39)</sup>	
コヒーシン複合体および関連因子	Smc1β	↓ (Tsutsumi M <i>et al.</i> , 2014) <sup>45)</sup>	↓ (Tsutsumi M <i>et al.</i> , 2014) <sup>45)</sup>
	Smc3	変化なし (Tsutsumi M <i>et al.</i> , 2014) <sup>45)</sup>	変化なし (Tsutsumi M <i>et al.</i> , 2014) <sup>45)</sup>
	Rec8	↓ (Liu L <i>et al.</i> , 2008) <sup>46)</sup> (Chiang T <i>et al.</i> , 2010) <sup>47)</sup> (Tsutsumi M <i>et al.</i> , 2014) <sup>45)</sup>	↓ (Tsutsumi M <i>et al.</i> , 2014) <sup>45)</sup>
	Sgo2	↓ (Lister LM <i>et al.</i> , 2010) <sup>20)</sup> (Yun Y <i>et al.</i> , 2014) <sup>44)</sup>	
		変化なし (Yun Y <i>et al.</i> , 2014) <sup>44)</sup>	

現量が増加することで卵母細胞の成熟と受精および胚盤胞形成を促進することが期待される。

二量体プロシアニジンB2 (PCB2) はブドウの種子から抽出された天然化合物であり、生体内で強力な抗酸化作用を示す<sup>61)</sup>。Zhuanらは10～11か月齢の老齢マウスのGV期卵母細胞を採取し、PCB2が5 μg/mL添加された培地でIVMを行ったところ、非添加区と比較して卵母細胞の皮質張力を制御するpERM (phospo-ERMs)、pMRLC (活性化型ミオシンII調節軽鎖)の発現レベルが増加し、また紡錘体形態、染色体異常が軽減、卵母細胞の酸化ストレスのレベルを表すROSレベルが減少したと報告している<sup>62)</sup>。このことからPCB2を5 μg/mLをIVM培地に添加することで、PCB2が抗酸化作用、皮質張力増強剤の二つの役割として働き、老齢個体由来卵母細胞を減数分裂異常から保護することが示唆された。

MitoQは、ミトコンドリアを標的とする成分(親油性トリ

フェニルホスホニウムカチオン)に化学的に結合した強力な抗酸化成分(ユビキノンを)を含んだ抗酸化剤である<sup>63, 64)</sup>。Al-Zubaidiらは、18か月齢の老齢マウスのGV期卵母細胞を採取し、50 nM MitoQを含んだ培地でIVMしたところ、非添加群と比較して、ミトコンドリア機能および卵成熟率を上昇させること、また、MII期での染色体不整列の頻度を低下させることを報告した<sup>16)</sup>。また著者らはこの報告の中で、ヒトのGV期卵母細胞に対しても50 nM MitoQを含んだ培地でIVMを行い、37歳以上の群では、非添加群と比較して、ミトコンドリア機能および第一極体放出率を上昇させることも示している。

BGP-15はヒドロキシルアミン誘導体であり、ミトコンドリアに優先的に蓄積され抗酸化作用を示す<sup>65)</sup>。Al-Zubaidiらは、18か月齢の老齢マウスのGV期卵母細胞を採取し、10 μM BGP-15を含んだ培地でIVMを行ったところ、非添加群と比較して、ミトコンドリア機能および第一極体放出率

を上昇させること、またMII期での染色体不整列の頻度を低下させることを報告した<sup>16)</sup>。

ケルセチンは、ブロッコリー、リンゴ、タマネギなどに含まれるフラボノイドの一種で抗酸化作用を示す<sup>66)</sup>。Caoらは9～10か月齢老齢マウスのGV期卵母細胞を採取し、10 μMケルセチンを含んだ培地でIVMを行ったところ、非添加群と比較して、卵核崩壊率、第一極放出率、胚盤胞到達率が上昇したことを報告した<sup>67)</sup>。この報告では、老齢マウスの卵母細胞におけるIVM培地へのケルセチンの添加は、ミトコンドリアの分布、ミトコンドリア膜電位、ATPレベル、ミトコンドリア構造、MII期での紡錘体形態および表層顆粒の分布を改善することに加え、SIRT3を介したSOD2のK68残基の脱アセチル化によりアポトーシスを減少させることが示されており、これらのデータは、ケルセチンが老齢個体由来卵母細胞の質を改善し、体外成熟-受精-培養 (IVMFC) による胚発生能を改善できることを示唆している。

### おわりに

老齢個体由来の卵子は、複合的要因により、卵母細胞-顆粒膜細胞間コミュニケーションの低下、減数分裂の進行の攪乱、紡錘体の形態異常、染色体分離異常を起こしやすく、それらの分子機構の解明と、加齢の制御法、卵子の質を改善する治療戦略などの研究・開発が進められている。実験モデルで減数分裂や発生過程における特定ステージの卵子・受精卵の分子動態の解析や、有効な添加剤のスクリーニングを進める上で、IVMFCは効率的な研究手段となり得る。さらに見出された添加剤の効果は、老齢由来卵のみならず、若齢由来卵にもよい効果が期待でき、結果的に汎用性の高い培養技術の高度化に繋がっていくことが期待される。

本総説では実験モデルとしてマウスを中心に概説したが、マウス卵子とヒト卵子では、紡錘体形成や染色体分離のメカニズムが異なることが示されており<sup>68)</sup>、研究を進めていく上では考慮されなければならない。また減数分裂過程では、卵子はDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクス制御が変動するが、母体加齢に伴い卵子はこの部分においても異常が生じることが報告されている<sup>69)</sup>。複合的要因で生じる卵子の老化現象については、それぞれの因果関係を紐解くように、分子細胞学レベルでの解明を進めることが必要であろう。

### 文 献

- Selesniemi, K., Lee, H.J., Muhlhauser, A. and Tilly, J.L. (2011): Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 12319–12324.
- Jones, K.T. and Lane, S.I. (2013): Molecular causes of aneuploidy in mammalian eggs. *Development*, 140, 3719–3730.
- Adhikari, D., Lee, I.W., Yuen, W.S. and Carroll, J. (2022): Oocyte mitochondria-key regulators of oocyte function and potential therapeutic targets for improving fertility. *Biol. Reprod.*, 106, 366–377.
- Fujino, Y., Ozaki, K., Yamamasu, S., Ito, F., Matsuoka, I., Hayashi, E., Nakamura, H., Ogita, S., Sato, E. and Inoue, M. (1966): DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum. Reprod.*, 11, 1480–1483.
- Longo, F.J. (1981): Changes in the zones pellucidae and plasmalemma of aging mouse eggs. *Biol. Reprod.*, 25, 399–411.
- Flurkey, K., Curren, J.M. and Harrison, D.E. (2007): *The mouse in aging research* (Fox, J.G., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomer, C.E., Quimby, F.W., Smith, A.L., eds.), *The Mouse in Biomedical Research* (2nd Edition), pp. 637–672, Elsevier Burlington, MA, Burlington.
- Dutta, S. and Sengupta, P. (2016): Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.*, 1, 152, 244–248.
- Merriman, J.A., Jennings, P.C., McLaughlin, E.A. and Jones, K.T. (2012): Effect of aging on superovulation efficiency, aneuploidy rates, and sister chromatid cohesion in mice aged up to 15 months. *Biol. Reprod.*, 86, 49, 1–6.
- Kuliev, A., Zlatopolsky, Z., Kirillova, I., Spivakova, J. and Cieslak, Janzen, J. (2011): Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod. Biomed. Online*, 22, 2–8.
- Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., Jaroudi, S., Sarasa, J., Enciso, M. and Wells, D. (2013): The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum. Genet.*, 132, 1001–1013.
- Greaney, J., Wei, Z. and Homer, H. (2018): Regulation of chromosome segregation in oocytes and the cellular basis for female meiotic errors. *Hum. Reprod. Update*, 24, 135–161.
- Kouznetsova, A., Liu, J.G., Valentiniene, S., Brismar, H. and Höög, C. (2022): Age-dependent aneuploidy in mammalian oocytes instigated at the second meiotic division. *Aging Cell*, 21, e13649.
- Liu, M.J., Sun, A.G., Zhao, S.G., Liu, H., Ma, S.Y., Li, M., Huai, Y.X., Zhao, H. and Liu, H.B. (2018): Resveratrol improves in vitro maturation of oocytes in aged mice and humans. *Fertil. Steril.*, 109, 900–907.
- Bertoldo, M.J., Listijono, D.R., Ho, W.J., Riepsamen, A.H., Goss, D.M., Richani, D., Jin, X.L., Mahbub, S., Campbell, J.M., Habibalahi, A., Loh, W.N., Youngson, N.A., Maniam, J., Wong, A.S.A., Selesniemi, K., Bustamante, S., Li, C., Zhao, Y., Marinova, M.B., Kim, L.J., Lau, L., Wu, R.M., Mikolaizak, A.S., Araki, T., Le, Couteur D.G., Turner, N., Morris, M.J., Walters, K.A., Goldys, E., O'Neill, C., Gilchrist, R.B., Sinclair, D.A., Homer, H.A. and Wu, L.E. (2020): NAD+ Repletion Rescues Female Fertility during Reproductive Aging. *Cell Rep.*, 30, 1670–1681.
- Shomper, M., Lappa, C. and FitzHarris, G. (2014): Kinetochore microtubule establishment is defective in oocytes from aged mice. *Cell Cycle*, 13, 1171–1179.
- Al-Zubaidi, U., Adhikari, D., Cinar, O., Zhang, Q.H., Yuen, W.S., Murphy, M.P., Rombauts, L., Robker,

- R.L. and Carroll, J. (2021): Mitochondria-targeted therapeutics, MitoQ and BGP-15, reverse aging-associated meiotic spindle defects in mouse and human oocytes. *Hum. Reprod.*, 36, 771–784.
- 17) Blengini, C.S. and Schindler, K. (2022): Acentriolar spindle assembly in mammalian female meiosis and the consequences of its perturbations on human reproduction. *Biol. Reprod.*, 106, 253–263.
  - 18) Koncicka, M., Tetkova, A., Jansova, D., Del, Llano, E., Gahurova, L., Kracmarova, J., Prokesova S., Masek, T., Pospisek, M., Bruce, A.W., Kubelka, M. and Susor, A. (2018): Increased Expression of Maturation Promoting Factor Components Speeds Up Meiosis in Oocytes from Aged Females. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 2841.
  - 19) Duncan, F.E., Chiang, T., Schultz, R.M. and Lampson, M.A. (2009): Evidence that a defective spindle assembly checkpoint is not the primary cause of maternal age-associated aneuploidy in mouse eggs. *Biol. Reprod.*, 81, 768–776.
  - 20) Lister, L.M., Kouznetsova, A., Hyslop, L.A., Kalleas, D., Pace, S.L., Barel, J.C., Nathan, A., Floros, V., Adelfalk, C., Watanabe, Y., Jessberger, R., Kirkwood, T.B., Höög, C. and Herbert, M. (2010): Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and Sgo2. *Curr. Biol.*, 20, 1511–1521.
  - 21) Conti, M., Andersen, C.B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S.Y., Horner, K., Jin, C. and Tsafri, A. (2002): Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 187, 153–159.
  - 22) Zhang, M., Su, Y.Q., Sugiura, K., Xia, G. and Eppig, J.J. (2010): Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, 330, 366–369.
  - 23) Bornslaeger, E.A., Mattei, P. and Schultz, R.M. (1986): Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.*, 114, 453–462.
  - 24) Jaffe, L.A. and Egbert, J.R. (2017): Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle. *Annu. Rev. Physiol.*, 79, 237–260.
  - 25) Su, Y.Q., Sugiura, K. and Eppig, J.J. (2009): Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin. Reprod. Med.*, 27, 32–42.
  - 26) El-Hayek, S., Yang, Q., Abbassi, L., FitzHarris, G. and Clarke, H.J. (2018): Mammalian Oocytes Locally Remodel Follicular Architecture to Provide the Foundation for Germline-Soma Communication. *Curr. Biol.*, 28, 1124–1131.
  - 27) Zhang, H., Li, C., Wen, D., Li, R., Lu, S., Xu, R., Tang, Y., Sun, Y., Zhao, X., Pan, M. and Ma, B. (2022): Melatonin improves the quality of maternally aged oocytes by maintaining intercellular communication and antioxidant metabolite supply. *Redox. Biol.*, 49, 102215.
  - 28) Park, M.J., Ahn, J.W., Kim, K.H., Bang, J., Kim, S.C., Jeong, J.Y., Choi, Y.E., Kim, C.W. and Joo, B.S. (2020): Prediction of ovarian aging using ovarian expression of BMP15, GDF9, and C-KIT. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 245, 711–719.
  - 29) Gong, Y., Li-Ling, J., Xiong, D., Wei, J., Zhong, T. and Tan, H. (2021): Age-related decline in the expression of GDF9 and BMP15 genes in follicle fluid and granulosa cells derived from poor ovarian responders. *J. Ovarian Res.*, 14, 1.
  - 30) McGuinness, B.E., Anger, M., Kouznetsova, A., Gil-Bernabé, A.M., Helmhart, W., Kudo, N.R., Wuensche, A., Taylor, S., Hoog, C., Novak, B. and Nasmyth, K. (2009): Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.*, 19, 369–380.
  - 31) Touati, S.A., Buffin, E., Cladière, D., Hached, K., Rachez, C., van Deursen, J.M. and Wassmann, K. (2015): Mouse oocytes depend on BubR1 for proper chromosome segregation but not for prophase I arrest. *Nat. Commun.*, 6, 6946.
  - 32) Blengini, C.S., Ibrahimian, P., Vaskovicova, M., Drutovic, D., Solc, P. and Schindler, K. (2021): Aurora kinase A is essential for meiosis in mouse oocytes. *PLoS. Genet.*, 17, e1009327.
  - 33) Nguyen, A.L., Drutovic, D., Vazquez, B.N., El, Yakoubi, W., Gentilello, A.S., Malumbres, M., Solc, P. and Schindler, K. (2018): Genetic Interactions between the Aurora Kinases Reveal New Requirements for AURKB and AURKC during Oocyte Meiosis. *Curr. Biol.*, 28, 3458–3468.
  - 34) Schindler, K., Davydenko, O., Fram, B., Lampson, M.A. and Schultz, R.M. (2012): Maternally recruited Aurora C kinase is more stable than Aurora B to support mouse oocyte maturation and early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109, E2215–E2222.
  - 35) Jiang, Z.Z., Hu, M.W., Wang, Z.B., Huang, L., Lin, F., Qi, S.T., Ouyang, Y.C., Fan, H.Y., Schatten, H., Mak, T.W. and Sun, Q.Y. (2014): Survivin is essential for fertile egg production and female fertility in mice. *Cell Death Dis.*, 5, e1154.
  - 36) Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C.A., Hunt, P.A., Liebe, B., Scherthan, H. and Jessberger, R. (2004): Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat. Cell Biol.*, 6, 555–562.
  - 37) Xu, H., Beasley, M.D., Warren, W.D., van, der, Horst, G.T., and McKay, M.J. (2005): Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev. Cell*, 8, 949–961.
  - 38) Llano, E., Gómez, R., Gutiérrez-Caballero, C., Herrán, Y., Sánchez-Martín, M., Vázquez-Quiñones, L., Hernández, T., de, Alava, E., Cuadrado, A., Barbero, J.L., Suja, J.A. and Pendás, A.M. (2008): Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes. Dev.*, 22, 2400–2413.
  - 39) Pan, H., Ma, P., Zhu, W. and Schultz, R.M. (2008): Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev. Biol.*, 316, 397–

- 407.
- 40) Steuerwald, N., Cohen, J., Herrera, R.J., Sandalinas, M. and Brenner, C.A. (2001): Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 7, 49–55.
  - 41) Lagirand-Cantaloube, J., Ciabrini, C., Charrasse, S., Ferrieres, A., Castro, A., Anahory, T. and Lorca, T. (2017): Loss of Centromere Cohesion in Aneuploid Human Oocytes Correlates with Decreased Kinetochores Localization of the Sac Proteins Bub1 and Bubr1. *Sci. Rep.*, 7, 44001.
  - 42) Steuerwald, N.M., Bermúdez, M.G., Wells, D., Munné, S. and Cohen, J. (2007): Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 14, 700–708.
  - 43) Riris, S., Webster, P. and Homer, H. (2014): Digital multiplexed mRNA analysis of functionally important genes in single human oocytes and correlation of changes in transcript levels with oocyte protein expression. *Fertil. Steril.*, 101, 857–864.
  - 44) Yun, Y., Holt, J.E., Lane, S.I., McLaughlin, E.A., Merriman, J.A. and Jones, K.T. (2014): Reduced ability to recover from spindle disruption and loss of kinetochores spindle assembly checkpoint proteins in oocytes from aged mice. *Cell Cycle*, 13, 1938–1947.
  - 45) Tsutsumi, M., Fujiwara, R., Nishizawa, H., Ito, M., Kogo, H., Inagaki, H., Ohye, T., Kato, T., Fujii, T. and Kurahashi, H. (2014): Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. *PLoS One*, 9, e96710.
  - 46) Liu, L. and Keefe, D.L. (2008): Defective cohesin is associated with age-dependent misaligned chromosomes in oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 16, 103–112.
  - 47) Chiang, T., Duncan, F.E., Schindler, K., Schultz, R.M. and Lampson, M.A. (2010): Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr. Biol.*, 20, 1522–1528.
  - 48) Musacchio, A. (2015): The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr. Biol.*, 25, R1002–1018.
  - 49) Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. (2004): Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*, 113, 211–222.
  - 50) Peters, J.M., Tedeschi, A. and Schmitz, J. (2008): The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev.*, 22, 3089–3114.
  - 51) Maiato, H., DeLuca, J., Salmon, E.D. and Earnshaw, W.C. (2004): The dynamic kinetochores-microtubule interface. *J. Cell Sci.*, 117, 5461–5477.
  - 52) Sharif, B., Na, J., Lykke-Hartmann, K., McLaughlin, S.H., Laue, E., Glover, D.M. and Zernicka-Goetz, M. (2010): The chromosome passenger complex is required for fidelity of chromosome transmission and cytokinesis in meiosis of mouse oocytes. *J. Cell Sci.*, 123, 4292–4300.
  - 53) 山口祐之・佐藤可野・河村和弘 (2022): 高齢不妊女性に対するサプリメントの有効性. *J. Mammal. Ova Res.*, 39(1): 27–34.
  - 54) Bonilla, L., Block, J., Denicol, A.C. and Hansen, P.J. (2014): Consequences of transfer of an in vitro-produced embryo for the dam and resultant calf. *J. Dairy Sci.*, 97, 229–239.
  - 55) Krishner, R.L. (2022): Present state and future outlook for the application of in vitro oocyte maturation in human infertility treatment. *Biol. Reprod.*, 106, 235–242.
  - 56) Li, C., He, X., Huang, Z., Han, L., Wu, X., Li, L., Xin, Y., Ge, J., Sha, J., Yin, Z. and Wang, Q. (2020): Melatonin ameliorates the advanced maternal age-associated meiotic defects in oocytes through the SIRT2-dependent H4K16 deacetylation pathway. *Aging (Albany NY)*, 12, 1610–1623.
  - 57) Yoon, J., Juhn, K.M., Jung, E.H., Park, H.J., Yoon, S.H., Ko, Y., Hur, C.Y. and Lim, J.H. (2020): Effects of resveratrol, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or dichloroacetic acid in the culture media on embryonic development and pregnancy rates in aged mice. *Aging (Albany NY)*, 12, 2659–2669.
  - 58) Ferlazzo, N., Andolina, G., Cannata, A., Costanzo, M.G., Rizzo, V., Currò, M., Ientile, R. and Caccamo, D. (2020): Is Melatonin the Cornucopia of the 21st Century? *Antioxidants (Basel)*, 9, 1088.
  - 59) Nasheed, Hamad, Almohammed, Z., Moghani-Ghoroghi, F., Ragerdi-Kashani, I., Fathi, R., Tahaei, L.S., Naji, M. and Pasbakhsh, P. (2020): The Effect of Melatonin on Mitochondrial Function and Autophagy in In Vitro Matured Oocytes of Aged Mice. *Cell J.*, 22, 9–16.
  - 60) Breuss, J.M., Atanasov, A.G. and Uhrin, P. (2019): Resveratrol and Its Effects on the Vascular System. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 1523.
  - 61) Luo, Y., Zhuan, Q., Li, J., Du, X., Huang, Z., Hou, Y. and Fu, X. (2020): Procyanidin B2 Improves Oocyte Maturation and Subsequent Development in Type 1 Diabetic Mice by Promoting Mitochondrial Function. *Reprod. Sci.*, 27, 2211–2222.
  - 62) Zhuan, Q., Li, J., Zhou, G., Du, X., Liu, H., Hou, Y., Wan, P. and Fu, X. (2022): Procyanidin B2 Protects Aged Oocytes Against Meiotic Defects Through Cortical Tension Modulation. *Front. Vet. Sci.*, 9, 795050.
  - 63) Murphy, M.P. (2016): Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochem. Soc. Trans.*, 44, 1219–1226.
  - 64) Ribeiro, Junior, R.F., Dabkowski, E.R., Shekar, K.C., O Connell, K.A., Hecker, P.A. and Murphy, M.P. (2018): MitoQ improves mitochondrial dysfunction in heart failure induced by pressure overload. *Free Radic. Biol. Med.*, 117, 18–29.
  - 65) Sumegi, K., Fekete, K., Antus, C., Debreceni, B., Hocsak, E., Gallyas, F. Jr., Sumegi, B. and Szabo, A. (2017): BGP-15 Protects against Oxidative Stress- or Lipopolysaccharide-Induced Mitochondrial Destabilization and Reduces Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species. *PLoS One.*, 12, e0169372.
  - 66) de, Oliveira, M.R., Nabavi, S.M., Braidy, N., Setzer,

- W.N., Ahmed, T. and Nabavi, S.F. (2016): Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. *Biotechnol. Adv.*, 34, 532–549.
- 67) Cao, Y., Zhao, H., Wang, Z., Zhang, C., Bian, Y., Liu, X., Zhang, C., Zhang, X. and Zhao, Y. (2020): Quercetin promotes in vitro maturation of oocytes from humans and aged mice. *Cell Death Dis.*, 11, 965.
- 68) Namgoong, S., Kim, N.H. (2018): Meiotic spindle formation in mammalian oocytes: implications for human infertility. *Biol. Reprod.*, 98, 153–161.
- 69) Ge, Z.J., Schatten, H., Zhang, C.L. and Sun, Q.Y. (2015): Oocyte ageing and epigenetics. *Reproduction*, 149, R103–114.