Glycative Stress Research

Online edition : ISSN 2188-3610
Print edition : ISSN 2188-3602
Received : July 19, 2019
Accepted : September 7, 2019
Published online : September 30, 2019
doi:10.24659/gsr.6.3_192

Review article

Antioxidative action of melatonin and reproduction

Hiroshi Tamura [1), Manabu Tanabe [2), Mai Jozaki [1), Toshiaki Taketani [1), Norihiro Sugino [1)

1) Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Yamaguchi, Japan
2) Department of Obstetrics and Gynecology, Saiseikai Shimonoseki General Hospital, Shimonoseki, Yamaguchi, Japan

Glycative Stress Research 2019; 6 (3): 192-197

（総説論文：日本語翻訳版）

メラトニンの抗酸化作用と生殖

田村博史 1)、田邊 学 2)、城﨑 舞 1)、竹谷俊明 1)、杉野法広 1)

1) 山口大学大学院医学系研究科 産科婦人科学 1
2) 済生会下関総合病院産婦人科

抄録

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、強力な抗酸化作用が明らかとなり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、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。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る。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。マウスやウシなどの卵子を用いた研究では、培養液にメラトニンを添加することで、卵子の成熟や胚発育の向上が期待できる。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。

KEY WORDS: メラトニン、抗酸化作用、活性酸素、酸化ストレス、卵子

連絡先： 連絡責任者 田村博史
山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学
〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1
TEL：0836-22-2288　FAX：0836-22-2287　E-mail：hitamura@yamaguchi-u.ac.jp
共著者：田邊 学 my071123my@yahoo.co.jp、城﨑 舞 mkawa@yamaguchi-u.ac.jp、
竹谷俊明 taketani@yamaguchi-u.ac.jp、杉野法広 sugino@yamaguchi-u.ac.jp

緒言

メラトニンは第 3 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。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。

活性酸素産生機序と酸化ストレス

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（·OH）が発生する。ヒドロキシラジカル（·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。

活性酸素と生殖機能

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[1)]。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がある。実際に、pregnant mare serum gonadotropin（PMSG）で過排卵刺激をおこない 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[2)]。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[3)]。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。

メラトニンの抗酸化作用

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[4)]。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（·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（$ONOO^-$）など、非常に幅広い[5)]。特に、ヒドロキシラジカル（·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-hydroxmelatonin（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[6)]。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[7)]。

卵巣におけるメラトニン

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りており、卵胞の発育に比例して増加する[8)]。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[9)]。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[3)]。これらの結果は、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を示唆するものである。

a. 顆粒膜細胞とメラトニン

田辺らはメラトニンが顆粒膜細胞の酸化ストレスを軽減し保護しているかどうかを検討した報告をしている[10)]。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 μg/ml）存在あるいは非存在下で培養した。DNA損傷の評価として、8-OHdG、DNAの2本鎖断裂マーカー（γH2AX）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γH2AX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。これらの結果から、活性酸素は顆粒膜細胞のDNA、ミトコンドリア、細胞膜を傷害するが、メラトニンはこれらの傷害を軽減させることで顆粒膜細胞を保護していることを明らかにしている。

さらに竹谷らは、ヒト顆粒膜細胞を用いて、黄体化に伴うプロゲステロン産生に対する活性酸素やメラトニンの影響を報告している[11)]。体外受精の採卵時に採取した黄体化顆粒膜細胞をメラトニン単独、H_2O_2 単独、H_2O_2 とメラトニンを同時添加し、培養液中のプロゲステロン濃度を測定したところ、メラトニン単独添加ではプロゲステロン産生に明らかな変化を認めなかったが、H_2O_2 添加では濃度依存性にプロゲステロン産生の抑制を認めた。H_2O_2 により抑制されたプロゲステロン産生はメラトニン添加により有意に改善を認めた。すなわち、酸化ストレスにより顆粒膜細胞の黄体化が抑制されるが、これをメラトニンは防御することが明らかとなった。

b. 卵子とメラトニン

田村らは、マウス卵子を用いて、卵子の成熟過程における活性酸素種やメラトニンの影響を検討している[3)]。PMSGで過排卵刺激したマウスより卵核胞（germinal 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。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[2)]。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。

以上の結果より、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（***Fig. 1***）。

メラトニンの生殖領域に対する臨床応用

近年、不妊治療領域において体外受精胚移植等の生殖補助医療技術の進歩は著しいものがあるが、満足できる妊娠率は得られていない。その大きな原因として卵子の質の問題がある[12, 13)]。体外受精胚移植において卵子を採取することができても、卵子の質が不良であるため受精、胚発育、着床過程が円滑に進行せず不成功に終わる症例をしばしば経験する。卵子の質が低下する機序については十分には解明されていないが、排卵過程における活性酸素種による酸化ストレスは需要な因子であると考えられている。また一方で、体外受精胚移植では、卵子を体外で培養し、卵子の成熟、精子との共培養、受精、胚発育といった過程を経て子宮内へ移植される。この体外での長期間にわたる培養条

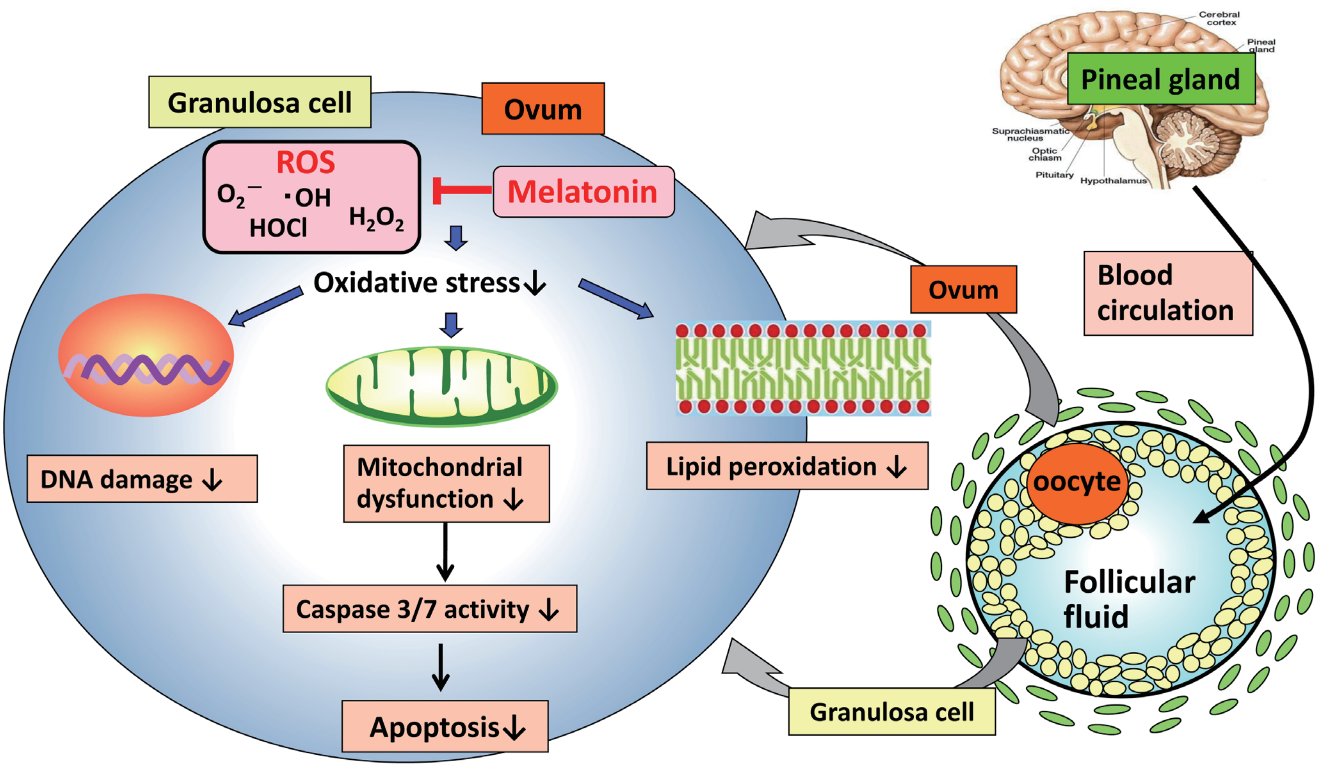

Fig. 1. **Presumed activities of melatonin in follicles.**

件は卵子や胚の質に大きな影響を与える因子であり、培養中の活性酸素による酸化ストレスに最も注意しなければならない。

抗酸化作用を持つメラトニンの生殖医療に対する応用としては、生体への投与（*in vivo*）によって排卵（採卵）までの卵子の質を向上させること、体外培養の培養液に添加して（*in vitro*）卵子の成熟、受精、胚発育を向上させることの、2 つの可能性がある（***Fig. 2***）。

a. 生殖補助医療（ART）におけるメラトニン

これまでに示したように、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 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）と内服なし群（対照群）で施行したところ、メラトニン群で受精率は約 50％（対照群は約 20％）、妊娠率は約 20％（対照群は約 10％）と IVF-ET の成績向上を認めた[3]。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[14-17]、メラトニンの生殖医療に対する臨床応用が期待される。

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が報告されている。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を保護する可能性がある。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[18-20]。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[21, 22]。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

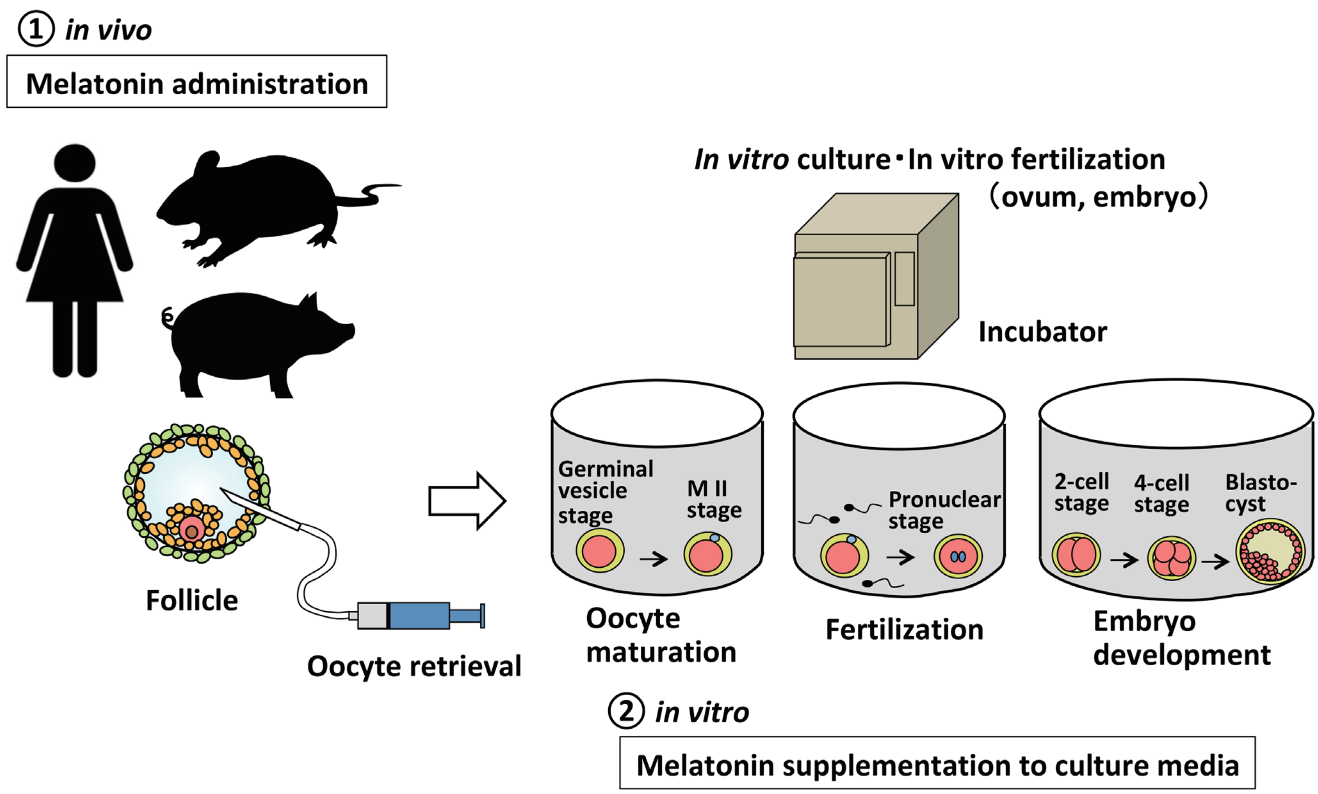

Fig. 2. **Possibility of use of melatonin in reproductive medicine.**

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ノム変化も、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[23-25]。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[24,26]。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。

卵巣加齢とメラトニン

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歳台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。その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おり、卵巣加齢にも有用かもしれない。マウスに長期間（10週から43週まで）メラトニンを投与すると、卵巣内の卵胞数が増加、過排卵刺激による排卵数の増加、体外受精による受精卵数、胚盤胞数が増加したことから、卵巣加齢が軽減できると報告されている[27]。さらにメカニズムをトランスクリプトーム解析から検討しており、リボゾーム機能維持、抗酸化機構の賦活、DNA 修復、各種関連蛋白発現（テロメア長、長寿遺伝子 sirtuins）調節といった多様な作用によって卵巣加齢を軽減させる可能性が推察される[27]。

結語

松果体ホルモンであるメラトニンは卵胞内において、局所で発生する活性酸素を消去して卵子を保護している可能性がある。この抗酸化作用を期待して卵子成熟や胚発育を向上させる試みが多く行われているが、メラトニン受容体を介した詳細なメカニズムが解明されれば、生殖医療の飛躍的な発展に貢献できるかもしれない。

利益相反申告

本研究については利益相反に該当する事項はない。

謝辞

本研究の概要は第 10 回抗加齢内分泌研究会（2018 年 9 月 2 日、東京）にて発表した。

参考文献

1) Kala M, Shaikh MV, Nivsarkar M. Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: A requisite for oocyte development and maturation. Reprod Med Biol. 2017; 16: 28-35.
2) Tamura H, Takasaki A, Taketani T, et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. J Ovarian Res. 2012; 5: 5.
3) Tamura H, Takasaki A, Miwa I, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. J Pineal Res. 2008; 44: 280-287.
4) Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, et al. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. J Pineal Res. 1993; 14: 151-168.
5) Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, et al. Melatonin: Detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. Adv Exp Med Biol. 2003; 527: 539-548.
6) Tan DX, Manchester LC, Terron MP, et al. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? J Pineal Res. 2007; 42: 28-42.
7) Moniruzzaman M, Ghosal I, Das D, et al. Melatonin ameliorates H_2O_2-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/NFkB pathway. Biol Res. 2018; 51: 17.
8) Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, et al. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. Fertil Steril. 2003; 80: 1012-1016.
9) Wurtman RJ, Axelrod J, Potter LT. The uptake of H^3-melatonin in endocrine and nervous tissues and the effects of constant light exposure. J Pharmacol Exp Ther. 1964; 143: 314-318.
10) Tanabe M, Tamura H, Taketani T, et al. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. J Reprod Dev. 2015; 61: 35-41.
11) Taketani T, Tamura H, Takasaki A, et al. Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. J Pineal Res. 2011; 51: 207-213.
12) Ge ZJ, Schatten H, Zhang CL, et al. Oocyte ageing and epigenetics. Reproduction. 2015; 149: R103-114.
13) Liu XJ. Targeting oocyte maturation to improve fertility in older women. Cell Tissue Res. 2016; 363: 57-68.
14) Batioglu AS, Sahin U, Gurlek B, et al. The efficacy of melatonin administration on oocyte quality. Gynecol Endocrinol. 2012; 28: 91-93.
15) Eryilmaz OG, Devran A, Sarikaya E, et al. Melatonin improves the oocyte and the embryo in IVF patients with sleep disturbances, but does not improve the sleeping problems. J Assist Reprod Genet. 2011; 28: 815-820.
16) Jahromi BN, Sadeghi S, Alipour S, et al. 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. 2017; 42: 73-78.
17) Nishihara T, Hashimoto S, Ito K, et al. Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer. Gynecol Endocrinol. 2014; 30: 359-362.
18) Keshavarzi S, Salehi M, Farifteh-Nobijari F, et al. Melatonin modifies histone acetylation during *in vitro* maturation of mouse oocytes. Cell J. 2018; 20: 244-249.
19) Lin T, Lee JE, Kang JW, et al. 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. 2018; 85: 665-681.
20) Marques TC, da Silva Santos EC, Diesel TO, et al. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the *in vitro* production and quality of bovine blastocysts. Reprod Domest Anim. 2018; 53: 226-236.
21) Cheng L, Qin Y, Hu X, et al. Melatonin protects *in vitro* matured porcine oocytes from toxicity of Aflatoxin B1. J Pineal Res. 2019; 66: e12543.
22) Park HJ, Park SY, Kim JW, et al. Melatonin improves oocyte maturation and mitochondrial functions by reducing bisphenol A-derived superoxide in porcine oocytes *in vitro*. Int J Mol Sci. 2018; 19(11).
23) An Q, Peng W, Cheng Y, et al. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. J Cell Physiol. 2019; 234: 17370-17381.
24) Lee S, Jin JX, Taweechaipaisankul A, et al. Melatonin influences the sonic hedgehog signaling pathway in porcine cumulus oocyte complexes. J Pineal Res. 2017; 63(3).
25) Pang Y, Zhao S, Sun Y, et al. Protective effects of melatonin on the *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. Anim Sci J. 2018; 89: 648-660.
26) Fang Y, Zhang J, Li Y, et al. Melatonin-induced demethylation of antioxidant genes increases antioxidant capacity through RORα in cumulus cells of prepubertal lambs. Free Radic Biol Med. 2019; 131: 173-183.
27) Tamura H, Kawamoto M, Sato S, et al. Long-term melatonin treatment delays ovarian aging. J Pineal Res. 2017; 62(2).