

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11261

研究課題名（和文）酸化ストレスによって障害を受けた精子機能に対する分子状水素の改善効果

研究課題名（英文）Improvement in oxidative stress-induced low mobility of mouse sperm by H2 treatment

研究代表者

野田 義博（Noda, Yoshihiro）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・技術員

研究者番号：40728078

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、水素分子医学における革新的な研究の一環として、生殖医療への水素の応用を検討した。マウス実験により、酸化ストレスによってマウス精子の機能低下が引き起こされる酸化ストレス障害モデル精子の実験系を確立し、精子運動機能、体外受精による受精率および胚移植による個体発生率の低下に対する分子状水素(H<sub>2</sub>)の抑制効果を検証した。その結果、H<sub>2</sub>は酸化ストレス障害を受けたマウス精子のミトコンドリアにおけるATP産生能ならびに前進性運動能の改善効果を呈した。これらの結果は、不妊治療における新しい男性不妊治療法につながる可能性があり、高齢出産などの社会的問題の解決に貢献する知見を提供するものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、水素の生殖医療への応用を探る革新的な研究の一環である。その学術的な意義として、マウス実験において、酸化ストレスによる精子の機能低下を再現する酸化ストレス障害モデルを確立した。これにより、マウス精子への酸化ストレス負荷はミトコンドリア機能に影響し、機能低下を引き起こすことが示唆され、分子状水素(H<sub>2</sub>)は酸化ストレスを受けた精子のミトコンドリアにおけるATP産生能と前進性運動能を改善し、受精率、個体への発生率についても改善することが示唆された。これらの知見は男性不妊治療の新たなアプローチにつながる可能性があり、高齢出産などの社会的な問題の解決に貢献する知見を提供することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the application of hydrogen in reproductive medicine as a part of innovative research in the field of molecular hydrogen medicine. We established an experimental system using oxidative stress-impaired mouse sperm, where oxidative stress leads to a decline in sperm function, and examined the inhibitory effects of molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) on sperm motility, fertilization rate through in vitro fertilization, and the developmental rate through embryo transfer. The results demonstrated that H<sub>2</sub> improved the mitochondrial ATP-producing capacity and forward motility of oxidative stress-impaired mouse spermatozoa. These findings hold the potential to pave the way for a new treatment for male infertility and contribute to addressing societal challenges like delayed childbirth.

研究分野：産婦人科学

キーワード：水素 不妊 精子 酸化ストレス 精子運動性 ミトコンドリア 生殖医療 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究の学術的背景

先進国では超高齢社会への突入に並行して平均出産年齢の高齢化により生じる出生率の低下を招いている。これは加速する少子化の大きな要因であるとされており、「生殖医療」に対する社会的な要求が高まっている。分子レベルでは、加齢に伴う活性酸素種(ROS)の過剰産生による生殖機能への酸化ストレス障害が重大な影響を及ぼしている。2012年現在、我が国では約24万件にもものぼる体外受精(IVF)や卵細胞質内精子注入法(ICSI)に代表される顕微授精が施行され、年間2万人以上の新生児が誕生する世界の生殖医療大国である(Saito, 2012)。新生児の約24人に1人が高度生殖医療により誕生している現状は、生殖医療が患者に福音をもたらすものであると同時にその責務は極めて大きい(日産婦誌, 2013)。現在もIVFやICSIは増加の一途を辿っているが、対象患者の質的拡大や加齢患者の増加による低品質の精子および卵子の利用によって、妊娠率の低下や流産率の増加が新たな課題として顕在化している(Ohyama, 2008)。このような状況下、老化現象に起因する不妊の問題を解決すべく、先進的な生殖補助(医療)技術の開発が強く求められている。

ROSによる酸化が運動能獲得と先体反応に深く関与し、精子受精能が獲得されることは良く知られている(Ramalho-Santos *et al.*, 2009)。しかし、ROS産生が過剰になると精子形成過程でミトコンドリアDNA(mtDNA)の複製抑制によるミトコンドリア数の減少(Agarwal *et al.*, 2014)、精子先体膜の過酸化およびアクロシン活性の低下による精子の卵母細胞融合不全が引き起こされる(Aitken *et al.*, 1989; Ichikawa *et al.*, 1999; Saleh *et al.*, 2003; Zorn *et al.*, 2003; Jedrzejczak *et al.*, 2005)。精子ミトコンドリアでは、運動などに必要なエネルギー産生を行なっているが、同時に電子伝達系においてはROSが産生される。

申請者は多くの加齢性疾患における要因が、ROSの制御異常による過剰産生であることに着目し、ROS消去系である活性酸素消去酵素スーパーオキシド・ディスムターゼ(SOD)を細胞質およびミトコンドリアで機能欠損させたマウスを作製し解析してきた。これらは、加齢黄斑変性、アルツハイマー病、拡張型心筋症、皮膚の菲薄化、脂肪肝、黄体機能不全等の多様な加齢性疾患を発症し、これらの病態の進行にROSが深く関与していることを明らかにしてきた。こうした知見は、ROSの制御が多くの加齢性疾患の抑制と治療に効果的であることを明示している。

ROSの制御について、研究分担者の大澤らは分子状水素(H<sub>2</sub>)が生体内において細胞障害作用の最も強いROSであるヒドロキシラジカル(・OH)を効率よく除去できることを報告した(Ohsawa *et al.*, *Nat. Med.* 2007)。

H<sub>2</sub>は生理的活性を持つ抗酸化物質として3点の特徴を持つ。ヒドロキシラジカル(・OH)と特異的に反応: スーパーオキシド、過酸化水素、一酸化窒素等は、シグナル伝達、免疫機構、精子活性化などで重要な役割を担っているため、過度の還元消去は副作用を伴う。しかし、H<sub>2</sub>はこれらと反応せず、高度の細胞障害性を示す・OHとのみ反応することから安全性が高い。

高い拡散速度と組織透過性: H<sub>2</sub>は最軽量無極性の気体で拡散速度が非常に大きいため、細孔・薄膜等から容易に漏洩する。水溶性、脂溶性を問わずに拡散することから生体内のどこへでも容易に到達可能で、細胞内でもミトコンドリアや核へ容易に到達する。

生体における新規性: 地球上のH<sub>2</sub>はごくわずかで、高濃度のH<sub>2</sub>は生体にとって新規物質と考えることが出来る。こうした特徴を備えたH<sub>2</sub>は、ROSの産生源であるミトコンドリア自体への酸化ストレス障害抑制に顕著な効果を示す(図1(1))。これにはH<sub>2</sub>による・OHの直接的還元(図1(2))に加え、ミトコンドリア活性化に付随する軽度のROSによって誘導される酸化ストレス防御機構(ホルミシス効果)が観察されている。

すでに H<sub>2</sub> の医学分野における応用の可能性については多くの臨床知見が報告されている。図 2 に高濃度に H<sub>2</sub> を含む水(水素水)の効果が動物モデルおよび臨床研究で報告された例を示す。最近、申請者らは、精子無力症のヒト精子を H<sub>2</sub> 添加保存液で培養することにより前進性運動能が改善されることを報告した。その作用機序は今後の検討課題であるが、H<sub>2</sub> を用いた新たな生殖医療の可能性を示すことができた(Nakata et al., 2015)。

研究期間内に何をどこまで明らかにするか

本研究では、マウス精子に過酸化水素を添加することで精子の運動機能低下を誘導する酸化ストレス障害モデル精子の実験系を確立し、これにより生じる精子運動機能、IVF による受精率および個体発生率の低下に対する H<sub>2</sub> の抑制効果を検証する。次いで、過酸化水素添加によるミトコンドリア機能低下が精子運動機能に与える影響を調べ、これに対する H<sub>2</sub> の寄与を解析することで、分子レベルの作用機序を解明する。特にミトコンドリア機能に対する H<sub>2</sub> の保護効果を重点的に解析する。

本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

本研究は、近年報告された H<sub>2</sub> の医療への応用(水素分子医学)という革新的な研究の一端である。生殖医療における H<sub>2</sub> の応用研究は、本申請時点で申請者の研究グループ以外からの報告はまだない。このため、精子への酸化ストレス障害と、それにより引き起こされる受精能の低下を水素が改善できるか確かめる本研究の独創性は極めて高い。さらに精子の機能低下とミトコンドリア活性に着目した本研究は、まだ未解明な部分の多い H<sub>2</sub> の分子レベルでの作用機序解明に向けた新たなデータを提供することができる。

本研究は臨床の観点からも極めて高い意義を持つ。ICSI では受精時に起こる精子と卵子の適切な修飾過程が起らないため、不妊治療では可能な限り IVF が選択される。H<sub>2</sub> による精子の活性化が IVF による受精率向上につながれば、安全で効果的な新しい男性不妊治療法となりうる。また、凍結保存精子の出生率改善も期待できる。

このように、本研究が遂行されれば、薬剤治療の困難な「生殖医療」に安全性の高い H<sub>2</sub> を応用することで、社会的問題となっている高齢出産における不妊を始めとした諸問題の解決への基盤となる知見を得ることができる。

## 2. 研究の目的

本研究は男性不妊の要因である精子の低運動性に起因する受精能の低下に、分子状水素(H<sub>2</sub>) が改善効果を示すことを明らかにすることを目的とする。まず、マウス精子の過酸化水素による酸化ストレス障害評価系を確立する。次いで、酸化ストレスによって生じる精子運動機能、受精率および個体発生能低下への H<sub>2</sub> 添加による抑制効果を示す。さらに活性酸素種による精子のミトコンドリア機能異常が精子運動機能に与える影響と、これに対する H<sub>2</sub> 添加の寄与を解析する。これにより H<sub>2</sub> による精子運動機能改善効果の分子レベルでの作用機序を解明する。よって、生殖医療における H<sub>2</sub> の臨床応用に向けた基盤となる知見が得られる。

## 3. 研究の方法

マウス精子を過酸化水素処理することで、運動性を低下させた酸化ストレス障害モデル系を確立する。また、体外受精・胚移植による受精率・個体発生率を解析することにより、酸化ストレスの影響を受精から個体発生の過程で評価する。さらに、H<sub>2</sub> 飽和培養液の添加による運動性低下の抑制効果を、運動率から個体発生に至る過程で評価する。過酸化水素で上昇、H<sub>2</sub> 添加によって抑制される ROS の影響について定量的に測定する。さらに精子ミトコンドリア機能については膜電位と ATP 産生の変動を測定する。これらを STED 超解像顕微鏡などにより時空間的に解析することで、H<sub>2</sub> の酸化ストレス防御機構を分子レベルで解明する。

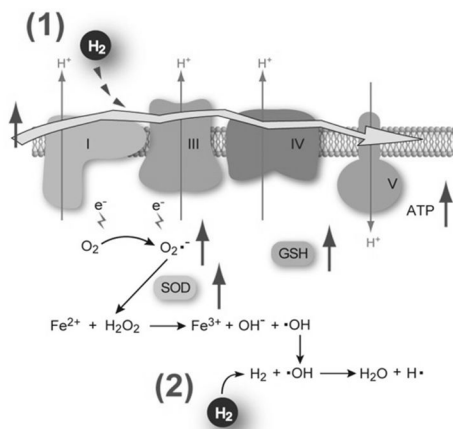


図 1：水素の抗酸化作用。

(1)水素がミトコンドリア活性を促進し、それに付随する活性酸素種の増加が防御機構を誘導する (ホルミシス効果)。

(2)ヒドロキシルラジカルの還元。

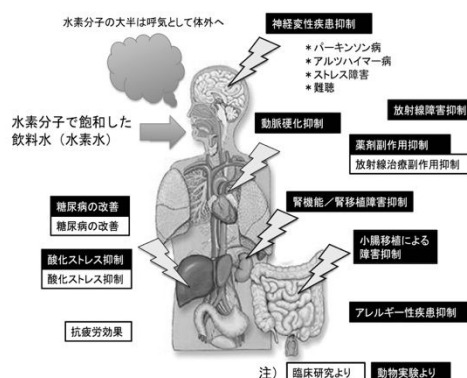


図 2：水素水の多様な効果

#### 4 . 研究成果

本研究は、近年報告された分子状水素( $H_2$ )の医療への応用(水素分子医学)という革新的な研究の一端である。生殖医療における $H_2$ の応用研究は、本申請時点で 申請者の研究グループ以外からの報告はまだない。このため、精子への酸化ストレス障害と、それにより引き起こされる受精能の低下を水素が改善できるか確かめる本研究の独創性は極めて高い。現在までの研究成果により、マウス精子に過酸化水素を添加することで精子の運動機能低下を誘導する酸化ストレス障害モデル精子の実験系を確立した。過酸化水素により発生するヒドロキシラジカルは精子ミトコンドリアに酸化ストレス障害を及ぼし、膜電位の低下とともに ATP 産生能の低下を引き起こし、運動機能を障害する。我々は、精子運動機能、体外受精による受精率および胚移植による個体発生率の低下に対する  $H_2$  の抑制効果を検証した。その結果、酸化ストレス障害を受けたマウス精子への  $H_2$  処理により、マウス精子のミトコンドリア機能の改善に寄与し、精子運動機能改善効果を確認した。体外受精による受精率および胚移植による個体発生率についても改善効果を示した。以上の結果から本研究では精子の機能低下とミトコンドリア活性に着目し、まだ未解明な部分の多い  $H_2$  の分子レベルでの作用機序解明に向けた新たな知見を得るための評価系を確立した。精子の運動機能の解析は臨床の観点からも極めて高い意義を持つ。不妊治療では 可能な限り IVF が選択される。 $H_2$  による精子運動性の活性化が IVF による受精率向上につながれば、安全で効果的な新しい男性不妊治療法となりうる。また、凍結保存精子の出生率改善も期待できる。また、薬剤治療の困難な「生殖医療」に安全性の高い  $H_2$  を応用することで、社会的問題となっている高齢出産における不妊を始めとした諸問題の解決への基盤となる知見を得ることができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Yoshihiro Noda, Taeko Nemoto, Tamao Endo, Ikuroh Ohsawa
2. 発表標題 Molecular hydrogen improves oxidative stress-induced damage to mouse sperm mitochondrial function.
3. 学会等名 73rd American Association for Laboratory Animal Science National Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihiro Noda, Taeko Nemoto, Tamao Endo, and Ikuroh Ohsawa
2. 発表標題 Molecular hydrogen protects mouse sperm mitochondria from oxidative stress and improves sperm motility.
3. 学会等名 72nd AALAS National Meeting Virtual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiro Noda, Taeko Nemoto, Tamao Endo, and Ikuroh Ohsawa
2. 発表標題 Protective effect of molecular hydrogen on oxidative stress-induced impairment in mouse sperm motility
3. 学会等名 71st AALAS National Meeting Virtual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihiro Noda, Taeko Nemoto, Tamao Endo, and Ikuroh Ohsawa
2. 発表標題 Protective effect of molecular hydrogen on oxidative stress-induced impairment in mouse sperm motility
3. 学会等名 70th American Association for Laboratory Animal Science National Meeting 2019 Denver (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田義博, 根本 妙子, 遠藤 玉夫, 大澤 郁朗
2. 発表標題 分子状水素は活性酸素障害によるマウス精子の機能低下を抑制する
3. 学会等名 第8回日本分子状水素医学生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro Noda, Taeko Nemoto, Tamao Endo, and Ikuroh Ohsawa
2. 発表標題 Protective effect of molecular hydrogen on oxidative stress-induced impairment in mouse sperm motility
3. 学会等名 69th American Association for Laboratory Animal Science National Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro Noda, Taeko Nemoto, Kumiko Nakata, Tamao Endo, Naoki Yamashita, and Ikuroh Ohsawa
2. 発表標題 Molecular hydrogen improves the oxidative stress-induced low motility of mouse sperm
3. 学会等名 68th American Association for Laboratory Animal Science National Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大澤 郁朗  (Ohsawa Ikuroh)  (30343586)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長    (82674)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	根本 妙子  (Nemoto Taeko)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・非常勤職員  (82674)	
連携研究者	遠藤 玉夫  (Endo Tamao)  (30168827)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・シニアフェロー  (82674)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関