

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15681

研究課題名（和文）高着床能力胚の生産を目指した核成熟速度に対応したウシ卵子体外培養系の構築

研究課題名（英文）Establishment of in vitro culture system of bovine oocyte corresponding to the speed of nuclear maturation for production of the embryo with high implantation ability

研究代表者

古山 敬祐（Koyama, Keisuke）

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・准教授

研究者番号：50611026

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、高着床能力胚の生産を目指した核成熟速度に対応したウシ卵子体外培養系の構築を目的とした。そのために、核成熟速度の非侵襲的な予測モデルを作成し、モデルにより予測された核成熟速度が精子侵入および前核形成時期ならびに卵割速度、異常卵割発生および胚盤胞への発生に及ぼす影響を解析した。結果として、機械学習の手法により、成熟培養18時間時点での核成熟速度の非侵襲的な予測モデルを構築できることが明らかとなり、そのモデルで分類された卵子では、体外受精を行う適切なタイミングが異なる可能性が示された。今後は、予測精度の向上および同モデルを活用した高着床能力胚の生産技術に資する研究が求められる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、卵子の個別成熟培養における核成熟速度の予測が機械学習を活用することで可能であることを示した世界で初めての成果である。酪農および畜産分野において一般的な技術となっている体外培養由来受精卵移植の受胎率は約40%程度であり、移植した60%もの体外培養由来の受精卵は着床および妊娠に至らないのが現状であるが、本研究成果を活用することでその受胎率を向上させる技術開発を進めることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop an optimal in vitro culture system for bovine oocytes based on nuclear maturation speed to produce embryos with high implantation potential. Initially, a non-invasive predictive model for nuclear maturation speed was created. Subsequently, the effect of the predicted nuclear maturation speed on fertilization dynamics and embryo development following in vitro fertilization was analyzed. Results indicated that a machine learning procedure could be utilized to construct a non-invasive prediction model for nuclear maturation speed at 18 hours of in vitro maturation of bovine oocytes. Furthermore, differences in predicted nuclear maturation speed may influence the optimal timing for in vitro fertilization. Future research should focus on improving the prediction accuracy of the developed model and constructing technology to produce embryos with high implantation potential using this model.

研究分野：臨床繁殖学

キーワード：牛 卵子 受精卵 成熟培養 機械学習 核成熟 個別培養 体外受精

1. 研究開始当初の背景

ウシ卵子の体外培養技術は、国内各地で臨床技術として既に活用されている。その培養技術による胚盤胞(子宮へ移植可能なステージ)までの生産効率は約40%である。また、体外培養由来の胚盤胞をウシ子宮内に移植した際の妊娠率は約40%である。すなわち、ウシに移植した60%もの体外培養由来の胚盤胞は着床および妊娠に至らない。ウシが妊娠するチャンスは、21日に1回しかなく、妊娠失敗は1回であっても畜産農家にとって大きな損害となる。

肉眼的に正常なウシ胚盤胞の中に、着床能力が著しく低い胚盤胞が存在することが明らかになっている(Sugimura et al. 2017 J Reprod Dev 63:353-7)。そして、それらは体外受精後早期の受精卵における卵割において、異常な動態を見せるため、経時的に受精卵を観察することで非侵襲的に見極めることができる。これまでの研究は、「肉眼的に正常な胚盤胞」をいかに効率的に生産するのか、を目指して行われてきたが、これからの研究では、「高着床能力を有する胚盤胞」をいかに効率的に生産するのかが求められる。

ウシ卵子が正常に受精し、正常な発生過程を経るためには、卵子が核成熟と細胞質成熟を受精時に完了していることが必須である。しかし、両成熟完了後にその発生能が維持される期間は限定的であり、その期間以降は発生能が失われていく。申請者は、ウシ体外成熟卵子の適切な受精時期(精子侵入時期)は、核成熟完了後約12時間目であることを明らかにした(Koyama et al. 2014 J Vet Med Sci 76:653-9)。一方で、ウシ卵子の核成熟速度が卵子毎に異なることも明らかにしている。すなわち、成熟培養開始からどれくらいの時間で核成熟完了後12時間目を迎えるかを卵子毎に予測できるかが重要となるが、予測を試みた報告はない。

2. 研究の目的

本研究は、高着床能力胚の生産を目指した核成熟速度に対応したウシ卵子体外培養系の構築をすることを目的とする。そのために、本研究期間内では以下のことを実施する。

- (1) 成熟培養時における核成熟速度の非侵襲的な予測モデルを作成する。
- (2) 核成熟速度に対応した個別体外受精が精子侵入時期および前核形成時期に及ぼす影響を明らかにする。
- (3) 核成熟速度に対応した個別体外受精が卵割速度および異常卵割発生に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 成熟培養時における核成熟速度の非侵襲的な予測モデルの作成

黒毛和種未経産牛の卵巣を食肉処理場より採取し、6時間以内に研究室に持ち帰った。持ち帰った卵巣内に存在する直径2~8mmの卵胞から卵胞液を吸引し、卵子卵丘細胞複合体(cumulus-oocyte complex: COC)を検索した。過去の報告(Nagano et al. 2006 Zygote 14:53-61)に基づき、COCの選抜を行った。選抜したCOCを15もしくは18時間、5%CO₂、20%O₂および38.5℃の環境下で個別成熟培養を行った。培養開始直前および培養開始後12時間目以降から培養終了まで3時間毎に経時的にCOCの写真を撮影し、COCの面積を測定した。その面積を用いて、培養開始直前からの面積の変化率および1時間当たりの面積の膨化速度を計算した。また、培養終了後の顆粒層細胞の膨化様式を3つに分類した(図1)。成熟培養終了後に、COCsから顆粒層細胞を除去し、固定および染色することで核相を判定した。

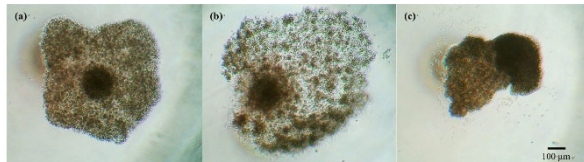


図1 顆粒層細胞の膨化様式。(a)膨化(クラスターなし)(EWOC)、(b)膨化(クラスターあり)(EWC)、(c)膨化なし

非侵襲的に取得したCOCの画像データから18個の特徴量を抽出した。抽出した特徴量を用いて、4種類の機械学習の手法(人工ニューラルネットワーク(ANN)、決定木(DT)、サポートベクターマシン(SVM)、ランダムフォレスト(RF))により、成熟培養開始後18時間の時点で、第二減数分裂中期に卵子が到達しているかどうかを予測するモデルを構築した。モデルの評価は、一つ抜き交差検証(LOOCV)を用いて行い、F値(適合率と再現率の算術平均)を基準に最適なモデルを選択した。

(2) 核成熟速度に対応した個別体外受精が精子侵入時期および前核形成時期に及ぼす影響

(1)と同様にして、採取した黒毛和種未経産牛由来COCを用いて、個別成熟培養を24時間行い、培養中にCOCの画像データを取得した。(1)の結果から良好な結果が得られたDTおよびRFモデルを用いて、成熟培養後18時間の時点での核成熟速度の予測を行った。成熟培養24時間後にパーコール処理を行った凍結融解精液を用いて、5%CO₂、5%O₂および38.5℃の環境下で個別体外受精(精子との共培養)を行った。媒精後3、6、9もしくは12時間目にCOCを取り出し、顆粒層細胞を除去後に固定および染色することで受精の進行状況を判定した。

(3) 核成熟速度に対応した個別体外受精が卵割速度および異常卵割発生に及ぼす影響

(1)および(2)と同様にして、採取した黒毛和種未経産牛由来COCを用いて、個別成熟培養を24もしくは28時間行い、個別体外受精を6時間行った。その後、マイクロウェルディッシュを用いて、5%CO₂、5%O₂および38.5℃の環境下で個別発生培養を162時間行った。培養中はタイムラプスカメラを用いて20分間隔で写真を撮影し、卵割の有無、第一卵割のタイミングおよび胚盤胞への発生の有無を記録した。

4. 研究成果

(1) 成熟培養時における核成熟速度の非侵襲的な予測モデルの作成

成熟培養15もしくは18時間目までの核成熟速度の違いが顆粒層細胞の膨化動態に及ぼす影響を図2に示した。成熟培養15時間目においては、第一減数分裂後期以降に到達した卵子をfast groupとし、第一減数分裂中期までしか到達しなかった卵子をslow groupとした。また、成熟培養18時間目においては、第二減数分裂中期に到達した卵子をfast groupとし、第一減数分裂終期までしか到達しなかった卵子をslow groupとした。成熟培養15時間目におけるslow groupのCOC面積は大きい傾向を示した(P<0.1)。さらに、slow groupの培養開始直前から成熟培養15時間前までのCOC面積の変化率および成熟培養12から15時間目までの1時間当たりのCOC面積の膨化速度は、fast groupよりも高い値であった(P<0.05)。一方、成熟培養18時間目までの核成熟速度の違いが顆粒層細胞の膨化動態に及ぼす影響は認められなかった。

顆粒層細胞の膨化様式が核成熟速度に及ぼす影響を図3に示した。クラスターありの顆粒層細胞の膨化(EWC)を示した卵子においては、成熟培養18時間目における第二減数分裂中期に到達した割合が、クラスターなしの顆粒層細胞の膨化(EWOC)を示した卵子よりも高かった(P<0.05)

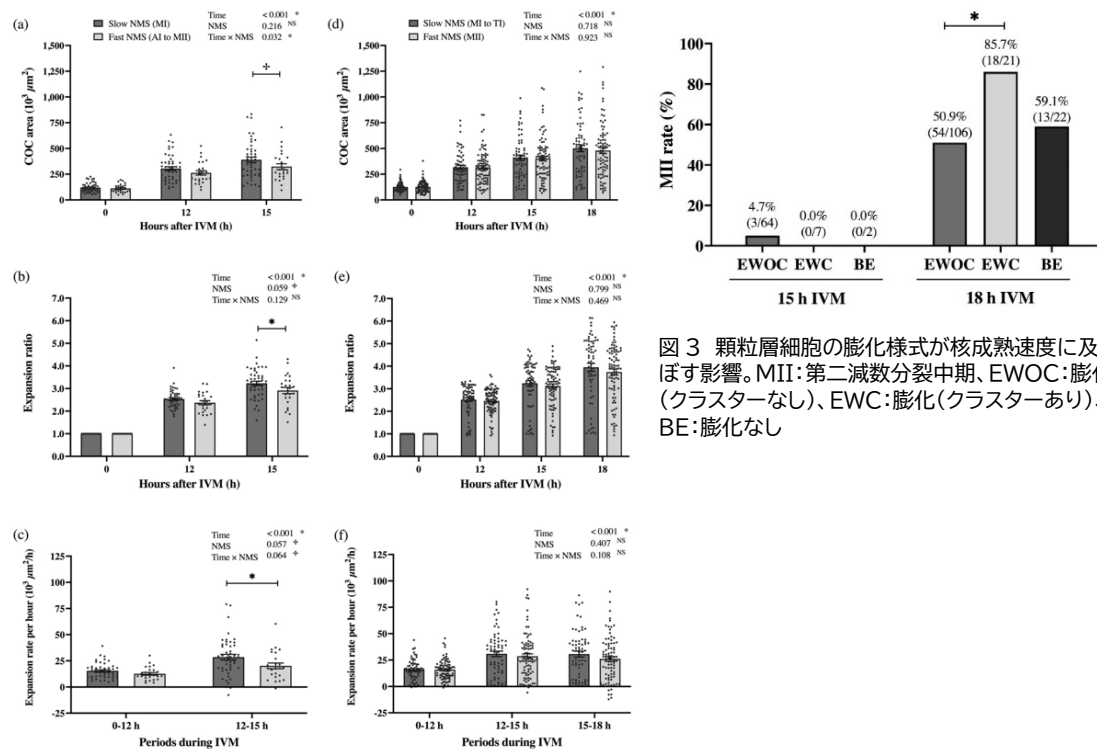


図3 顆粒層細胞の膨化様式が核成熟速度に及ぼす影響。MII:第二減数分裂中期、EWOC:膨化(クラスターなし)、EWC:膨化(クラスターあり)、BE:膨化なし

図2 成熟培養15もしくは18時間目までの核成熟速度の違いが顆粒層細胞の膨化動態に及ぼす影響。成熟培養15時間目までの(a)COC面積、(b)培養開始直前からのCOC面積の変化率および(c)1時間当たりのCOC面積の膨化速度ならびに成熟培養18時間目までの(d)COC面積、(e)培養開始直前からのCOC面積の変化率および(f)1時間当たりのCOC面積の膨化

成熟培養開始後 18 時間の時点で、第二減数分裂中期に卵子が到達しているかどうかを予測するために構築したモデルの性能を表 1 に示した。ANN と SVM で構築したモデルは高い感度を示したが、ほとんどの卵子を fast group として予測していた。一方、DT と RF で構築したモデルでは、実際の第二減数分裂中期の割合 (57.0%) と同様の割合で、group 分けが行われていた。また、両モデルで予測された fast group の卵子の第二減数分裂中期の卵子の割合は slow group よりも高い値を示した ($P < 0.05$)。

表 1 黒毛和種未経産牛における成熟培養開始後 18 時間時点での核成熟速度予測モデルの性能

Machine learning algorithm	Model performance			Metaphase II rate	
	Sensitivity	Accuracy	F value	Fast-predicted NMS	Slow-predicted NMS
Artificial neural network	94.1%	53.7%	69.9%	55.6% (80/144)	100.0% (5/5)
Decision tree	78.8%	76.5%	79.3%	79.8% (67/84) ^a	27.7% (18/65) ^b
Random forest	74.1%	65.8%	71.2%	68.5% (63/92) ^a	38.6% (22/57) ^b
Support vector machine	98.8%	58.4%	73.0%	57.9% (84/145)	25.0% (1/4)

以上の結果より、機械学習手法により、成熟培養 18 時間時点での核成熟速度の非侵襲的な予測モデルを構築できることが示された。卵子の個別成熟培養における核成熟速度の予測が機械学習を活用することで可能であることを示した初めての成果である。

(2) 核成熟速度に対応した個別体外受精が精子侵入時期および前核形成時期に及ぼす影響

異なる核成熟速度であると予測された卵子の第二減数分裂中期の割合ならびに精子侵入および前核形成時期を表 2 に示した。成熟培養 24 時間目での第二減数分裂中期の卵子の割合は、どの group の卵子でも高い値を示し、群間差は認められなかった。また、精子侵入および前核形成動態における群間差は認められず、どの group においても、50% 以上の卵子で精子侵入が起きていたタイミングは、媒精開始後 3~6 時間であった。

表 2 異なる核成熟速度であると予測された卵子の第二減数分裂中期の割合、精子侵入時期および前核形成時期

	Decision tree		Random forest	
	Fast-predicted NMS	Slow-predicted NMS	Fast-predicted NMS	Slow-predicted NMS
Metaphase II rate after 24 h of IVM	100% (23/23)	87.5% (21/24)	95.5% (21/22)	92.0% (23/25)
Sperm penetration rate at (h) after IVF start				
3 h	42.1% (8/19)	23.1% (9/39)	31.3% (10/32)	26.9% (7/26)
6 h	85.7% (12/14)	78.3% (36/46)	80.0% (20/25)	80.0% (28/35)
9 h	75.0% (15/20)	55.2% (16/29)	70.6% (24/34)	46.7% (7/15)
12 h	90.9% (20/22)	80.0% (12/15)	84.6% (22/26)	90.9% (10/11)
Two pronuclei formation rate at (h) after IVF start				
3 h	5.3% (1/19)	0.0% (0/39)	3.1% (1/32)	0.0% (0/26)
6 h	28.6% (4/14)	17.4% (8/46)	24.0% (6/25)	17.1% (6/35)
9 h	60.0% (12/20)	44.8% (13/29)	55.9% (19/34)	40.0% (6/15)
12 h	90.9% (20/22)	80.0% (12/15)	84.6% (22/26)	90.9% (10/11)

以上の結果から、成熟培養開始後 18 時間の時点での核成熟速度の違いは精子侵入および前核形成動態に影響を及ぼさない可能性が示された。(1)の結果から、fast および slow group であると予測された卵子の 50% 以上は、それぞれ第二減数分裂中期に成熟培養開始後 15~18 および 18~24 時間で到達していたと推定される。それゆえに、成熟培養開始後 24 時間目に体外受精を開始した場合、fast および slow group であると予測された卵子の 50% 以上に精子が侵入した時期は、それぞれ第二減数分裂中期に到達後 9~15 および 3~12 時間であったと推定された。すなわち、今回使用した培養系においては、成熟培養 24 時間目というタイミングは、体外受精開始時期として fast group にとっては最適であり、slow group にとっては少し早かったと示唆された。

(3) 核成熟速度に対応した個別体外受精が卵割速度および異常卵割発生に及ぼす影響

異なる核成熟速度であると予測された卵子の体外受精後における卵割率および第一卵割時期を図 4 および 5 に示した。成熟培養 24 時間後に体外受精を開始した場合において、RF モデルで fast group であると予測された卵子は、slow group であると予測された卵子よりも、卵割率は高い値を示した ($P < 0.05$)。しかし、成熟培養 28 時間後に体外受精を開始した場合においては、群間での違いは認められなかった。また、第一卵割時期においては、群間での違いは認められなかった。

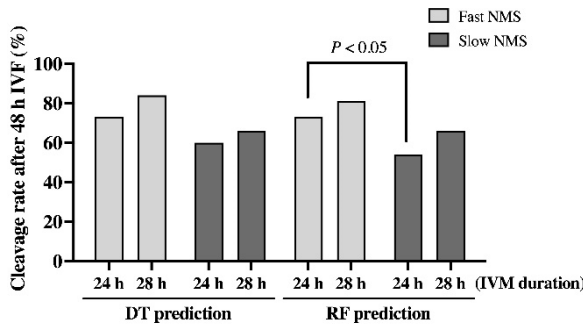


図 4 異なる核成熟速度であると予測された卵子の体外受精開始後 48 時間目における卵割率

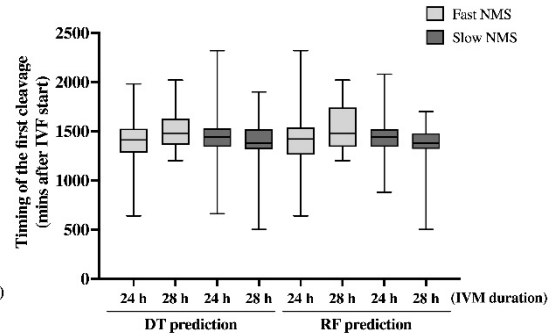
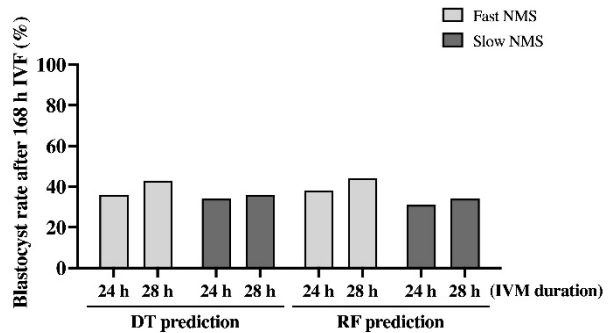


図 5 異なる核成熟速度であると予測された卵子の体外受精の第一卵割時期

体外受精開始後 27 時間よりも後に第一卵割が起きた受精卵の割合は、成熟培養 24 時間後に体外受精を開始した場合では群間差が認められなかった。しかし、成熟培養 28 時間後に体外受精を開始した場合においては、RF モデルで fast group であると予測された卵子由来の受精卵の同割合は高い値を示した ($P < 0.05$)



異なる核成熟速度であると予測された卵子の体外受精後の胚盤胞への発生率を図 6 に示した。胚盤胞への発生率に関しては、群間での違いは認められなかった。

図 6 異なる核成熟速度であると予測された卵子の体外受精後の胚盤胞への発生率

上述したように今回使用した培養系においては、成熟培養 24 時間目というタイミングは、体外受精開始時期として fast group にとっては最適であり、slow group にとっては少し早かったと考えられた。それゆえに、成熟培養 24 時間後に体外受精を開始した場合において認められた卵割率の違いは、核成熟速度の違いに起因すると考えられた。一方、成熟培養 28 時間目というタイミングは、体外受精開始時期として fast group にとって少し遅く、slow group では最適であると考えられる。それゆえに、第一卵割が体外受精開始後 27 時間よりも後に起きた受精卵の割合で認められた違いも、核成熟速度の違いに起因すると考えられた。

本研究を通じて、成熟培養 18 時間時点での核成熟速度の非侵襲的な予測モデルを機械学習の手法により構築できることが明らかとなった。また、そのモデルで予測された核成熟速度の違いが体外受精を行う適切なタイミングに影響を及ぼす可能性も示された。今後は、予測精度の向上および同モデルを活用した高着床能力胚の生産技術に資する研究を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koyama Keisuke, Kubo Tomoaki, Koyama Takeshi, Takahashi Yoshiyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Parity affects the relationship between the insemination/ovulation interval and the conception rate in lactating dairy cows	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproduction in Domestic Animals	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/rda.14363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyama Keisuke, Takahashi Takayoshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Relationship between sire predicted transmitting ability for daughter pregnancy rate and daughter's reproductive performance and milk production in Japanese dairy herds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 445 ~ 452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Thomas Chia-Tang HO, Noritoshi KAWATE, Keisuke KOYAMA
2. 発表標題 Ovarian origins and cumulus expansion pattern affected maturation and subsequent embryo development for in vitro production of bovine oocytes
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------