

| | | |
|---------|--|---------------------|
| 称号及び氏名 | 博士（獣医学） | Thomas Chia-Tang Ho |
| 学位授与の日付 | 2025年3月31日 | |
| 論文名 | Nuclear maturation speed of bovine oocytes: development of a prediction model and its application for improving <i>in vitro</i> embryo production （ウシ卵子の核成熟速度：予測モデルの構築と体外胚 生産への応用） | |
| 論文審査委員 | 主査 | 川手 憲俊 |
| | 副査 | 金子 武人 |
| | 副査 | 鳩谷 晋吾 |
| | 副査 | 古山 敬祐 |

論文要旨

Introduction

Nuclear maturation, from germinal vesicle to metaphase II (MII), serves as the primary criterion for oocyte maturity and can be confirmed by first polar body extrusion or chromosomal staining. Although over 90% of bovine immature oocytes complete nuclear maturation within 24 h of *in vitro* maturation (IVM), nuclear maturation speeds (NMS) differ between individual oocytes. Since optimal sperm penetration was demonstrated to occur 12 h after nuclear maturation, the optimal fertilization time may vary among oocytes. In this regard, the varying NMS presents a significant challenge in conventional group culture systems, where all oocytes undergo fertilization simultaneously, regardless of their maturation status. To address this limitation, two requirements must be fulfilled: implementation of individual culture systems and development of non-invasive methods to determine NMS.

Cumulus-oocyte complex (COC) expansion is essential for nuclear maturation. Based on this biological characteristic, this study proposed two hypotheses. First, morphological features of COC expansion could serve as indicators for predicting NMS. Second, extending IVM duration could enhance the developmental competence of oocytes with slow NMS. Therefore, this study aimed to develop NMS prediction methods to improve the efficiency of bovine *in vitro* embryo production.

The specific objectives were addressed in three chapters. Chapter 1 focused on extracting COC morphological features during 18 h of IVM and developing machine

learning models to classify oocytes as Fast (MII achieved) or Slow NMS (MII not achieved). Chapter 2 investigated the effects of IVM durations (24, 28, or 32 h) on oocytes with Fast and Slow NMS predictions, evaluating developmental competence and embryo quality through analyses of cell numbers and expression levels of development-related genes. Chapter 3 examined cumulus cells (CCs) after 18 h of IVM to elucidate mechanisms underlying different NMS and expansion patterns through quantification of cumulus-expansion-related genes.

Chapter 1: Development of machine learning-based models for predicting NMS in bovine oocytes

The objective was to establish machine learning models for NMS using non-invasive indicators during individual IVM of Japanese Black (JB) beef heifer oocytes. COCs were collected from JB heifer ovarian follicles (2–8 mm diameter). Individual IVM was performed for either 15 (n = 73) or 18 h (n = 149), with COC images captured at the start and every 3 h from 12 h onward. Following IVM, meiotic progression was assessed by chromatin staining of oocytes to determine NMS. Morphological features were extracted from images, analyzing COC area, cumulus expansion ratio, expansion rate per hour, and expansion pattern. At 15 h of IVM, COC expansion ratio and rate per hour differed between NMS groups ($p < 0.05$). However, predicting nuclear maturation was difficult due to low MII rate (4.1%). At 18 h of IVM, moderate MII rate (57.0%) was achieved, and differences ($p < 0.05$) were observed between expansion patterns with (EWC) or without clusters (EWOC). Therefore, features during 18 h of IVM were used to develop prediction models using four machine learning algorithms. Decision tree (DT) and random forest (RF) models achieved moderate accuracies (DT: 76.5%; RF: 65.8%) with corresponding F-scores (DT: 0.793; RF: 0.712). Both models demonstrated significant differences in MII rates after 18 h of IVM between Fast- and Slow-predicted NMS oocytes ($p < 0.05$), confirming their ability to distinguish NMS groups.

Models were assessed through maturation at 21 and 24 h of IVM (n = 89), fertilization dynamics at 3, 6, 9, and 12 h after the start of *in vitro* fertilization (IVF; n = 204), and embryo development by cleavage rates at 48 h and blastocyst formation at 168 h after IVF start (n = 115). DT model-predicted Fast NMS oocytes showed a tendency toward higher MII rates after 21 h of IVM ($p = 0.07$), while RF model-predicted Fast NMS oocytes exhibited a tendency toward higher cleavage rates at 48 h after IVF start ($p = 0.08$). Fertilization and blastulation were not associated with NMS predictions.

In conclusion, this study demonstrated the feasibility of using COC morphological features during IVM as indicators for predicting NMS of bovine oocytes. While the prediction models showed promising accuracy in distinguishing Fast and Slow NMS oocytes, subsequent analysis of predicted groups revealed tendencies toward higher maturation and cleavage rates, although no differences were observed in fertilization dynamics and blastocyst formation.

Chapter 2: Effects of extended IVM duration on developmental competence and embryo quality in bovine oocytes with predicted NMS

Based on models from Chapter 1, this study evaluated effects of IVM durations (24, 28, and 32 h) on developmental competence and embryo quality from predicted Fast or Slow NMS oocytes. COCs were cultured individually following Chapter 1 protocols. The DT model classified oocytes as Fast or Slow NMS based on morphological features during 18 h of IVM. COCs were randomly assigned to three IVM duration groups: 24 (n = 310), 28 (n = 201), or 32 h (n = 276), followed by 6 h of IVF and 186 h of IVC. Developmental competence was evaluated by cleavage rates at 27 and 48 h post-IVF and blastocyst formation at 168 and 192 h post-IVF. First cleavage was monitored through time-lapse imaging. In Slow NMS oocytes, extending IVM from 24 to 28 h increased cleavage rates at 27 and 48 h and first cleavage speed ($p < 0.01$). At 24 h of IVM, Slow NMS oocytes exhibited lower blastocyst rates at 168 and 192 h post-IVF than Fast NMS oocytes ($p < 0.05$). This difference disappeared with 28 h of IVM, and Slow NMS oocytes showed a tendency toward increased blastocyst rates at 192 h compared to 24 h of IVM ($p = 0.08$).

Embryo quality was evaluated through differential staining of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells in day-8 blastocysts (n = 83) and quantitative RT-PCR analysis of quality-related genes in twelve day-8 blastocysts per group. Analyzed genes included those for TE differentiation (*CDX2* and *IFNT*), embryo development (*IGF1R*), and ICM pluripotency (*NANOG*, *OCT4*, and *SOX2*). Cell number showed no differences between NMS groups. However, gene expression analysis showed lower *CDX2* expression overall ($p < 0.05$) and reduced *SOX2* expression at 24 h of IVM in Slow NMS group than Fast NMS group. Extended IVM (28 and 32 h) decreased ICM pluripotency genes (*NANOG* and *OCT4*) expression regardless of NMS classification.

In conclusion, extending IVM to 28 h improved developmental competence of Slow NMS oocytes, supporting the hypothesis that optimal IVF timing is crucial. While extended IVM enhanced development rates, it did not improve quality in embryos derived from Slow NMS oocytes and potentially compromised pluripotency, regardless of NMS classification.

Chapter 3: Molecular mechanisms underlying NMS variation and CC expansion patterns during IVM

Based on NMS predictions from Chapter 1, functional differences in CCs could be identified. COCs with EWC pattern demonstrated highest MII and blastocyst rates, suggesting expansion patterns influence maturation and developmental outcomes. Since Slow NMS oocytes displayed larger expansion ratios in Chapter 1, they might have higher expression of CC expansion-related genes. It was also hypothesized that elevated hyaluronan synthesis-related gene expression in EWC pattern COCs could create larger intracellular gaps between CCs. This study aimed to elucidate molecular mechanisms underlying NMS variation and CC expansion patterns during IVM.

Individually cultured COCs were subjected to CC collection, followed by chromosomal staining after 18 h of IVM. Samples included EWOC patterns (n = 24; 12

MI, 12 MII) and EWC patterns (n = 12; 5 MI, 7 MII), with NMS variation defined by whether meiosis had reached MII stage. Quantitative RT-PCR was performed to evaluate the mRNA expression of genes for expansion regulation (*FSHR*), hyaluronan synthesis (*HAS2*), and extracellular matrix formation (*PTGS2* and *TNFAIP6*). Lower *HAS2* and *TNFAIP6* but higher *PTGS2* expression was observed in CC samples with EWC pattern than in those with EWOC. Gene expression did not differ between NMS groups. COC area, expansion ratio, and expansion rate per hour after 18 h of IVM positively correlated with *HAS2* and *TNFAIP6* expression ($p < 0.05$).

In conclusion, these findings suggest that distinct expansion patterns arise through altered expansion-related gene expressions. Although *HAS2* and *TNFAIP6* expression were associated with COC expansion morphology, they were not correlated with the NMS of oocytes during IVM, indicating other molecular mechanisms regulate NMS.

Overall conclusions

1. Machine learning models using COC morphological features during 18 h of IVM successfully classified NMS, with DT and RF algorithms demonstrating significant classification performance.
2. Extending IVM from 24 to 28 h improved the fertilization competence of slow-predicted NMS oocytes through increased cleavage and blastocyst rates, demonstrating the importance of optimal IVF timing.
3. Extended IVM (28 and 32 h) reduced expression of ICM pluripotency genes (*NANOG* and *OCT4*), regardless of predicted NMS. Additionally, it failed to improve the quality of embryos derived from slow-predicted NMS oocytes, as evidenced by reduced *CDX2* and *SOX2* expression.
4. Lower *HAS2* and *TNFAIP6* expression but higher *PTGS2* expression were identified in CCs of EWC than EWOC, revealing altered expression of expansion-related genes between expansion patterns.
5. While *HAS2* and *TNFAIP6* expression correlated with COC expansion morphology, they were not associated with meiotic progression, suggesting that other mechanisms regulate NMS.

審査結果の要旨

畜産分野における体外胚生産 (IVP) 技術は、優良な遺伝形質を持つ個体の効率的な生産や、遺伝的改良の加速化に重要な役割を果たしている。特に、ウシにおける体外受精由来胚 (体外胚) の移植は、人工授精と比較して暑熱環境下での受胎率が高く、長期不受胎牛対策としても有用であることから、その需要は年々増加している。2016 年以降、体外胚の移植は体内受精由来胚 (体内胚) を上回っているが、その生産効率には依然として課題が残されている。ウシ IVP における胚盤胞形成率は 20–40%程度に留まっており、過去 20 年にわたり、その改善が大きな課題となっている。さらに、体外胚は体内胚と比較して胚移植後の受胎率が低いことが報告さ

れている。この主な原因として、成熟培養（IVM）過程における核成熟と細胞質成熟の非同期化が指摘されている。IVM 環境下では卵子採取直後に減数分裂再開が起こるため、細胞質成熟が十分に進行する前に核成熟が完了してしまう。この課題に対しては、これまで cAMP などを用いた減数分裂再開阻害や、IVM 時間の延長など、様々なアプローチが試みられてきた。しかし、個々の卵子で核成熟速度（NMS）が異なることから、従来法である集団培養法でとられる画一的な培養条件では十分な改善効果が得られていない。

従来の核成熟評価法では卵丘細胞の除去が必要となる。一方、卵丘細胞は、卵子の成熟とその後の受精において重要な役割を果たしており、その除去は発生能を著しく低下させる。それゆえに、IVM 過程において個々の卵子の NMS を非侵襲的に把握することは不可能であった。そのため、卵丘細胞を維持したまま核成熟状態を評価する手法の開発が求められていた。近年、画像解析を用いた胚の品質評価や妊娠予測などの機械学習技術の生殖医療分野への応用が進んでいる。本研究において申請者は、この技術を活用し、ウシ卵丘卵子複合体（COC）の形態学的特徴から非侵襲的に NMS を予測する手法の確立を試みている。さらに、予測された NMS に基づいて培養条件を最適化することで、IVP の効率改善を目指している。

第 1 章において申請者は、個別培養下での COC 形態変化を経時的に観察し、機械学習アルゴリズムを用いて IVM 開始 18 時間後の NMS を予測するモデルを開発している。申請者は COC の面積、膨化率、時間当たりの膨化速度、および膨化パターンなど 17 個の形態学的特徴を抽出し、これらを機械学習モデルの特徴量として使用した。複数の機械学習アルゴリズムを検討した結果、Decision Tree と Random Forest モデルにおいて、それぞれ正解率（accuracy）76.5% と 65.8% で NMS を予測することに成功した。また、NMS が早いと予測された卵子では 18 時間の IVM でより高い核成熟率を示したのに対し、NMS が遅いと予測された卵子では IVM 開始後 21 時間まで成熟が遅延する傾向が認められた。この成果は、卵丘細胞を除去することなく NMS を評価可能にした点で新規性が高く、個々の卵子に適した培養条件の最適化への道を開いたと評価できる。

第 2 章において申請者は、第 1 章で確立した NMS 予測モデルを活用し、個々の卵子の NMS に応じた培養条件の最適化を試みている。特に、NMS が遅いと予測された卵子に対して IVM 時間を 24 から 28 時間に延長することで、発生能が改善されることを実証した。延長培養により、これらの卵子の卵割率は有意に向上し、体外受精開始後 192 時間目における胚盤胞形成率も改善傾向を示した。特に、第一卵割までの時間が短縮されたことは、受精能の向上を示唆する重要な知見である。一方で、申請者は胚の分子生物学的解析により、IVM 時間延長は内細胞塊の多能性関連遺伝子（*NANOG*、*OCT4*）の発現低下を引き起こすことも明らかにした。また、NMS が遅いと予測された卵子由来の胚では、栄養外胚葉分化関連遺伝子（*CDX2*）の発現が低下することも示された。これらの成果は、NMS 予測に基づく IVM 時間の最適化が発生能改善に有効である一方で、胚の品質への影響も考慮する必要性を示唆している。

第 3 章において申請者は、COC の形態学的特徴と NMS の関連性の解明を目指し、卵丘細胞の膨化パターンに着目した分子生物学的解析を行っている。申請者は膨化した卵丘細胞内にクラスター形成が見られる（EWC）および見られない（EWOC）パターンの COC 由来の卵丘細胞を用いて、卵胞刺激ホルモン受容体（*FSHR*）、プロスタグランジン合成酵素 2（*PTGS2*）、ヒアルロン酸合成酵素 2（*HAS2*）、および腫瘍壊死因子 α 誘導タンパク質 6（*TNFAIP6*）の発現を定量的 PCR により解析した。その結果、NMS の違いによる遺伝子発現の差異は認められなかったものの、膨化パターン間で遺伝子発現量に明確な差異が認められた。特に EWC パターンでは、*PTGS2* の発現上昇と *HAS2*、*TNFAIP6* の発現低下が観察され、この特徴的な遺伝子発現

パターンは優れた発生能と関連することを示唆している。これらの知見は、COCの形態学的特徴と分子生物学的性状との関連性を示すとともに、IVM過程における卵丘細胞の役割についての理解を深めることに貢献している。

本研究は、ウシIVPシステムの効率化に新たな展望を開くとともに、卵子成熟機構の理解を深める上でも重要な知見を提供している。申請者は、ウシIVPの生産効率改善という実用的な課題に対して、最新の機械学習技術を応用し、さらに分子生物学的アプローチを組み合わせることで、実践的かつ科学的な解決手法を提示している点が高く評価できる。特に、従来は技術的制約から困難とされてきた個別卵子のNMS評価を、非侵襲的手法により可能にしたことは、個々の卵子に最適化された培養条件の提供という新たな研究領域を切り開いている。また、COC膨化パターンと遺伝子発現プロファイルの関連性を詳細に解析することで、卵子成熟メカニズムの理解にも貢献している。上述したように、本論文の成果は、獣医繁殖学領域における基礎研究としての学術的価値に加え、実用的な胚生産技術の向上にも寄与することから、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。