

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K16153

研究課題名(和文) 情報科学的アプローチによるインスリン受容体周辺の膜環境の動態解析

研究課題名(英文) Time-lapse image analysis of the local membrane environment surrounding the insulin receptor with an information science approach

研究代表者

竹本 智子 (Takemoto, Satoko)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究センター・研究員

研究者番号：00450403

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)：本研究では、細胞膜上のインスリンシグナル受容体周辺の膜環境変化を画像解析により明らかにすることを目的に、大量のタイムラプス観察画像から受容体を自動検出し、その膜流動性を解析した。膜流動性に関わる計測値は極めて小さいため、画像間類似度計測法の一つであるZero-mean normalized cross correlation (ZNCC) を活用し、計測値の空間分布及び時間変化を可視化した。その結果、受容体周辺の膜流動性はインスリン刺激時に増加すること、受容体の局所的な膜環境は動的で不均一であることが分かった。これらはインスリン受容体が一般的な原形質膜とは異なる局所膜環境を持つことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで観察が難しかった細胞膜上のインスリン受容体周辺について、初めてタイムラプス観察画像を取得し、その動態を画像解析したものである。これは、インスリン受容体を環境感受性の蛍光プローブで直接ラベルする観察系が、研究協力者らによって確立されたことによる。本研究によって大量のタイムラプス観察画像の自動解析法が確立できたことで、これまで不明であった受容体周辺の膜流動性についての定量解析が可能となった。結果として、インスリン刺激時の受容体周辺の膜流動性の変化や空間分布の不均一性が明らかになると、病態の発生原因の解明研究の促進に寄与することができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to understand how the membrane domain surrounding signaling molecules changes during insulin signaling, we have developed an image analysis procedure. The procedure includes automatic detection for insulin receptor from noisy time-lapse images, measuring membrane fluidity based on Generalized polarization (GP) value, and visualization of GP value using Zero-mean normalized cross correlation (ZNCC). Our results reveals that the membrane fluidity of local environment surrounding the insulin receptor increased upon insulin stimulation. Furthermore, we found the local membrane environment of the insulin receptor was quite dynamic and heterogeneous. These results suggest that the insulin receptor has distinct local membrane environment from the general plasma membrane.

研究分野：情報科学

キーワード：画像解析 細胞内ロジスティクス 細胞膜 インスリン受容体 可視化 膜流動性 領域分割

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に存在する脂質ラフト[1]は、細胞内の情報伝達プラットフォームとしての役割を担い、細胞内輸送や免疫応答など多くの機能発現に関与する。アルツハイマー病や C 型肝炎、インフルエンザなどの各種ウイルスも脂質ラフトに集まることが分かってきており、ラフトにおけるシグナル伝達異常が多くの病態の発生原因になると示唆されている。そこで脂質ラフトと各種シグナル受容体に注目した研究が行われているが、シグナル伝達時の受容体周辺の膜環境については未だ多くの点が明らかになっていない。その理由の一つとして、受容体周辺の膜環境を詳細に観察する方法が無かったことが挙げられる。これに対して近年、インスリン受容体を環境感受性の蛍光プローブ (Environment-sensitive dye) で直接ラベルし、受容体周辺の膜環境のみを観察する系が確立され、生細胞でのシグナル伝達時の受容体周辺の膜環境を観察した大量のタイムラプス画像が取得できるようになった[2]。

問題はその後の解析である。ラフトはコレステロールと脂質による秩序液相からなる。シグナル伝達による膜流動性の変化は、環境感受性プローブが秩序液相で短波長シフト、水分量の多い液晶相で高波長シフトを示すことから、短・高波長の蛍光輝度比で表現できる。これは膜流動性を表す Generalized polarization (GP) 値として知られている。しかし実際の撮影画像では特に高波長チャンネルにノイズが多く、受容体周辺の蛍光輝度を正しくとらえるためには、画像中から予め注目領域のみを検出しておく必要がある。自動検出法は確立されておらず、タイムラプス観察画像を用いた解析は実現に至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、インスリンシグナル受容体周辺の膜環境変化に注目し、シグナル伝達時の膜環境変化を情報科学的アプローチから定量解析する。本研究に先立って、インスリン受容体周辺の細胞膜を、環境感受性の蛍光プローブで標識したタイムラプス観察画像が取得できていることから、シグナル前後の膜環境変化について、画像処理・画像認識・幾何形状処理・多変量解析などのアプローチを活用した解析を実施する。本研究によって受容体周辺の膜環境の理解が進めば、シグナル伝達に留まらず、細胞内輸送や免疫応答など、細胞膜で生じる多様な機能や病態発現の解明の一助となることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、環境感受性の蛍光プローブで染色したインスリン受容体を共焦点レーザー顕微鏡で撮影したタイムラプス画像を用いる。観察画像に対し、インスリン刺激を与えた前後について、膜流動性を表す GP 値の時空間変化を解析する。これに必要な課題として、主に以下 2 を実施した。

(1) インスリン受容体の自動検出法の確立

観察画像中で、インスリン受容体は数ピクセルから数十ピクセルの点の集合として、多くのノイズとともに大量に存在している。タイムラプス観察であることから、細胞の移動や変形、蛍光輝度の減衰などによる画像の低 S/N 比問題は避けられず、インスリン受容体を画像中から検出することは容易ではない。これに対して本研究では、Difference of Gaussian (DoG) フィルタと K-means クラスタリングを活用した自動検出法を確立した。なお、検出法の決定には、本研究に先立って開発した画像処理法の評価システム[3]を用いた。

(2) GP 値変化の可視化と解析

取得したタイムラプス観察画像は、580nm 及び 630nm 前後の短・高波長 2 チャンネルである。これらの画像から、(1) で確立した方法を用いてインスリン受容体周辺領域を検出し、検出領域に対して膜流動性を表す GP 値を求めた。図 1 に自動検出結果と疑似カラー表現した GP 値の一例を示す。

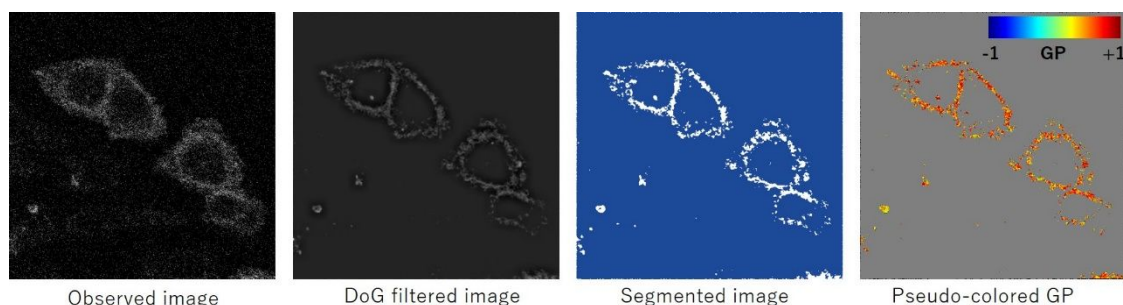


図 1 : インスリン受容体周辺領域の自動検出と GP 値可視化の例

GP 値変化量は極めて小さいことから、画像間類似度の計測法としてテンプレートマッチングなどに用いられる Zero-mean normalized cross correlation (ZNCC) を活用し、GP 値の空間分布及び時間変化を可視化した。一例を図 2 に示す。また、インスリン刺激前後で最も GP 値変化が大きい(または、小さい)任意領域について、横軸に空間情報、縦軸に時間変化を示すカイモグラフを生成し、GP 値の時空間変化を解析した。図 3 にカイモグラフの一例を示す。

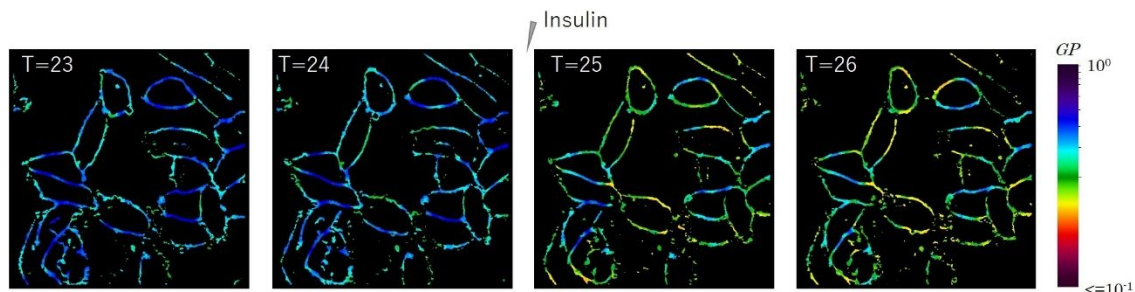


図 2 : ZNCC を利用した GP 値の局所変化の可視化

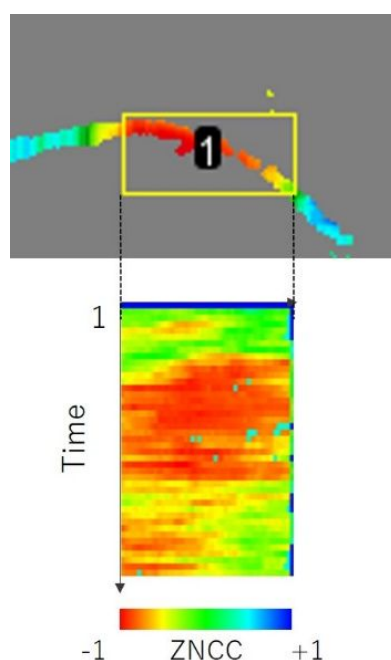


図 3 : 任意領域の GP 値変化のカイモグラフ

4 . 研究成果

撮影した計 667 セット (51~55 時相/1 セット) のタイムラプス観察画像に対し、受容体周辺領域の検出、GP 値の計測、時空間変化の可視化を実施した。その結果を研究協力者と解析したところ、インスリン受容体を取り巻く局所環境の膜流動性は、インスリン刺激時に増加することが明らかになった。さらに、インスリン受容体の局所的な膜環境は非常に動的で不均一であることが分かった。これらは、インスリン受容体が一般的な原形質膜とは異なる局所膜環境を持っていることを示唆している。得られた成果を現在投稿中である。

参考文献 :

1. D. Lingwood, K. Simons: Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science*, 327(5961), pp. 46-50, 2010.
2. E. Prifti et al.: A Fluorogenic Probe for SNAP-Tagged Plasma Membrane Proteins Based on the Solvatochromic Molecule Nile Red, *ACS Chem. Biol.* 9, pp. 606-612, 2014.
3. 竹本 智子ら, 画像処理法の決定支援システム *Sommelier*, 画像センシングシンポジウム, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mimura Yasuhiro, Takemoto Satoko, Tachibana Taro, Ogawa Yutaka, Nishimura Masaomi, Yokota Hideo, Imamoto Naoko	4. 巻 7
2. 論文標題 A statistical image analysis framework for pore-free islands derived from heterogeneity distribution of nuclear pore complexes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-16386-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitrungrotsakul Titinunt, Han Xian-Hua, Iwamoto Yutaro, Takemoto Satoko, Yokota Hideo, Ipponjima Sari, Nemoto Tomomi, Xiong Wei, Chen Yen-Wei	4. 巻 32
2. 論文標題 An end-to-end CNN and LSTM network with 3D anchors for mitotic cell detection in 4D microscopic images and its parallel implementation on multiple GPUs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neural Computing and Applications	6. 最初と最後の頁 5669 ~ 5679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00521-019-04374-8	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 Kitrungrotsakul Titinunt, Han Xian-Hua, Iwamoto Yutaro, Takemoto Satoko, Yokota Hideo, Ipponjima Sari, Nemoto Tomomi, Wei Xiong, Chen Yen-Wei	4. 巻 1
2. 論文標題 A Cascade of 2.5D CNN and Bidirectional CLSTM Network for Mitotic Cell Detection in 4D Microscopy Image	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/TCBB.2019.2919015	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 TAKEMOTO Satoko, HORI Keisuke, SAKAI Yoshimasa, NISHIMURA Masaomi, IKEMATSU Hiroaki, YANO Tomonori, YOKOTA Hideo	4. 巻 85
2. 論文標題 Applying Convolutional Neural Networks for Automatic Detection of Early Gastric Cancer with Limited Endoscopic Images	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Society for Precision Engineering	6. 最初と最後の頁 761 ~ 764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.2493/jjspe.85.761	査読の有無 無
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 Morita Masahiko, Shimokawa Kazuro, Nishimura Masaomi, Nakamura Sakiko, Tsujimura Yuki, Takemoto Satoko, Tawara Takehiro, Yokota Hideo, Wemler Shuhei, Miyamoto Daisuke, Ikeno Hidetoshi, Sato Akira, Furuichi Teiichi, Kobayashi Norio, Okumura Yoshihiro, Yamaguchi Yoko, Okamura-Oho Yuko	4. 巻 47
2. 論文標題 ViBrism DB: an interactive search and viewer platform for 2D/3D anatomical images of gene expression and co-expression networks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 D859 ~ D866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky951	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 Sakai Y., Takemoto S., Hori K., Nishimura M., Ikematsu H., Yano T., Yokota H.	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Automatic detection of early gastric cancer in endoscopic images using a transferring convolutional neural network	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society	6. 最初と最後の頁 4138-4141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/EMBC.2018.8513274	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14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Kitrungrotsakul, Titinunt & Iwamoto, Yutaro & Han, Xian-Hau & Takemoto, Satoko & Yokota, Hideo & Ipponjima, Sari & Nemoto, Tomomi & Xiong, Wei & Chen, Yen-Wei.
2. 発表標題 A Cascade of CNN and LSTM Network with 3D Anchors for Mitotic Cell Detection in 4D Microscopic Image.
3. 学会等名 ICASSP 2019 - 2019 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹本 智子, 森田 正彦, 西村 将臣, 横田 秀夫
2. 発表標題 画像処理法の決定支援システムSommelier
3. 学会等名 画像センシングシンポジウム (SSI1)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Umebayashi, L. Reymond, S. Takemoto, H. Yokota, M. Sundokova, K. Johnsson, H. Riezman
2. 発表標題 Probing the local membrane environment of the human insulin receptor
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅林 美和, Luc Reymond, 竹本 智子, 横田 秀夫, Kai Johnsson, Howard Reizman
2. 発表標題 インスリン受容体近傍の局所的な膜動態の観察
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Takemoto, M. Umebayashi, M. Morita, H. Riezman, and H. Yokota
2. 発表標題 Sommelier: A system for performance evaluation of image segmentation methods toward better objectivity of cell image analysis
3. 学会等名 Taiwan-Japan Joint Meeting on Bioimaging for Young Researchers (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Takemoto
2. 発表標題 Performance evaluation of image segmentation methods for better objectivity of cell image analysis
3. 学会等名 NCCR Special Lecture series (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Umebayashi, L. Reymond, R. Hovius, S. Takemoto, H. Yokota, M. Sundukova, A. Bucci, P. Heppenstall, K. Johnson, H. Riezman
2. 発表標題 Probing the local environment of the human insulin receptor
3. 学会等名 NCCR seminar (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹本智子, 梅林美和, 森田正彦, Riezman Howard, 横田秀夫
2. 発表標題 画像処理法の性能評価システムを用いた細胞膜認識手順の自動化
3. 学会等名 第23回画像センシングシンポジウム (SSI2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹本 智子, 横田 秀夫
2. 発表標題 画像処理法の決定支援システム: Sommelier
3. 学会等名 理化学研究所・広島大学合同公開シンポジウム「イメージングから理論」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Morita, S. Takemoto, M. Nishimura, Y. Morii, M. Maeda, Y. Okumura, Y. Yamaguchi, and H. Yokota
2. 発表標題 "A cloud-based communication platform for image-based brain research"
3. 学会等名 International Symposium of Brain/MINDS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 H. Yokota, S. Yoshizawa, S. Takemoto, M. Morita, T. Sera, M. Nishimura, Y. Tsujimura, S. Nakamura, and T. Michikawa
2 . 発表標題 Bioimage Processing
3 . 学会等名 Resonance Bio International Symposium (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 M. Morita, M. Nishimura, S. Takemoto, Y. Tsujimura, and H. Yokota
2 . 発表標題 Cloud-based image processing system: RBICP
3 . 学会等名 Resonance Bio International Symposium (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Y.-W. Chen, T. Kitrungrotsakul, X.-H. Han, Y. Iwamoto, J. Liu, S. Takemoto, H. Yokota, S. Ipponjima, and T. Nemoto
2 . 発表標題 An End-to-end CNN and CLSTM Network with 3D Anchors for Mitotic Cell Detection in 4D Microscopic Images
3 . 学会等名 Resonance Bio International Symposium (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 M. Umebayashi, S. Takemoto, L. Reymond, M. Sundukova, A. Bucci, P.A. Heppenstall, H. Yokota, K. Johnsson, H. Riezman
2 . 発表標題 Receptor-linked environment-sensitive probe reveals the heterogeneity of local-membrane environment surrounding the insulin receptor
3 . 学会等名 International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4 . 発表年 2019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 協力 者	梅林 美和 (Umebayashi Miwa)		