Analytical Methods for the Analysis of Structural Connectivity in the Mouse Brain

Sang-Jin Im[1], Hyeon-Man Baek[1,2,*]

[1]Core Facility for Cell to in-vivo Imaging, Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University
[2]Department of Molecular Medicine, Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University

Received: August 19 2021. Revised: August 28, 2021. Accepted: August 31, 2021.

ABSTRACT

Magnetic resonance imaging (MRI) is a key technology that has been seeing increasing use in studying the structural and functional innerworkings of the brain. Analyzing the variability of brain connectome through tractography analysis has been used to increase our understanding of disease pathology in humans. However, there lacks standardization of analysis methods for small animals such as mice, and lacks scientific consensus in regard to accurate preprocessing strategies and atlas-based neuroinformatics for images. In addition, it is difficult to acquire high resolution images for mice due to how significantly smaller a mouse brain is compared to that of humans. In this study, we present an Allen Mouse Brain Atlas-based image data analysis pipeline for structural connectivity analysis involving structural region segmentation using mouse brain structural images and diffusion tensor images. Each analysis method enabled the analysis of mouse brain image data using reliable software that has already been verified with human and mouse image data. In addition, the pipeline presented in this study is optimized for users to efficiently process data by organizing functions necessary for mouse tractography among complex analysis processes and various functions.

Keyword: Connectome, Tractography, Probabilistic analysis, Deterministic Analysis, Structural Connectivity, DTI

I. INTRODUCTION

마우스는 다수의 연구자들이 선택하는 실험 대상이며, 이들은 인간 생물학(Human Biology)을 매우 잘 반영한다. 인간 게놈의 내용을 이해하기 위한 핵심 정보도구로 마우스의 게놈 서열을 연구한 이전 논문[1]을 바탕으로 유전자 기능에 대한 이해를 높일 수 있는 형질전환 및 유전자 변형 마우스가 증가되었다. 이러한 마우스는 행동학적, 해부학적, 생리학적, 생화학적 및 병리학적 분석 같이 유전자의 기능을 이해하는데 기여한다. 마우스의 조직학적 방법을 사용한 연구에서는 가설을 검증하고 변경된 유전자 기능을 수반하는 예상치 못한 생화학적 변화를 밝히는데 유용한 것으로 알려져 있다[2]. 또한, 마우스는 면역학적 연구에서도 인간생물학을 매우 잘 반영하고 있으며, 이러한 기능의 보존은 인간과 생쥐 게놈의 염기서열 분석에 도 나타난다. 현재까지 300개정도의 유전자만이 고유한 것으로 나타났다[3]. 그러나 조직학적 분석을 위한 조직 준비는 침습적이고 낮은 처리량으로 인해 제한점이 있기 때문에 비침습적이고 높은 처리량을 가질 수 있으며, 강력한 재현이 가능한 방법이 필요하다[4].

고해상도 자기공명영상(MRI: Magnetic Resonance Imaging)은 비침습적 방법으로 생체내 영상을 획득할 수 있는 강력한 영상 기술이며, 마우스의 연구에 사용이 증가하고 있다[5]. 특히 MRI에 적용이 용이한 하드웨어 및 컴퓨터 전력의 발전과 복잡한 화

* Corresponding Author: Hyeon-Man Baek E-mail: hmbaek98@gachon.ac.kr Tel: +82-32-899-6678
Address: 155, Gaetbeol-ro, Yeonsu-ku, Incheon City, Korea

상 처리기법의 발전으로 뇌를 대상으로 상세한 신경해부학적 정보를 획득 할 수 있게 되었다. MRI를 통한 구조적 분할은 구조 영역에 대한 부피를 제공하고 위치정보를 식별하게 해주기 때문에 분석을 향상시킬 수 있다[6]. 특히 MRI를 이용한 영상 분석법에서 백질의 신경 구조에 대한 정보를 얻을 수 있는 확산가중영상(DTI: Diffusion Tensor Imaging)을 활용한 Tractography 분석은 부분적으로 변경된 신경 연결이 여러 신경 및 정신 질환에 기여할 수 있기 때문에 신경 과학 분야의 주요한 방법론으로 등장했다[7]. Tractography를 사용한 이전 연구에서는 특정 기능과 관련된 피질 영역을 식별하기 위해 기능적 자기공명영상(fMRI: funtional Magnetic Resonance Imaging)과 이러한 구조 영역간 연결 경로의 정보를 획득 할 수 있는 Tractography를 동시에 획득해 특징이 있는 네트워크 내에서 영역간 연결의 선택적 추적 방법을 제공함으로서 뇌 구조와 기능간의 관계를 조사했다[8,9].

MRI 스캔은 비침습적 방법으로 신체 내부를 확인 할 수 있다. 하지만, 높은 해상도를 달성하기 위해선 높은 전계강도나 충분히 긴 스캔시간이 필요하게 된다. 특히 마우스의 경우 인간의 뇌 영상처럼 높은 해상도를 갖기 위해선 어려움이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 생체 외(Ex-vivo) 실험이 수행되고 있으며, 생체 내(In-vivo) 실험에서 얻을 수 없는 높은 해상도의 영상을 획득 할 수 있다[10].

Tractography는 크게 결정론적 방법과 확률론적 방법으로 분류하는데, 두 방법론의 특징적인 차이는 유선 전파를 위한 섬유 방향의 샘플링이다. 결정론적 Tractography를 사용하면 유선이 각 복셀에서 고정된 방향에 따라 조정되어 단일 및 복셀당 추정된 다중 섬유 방향에 사용할 수 있다[11]. 확률론적 Tractography는 각 복셀에 대해 섬유 배향 분포가 추정되어 유선 전파 방향을 결정하기 위해 분포에 대해 무작위로 추출된다[12]. 결정론적 방법은 섬유 배향 추정치의 고유한 불확실성을 설명할 수 없고 주변 주요 방향과 노이즈에 대해 민감한 것을 볼 수 있다[13]. 확률론적 방법은 재구성된 각 경로의 확률적 신뢰도를 정량화 할 필요가 있는 경우 백질 다발을 재구성하고 해부하는 우수한 방법으로 알려져 있다[14]. 하지만 확률론적 방법은 테스트의 다양성으로 인해 재구성된 섬유가 거짓 정보일 가능성이 있다[15]. 이러한 이유로 결정론적 방법론과 확률론적 방법론 중 어떤 Tractography 방법론이 우수한지는 여전히 불분명 하다[16].

작은 동물인 마우스의 경우 영상데이터의 전처리 전략과 Atlas 기반 신경 정보학에 대한 과학적 합의가 없다. 따라서 맞춤형 코드 또는 임상 소프트웨어의 개별 조정을 사용하고 표준 Atlas 없이 처리된 다양한 연구들이 존재하며 상용 소프트웨어가 필요하다거나 구조적 및 기능적 MRI 모두에 대한 알고리즘을 통합하지 않는 문제점들이 발생한다[17]. 특히 재현성과 비교 가능성의 신뢰도에서 중개 동물 연구의 주요 단점이 나타나게 된다[18]. 구조분석에 필요한 뇌의 상세한 3차원 Atlas를 만드는 것은 매우 어려운 작업이며, 세분화의 기반이 되는 고해상도 MR 영상 데이터와 함께 해부학에 대한 높은 이해도를 요구한다[19]. 이러한 이유로 마우스의 구조분할 및 Tractography 분석에는 검증된 Atlas와 소프트웨어를 병합한 분석 파이프라인이 필요하다.

본 연구에서 최근 가장 상세한 것으로 알려져 있는 3D 마우스 뇌 Atlas인 Allen Mouse Brain Atlas(ABA)[20]를 사용할 수 있는 Atlas Normalization Toolbox using elastix2(ANTx2)와 이미 검증되어 많은 연구가 진행되고 있는 대표적 소프트웨어인 MRtrix3와 FMRIB software library (FSL) 그리고 DSIstudio의 기능을 각각 결합하여 마우스 뇌의 구조 및 기능 분석을 할 수 있는 확률론적 Tractography와 결정론적 Tractography 분석 방법을 제시하고자 한다. 이 연구는 이전 연구의 발전형이다[8].

II. MATERIAL AND METHODS

1. 동물 준비 및 자기공명영상(MRI) 획득

1.1 동물 준비

연구에 사용된 마우스는 ABA를 참조하여 C57BL/6J 모델(8주령, 수컷; 오리엔트바이오, 서울)이 사용되었다. 동물실험은 국제실험동물관리평가인증협회(AAALAC Iternational)의 지침을 따라 수

행되었으며, 가천대학교 이길여암당뇨연구원의 실험동물 센터(CACU: Center of Animal Care and Use, 인천)에서 동물실험계획서 승인 후 처리되었다.

1.2 생체-외(Ex-vivo) 실험 준비

연구에 사용된 마우스는 높은 해상도를 달성하기 위해 샘플링화 되었다. 먼저 포란액(isoflurane, 중외제약, 서울)으로 호흡 마취된 마우스를 PBS 용액(Phosphate-buffered saline, welgene, US), 10% sucrose 용액 (C12H22O11, S8501; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 4% paraformaldehyde (HO(CH2O)nH, 30525-89-4; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 0.1% Magnevist® (Magnevist, 동국제약, 서울)으로 심혈관 내 관류가 수행되었다. 이후, 마우스의 머리를 분리하고 두개골 주위의 피부와 근육을 제거했다. 처리가 끝난 두개골은 4˚C에서 0.1% Magnevist/phosphate 용액에 24시간씩 3일간 배양된 뒤, fomblin (Y25/6, Solvay, Brussels, Belgium)이 들어있는 튜브에 고정하고 샘플링 하였다. Ex-vivo 샘플링 방법을 요약한 파이프라인은 Fig. 1에 제시되었다.

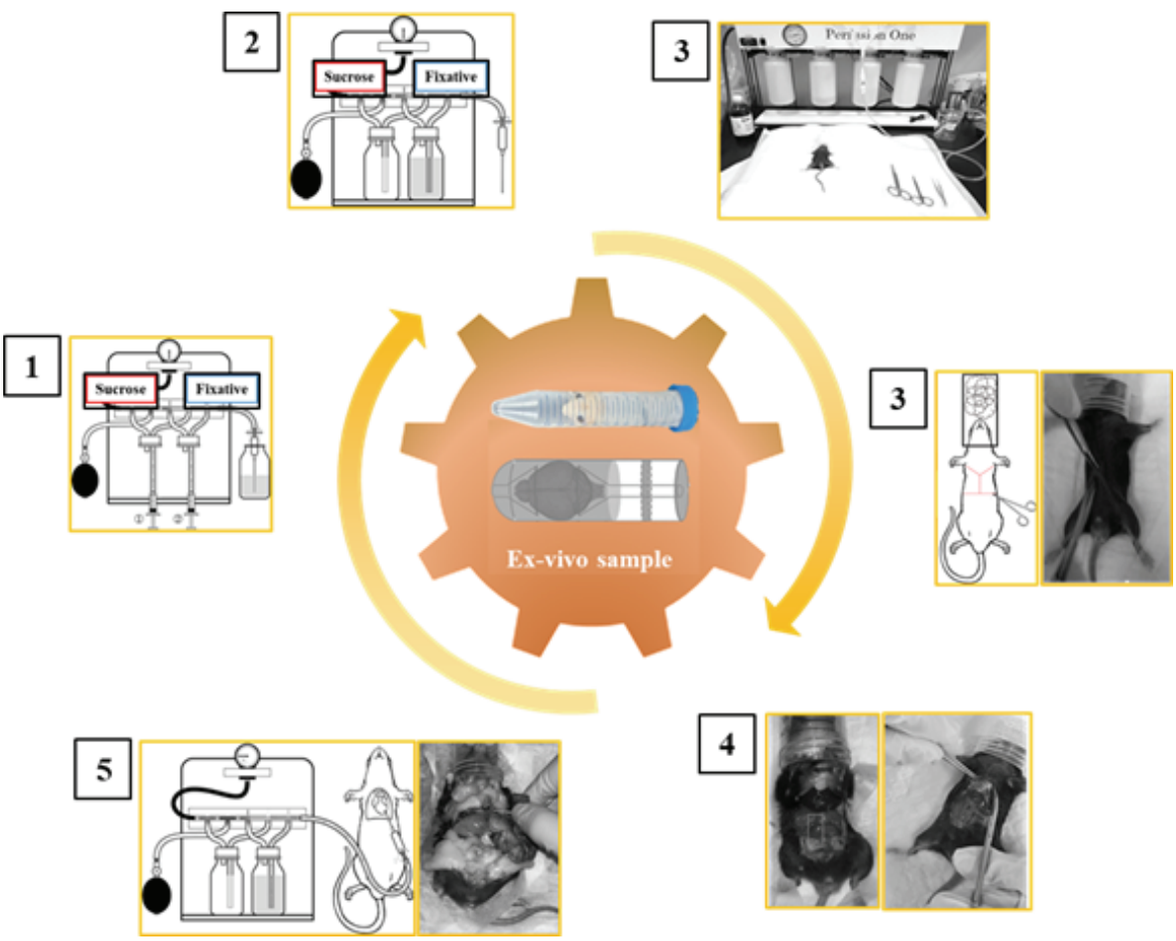

Fig. 1. The brain extraction procedure.

1.3 MR 영상 획득

모든 영상 데이터 획득은 핵심연구지원센터(Core Facility for Cell to In-vivo Imaging, 이길여암당뇨연구원, 가천대학교, 인천)의 동물 전용 9.4T MRI(Bruker Biospin, Ettlingen, Germany)에서 수행되었다. RF 여기를 위해 Quadrature volume resonator(inner diameter (114mm); Bruker Biospin, Ettlingen, Germany)이 사용되었으며, 신호 수신을 위해 4채널 mouse surface

coil(Bruker Biospin, Ettlingen, Germany)이 사용되었다. 영상 획득에 사용된 소프트웨어는 Paravision 6.0(PV6)였다.

영상획득에 사용된 펄스 시퀀스는 3D TurboRARE T2 (Spin echo sequence with a repetition time = 1800 ms, echo time = 37.7 ms, flip angle = 90°, Bandwidth = 99kHz, field of view = 1.2 × 1.2 × 1.6 cm, matrix = 200 × 200 × 265, resolution = 60 × 60 × 60 μm, 1 averages and resulting in a total acquisition time of 1h 44m)와 2D EPI-DTI(Spin echo sequence with a repetition time = 7000 ms, echo time = 30 ms, flip angle = 90°, bandwidth = 170kHz, b-value = 3003 s/mm^2, diffusion gradient pulse duration (δ) = 4.5 ms, diffusion gradient separation (Δ) = 10.6 ms, diffusion direction = 30, field of view = 1.8 × 1.8 cm, slice thickness = 0.12 mm, matrix = 150 × 150, slice = 70, resolution = 120 x 120 x 120 μm, 8 averages and resulting in a total acquisition time of 8 h 10 m) 였다.

2. 데이터 분석 파이프라인

연구에서 제시되는 분석 방법은 ABA를 이용한 구조 분석 방법을 진행 한 뒤, Tractography 분석을 수행하기 위한 결정론적 Tractography 분석 방법과 확률론적 Tractography 분석 방법으로 나누어진다. 전체 파이프라인은 Fig. 2에 제시되었다.

2.1 구조적 분석 방법

먼저, 두 분석방법의 공통 분석인 구조 영역을 분할하는 방법은 MRI에서 획득한 Raw 데이터를 ANTx2 (Atlas Normalization Toolbox using elastix 2, University Medicine Berlin, Germany)[21-23]에서 사용하여 Neuroimaging Informatics Technology Initiative (NIFTI) 형식으로 변환된 후 ABA 공간으로 정규화가 수행 되었다. 또한, 정규화된 데이터 중 DTI 데이터에서 B0 이미지 추출한다. 준비된 T2데이터와 B0데이터를 기반으로 영상 데이터에서 뇌를 추출하고 분석에 필요한 구조영역을 분할하여 획득한다. 모든 구조 영역은 FSL의 BET[24]을 이용해 뇌 마스크를 획득하고 FLIRT[25]를 통해 선형으로 영상 데이터에 등록되었다. 구조분석 파이프라인은 Fig. 2-A에 제시되었다.

2.2 DTI 데이터 전처리 방법

DTI 데이터는 전처리를 위해 Linux 환경으로 옮긴 뒤, MRtrix3 (Brain Research Institute, Melbourne, Australia)[26]에서 노이즈를 제거하기 위한 denoising과 B1 필드 불균일성을 보정하는 bias field correct가 수행되었다. 또한, 왜곡 및 움직임 인공물 등의 보정을 위해 FSL의 eddy correct[27]가 수행되었다.

2.3 결정론적 Tractography 분석 방법

결정론적 Tractography 분석은 DSIstudio의 Fibertracking을 사용해 구조 영역의 Q-Sampling Imaging(GQI)을 수행하게 되며, 유선 추적 알고리즘에 의해 하나의 복셀에서 최대 2개의 섬유가 분해되어 얻어진다[28].

먼저, DTI 데이터를 불러와 SRC 형식으로 변환해 준 뒤, 재구성을 진행한다. 재구성을 진행하면서 분석 대상이 되는 뇌의 범위를 지정한다. 지정된 범위는 뇌 마스크 역할을 하며, Fiber tracking 단계에서 Tracking 범위 결정에 반영된다.

Fiber tracking(Tracking Threshold: 0.01, Angular Threshold: 45, Step size: 0.6, Min Length: 0.5, Max Length: 250, Terminate if: 2000000) 수행시 목적하는 구조 영역이 ROI로 지정되게 되며, 대상 구조 영역을 통과하는 유선의 수와 모양이 나타나게 된다. 결정론적 Tractography 분석 파이프라인은 Fig. 2-B에 제시되었다.

2.4 확률론적 Tractography 분석 방법

확률론적 Tractography 분석은 FSL의 FMRIB's Diffusion Toolbox(FDT)를 사용하게 되며, 구조 영역을 기준으로 단일 또는 다중 복셀에서 연결 분포를 생성할 수 있다.

먼저, 텐서를 계산하기 위해 FSL의 DTIFIT을 사용하여 각 복셀에 확산 텐서 모델을 피팅하고 BEDPOSTX(Number of fibers per voxel: 3, Burnin period: 3000, Zeppelins model)를 사용하여 섬유 재구성 데이터를 생성하였다[29]. 또한, 복셀 주확산 방향의 확률을 반복적으로 샘플링하여 확률적 추적 방법을 사용해 교차 섬유의 유선을 생성하는 PROBTRACKX(Samples per voxel: 5000, Curvature

threshold: 0.2, Step size: 0.6)를 사용하여 확률론적 Tractography를 생성하였다[30]. PROBTRACX에서 Waypoint 기능을 이용해 각 구조 영역이 시드 및 타겟으로 지정되며, 대상 구조물을 통과하는 유선의 수와 유선의 모양이 결과물로 생성된다. 확률론적 Tractography 분석 파이프라인은 Fig. 2-C에 제시되었다.

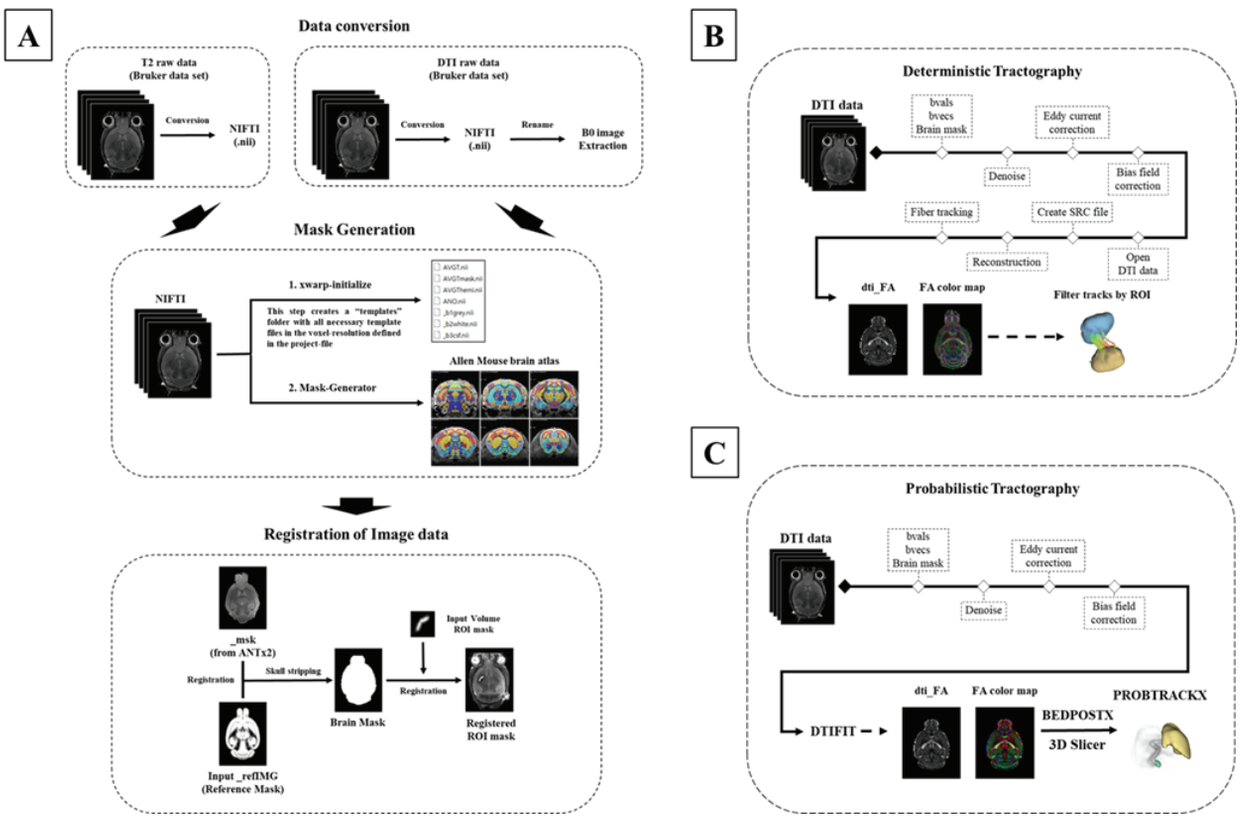

Fig. 2. All analysis pipeline of the mouse brain. Segmentation and preprocessing pipeline(A), Deterministic Tractography pipeline(B), Probabilistic pipeline(C).

IV. RESULT

1. 구조 영역 세분화

마우스 뇌 구조 영역의 세분화를 위해 ABA를 사용해 마스크를 생성할 수 있는 ANTx2 및 FSL의 선형 등록 기능을 결합하여 구조적 분석 파이프라인을 구성하여 적용하였다.

ABA를 이용한 마우스 뇌의 구조 영역 세분화 결과는 T2 영상 위에 겹쳐져 Fig. 3에 제시되었다. 분할에 사용된 ABA의 명칭과 약어 정보는 이전 연구를 참조하여 수행되었다[7].

세분화된 마우스 전체 뇌 영역은 정성적으로 평가되었으며, ABA의 좌표를 이용해 선형 등록하는 방식으로 진행되었다. 등록 결과로 T2 데이터에 ABA가 정확하게 겹쳐진 것을 확인 할 수 있었다. 등록된 결과에서 해부학적 구조의 외곽 부분부터 안쪽 부분까지 사실적으로 윤곽이 맞는 것을 확인할 수 있었다.

세분화 된 구조영역은 총 1328개였으며, 기초신경절 영역이 48개 영역이 좌반구와 우반구로 세분화되어 구조적 연결 매트릭스 분석에 사용되었다. 또한, 연구에서 수행되는 결정론적 Tractography 및 확률론적 Tractography 분석 결과를 위해 외담창구(GPe: Globus Pallidus external)와 적색핵(RN: Red nucleus)의 마스크가 추출되어 시드와 타겟으로 나뉘어 구조적 연결성 분석에 사용되었다.

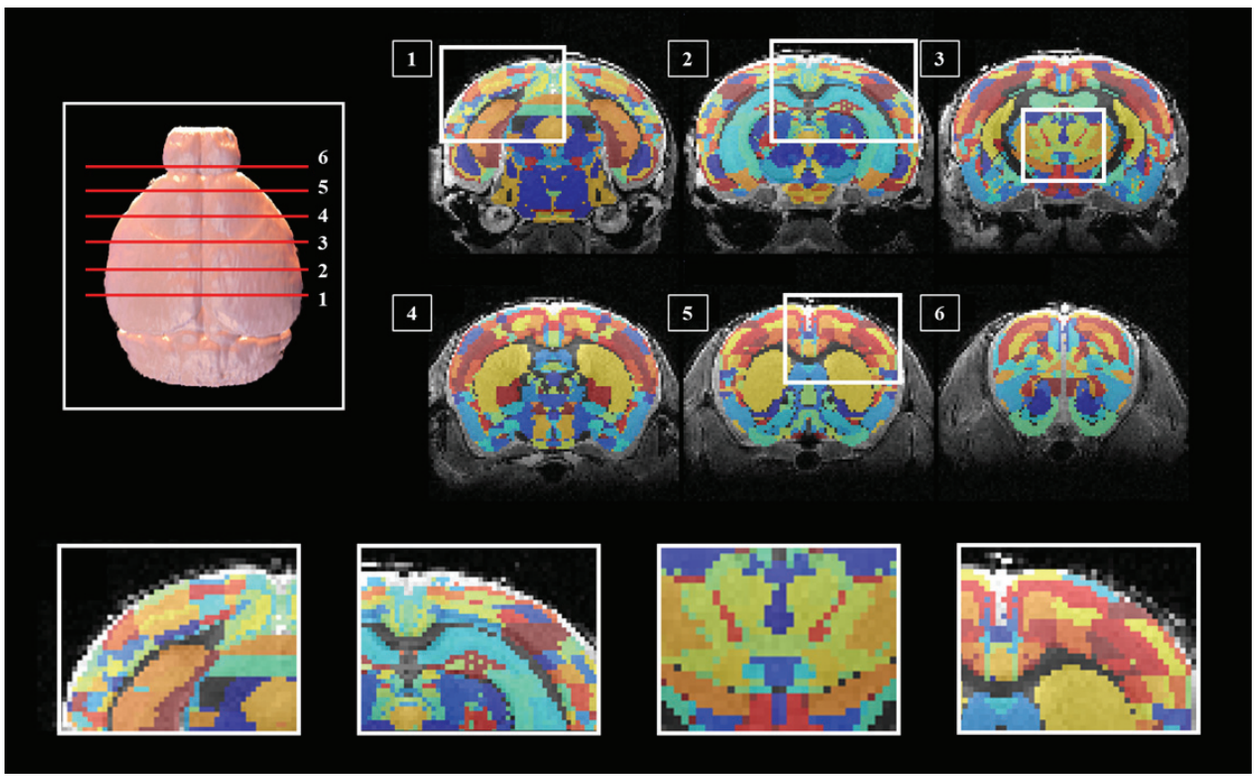

Fig. 3. 3D rendered brain shows the slice number to verify the location of the segmentations (Top left), segmentations overlaid on 3D T2 image data (Top right 1-6), Detailed views. (bottom).

2. Tractography 분석

2.1 구조적 연결 매트릭스 분석

구조적 연결 매트릭스 분석에 사용된 기초신경절 영역은 좌반구 5개 우반구 5개로 각 구조 영역이 시드와 타겟으로 지정되어 Tractography 분석이 수행된 후 Fig. 4에 제시되었다.

각 구조 영역을 기준으로 생성된 연결성 값은 결정론적 Tractography와 확률론적 Tractography에서 각각 다른 값을 확인 할 수 있으며, 분석 알고리즘에 따라 복셀을 기준으로 정량화 하게 된다. 각 구조 영역 사이의 연결값은 매트릭스로 표현되었으며, 행렬을 기준으로 연결성을 비교 할 수 있었다.

모든 구조 영역 사이의 연결성은 직접 비교를 위해 log10 스케일 색상 맵으로 표현되었으며, 파란색에 가까울수록 연결성이 약한 것을 나타내고 빨간색에 가까울수록 강한 연결성을 나타낸다. 매트릭스의 왼쪽 행은 시드 영역을 의미하며, 상단 행은 타겟을 의미한다. 또한, 각 구조 영역의 위치 정보를 확인하기 위해 구조 영역이 3D 렌더링 되어 표현되었다.

각 구조 영역간 연결 매트릭스 분석 결과 좌반구와 우반구의 각 반구별 연결성을 확인 할 수 있었다. 행렬을 기준으로 중앙의 대각선 연결성이 가장 높은 연결성을 보여주었다. 또한, 같은 반구간의 연결성은 높은 연결성을 보여주었고, 다른 반구간의 연결성은 낮은 연결성을 보이거나 연결성이 없는 것으로 나타났다. 각 반구에 있는 구조 영역에서도 거리가 가까운 영역들은 높은 연결성을 보여주었으며, 영역 사이의 거리가 먼 영역들은 낮은 연결성을 보여주었다.

결정론적 Tractography 분석 결과를 보여주는 Fig. 4-A 행렬에서는 서로 다른 반구에 있거나 같은 반구 내에서 거리가 먼 구조 영역간의 연결성은 약하거나 없는 것으로 나타났고 확률론적 Tractography 분석 결과를 보여주는 Fig. 4-B 행렬에서는 서로 다른 반구에 있거나 같은 반구에서 거리가 먼 영역간 연결성은 약하게 나타났다.

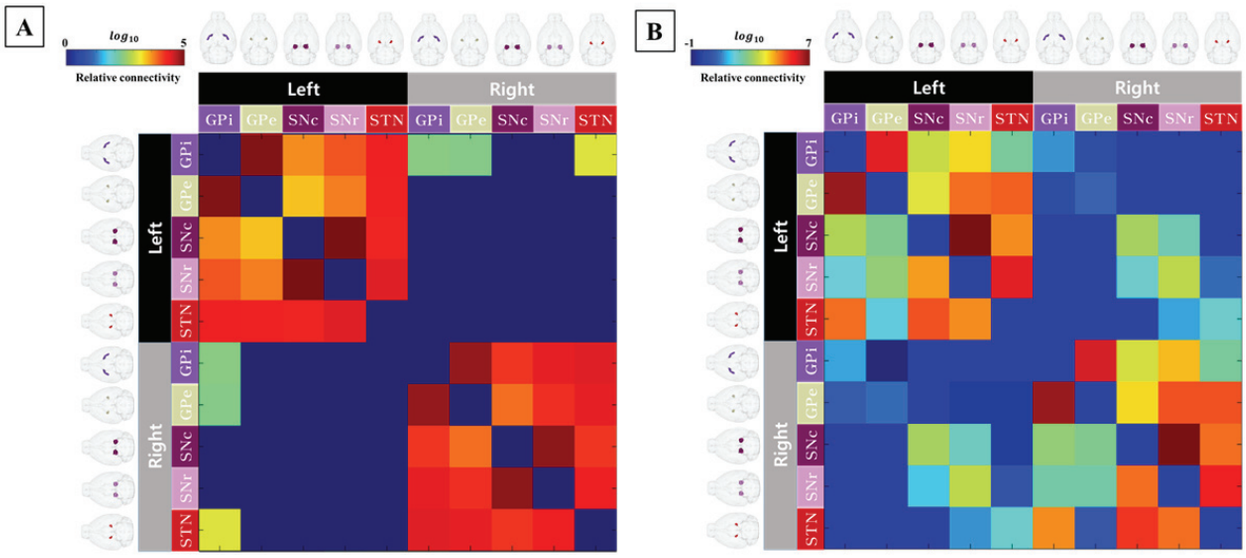

Fig. 4. A deterministic tractography(A) and probabilistic tractography(B) connectivity matrix of the mouse brain. Relative connectivity were estimated between 10 anatomic regions with a log10 scale color map. The tractography seeds (top row) and targets (left column) are displayed as volume renderings.

2.2 연결성 경로 분석

구조적 Tractography 분석에서 구조 영역 사이의 연결 경로를 시각화하기 위해 외담창구와 적색핵이 세분화 되어 각각 시드와 타겟으로 구분되어 분석이 수행되었다. 각 구조영역 사이의 연결 경로는 Fig. 5에서 시각화 되었다.

그림 상단에 구조 영역간 연결 경로의 연결성 강도에 따른 스케일 색상 맵이 표시되었다. Fig. 5-A의 확률론적 Tractography 분석을 통한 구조 영역간 연결 경로는 검은색에 가까울수록 약한 연결성을 나타내며, 흰색에 가까울수록 강한 연결성을 나타낸다. Fig. 5-B의 결정론적 Tractography 연결 경로는 보라색에 가까울수록 약한 연결성을 나타내며, 노란색에 가까울수록 강한 연결성을 나타낸다. 외담창구와 적색핵 사이의 연결 경로를 자세히 확인하기 위해 앞, 뒤, 바깥쪽, 안쪽, 위, 아래에서 확인할 수 있는 경로 모양을 Fig. 5에 시각화 하였다.

확률론적 방법과 결정론적 방법에서 강한 연결성을 나타내는 경로는 비슷한 모양으로 보였지만 확률론적 Tractography 분석에서 잔가지형식의 약한 연결성이 추가되는 것을 확인 할 수 있었다.

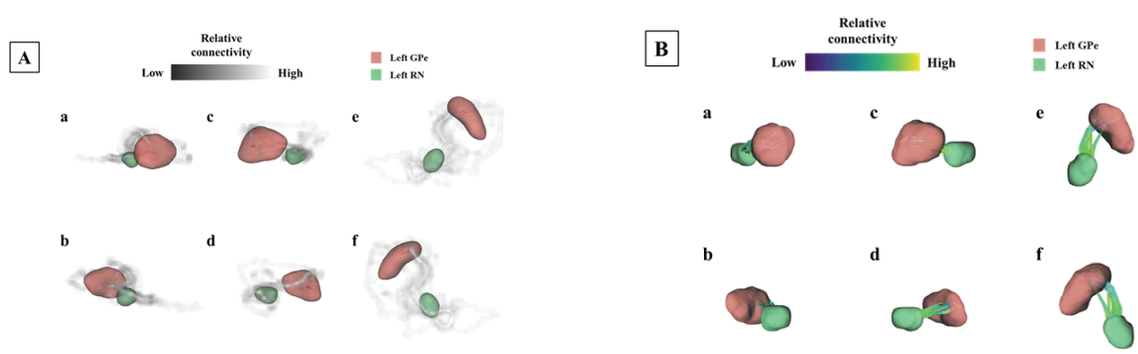

Fig. 5. Visualization of neuronal pathways in GPe-RN areas in Probabilistic tractography(A) and Deterministic tractography(B). The Pathway views: anterior (A-a), posterior (A-b), left lateral (A-c), left medial (A-d), superior (A-e), inferior (A-f)and anterior (B-a), posterior (B-b), left lateral (B-c), left medial (B-d), superior (B-e), inferior (B-f). Pathway connection strength is expressed in accordance with a color scale(each top).

IV. DISCUSSION

연구에서 MRI를 통해 마우스의 뇌 영상을 획득한 뒤, 영상데이터의 분석을 위한 파이프라인을 구축하였다. 파이프라인 검증을 위해 C57BL/6J 마우스가 사용되었으며, 마우스의 뇌를 고정시키는 샘플화를 수행하였다. 샘플은 해부학적 정보를 보존하고 인공물 없이 최적의 조직 무결성을 제공할 수 있다[31]. 샘플화는 조영제를 사용함으로서 신호 대 잡음비를 향상시키고 긴 스캔시간을 보장할 수 있기 때문에 고해상도 및 고대비 그리고 낮은 노이즈 등의 효과로 향상된 영상데이터를 획득 할 수 있다[32].

이미 인간을 대상으로 하는 영상 분석 연구에서는 완전한 평가 및 단계별 작업 절차를 제공하는 다양한 프로그램들이 개발 및 검증되었다. 하지만, 전 임상 환경에서 MRI를 이용한 영상 데이터의 획득, 처리 및 공유의 표준화는 여전히 다양한 평가 및 개발이 필요하다[33,34].

마우스의 구조적 및 기능적 연구에서 Atlas 기반의 영상 데이터 분석 방법은 직접 손으로 그리는 방법들과 달리 공통으로 사용할 수 있는 구조 영역 템플릿을 통해 다른 연구자들과 같은 영역으로 실험 결과를 확인할 수 있게 되며, 개별 관심 영역 매핑이 더 쉽고 빠르게 수행 가능해진다. 특히 높은 정확도를 갖는 ABA를 사용하면 영상 해상도가 낮고 인공물의 영향을 받는 DTI나 fMRI 분석에 특히 유용하게 사용할 수 있다. 하지만, 원본 영상의 해상도와 현저한 차이를 보이는 영상데이터에 적용할 경우 아주 작은 구조영역은 불일치가 발생할 수 있다. 그럼에도 불구하고 대부분의 구조 영역들이 정확한 세분화가 진행되는 것을 확인 할 수 있기 때문에 분석에 ABA를 적용하는 분석 방법이 권장되고 있다[19].

연구의 한계점은 실험에 사용된 마우스 표본수가 적어 각 분석에서 획득한 정량적 수치들을 통계적으로 확인할 수 없었다. 향후 표본숫자를 늘리고 횡단적 연구가 아닌 종단적 연구로 진행할 필요가 있다.

본 연구에서 구축한 분석 파이프라인은 마우스의 전체 뇌 구조 영역을 성공적으로 세분화했고 Tractography 분석을 위해 개별 마스크를 추출할 수 있었다. 추출된 마스크를 기준으로 Tractography 분석이 진행되었으며, 각 구조 영역이 시드와 타겟로 지정되어 구조적 연결성을 나타내었다. 특히 이 분석 파이이프라인은 확률론적 Tractography와 결정론적 Tractography 각각에 적용이 가능한 방법이기 때문에 향후 마우스 뇌 관련 다양한 연구에 활용될 수 있다.

V. CONCLUSIONS

우리의 연구는 마우스를 대상으로 뇌 구조를 분할하고 구조적 연결성 분석이 가능한 분석 방법을 제시한다. MRI를 이용한 구조 분석과 구조적 연결성을 확인 할 수 있는 Tractography는 신경과학분야에서 주요 초점으로 인식되고 있다. 하지만, 인간과 다르게 마우스는 뇌의 크기가 매우 작아 영상획득의 어려움이 있으며, 분석 방법이 과학적으로 합의가 되지 않아 표준화된 분석 방법이 존재하지 않는다. 특히 구조 영역을 세분화 하는 방법은 해부학 관련 전문가가 직접 그리거나 평가를 해야 하는 어려움이 있다. 이러한 방법의 해결방법은 높은 정확도를 보이는 표준화 아틀라스를 사용하는 것이다. 하지만, 마우스의 아틀라스 개발이 인간에 비해 느린 편이며, 지속적인 개발이 되지 않아 아틀라스 사용에도 어려움이 있다. 최근 ABA의 개발로 높은 정확도를 갖는 아틀라스 사용이 가능해졌으며, 이에 따라 ABA를 사용할 수 있는 분석 파이프라인의 정립이 필요해졌다. 우리의 연구에선 ABA를 이용할 수 있는 구조적 분석 방법과 두가지의 Tractography 분석방법을 정립하였으며, 실제 마우스 데이터에 적용해 분석 방법을 성공적으로 수행하였다. 본 연구에서 제시된 두 가지 Tractography 분석 방법 중 국부 섬유 방향의 불확실성으로 발생하는 Tractography 결과의 가변성을 특성화하는 확률론적 Tractography와 관심 영역을 뇌의 모든 부분에 연결하기 위한 단일 결정론적 답변을 제공하는 결정론적 방식의 사용은 서로 대조된다[35]. 이러한 두 분석 방법 중 어떤 방법이 우수한지는 여전히 불분명하기 때문에 분석 방법의 선택에 대한 연구자의 신중한 고려가 있어야 한다[16]. 이러한 결과는 신경과학분야 관련 뇌의 해부학적 구조 분석과

구조적 연결성을 확인하는 연구 분야에 포괄적인 활용이 가능할 것이다.

Acknowledgement

This research was supported by Basic Science Research Capacity Enhancement Project through Korea Basic Science Institute (National research Facilities and Equipment Center) grant funded by the Ministry of Education(grant No.2021R1A6C101A432) and Brain Research Program (NRF-2017M3C7A1044367) through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science and ICT.

Reference

[1] R. H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome", Nature, Vol. 420, No. 6915, pp. 520-562, 2002. http://dx.doi.org/10.1038/nature01262

[2] J. N. Crawley, "Behavioral phenotyping strategies for mutant mice", Neuron, Vol. 57, No. 6, pp. 809-818, 2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.001

[3] J. Mestas, C. C. Hughes, "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology", The Journal of Immunology, Vol. 172, No. 5, pp. 2731-2738, 2004. http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731

[4] H. E. Holmes, N. M. Powell, D. Ma, O. Ismail, I. F. Harrison, J. A. Wells, N. Colgan, J. M. O`Callahan, R. A. Johnson, T. K. Murray, Z. Ahmed, M. Heggenes, A. Fisher, M. J. Cardoso, M. Modat, M. J. O`Neill, E. C. Collins, E. M. C. Fisher, S. Ourselin, M. F. Lythgoe, "Comparison of In Vivo and Ex Vivo MRI for the Detection of Structural Abnormalities in a Mouse Model of Tauopathy", Frontiers in Neuroinformatics, Vol. 11, pp. 20, 2017. http://dx.doi.org/10.3389/fninf.2017.00020

[5] A. Badhwar, J. P. Lerch, E. Hamel, J. G. Sled, "Impaired structural correlates of memory in Alzheimer's disease mice", Neuroimage, Vol. 3, pp. 290-300, 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.nicl.2013.08.017

[6] F. Hébert, M. Grand'Maison, M. K. Ho, J. P. Lerch, E. Hamel, B. J. Bedell, "Cortical atrophy and hypoperfusion in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease", Neurobiology of Aging: age-related phenomena, neurodegeneration and neuropathology, Vol. 34, No. 6, pp. 1644-1652, 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.022

[7] K. Xue, C. Luo, D. Zhang, T. Yang, J. Li, D. Gong, L. Chen, Y. I. Medina, J. Gotman, D. Zhou, D. Yao, "Diffusion tensor tractography reveals disrupted structural connectivity in childhood absence epilepsy", Epilepsy Research, Vol. 108, No. 1, pp. 125-138, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.10.002

[8] M. Mesulam, "Mesulam Imaging connectivity in the human cerebral cortex: the next frontier?", Annals of Neurology, Vol. 57, pp. 5-7, 2005. https://doi.org/10.1002/ana.20368

[9] H. R. Powell, G. J. Parker, D. C. Alexander, M. R. Symms, P. A. Boulby, C. A. M. Wheeler-Kingshott, G. J. Barker, U. Noppeney, M. J. Koepp, J. S. Duncan, "Hemispheric asymmetries in language-related pathways: a combined functional MRI and tractography study", NeuroImage, Vol. 32, No. 1, pp. 388-399, 2006. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.03.011

[10] S. J. Im, H. M. Baek, "Semi-automated Tractography Analysis using a Allen Mouse Brain Atlas: Comparing DTI Acquisition between NEX and SNR", Journal of the Korean Society of Radiology, Vol. 14, No. 2, pp. 157-168, 2020. http://dx.doi.org/10.7742/jksr.2020.14.2.157

[11] F. C. Yeh, T. D. Verstynen, Y. Wang, J. C. Fernández-Miranda, W. Y. I. Tseng, "Deterministic diffusion fiber tracking improved by quantitative anisotropy", PLOS ONE, Vol. 8, No. 11, pp. e80713 2013. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080713

[12] J. D. Tournier, F. Calamante, A. Connelly, "MRtrix: diffusion tractography in crossing fiber regions", International journal of imaging systems and technology, Vol. 22, No. 1, pp. 53-66, 2012. http://dx.doi.org/10.1002/ima.22005

[13] D. K. Jones, "Challenges and limitations of quantifying brain connectivity in vivo with diffusion MRI", Imaging in Medicine, Vol. 2, No. 3, pp. 341,

2010. http://dx.doi.org/10.2217/iim.10.21

[14] S. N. Sotiropoulos, A. Zalesky, "Building connectomes using diffusion MRI: why, how and but", NMR in Biomedicine, Vol. 32, No. 4, pp. e3752, 2019. http://dx.doi.org/10.1002/nbm.3752

[15] J. A. Roberts, A. Perry, G. Roberts, P. B. Mitchell, M. Breakspear, "Consistency-based thresholding of the human connectome", NeuroImage, Vol. 145, pp. 118-129, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.09.053

[16] T. Sarwar, K. Ramamohanarao, A. Zalesky, "Mapping connectomes with diffusion MRI: deterministic or probabilistic tractography?", Magnetic resonance in medicine, Vol. 81, No. 3, pp. 1368-1384, 2019. http://dx.doi.org/10.1002/mrm.27622

[17] S. Koch, S. Mueller, M. Foddis, T. Bienert, D. von Elverfeldt, F. Knab, "Atlas registration for edema-corrected MRI lesion volume in mouse stroke models", Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, Vol. 39, No. 2, pp. 313-323, 2019. http://dx.doi.org/10.1177/0271678X17726635

[18] A. E. Dorr, J. P. Lerch, S. Spring, N. Kabani, R. M. Henkelman, "High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice", Neuroimage, Vol. 42, No. 1, pp. 60-69, 2008. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.03.037

[19] N. Pallast, M. Diedenhofen, S. Blaschke, F. Wieters, D. Wiedermann, M. Hoehn, G. R. Fink, M. Aswendt, "Processing pipeline for atlas-based imaging data analysis of structural and functional mouse brain MRI (AIDAmri)", Frontiers in Neuroinformatics, Vol. 13, pp. 42, 2019. http://dx.doi.org/10.3389/fninf.2019.00042

[20] H. W. Dong, "The Allen reference atlas: A digital color brain atlas of the C57Bl/6J male mouse", John Wiley & Sons Inc, 2008.

[21] S. Koch, S. Mueller, M. Foddis, "Atlas registration for edema-corrected MRI lesion volume in mouse stroke models", Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, Vol. 39 No. 2, pp. 313-323, 2019. http://dx.doi.org/10.1177/0271678X17726635

[22] N. S. Huebner, A. E. Mechling, H. L. Lee, et. al., "The connectomics of brain demyelination: Functional and structural patterns in the cuprizone mouse model", Neuroimage, Vol. 146, pp. 1-18, 2017. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.11.008

[23] Ed S. Lein, Michael J. Hawrylycz, Nancy Ao, et. al., "Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain", Nature, Vol. 445, No. 7124, pp. 168, 2007. http://dx.doi.org/10.1038/nature05453

[24] M. Jenkinson, M. Pechaud, S. Smith, "BET2: MR-based estimation of brain, skull and scalp surfaces", In Eleventh Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping, Vol. 17, pp. 167, 2005.

[25] M. Jenkinson, P. Bannister, J. M. Brady, S. M. Smith, "Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images", NeuroImage, Vol. 17, No. 2, pp. 825-841, 2002. http://dx.doi.org/10.1006/nimg.2002.1132

[26] L. Cordero-Grande, D. Christiaens, J. Hutter, A. N. Price, J. V. Hajnal, "Complex diffusion-weighted image estimation via matrix recovery under general noise models", NeuroImage, Vol. 200, pp. 391-404, 2019. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.06.039

[27] M. S. Graham, I. Drobnjak, H. Zhang, "Realistic simulation of artefacts in diffusion MRI for validating post-processing correction techniques", NeuroImage, Vol. 125, pp. 1079-1094, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.11.006

[28] F. C. Yeh, T. D. Verstynen, Y. Wang, J. C. Fernandez-Miranda, W. Y. Tseng, "Deterministic diffusion fiber tracking improved by quantitative anisotropy", PLOS ONE, Vol. 8, No. 11, pp. e80713, 2013. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080713

[29] S. N. Sotiropoulos, M. Hernandez-Fernandez, A. T. Vu, J. L. Andersson, S. Moeller, E. Yacoub, C. Lenglet, K. Ugurbil, T. E. J. Behrens, S. Jbabdi, "Fusion in diffusion MRI for improved fibre orientation estimation: An application to the 3T and 7T data of the Human Connectome Project", Neuroimage, Vol. 134, pp. 396-409, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.04.014

[30] T. E. J. Behrens, H. Johansen-Berg, S. Jbabdi, M. F. S. Rushworth, M. W. Woolrich, "Probabilistic

diffusion tractography with multiple fibre orientations: What can we gain?", NeuroImage, Vol. 34, No. 1 pp. 144-155, 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.09.018

[31] R. X. Moldrich, K. Pannek, R. Hoch, J. L. Rubenstein, N. D. Kurniawan, L. J. Richards, "Comparative mouse brain tractography of diffusion magnetic resonance imaging", Neuroimage, Vol. 51, No. 3, pp. 1027-1036, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.03.035

[32] C. Watson, A. L. Janke, C. Hamalainen, S. M. Bagheri, G. Paxinos, D. C. Reutens, J. F. P. Ullmann, "An ontologically consistent MRI-based atlas of the mouse diencephalon", Vol. 157, pp. 275-287, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.05.057

[33] M. Rubinov, O. Sporns, "Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations", Neuroimage, Vol. 52, No. 3, pp. 1059-1069, 2010. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.003

[34] Z. Cui, S. Zhong, P. Xu, Y. He, G. Gong, "PANDA: a pipeline toolbox for analyzing brain diffusion images", Frontiers in Human Neuroscience, Vol. 7 pp. 42, 2013. http://dx.doi.org/10.3389/fnhum.2013.00042

[35] M. Bastiani, N. J. Shah, R. Goebel, A. Roebroeck, "Human cortical connectome reconstruction from diffusion weighted MRI: the effect of tractography algorithm", NeuroImage, Vol. 62, No. 3, pp. 1732-1749, 2012. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.06.002

마우스 뇌의 구조적 연결성 분석을 위한 분석 방법

임상진,[1] 백현만[1,2,*]

[1]가천대학교 이길여암당뇨연구원 Cell to In-vivo imaging 핵심연구지원센터
[2]가천대학교 이길여암당뇨연구원 분자의학과

요 약

자기공명영상(MRI)은 뇌의 구조적 및 기능적 연구에서 핵심 기술로 필요성이 증가하고 있다. Tractography 분석을 이용하는 뇌지도(Connectome)는 MRI를 통해 뇌의 구조적 연결성을 확인하고 연결성의 변동성을 이용해 질병 병리학에 대한 이해를 높이는 방법으로 인간을 대상으로 활발한 연구가 진행되고 있다. 하지만 마우스 같은 작은 동물의 경우 분석 방법의 표준화가 부족하고 영상에 대한 정확한 전처리 전략 및 아틀라스 기반 신경 정보학에 대한 과학적 합의가 없다. 또한, 인간의 뇌에 비해 마우스의 뇌는 매우 작기 때문에 높은 해상도를 갖는 영상을 획득하는 것에도 어려움이 있다. 연구에서는 구조적 영상과 확산 텐서 영상을 이용해 구조 영역 세분화를 포함한 구조적 연결성 분석을 가능하게 하고 마우스 뇌 데이터를 처리하는 Allen Mouse Brain Atlas 기반 영상 데이터 분석 파이프라인을 제시한다. 각 분석 방법은 마우스 뇌 영상 데이터의 분석을 가능하게 하고 이미 인간 영상데이터로 검증된 소프트웨어를 이용해 신뢰성을 가질 수 있게 하였다. 또한, 연구에서 제시되는 파이프라인은 복잡한 분석 과정과 다양한 기능들 중 마우스 Tractography에 필요한 기능들을 정리하여 사용자가 효율적으로 데이터 처리를 하는데 최적화되었다.

중심단어: 커넥톰, 뇌지도, 확률론적 분석, 결정론적 분석, 구조적 연결성, 확산 텐서 영상

연구자 정보 이력

	성명	소속	직위
(제1저자)	임상진	가천대학교 이길여암당뇨연구원 Cell to In-vivo imaging 핵심연구지원센터	연구원
(교신저자)	백현만	가천대학교 이길여암당뇨연구원 분자의학과	교수