

약한 D 표현형을 가진 한 환자에서 발견된 weak D type 33: 국내 첫 보고

유홍비¹ · 박종은² · 박 건³ · 조 덕^{1,2}

성균관대학교 삼성융합의과학원 융합의과학과¹, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과²,
조선대학교 의과대학 진단검사의학과³

Weak D type 33 Found in a Patient with a Weak D Phenotype: The First Case in Korea

HongBi Yu¹, Jong Eun Park², Geon Park³, Duck Cho^{1,2}

Department of Health Sciences and Technology, SAIHST, Sungkyunkwan University¹, Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine², Seoul, Department of Laboratory Medicine, Chosun University College of Medicine³, Gwangju, Korea

RHD genotyping is a useful adjunct to serologic testing. Although the use of *RHD* genotyping in the detection of Asia type DEL in serological D negative Koreans is gradually increasing, it is rarely requested for patients with a known weak D phenotype. This paper reports the first Korean case of a 52-year-old female patient with serologic weak D phenotype and weak D type 33 (c.520G>A at exon 4 of *RHD*) identified by *RHD* exon 1 to 10 sequencing. *In silico* analysis predicted that the *RHD* c.520G>A (V174M) results in a serologic weak D phenotype. (Korean J Blood Transfus 2019;30:65-70)

Key words: RhD, Weak D, Phenotype, Genotyping

서론

RhD 음성 혹은 RhD 변이형 환자는 D 항원에 노출될 경우 항-D가 발생할 수 있다. 만약 항-D를 보유한 환자에게 D 양성 혈액제제의 수혈시에는

용혈수혈반응, 항-D를 보유한 산모가 D 양성 태아를 가지면 태아신생아용혈성질환이 발생할 가능성이 높다[1]. 따라서, 항-D가 발생하지 않게 예방하는 것이 중요하며, 이를 위해서는 정확한 RhD 혈액형 검사가 선행되어야 한다. 그런데, 최근에

Received on February 12, 2019. Revised on March 15, 2019. Accepted on March 23, 2019

Correspondence to: Duck Cho

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 06351, Korea

Tel: 82-2-3410-2403, Fax: 82-2-3410-2719, E-mail: duck.cho@skku.edu, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6861-3282>

Co-correspondence to: Geon Park

Department of Laboratory Medicine, Chosun University College of Medicine, 365 Pilmundae-ro, Dong-gu, Gwangju 61453, Korea

Tel: 82-62-220-3272, Fax: 82-62-232-2063, E-mail: creatgeon@chosun.ac.kr, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1414-7877>

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright ©2019 The Korean Society of Blood Transfusion

는 기존 혈청학적 검사만으로는 RhD 혈액형을 정확히 규명할 수 없어 *RHD* 유전자 검사가 필요했던 사례들이 보고되었다[2-4]. 혈청학적으로 RhD 음성으로 판정된 한국인 헌혈자나 환자가 *RHD* 유전자 검사를 추가하여 Asia type DEL형으로 다시 판명되었다. 즉, 일부 검체는 혈청학적 검사만으로는 정확한 RhD 혈액형을 판명할 수 없어 *RHD* 유전자 검사가 필수적이다. 그간 백인, 중국인, 일본인 등에서 혈청학적으로 D 음성 뿐 아니라 약한 표현형 검체로 *RHD* 유전자 검사가 시행되었다[4-6]. 그런데, 한국인에서는 *RHD* 유전자 검사가 혈청학적으로 D 음성인 검체로 주로 이루어졌지만 약한 D 표현형 검체에는 비교적 드물었다[2,3,7].

본 증례는 혈청학적으로 약한 D 발현을 보인 검체에 *RHD* 유전자 엑손 10개 및 주변부 인트론을 분석하여 그간 국내에서는 보고되지 않았던 weak D type 33형을 국내 최초로 보고한다.

증례

52세 여자 환자가 자궁근종과 자궁탈출로 자궁적출술을 받기 위해 입원하였다. 수혈전검사를 위해 시간 간격을 두고 두 개의 K₂-EDTA처리 정

Table 1. Serological results of RhD typing, weak D test, and testing for partial RhD category performed by various methods and anti-D reagents, including epitope and clone (type) information

Tests	Methods	Reactivity	Brand	Epitope	Clone (type)
RhD typing	Microplate	4+	Qwalys	NI	P3X61 (IgM)
	Tube	2+	SIHDIA	NI	TH-28 (IgM), MS-26 (IgG)
		—*	Bioclone	NI	MAD2 (IgM), Polyclonal (IgG)
		Gel	3+	BioRad	NI
Weak D test	Tube	4+	Bioscote	NI	TH-28 (IgM), MS-26 (IgG)
		3+	Ortho	NI	NI
	Gel	3+	Bioscote	NI	TH-28 (IgM), MS-26 (IgG)
		2+	Ortho	NI	NI
Testing for partial D	Tube	3+	Diagast	epD2	P3X249 (IgG)
		3+		epD3	P3X290 (IgG)
		3+		epD5	P3X241 (IgG)
		3+			P3X35 (IgG)
		3+		epD6	HM10 (IgM)
		4+			HM16 (IgG)
		2+			P3X61 (IgM)
		+/-		epD8	P3X21211F1 (IgM)
		2+		epD9	P3X21223B10 (IgM)

Partial RhD category were detected with the D-Screen Diagast kit, which consisted of 9 monoclonal anti-D antibodies specific to the most common categories of partial D (DII, DIIIa, DIIIb, DIIIc, DIVa, DIVb, DVa, DVI, DVII, DFR, DBT, DHAR, and DHMi).

*Microscope: +/-.

Abbreviation: NI, no information available.

백혈 검체가 전달되었다. 하나는 자동화 장비(QWALYS-3 system; DIAGAST, Loos Cedex, France)를 이용하여 혈액형 및 비예기항체선별검사를 실시하였고, 다른 하나는 Anti-A SIHDIA (Shingyang Diagnostics, Siheung, Korea), Anti-B SIHDIA (Shingyang Diagnostics), Anti-D SIHDIA (Shingyang Diagnostics) 시약을 사용하여 시험관법으로 혈액형을 재확인하였다. ABO 혈액형 검사에서는 모두 B형으로 일치하였으나 RhD 혈액형 검사에서는 응집강도에서 차이를 보였다. 자동화장비에서는 4+였으나, 시험관법에서는 2+였다. 보유 중인 다른 anti-D 시약(Bioclone; Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA)을 이용하여 시험관법으로 검사한 결과는 육안으로는 음성이었고, 현미경상에서 미약한 응집(trace)이 관찰되었다. 이후 추가 채혈 검체로 다양한 clone의 시약으로 실시한 RhD 혈액형 검사, 약-D 검사 그리고 부분-D 검사를 실시하였고, 그 결과와 시약에 대한 정보는 Table 1에 정리하였다. 한편, C, E형 검사(anti-C, -c, -E 및 -e, Ortho Clinical Diagnostics, High Wycombe, UK)는 Cce형이었다.

D 변이형의 유형을 확인하기 위해 *RHD* 유전

자의 엑손 1~10 그리고 각 엑손의 주변부 인트론을 *RHD* 유전자 특이적인 시발체(primer)를 이용한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)으로 *RHD* 유전자를 증폭한 후 증폭 시발체로 직접염기서열분석(direct sequencing)을 Seo 등[2]이 보고한 방법과 동일하게 실시하였다. 표준 염기서열인 NM_016124.4를 기준으로 비교 분석한 결과 엑손 4번에서 c.520G>A (V174M) 과오돌연변이가 반접합체(hemizygote)로 발견되었다(Fig. 1). 이 유전자에서 발견된 c.520G>A 변이는 International Society of Blood Transfusion (ISBT) 명명법에 의하여 *RHD**01W.33으로 명명할 수 있었다. 이 변이가 적혈구 D항원의 표현형에 미치는 영향을 분석하기 위하여 아미노산 변이가 단백질에 어떠한 변화를 유발했는지를 예측하는 생물정보학 분석 결과 PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)와 SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html)에서 단백질 구조에 변성을 일으킬 가능성이 높을 것으로 예측되었다.

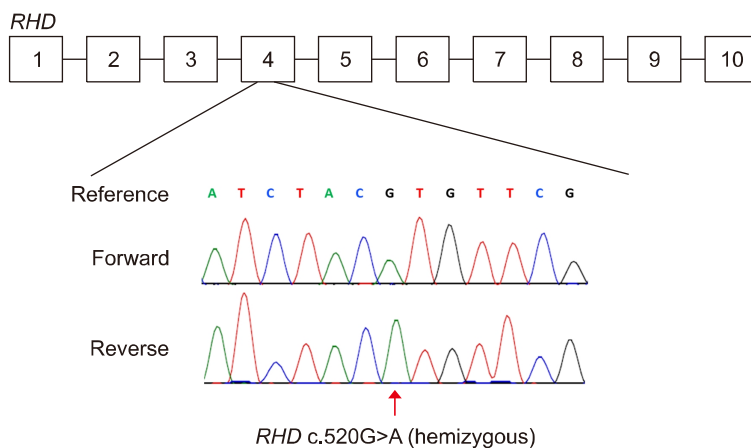


Fig. 1. Direct sequencing of *RHD* exon 4 identified a hemizygous c.520 G>A variant; the arrow indicates the adenine peak on the mutation site.

고찰

약-D형은 RhD 변이형의 한 유형인데, 부분-D형과 대비된다. 부분-D형은 D항원의 양적 감소 뿐 아니라 항원결정인자(epitope) 결손이 있지만, 약-D형은 이들 결손이 없고 양적 감소가 주된 특징이다[1]. 따라서 수혈이나 임신에 의해 D항원에 노출되면 부분-D형은 항-D가 발생할 가능성이 높고, 약-D형은 발생 가능성이 낮다고 알려졌다. 하지만, 약-D형도 항-D를 발생한 사례가 많고, 혈청학적 검사법만으로는 부분-D형과 약-D형을 정확한 구분할 수 없으니 임상 검사실에서는 이들 유형을 구분하지 않고 “RhD 변이형”으로 사용될 수도 있다[1]. 본 증례는 일부 클론의 항-D 시약에는 응집반응이 없거나 현미경적 관찰에만 반응이 보이고, 다른 시약에는 2+ 이상의 반응이 있어 처음에는 부분-D형을 우선 의심하였다. 하지만, 9가지 클론의 항-D 시약이 함유된 부분-D 감별 키트로 추가로 실시하였더니 모든 클론의 시약에 동일한 반응을 보여 약-D형을 더 의심하였다. 따라서, 정확한 약-D형의 유형을 확인하기 위해 *RHD* 유전자의 10개의 엑손(1~10)과 주변부 인트론을 직접염기서열로 분석하여 weak D type 33으로 판정하였다. 환자의 가족조사는 실시되지 못하여, 가족의 혈청학적 및 유전형은 규명되지 않았다.

RhD 변이형을 검사할 경우에는 항-D 시약의 클론에 따라 상이한 결과를 보일 수도 있어 주의가 필요하다. 또한, 각종 검사법의 종류(시험관법, 원주응집법 및 microplate법 등)에 따라 다른 결과가 도출될 수도 있다. 본 증례는 microplate법을 사용하는 자동화 장비(QWALYS-3 system)의 결과만 고려했을 때는 RhD 양성으로 간주되어 발견하기 어려웠을 것이다. 하지만, 해당 의료기관은 자동화 장비 뿐 아니라 표준 시험관법을 추가

로 시행하는 검사 정책을 시행하고 있어서 본 증례를 검출할 수 있었다고 판단된다. 이러한 사례는 자동화 장비에 의해서만 RhD 혈액형 검사를 시행하여 보고할 경우 위험이 존재할 수도 있음을 시사하고 있다.

그간 보고된 약-D형의 유전형은 Rh 관련 데이터베이스(예, <http://www.rhesusbase.info/>)에 잘 정리되어 있다. 그간 동양인에서 보고된 약-D형은 일본인에서 c.960G>A, c.845G>A (*RHD**15), c.1013T>C (*RHD**01W.24) [5], 중국인에서 c.845G>A (*RHD**15) [6]이 주를 이루었으나 한국인에서는 체계적인 보고는 없이 산발적으로 1예의 weak D type 15, 2예의 weak D type 17, 1예의 weak D type 43 [7], 그리고 비강용종 제거를 위해 내원한 한국인 남자에서 새로운 *RHD* 변이형 (*RHD* 1056C>G, G353G, GenBank accession no. MF737522) [8] 등의 보고가 있었다. 본 증례에서 발견된 weak D type 33은 타이완에서 처음 보고되었으며[9], 일본인에서 낮은 빈도로 존재하였고[10], 그간 한국인에서는 보고된 바 없다. 본 증례는 보고된 증례와 동일하게 혈청학적으로 약한 D 표현형을 가지고 있으며, c.520G>A 염기서열 변이로 인해 V174M 아미노산 변이가 일어났다. 세포외 도메인에 위치한 아미노산 변이가 부분-D로 분류되고, 막관통(transmembrane) 도메인 및 세포내 도메인에 위치한 아미노산 변이는 약-D형으로 분류된다고 알려졌는데, 본 증례에서 발견된 174번 아미노산 변이는 막관통 도메인에 위치하고 있다[11,12].

RHD 유전자 검사는 RhD 변이형을 가진 환자나 공여자에게 정확한 RhD 혈액형을 규명하여 안전한 수혈을 하기 위해서다. 본 환자는 RhD 혈액형 검사가 자동화된 장비로만 이루어졌을 경우 RhD 양성으로 보고되어 RhD 양성 혈액을 수혈할 수 있었다. 하지만, 수기법에서 약한 D항원을

보여 정확한 RhD 혈액형 판정을 위해 *RHD* 유전자 검사를 실시하여 weak D type 33형으로 확인되었다. 만약, D 항원의 항원결정인자가 양적으로만 감소하고 질적인 결손이 없어 RhD 양성 혈액을 수혈 받아도 안전하다고 알려진 weak D type 1, 2, 3 그리고 Asia type DEL로 확인되었다면 RhD 양성 수혈도 안전하겠지만, 본 환자는 이들 이외의 유형이므로 D항원에 노출 시 항-D가 발생할 가능성을 고려하여 RhD 음성 혈액제제를 수혈해야 한다[1,13,14].

RHD 유전자의 변이는 아미노산 변이 혹은 스프라이싱 변화 등을 유발하여 적혈구 D항원의 표현형 약화를 유발할 수 있다. 이를 예측하기 위하여 생물정보학 분석을 실시하기도 한다. 최근 본 연구팀에 의해 혈청학적으로 약한 D 표현형을 보인 한국인 환자의 *RHD* 유전자 c.1056C>G 이 발견되었는데, 비록 아미노산 변화는 없는 동의치환이었지만, 생물정보학 분석에 의해 mRNA의 스프라이싱에 영향을 주어 표현형이 약해졌음을 예측하였다[8]. 그런데, 본 증례는 이와 달리 *RHD* 유전자의 c.520G>A 염기서열 변이로 인해 V174M 아미노산 변이가 존재하였고, 이 변이가 RhD 단백질 구조에 변성을 일으킬 가능성이 높을 것이라고 예측되었다.

요 약

RHD 유전자 검사는 RhD 혈청학적 검사를 보완하기 위해 매우 유용하다. 비록 한국인에서는 혈청학적으로 RhD 음성인 검체에서 RhD 변이형 특히, 아시아형 DEL 형을 검출하기 위해 점차 사용이 증가하고 있다. 하지만, 약한 D 표현형을 보이는 검체의 환자에서는 거의 시행되지 않는다. 본 연구팀은 약한 D 표현형을 가진 52세 여자 환자가 *RHD* 유전자의 10개 엑손 전체의 분석으로

엑손 4번에서 c.520G>A 돌연변이가 있는 weak D type 33 유형을 국내에서 최초로 발견하여 보고하는 바이다. 또한, 생물정보학 분석으로 c.520G>A 돌연변이가 적혈구 D항원의 표현형을 약화시켰을 것으로 예측하였다.

References

1. Daniels G. Variants of RhD--current testing and clinical consequences. *Br J Haematol* 2013; 161:461-70
2. Seo MH, Won EJ, Hong YJ, Chun S, Kwon JR, Choi YS, et al. An effective diagnostic strategy for accurate detection of RhD variants including Asian DEL type in apparently RhD-negative blood donors in Korea. *Vox Sang* 2016;111:425-30
3. Kim JY, Kim SY, Kim CA, Yon GS, Park SS. Molecular characterization of D- Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion* 2005;45:345-52
4. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385-93
5. Isa K, Sasaki K, Ogasawara K, Saito M, Tsuneyama H, Yabe R, et al. Prevalence of RHD alleles in Japanese individuals with weak D phenotype: identification of 20 new RHD alleles. *Vox Sang* 2016;111:315-9
6. Ye SH, Wu DZ, Wang MN, Wu XY, Xu HG, Xu H, et al. A comprehensive investigation of RHD polymorphisms in the Chinese Han population in Xi'an. *Blood Transfus* 2014;12:396-404
7. Luettringhaus TA, Cho D, Ryang DW, Flegel WA. An easy RHD genotyping strategy for D-East Asian persons applied to Korean blood donors. *Transfusion* 2006;46:2128-37
8. Chun S, Yun JW, Park G, Cho D. The synonymous nucleotide substitution RHD 1056

- C>G alters mRNA splicing associated with serologically weak D phenotype. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22330
9. Lin IL, Shih MC, Hsieh MH, Liu TC, Chang SE, Lin CL, et al. Molecular basis of weak D in Taiwanese. *Ann Hematol* 2003;82:617-20
 10. Ogasawara K, Sasaki K, Isa K, Tsuneyama H, Uchikawa M, Satake M, et al. Weak D alleles in Japanese: a c.960G>A silent mutation in exon 7 of the RHD gene that affects D expression. *Vox Sang* 2016;110:179-84
 11. Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr Opin Hematol* 2006;13:476-83
 12. Sandler SG, Chen LN, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Br J Haematol* 2017;179:10-9
 13. Choi S, Chun S, Seo JY, Yang JH, Cho D. Planned transfusion of D-positive blood components in an Asia type DEL patient: proposed modification of the Korean national guidelines for blood transfusion. *Ann Lab Med* 2019;39:102-4
 14. Shao CP. Transfusion of RhD-positive blood in "Asia type" DEL recipients. *N Engl J Med* 2010;362:472-3