

## Fisiopatologia del tessuto osseo nelle neoplasie di interesse ematologico: il modello del mieloma multiplo

Monica De Matteo, Lucia Lombardi, Cosima Quatraro, Franco Silvestris, Paola Cafforio

Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Bari

### ABSTRACT

**Bone pathophysiology in hematological tumors: the multiple myeloma model.** Bone is a dynamic tissue and undergoes continuous remodeling promoted by both osteoblasts and osteoclasts. Bone homeostasis is physiologically balanced between matrix synthesis by osteoblasts and resorption by osteoclasts, thus ensuring the function maintenance. Pathological involvement of bone during inflammatory diseases or tumors may induce osteoclast hyperactivation and concurrent derangement of osteoblast function associated to variation of serum concentrations of bone biochemical markers. Tumors with skeletal tropism generally lead to imbalance in bone metabolism induced by a number of cytokines secreted by tumor, stromal and bone cells. Recent studies suggest that the soluble receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and the macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  regulate the physiologic differentiation and activation of osteoclasts. In several tumors their altered secretion leads to hyperactive osteoclastogenesis and severe bone devastation. Multiple myeloma, a clonal plasma cell tumor, is characterized by its growth within the marrow and progressive erosion of bones by osteolytic lesions. We demonstrated that plasma cells directly secrete elevated amounts of RANKL and MIP-1 $\alpha$  and degrade soluble osteoprotegerin (OPG), a decoy receptor of RANKL thus reducing its serum concentrations. Therefore, the increase of RANKL and MIP-1 $\alpha$  may contribute to the excess of osteoclast activity. Measurements of RANKL, MIP-1 $\alpha$  and OPG as markers of the bone pathophysiology can be useful for clinical management of the skeleton derangement present in several tumors.

### INTRODUZIONE

L'osso è costituito da tessuto connettivo mineralizzato formato da una componente inorganica ricca di cristalli di idrossiapatite e da una organica rappresentata principalmente da fibre collagene. La componente cellulare del tessuto osseo è caratterizzata principalmente da due popolazioni funzionalmente distinte: gli osteoblasti (OB), presenti in varie fasi maturative, e gli osteoclasti (OC). Gli OB sono di derivazione mesenchimale e sintetizzano la matrice ossea mentre gli OC, originati dalla linea monocito-macrofagica, sono responsabili del riassorbimento osseo (1,2).

L'interazione funzionale tra questi due tipi cellulari è alla base della fisiopatologia del tessuto osseo. Quest'ultimo, infatti, è in continuo rinnovamento ed il suo rimodellamento si articola in una prima fase in cui prevale la graduale degradazione della matrice e in una seconda, in cui essa viene sostituita da tessuto osseo neoformato. In entrambe le fasi, che possono concomitare in siti diversi degli stessi segmenti ossei, intervengono numerosi fattori autocrini e paracrini.

La prima fase del rimodellamento osseo comprende la differenziazione di precursori osteoclastogenici dalla linea monocito-macrofagica a seguito della stimolazione da parte di fattori solubili tra cui "macrophage-colony stimulating factor" (M-CSF), "granulocyte macrophage-colony stimulating factor" (GM-CSF), "receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand" (RANKL) e "macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ " (MIP-1 $\alpha$ ) (2,3). Questi ultimi vengono fisiolo-

gicamente prodotti da cellule stromali e dagli OB per regolare le varie fasi del rimaneggiamento. In particolare, la differenziazione in OC è attivata dall'interazione tra le proteine di membrana "receptor activator of NF- $\kappa$ B" (RANK) e "chemokine receptor" (CCR)-1 ed i loro ligandi naturali RANKL e MIP-1 $\alpha$ , rispettivamente. A seguito di tali stimoli attivatori, gli OC immaturi si fondono tra loro dando origine a cellule multinucleate, migrano dal midollo verso l'osso, aderiscono alla superficie ossea, polarizzano e, acidificando l'ambiente osseo delimitato dalla propria membrana, dissolvono i cristalli d'idrossiapatite e degradano la matrice organica rimuovendo in primo luogo l'eccesso di Ca<sup>++</sup>.

Gli OB regolano il riassorbimento osseo inibendo l'iperattività degli OC mediante il rilascio di osteoprotegerina (OPG) e migrando nella sede di erosione in cui depositano nuova matrice ossea. OPG è una proteina capace di legarsi stabilmente a RANKL prevenendo il suo legame con RANK e pertanto impedendo l'attivazione del recettore (4). In quanto proteine solubili, RANKL ed OPG possono essere misurate nel siero. Il loro rapporto è costante nei soggetti sani mentre l'aumento di uno o dell'altro fattore è indice di disequilibrio del processo di rimodellamento osseo (5).

L'equilibrio tra riassorbimento e neodeposizione di matrice ossea è pertanto finemente regolato dalla presenza di tali fattori citochinici. Tuttavia, in corso di alcune neoplasie ad interessamento scheletrico, la loro espansione e metastatizzazione determina uno sbilanciamento del metabolismo osseo in seguito ad interazioni dirette

ed indirette con il tessuto.

Nella presente rassegna è rivisitato il significato clinico delle molecole regolatorie dei meccanismi di rimodellamento osseo alla luce di nuove acquisizioni e di studi completati presso il nostro Dipartimento, con particolare riguardo alla patogenesi della distruzione scheletrica associata al mieloma multiplo (MM).

### **RANKL E MIP-1 $\alpha$ : MOLECOLE FUNZIONALMENTE PREDOMINANTI NELLE LESIONI SCHELETRICHE TUMORALI**

La proteina RANK, membro della famiglia del "tumour necrosis factor receptor" (TNFR), è stata in principio implicata nella differenziazione dei monociti e delle cellule dendritiche e clonata per la prima volta a livello di queste cellule. Il suo ligando naturale RANKL è stato invece clonato nelle cellule T durante la ricerca di geni regolatori dell'apoptosi e denominato "tumour necrosis factor (TNF)-related activation-induced cytokine" (TRANCE) in quanto mostrava domini di analogia con membri della famiglia del TNF (6). Originariamente, il sistema RANK/RANKL è stato studiato nelle interazioni tra linfociti T attivati e cellule dendritiche; successivamente tali molecole sono state associate ai meccanismi di rimaneggiamento osseo in seguito alla dimostrazione della loro espressione da parte degli OC e OB, rispettivamente.

RANKL è una proteina transmembrana di II° tipo di circa 40-45 kD, costituita da 316 aminoacidi con un dominio citoplasmatico di 48 aminoacidi ed un dominio extracellulare di 247 aminoacidi (7). Esiste anche in una forma clivata dalla molecola nativa in seguito all'azione della proteasi "TNF- $\alpha$  converting enzyme" (TACE) in corrispondenza della porzione transmembrana (8).

Nella fisiopatologia della risposta immune, RANKL media il processo di differenziazione delle cellule T e B e la sopravvivenza delle cellule dendritiche (7), mentre a livello del tessuto osseo stimola la differenziazione, l'attività e la sopravvivenza degli OC.

L'attività funzionale di RANKL nel microambiente osseo è modulata dall'OPG. Quest'ultima molecola è un polipeptide di 401 aminoacidi con vari domini funzionali e viene considerato un "decoy-receptor" in grado di disattivare funzionalmente RANKL. La regione N-terminale è costituita da sequenze ricche in cisteina e rappresenta la porzione in grado di attivare i segnali molecolari, mentre la regione C-terminale è coinvolta nella dimezzazione della proteina.

MIP-1 è stata inizialmente identificata come chemochina coinvolta nei processi infiammatori nel topo ed esistente in due forme, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , che differiscono tra di loro a livello delle sequenze N-terminali. In seguito è stato sequenziato nell'uomo il gene *LD78* che codifica per una proteina con omologie di sequenza con il MIP-1 murino (9).

MIP-1 $\alpha$  è codificato da tre differenti geni, *LD78 $\alpha$* , *LD78 $\beta$* , *LD78 $\gamma$* , tra i quali i primi due sono responsabili della sua attivazione. I recettori con i quali la chemochina interagisce sono tre: CCR1, CCR3 e CCR5 (10). Le

prime cellule ad essere identificate come responsabili della produzione di MIP-1 $\alpha$  a funzione chemiotattica e infiammatoria sono stati i macrofagi (11). In seguito la molecola è stata isolata anche in cellule stromali e cellule staminali della linea emopoietica. Le conoscenze attuali attribuiscono un ruolo fondamentale a MIP-1 $\alpha$  nella progressione delle lesioni scheletriche di origine tumorale. MIP-1 $\alpha$  è una chemochina ad attività osteoclastogena. Viene prodotta da cellule stromali, precursori emopoietici ed osteoclastogenici (12), partecipa attivamente ad eventi fisiopatologici, tra cui la flogosi, in quanto stimola l'adesione e la chemiotassi di linfociti, monociti, polimorfonucleati, cellule dendritiche, eosinofili e cellule natural killer verso i siti flogistici (13). Nel compartimento midollare gli elevati livelli di MIP-1 $\alpha$ , conseguenti a malattie infiammatorie croniche o alla deregolata secrezione da parte di cellule stromali e precursori emopoietici, spesso presente in alcune neoplasie, consentono una accelerata differenziazione in OC di macrofagi midollari. MIP-1 $\alpha$  è, infine, un inibitore dell'emopoiesi; in particolare inibisce la differenziazione delle "colony-forming units-spleen" (CFU-S), "colony-forming units granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte" (CFU-GEMM), "colony-forming units granulocyte-macrophage" (CFU-GM), nonché delle "burst-forming unit-erythroid" (BFU-E). Tale funzione sembra avere un ruolo determinante nei pazienti sottoposti a terapie mielosoppressive (14).

Gli eventi scheletrici associati alla colonizzazione ossea da parte di varie neoplasie si presentano con particolare drammaticità in relazione alla capacità delle cellule tumorali di distruggere il tessuto osseo comportando fratture patologiche, ipercalcemia, compressione midollare e delle radici nervose (15). Questi eventi scheletrici sono costantemente caratterizzati da intensa e irriducibile sintomatologia dolorosa. Tra i tumori solidi che più facilmente metastatizzano a livello osseo vanno ricordati con frequenza decrescente il carcinoma mammario, della prostata, del polmone, della tiroide e del rene, mentre le neoplasie ematologiche che presentano un particolare tropismo scheletrico comprendono principalmente il MM ed i linfomi non Hodgkin. Le metastasi ossee si suddividono in osteolitiche e osteoaddensanti (15). Le metastasi osteolitiche sono caratterizzate dalla progressiva distruzione del tessuto osseo senza contemporanea deposizione di nuova matrice da parte degli OB; al contrario le metastasi osteoaddensanti sono caratterizzate da riassorbimento osseo seguito da eccessiva deposizione di tessuto neoformato.

Nelle metastasi osteolitiche le cellule tumorali interagiscono con altri elementi cellulari del microambiente midollare per un maggiore effetto distruttivo a discapito del tessuto osseo. Infatti, le cellule tumorali dopo adesione allo stroma con cui hanno interferenze molecolari multiple rilasciano "parathyroid hormone-related protein" (PTHrP) che stimola la maturazione dei progenitori degli OC in cellule mature nonché altri fattori osteoclastogenici. Tra questi, interleuchina (IL)-6, prostaglandina (PG) E2, TNF, M-CSF promuovono la differenziazione di precursori in OC mentre durante le fasi erosive vengono

rilasciati nell'ambiente midollare altri fattori di crescita autocrini tra cui "transforming growth factor" (TGF)- $\beta$ , "insulin-like growth factor" (IGF), "fibroblast growth factor" (FGF), "platelet-derived growth factor" (PDGF) e "bone morphogenetic proteins" (BMPs) che concorrono allo sviluppo del tumore (16).

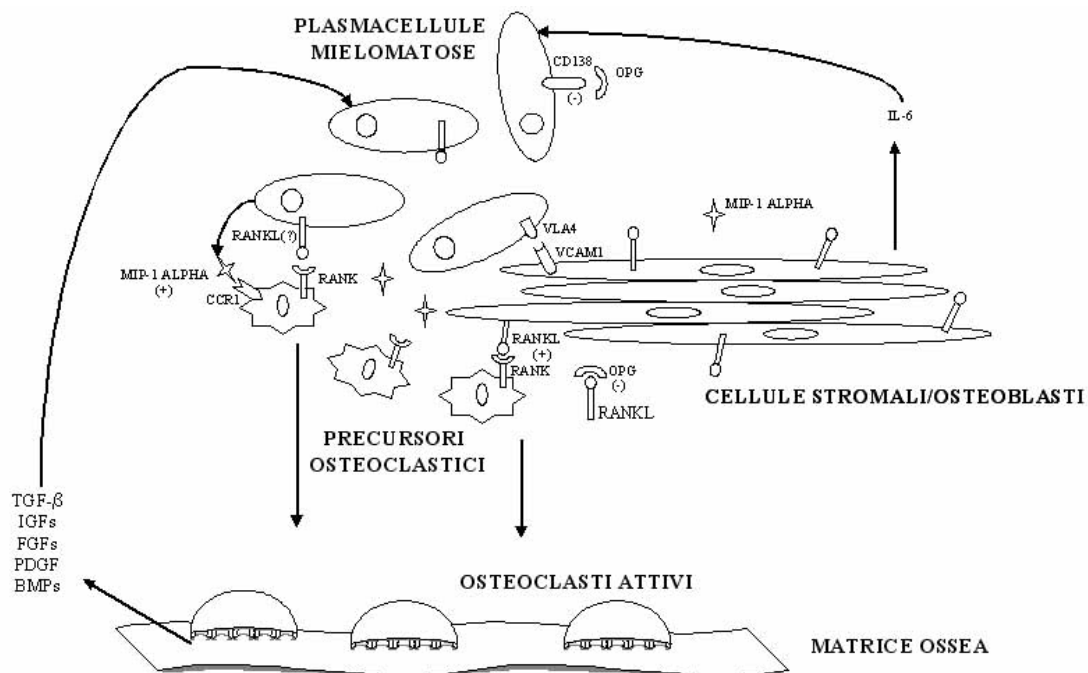
Oltre queste molecole, RANKL e MIP-1 $\alpha$  contribuiscono in maniera determinante alla progressione delle lesioni osteolitiche. Infatti, numerosi Autori hanno dimostrato mediante analisi molecolari e di espressione proteica la produzione di RANKL da parte di cellule tumorali di diversa origine, tra cui il carcinoma mammario, prostatico, polmonare e tiroideo (16). La produzione del ligando da parte del tumore comporta un eccesso di maturazione dei progenitori delle cellule ematopoietiche in OC con accentuazione dei processi erosivi nelle sedi delle metastasi e loro progressione (17). All'aumentato numero di OC non corrisponde tuttavia un parallelo aumento dell'attività osteoblastogenica in quanto le cellule tumorali inducono una drammatica riduzione del differenziamento degli OB promuovendone l'apoptosi. Tale effetto provoca anche una ridotta produzione di OPG, che si dimostra insufficiente a neutralizzare l'eccessiva concentrazione di RANKL, causando pertanto un significativo disequilibrio tra riassorbimento e nuova deposizione di tessuto osseo (15).

L'espressione di MIP-1 $\alpha$  è stata riscontrata in linee cellulari e colture primarie derivanti da pazienti affetti da leucemia acuta a cellule T (ATL), leucemia linfatica acuta (ALL) e leucemia non linfatica acuta (ANLL) (9). In

particolare, nella ATL è stata riscontrata una correlazione tra le concentrazioni sieriche di MIP-1 $\alpha$  e l'ipercalcemia (18), mentre nel linfoma a cellule B la produzione di MIP-1 $\alpha$  da parte delle cellule tumorali potrebbe essere coinvolta anche nello sviluppo di lesioni litiche nei casi ad elevata malignità (19). Nei tumori solidi, invece, è stato solo analizzato il ruolo chemotattico di MIP-1 $\alpha$ . Linee cellulari di carcinoma mammario rispondono alla chemochina che ne promuove la migrazione e ciò favorisce il fenomeno di metastatizzazione (20).

### MM E DISTRUZIONE SCHELETRICA

L'interessamento scheletrico nel MM è caratterizzato da estese lesioni osteolitiche che colpiscono in prevalenza le ossa piatte del cranio, vertebre, bacino ed ossa lunghe tra cui omero e femore e si associa frequentemente a fratture e compressione del midollo spinale. Le lesioni ossee e l'ipercalcemia sono direttamente correlate con la massa tumorale ed il loro monitoraggio viene utilizzato a fini prognostici (21). Lo sviluppo di lesioni litiche è dovuto in parte all'interazione delle plasmacellule mielomatose con la matrice ossea ed in particolare con le cellule stromali, che vengono stimolate a produrre fattori osteoclastogenici (22). Inoltre le cellule mielomatose sono in grado di attivare direttamente gli OC provocandone il differenziamento mediante il rilascio di vari fattori osteoclastogenici nell'ambiente midollare tra cui, ancora una volta, RANKL e MIP-1 $\alpha$  (Figura 1) (23).



**Figura 1**  
 Meccanismo di feedback autocrino plasmacellule/cellule stromali. Le cellule mielomatose up-regolano RANKL e MIP-1 $\alpha$  e down-regolano OPG a livello delle cellule stromali e degli osteoblasti attraverso l'interazione cellula-cellula. Lo sbilanciamento RANKL/OPG in favore di RANKL e l'aumento della concentrazione di MIP-1 $\alpha$  nel microambiente midollare favoriscono l'attivazione dei precursori osteoclastici e l'erosione ossea.

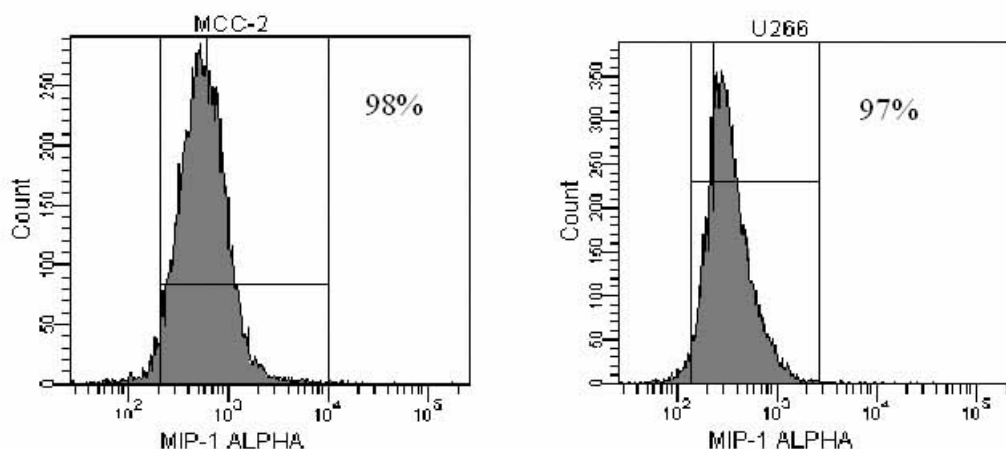
Recentemente sono stati descritti nuovi meccanismi patogenetici dell'anemia e delle lesioni osteolitiche in corso di MM. Plasmacellule ad elevata malignità biologica sono in grado di indurre a loro volta apoptosi in elementi cellulari sensibili, quali gli eritroblasti e gli OB, determinando una riduzione di questi precursori a livello midollare. La mancata maturazione eritroblastica è causa di grave anemizzazione mentre l'apoptosi osteoblastica contribuisce ad alterare l'equilibrio fisiologico tra neodeposizione di tessuto osseo e riassorbimento durante i fenomeni di rimaneggiamento osseo. Inoltre, le plasmacellule mielomatose neutralizzano l'OPG nell'ambiente midollare, dapprima legando la molecola all'eparan-solfato del "syndecan-1" (CD138), recettore espresso sulla propria membrana e successivamente internalizzandola e degradandola (24). La neutralizzazione funzionale di OPG comporta di riflesso un aumento della concentrazione midollare e sierica di RANKL che contribuisce ulteriormente all'attivazione di precursori osteoclastici. L'alterato rapporto RANKL/OPG osservato nei pazienti con grave malattia ossea (25) correla con il numero di lesioni osteolitiche e con le concentrazioni sieriche di "tartrate-resistant acid phosphatase" (TRACP)-5b.

Come già accennato, MIP-1 $\alpha$  viene prodotta direttamente dalle plasmacellule maligne. Alcune recenti analisi completate presso il nostro laboratorio mediante citometria a flusso hanno confermato l'espressione di MIP-1 $\alpha$  su linee cellulari mielomatose. Data la localizzazione citoplasmatica di questa chemochina, le cellule sono state dapprima fissate con paraformaldeide al 4% e permeabilizzate con digitonina (100  $\mu$ g/mL) e, successivamente, incubate con un anticorpo monoclonale specifico anti-MIP-1 $\alpha$  coniugato con ficoeritrina (PE). Lo studio, condotto sia su linee cellulari commerciali (U266, RPMI 8226) che su una linea in coltura presso il nostro laboratorio (MCC-2), ha evidenziato una pressoché totale espressione di MIP-1 $\alpha$  (~98%) da parte delle popolazioni plasmacellulari analizzate (Figura 2) (26).

Per le sue caratteristiche di chemochina osteoclastogena, le concentrazioni circolanti di MIP-1 $\alpha$  correlano generalmente con il numero delle lesioni osteolitiche, con le concentrazioni sieriche di  $\beta_2$ -microglobulina e quelle della deossipiridolina urinaria, marcatore biochimico di riassorbimento osseo (27). In un nostro recente studio è stata descritta una correlazione significativa tra concentrazioni sieriche di MIP-1 $\alpha$  e marcatori di riassorbimento osseo quali N-telopeptide del collagene di tipo I e TRACP-5b, prodotti solo da OC attivati (26,28). In particolare, in un gruppo di pazienti con MM abbiamo studiato le concentrazioni sieriche di RANKL, OPG e MIP-1 $\alpha$ . Il dosaggio mediante metodica ELISA di MIP-1 $\alpha$  ha evidenziato una maggiore espressione della proteina in forma solubile nei pazienti in prime diagnosi non trattati ( $476 \pm 44,6$  ng/L; n=3) rispetto a pazienti con malattia in remissione ( $111 \pm 20,4$  ng/L; n=7) ( $P < 0.005$ ). Anche le concentrazioni sieriche di RANKL sono risultate significativamente ( $P < 0.003$ ) aumentate nei pazienti in prima diagnosi ( $516 \pm 36,2$  ng/L; n=3) rispetto a quelli in remissione ( $93 \pm 12,5$  ng/L; n=7). Il dosaggio delle concentrazioni sieriche di OPG ha invece evidenziato un aumento nei pazienti con malattia in remissione ( $212 \pm 15,7$  ng/L) rispetto a pazienti in prima diagnosi ( $58 \pm 2,5$  ng/L) ( $P < 0.0001$ ) (26).

## Conclusioni

La fisiopatologia del tessuto osseo è argomento di crescente interesse da parte di numerosi gruppi di ricerca. Questo tessuto è caratterizzato dalla presenza di diversi tipi cellulari che interagiscono con la matrice extracellulare ricca di componenti organiche ed inorganiche e partecipano ai processi fisiologici del rimodellamento. Tale processo viene drammaticamente alterato in alcune neoplasie capaci di colonizzare lo scheletro. In particolare, nel MM il clone neoplastico, per favorire la propria espansione nell'ambiente midollare, produce fattori che attivano i precursori osteoclastici e quindi il rias-



**Figura 2**

Espressione citoplasmatica di MIP-1 $\alpha$  in linee cellulari mielomatose. L'analisi citofluorimetrica evidenzia l'elevata espressione di MIP-1 $\alpha$  in una linea cellulare isolata da un paziente con lesioni osteolitiche multiple (MCC2) (~98%) e nella linea commerciale U266 (~97%).

sorbimento osseo, comportando una condizione di grave fragilità scheletrica per il difetto quantitativo di sali minerali, in particolare calcio e fosfato.

L'identificazione del sistema RANKL/OPG ha permesso di chiarire alcuni punti essenziali nella fisiopatologia dell'osso in corso di neoplasie ad interessamento scheletrico. Studi condotti sul carcinoma mammario e sul MM hanno infatti dimostrato che le cellule tumorali stimolano la produzione di RANKL da parte delle cellule stromali, mentre inibiscono quella dell'OPG in modo da favorire l'attivazione persistente degli OC e la distruzione del tessuto osseo. Le stesse plasmacellule mielomatose, caratterizzate dalla capacità di espandersi nell'ambiente midollare, producono RANKL e MIP-1 $\alpha$ .

Nel MM la determinazione nel siero di RANKL, OPG e MIP-1 $\alpha$  ha evidenziato una diretta correlazione della loro espressione con le fasi di malattia. In particolare, queste proteine solubili permettono di valutare precocemente il danno osseo o la sua evoluzione anche in relazione alle terapie effettuate e potrebbero quindi essere utilizzate nella stadiazione della malattia a fini prognostici.

Infine, tali chemochine potrebbero in futuro diventare un interessante bersaglio per lo sviluppo di nuove terapie al fine di controllare il fenomeno dell'osteoclastogenesi. Infatti, recenti studi eseguiti su modelli murini hanno dimostrato come l'utilizzo di OPG ricombinante o di RANKL-Fc riduca la progressione delle metastasi osteolitiche neutralizzando RANKL.

## Bibliografia

- Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-4.
- Väänänen K, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000;113:377-81.
- Scheven BA, Milne JS, Hunter I, Robins SP. Macrophage-inflammatory protein-1 $\alpha$  regulates preosteoclast differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:773-8.
- Roodman GD. Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3562-71.
- Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, et al. Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol* 2003;163:2021-31.
- Wong BR, Josien R, Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 1999;65:715-24.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175-9.
- Willard D, Chen WJ, Barrett G, et al. Expression, purification, and characterization of the human receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) extracellular domain. *Protein Expr Purif* 2000;20:48-57.
- Yamamura Y, Hattori T, Obaru K, et al. Synthesis of a novel cytokine and its gene (LD78) expressions in hematopoietic fresh tumor cells and cell lines. *J Clin Invest* 1989;84:1707-12.
- Blum S, Forsdyke RE, Forsdyke DR. Three human homologs of murine gene encoding an inhibitor of stem cell proliferation. *DNA Cell Biology* 1990;9:589-602.
- Oyajobi BO, Franchin G, Williams PJ, et al. Dual effects of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  on osteolysis and tumor burden in the murine 5TGM1 model of myeloma bone disease. *Blood* 2003;102:311-9.
- Watanabe T, Kukita T, Kukita A, et al. Direct stimulation of osteoclastogenesis by MIP-1 alpha: evidence obtained from studies using RAW264 cell clone highly responsive to RANKL. *J Endocrinol* 2004;180:193-201.
- Di Pietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1 $\alpha$  as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest* 1998;101:1693-8.
- Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol* 1999;27:1113-23.
- Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004;350:1655-64.
- Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:49-57.
- Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kühne CA, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003;101:2094-8.
- Okada Y, Tsukada J, Nakana K, et al. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  induces hypercalcemia in adult T-cell leukemia. *J Bone Miner Res* 2004;19:1105-11.
- Matsushashi Y, Tasaka T, Uehara E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma presenting with hypercalcemia and multiple osteolysis. *Leuk Lymphoma* 2004;45:397-400.
- Youngs SJ, Ali SA, Taub DD, Rees RC. Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1997;71:257-66.
- Roodman GD. Mechanisms of bone lesion in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer* 1997;80:1557-63.
- Giuliani N, Colla S, Morandi F, Rizzoli V. The RANK/RANK ligand system is involved in interleukin-6 and interleukin-11 up-regulation by human myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Haematologica* 2004;89:1118-23.
- Mundy GR, Raisz LG, Cooper RA. Evidence for the secretion of an osteoclast-stimulating factor in myeloma. *N Engl J Med* 1974;291:1041-6.
- Barillé-Nion S, Barlogie B, Bataille R, et al. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003;1:248-78.
- Giuliani N, Colla S, Rizzoli V. New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: focus on the receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL). *Exp Hematol* 2004;32:685-91.
- Silvestris F, Lombardi L, De Matteo M, Bruno A, Dammacco F. Myeloma bone disease: pathogenetic mechanisms and clinical assessment. *Leuk Res* 2007;31:129-38.
- Hashimoto T, Abe M, Oshima T, et al. Ability of myeloma cells to secrete macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  correlates with lytic bone lesions in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004;125:38-41.
- Terpos E, Politou M, Viniou N, Rahemtulla A. Significance of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 $\alpha$ ) in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2005;46:1699-707.