糖鎖高分子ベシクルの設計と DDS ナノファクトリーとしての機能

京都大学大学院 工学研究科 高分子化学専攻*

西村智貴*・秋吉一成*

Design of glyco polymer vesicles and their function as DDS nanofactories

The development of drug delivery systems (DDS) that enable encapsulation of drugs, selective delivery to target tissues or organs, and release of drugs has improved therapeutic effect and reduced side effects. Although these conventional DDSs have valuable therapeutic effects, their effects are limited. Different approaches to the development of novel DDSs are hence desirable. Concepts such as DDS nanofactories are therefore attracting much attention. DDS nanofactories combine the features of nanoreactors and delivery carriers. They can produce drugs or transform toxic compounds into harmless compounds at disease sites. Here, we described the required features of DDS nanofactories and the characteristics of the molecular permeable glyco polymer vesicles and their functions as a DDS nanofactory.

さまざまなナノ粒子を用いたドラッグデリバリーシステム(DDS)の発展により、薬効の向上や副作用の低減を実現させてきた。近年、薬剤を送達するという従来型の DDS ではなく、酵素などにより物質を変換する機能を有するナノデバイスを患部に送達し、疾患部位で薬剤をつくり出したり、不要な分子を除去して治療を行う概念(DDS ナノファクトリー)が注目されつつある。本稿では、この DDS ナノファクトリーの特徴と設計指針について言及した後に、筆者らが開発した糖鎖高分子ベシクルの特性と機能、そして DDS ナノファクトリーとしての応用に関して概説する。

Tomoki Nishimura*, Kazunari Akiyoshi*

Keywords: DDS nanofactory, Polymer vesicle, Molecular permeability

1. はじめに

薬剤を安全かつ、効率的に体内の標的部位に送達するドラッグデリバリーシステム(DDS)は、薬物治療における重要な研究分野として発展している。DDS において、薬剤を効率よく封入し、目的の場所に届けられることができる運搬体(キャリア)の開発が最も重要である。精密な化学合成技術の進展はもとより、近年のナノテクノロジーの進展から、リン脂質からなるリポソームや、高分子ミセル、デンドリマー、ナノゲル、薬物を抗体に付加した抗体薬物複合体など、さまざまなナノ DDS キャリアが開発されてきた。そのなかには、臨床応用に至っているも

のもあり、リポソーム製剤である Doxil のようにすでに医薬品として認可され、広く治療に使われている。

一方、従来の DDS とは異なるアプローチで、薬剤を疾患部位で産生したり、不要な分子を無害な分子に変換する新たな DDS(本稿では DDS ナノファクトリーと呼ぶ)が、近年注目を集めつつある。治療用ナノファクトリーとしての DDS ナノファクトリー開発においては、酵素などの触媒系を安定に保持できるキャリアが求められ、また、そのキャリア内部に基質を供給できる機能も必要不可欠である。このように、DDS ナノファクトリーでは、求められるキャリアの機能が従来型キャリアとは異なるため、新たなコンセプトのキャリア設計が必要となる。本稿では、このような DDS ナノファクトリーの概

* Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

念とその構築に求められる条件を概説し、筆者らが開発した分子透過性高分子ベシクルを用いた DDS ナノファクトリーへの応用例について紹介する。

2. DDS ナノファクトリーとは

1980年代中頃から、抗がん剤がもたらす強い副作用を低減させるために、抗がん剤を投与するのではなく、抗がん剤のプロドラッグと酵素を組み合わせ投与する酵素-プロドラッグ療法(Enzyme-prodrug therapy : EPT)が試みられている。最も初期の例として、Nishiyama らは、透析バッグの中に Cytosine deaminase を封入し、インプラント可能なデバイスとして作成し、担がんマウス皮下に移植した。その後、5-fluorocytosine を投与すると、Cytosine deaminase により 5-fluorouracil が産生されることで、がんの成長が抑制されることを報告している¹⁾。この研究を発端として、その後、さまざまな EPT が報告されている²⁾。例えば、より薬効を高めるために、酵素をポリマーに修飾し、静脈注射が可能なポリマー修飾酵素-プロドラッグ療法(Polymer-directed enzyme-prodrug therapy : PDEPT)³⁾や、疾患部位への指向性を高めた抗体修飾酵素-プロドラッグ療法(antibody-directed enzyme prodrug therapy : ADEPT)⁴⁾などが開発されている。

しかし、いずれの手法も、酵素を高分子や抗体に修飾するために化学修飾に伴う酵素の活性低下が問題となる。そのようななかで、2005年に Gelder らは、上記とは異なる EPT コンセプトである治療用ナノリアクター(therapeutic nanoreactor)を報告している^{5,6)}。彼らは、酵素の安定性を高めるため、酵素を高分子ベシクルに封入した。また、後述するように高分子ベシクルは、分子透過能が低いいため、基質であるプロドラッグを高分子ベシクル内に供給できるようにチャンネル型膜タンパク質を高分子ベシクルに組み込んだ。これにより酵素の安定性を向上させつつ、分子を外部から供給しえるコンパートメントの作成に成功している。

このような背景のなかで、さらなる治療効果を求めて医学・工学・化学などのさまざまな研究者

からなるワーキンググループによって、2007年に疾患部位で疾患をもたらす分子を除去したり、生体内にある分子やプロドラッグなどを変換することのできるナノデバイス(artificial cell や pseudo-cell factory)により治療を行う“*in vivo* biologically inspired nanofactory”の概念が提案された⁷⁾。疾患部位で薬剤産生や代謝を行うことができるため、優れた治療効果と低い副作用が期待されている。

上述のワーキンググループでは、この系を設計する上で、以下の要件が必要不可欠であると述べている(図1)。

- シェルをもつコンパートメント(例えば、リボソーム)であること
- コンパートメント内部に分子を変換可能な分子機械、触媒(酵素など)を封入できること
- 酵素基質などの分子をコンパートメント内部に供給可能であること
- 疾患部位へのターゲティング能があること
- 治療が不要となれば、外部刺激によってキャリアを崩壊しえること

現在では、酵素などを封入しえるコンパートメントとして、リン脂質・合成脂質からなる脂質ベシクル、両親媒性高分子からなる高分子ベシクルのみならず、ポリイオンコンプレックスからなる高分子ベシクル、Layer-by-Layer を利用した高分子カプセル、メソポーラスシリカ粒子、酵素を高分子で被覆した酵素ナノカプセル、ウイルスカプシドなどが報告されている⁸⁾。一方で、分子をコンパートメントに供給しえる機能を付与することは、極めて困難で

図1 DDS ナノファクトリーに求められる要件

あり、概念の提案当初からの課題であった。ポリイオンコンプレックス高分子ベシクル⁹⁾や Layer-by-Layer 型高分子カプセル¹⁰⁾は、水溶性低分子の物質透過性は比較的よいものの、比較的古くから生体親和性の高いコンパートメント、人工細胞として広く用いられているリン脂質ベシクルや、力学的強度に優れた高分子ベシクルは、分子透過性が著しく低く、DDS ナノファクトリーのコンパートメントとして用いるには、透過性の向上が必要不可欠であった。

筆者らは、高い分子透過性を固有の性質としてもつ高分子ベシクルを新たに開発し、その分子透過能を利用してがん治療を指向した DDS ナノファクトリーへの応用を行った。また、透過性を向上させる両親媒性高分子中の疎水性セグメントの探索を行ってきたので、以下ではこれらの分子設計に関しても合わせて紹介する。

3. 分子透過性高分子ベシクルの設計と DDS ナノファクトリーとしての機能

3-1. 糖鎖高分子ベシクルの設計とその DDS 応用

高分子ベシクルを発展させた Eisenberg や Discher らは、分子透過能は、高分子ベシクルを形

成する高分子の分子量に依存して、減少すると指摘している¹¹⁾。分子の透過速度が、単純な濃度勾配に比例する Fick の一次則に従うと仮定すれば、二分子膜の厚みに反比例し、透過能は減少する¹²⁾。したがって、二分子膜がリン脂質に比べて厚い高分子ベシクルは、分子透過能が著しく低くなる。

このようななかで、筆者らは、Maltopentaose や Maltotriose などのオリゴ糖を親水性セグメントとして、また、温度応答性を示す Poly(propylene oxide) を疎水性セグメントとして有する両親媒性高分子が、水溶液中で自己組織的に会合し、高分子ベシクルを形成することを見出した(図2)¹³⁾。この高分子は、リン脂質ベシクルの作成時と同様に、高分子フィルムを水和させた後、超音波をかけることにより、サイズの揃った高分子ベシクルを形成させることができる。また、Poly(propylene oxide) が、水溶液中で下限臨界溶液温度(LCST)を示すことから、高分子を水溶液に加えた後に、冷却することで、すべての高分子を水溶液中に溶解させることができる。その後、高分子溶液を LCST 以上で静置することによって、容易に高分子ベシクルを形成させることができる点が特徴である。通常の両親媒性高分子は、DMSO や DMF などの極性有機溶媒に溶

図2 Carbohydrate-*b*-Poly(propylene oxide) ブロックコポリマーの自己組織化による分子透過性高分子ベシクルの形成

図3 Maltopentaose-*α*-Poly(propylene oxide) が形成する高分子ベシクルの放射光 SAXS による構造解析

a) Maltopentaose-*α*-Poly(propylene oxide) 溶液からの SAXS プロファイルおよび二分子膜モデルが与える理論曲線。b) 理論式から予想される二分子膜の模式図。

解させたストック溶液を、水溶液中に添加することにより自己組織化体を形成させるが、本手法では、生体に有害な有機溶媒を必要とせず、単純な冷却・昇温することにより高分子ベシクル溶液を調製できる。さらに、二分子膜が柔らかいために、エクストルーダーによって、自在にサイズおよびその分布を制御できる点も特徴である。

ベシクルの構造上の特徴である二分子膜形成の確認とその厚みを計測するために、放射光 X 線を用いた小角 X 線散乱法を用いて散乱プロファイルを解析したところ、多層のベシクルを形成することなく、単層の二分子膜を形成することが明らかになった。例えば、五糖のマルトペンタオースと重合度 43 の Poly(propylene oxide) からなる高分子では、マルトペンタオース層の厚みが 2.0 nm、Poly(propylene oxide) 層の厚みが 9.4 nm からなる膜厚 13.4 nm の二分子膜を形成する(図3)。また、糖鎖および Poly(propylene oxide) の重合度を変化させることにより、8.0 から 19.5 nm の間で、自在に膜の厚みを変化させることも可能である。

ベシクルは、二分子膜により区画化された分子集合体であり内水相を有する。したがって、親水性の化合物を、その内部に保持できる。そこで、筆者らが開発した高分子ベシクルに対して、種々の親水性化合物(タンパク質や蛍光色素)の内包能を評価した。その結果、興味深いことに、タンパク質(FITC 修飾 BSA)などの分子量の大きな化合物は、安定に

図4 透析過程での種々の分子量の FITC-PEG および FITC-BSA の高分子ベシクルからの放出プロファイル

保持されるのに対し、フルオレセインやローダミンといった水溶性の低分子は、保持されないことが判明した。この現象を詳細に調べるため、さまざまな分子量の FITC 修飾ポリエチレングリコール(FITC-PEG)または、FITC-BSA をベシクルに内包し、透析過程での放出挙動を調べた(図4)。その結果、分子量 5000 の FITC-PEG や FITC-BSA (分子量 66 K) は、ほぼ放出されないのに対し、それ以下の分子量の FITC-PEG は放出されることがわかった。さらに、その放出速度は、PEG の分子量に依存し、分子量が小さくなるほど速やかに放

図5 Maltopentaose- α -Poly(propylene oxide)ベシクルの酵素反応場としての機能

a) β -galactosidase 内包高分子ベシクルによる酵素反応の模式図。b) TokyoGreen に由来する蛍光スペクトル強度の時間変化。

出されることが明らかになった。これらの結果から、筆者らの開発した高分子ベシクルが、分子量依存的な分子透過性を有することを見出した。さらに、この分子透過の機構を明らかにするため、水/Poly(propylene oxide) からなる二相系における Poly(propylene oxide) 層への FITC-PEG の分配係数を調べたところ、FITC-PEG は、Poly(propylene oxide) 層に極めてよく分配されることがわかった。また、その分配係数は、FITC-PEG の分子量に依存し、分子量が小さくなるほど高くなることも明らかとなった。この傾向は、上述の FITC-PEG の透過における分子量依存性とよく相関することから、透過する分子の Poly(propylene oxide) 層への分配が、主要な要因であると考えられる。このように親水性化合物が、Poly(propylene oxide) 層へ分配されたのは、Poly(propylene oxide) が、LCST 以上であっても部分的に弱く水和していることが原因と考えられる。実際に、中性子散乱法から得られたベシクル溶液の散乱プロファイルを解析したところ、二分子膜中の疎水領域に水を含むことが明らかになりつつある。

筆者らは、上記のように高分子は保持し、低分子は透過させる高分子ベシクルの性質を利用す

ることで、外部から基質が供給できる酵素反応場として機能するのではないかと考えた。そこで、 β -galactosidase を高分子ベシクル内に内包させ、非蛍光性の基質である TokyoGreen- β -gal¹⁴⁾ を添加したところ、基質添加直後から、加水分解産物由来の蛍光シグナルが増加した(図5)。これらの結果は、基質が二分子膜を透過し、内水相にある β -galactosidase により加水分解を受けたことを意味する。また、この際、ベシクル外水相には、加水分解酵素である Proteinase K を加えているにも関わらず、 β -galactosidase が活性を保持していることから、分子量の大きい Proteinase K はベシクル内水相に移行できず、高分子ベシクルが β -galactosidase を保護していると考えられる。 β -galactosidase のみならず、chymotrypsin や horse radish peroxidase などの酵素を用いても、種々の基質を透過させ、酵素反応を進行させた。この実験結果より、筆者らの開発した高分子ベシクルは、基質を外部から供給しえる酵素反応場として機能することを明らかにした。

次に、より複雑な環境下である細胞内においても、酵素反応場として機能しえるか評価を行った。ここでは、細胞への取り込み能を高めるために、

細胞透過性ペプチドである TAT ペプチドを Poly (propylene oxide) に修飾したポリマーと上述の糖鎖ポリマーを混合し、TAT ペプチドを表面に提示した高分子ベシクルに、 β -galactosidase を内包させた(図6 a)。その TAT 提示高分子ベシクル溶液を HeLa 細胞に添加したところ、主にマクロピノサイトーシス経路により細胞に速やかに取り込まれ、後期エンドソームやライソソームへと移行することが判明した。細胞内への取り込みを確認した後に、抗がん剤である Doxorubicin にガラクトースを修飾したプロドラッグを細胞に添加したところ、極めて顕著な細胞毒性を示した(図6 b)。Doxorubicin のプロドラッグのみを投与した系では、ほぼ細胞毒性を示さなかったことから、細胞内に存在する β -galactosidase 内包高分子ベシクルにより加水分解を受け、Doxorubicin へと変換されたことで細胞

毒性を示したと考えられる。これらのことから、筆者らが開発した高分子ベシクルは、細胞内においても酵素反応場として機能することを明らかにした。

さらに、筆者らは高分子ベシクルが酵素反応場として機能することを活かし、生体内、特に腫瘍周囲で抗がん剤のプロドラッグを変換し、抗がん剤を産生する DDS ナノファクトリーとしての応用を試みた(図7 a)。CT26 担がんマウスに、 β -galactosidase 内包高分子ベシクルを尾静脈より投与すると、EPR 効果によるものと思われる腫瘍への集積が認められた。ベシクルを投与して24時間後に、Doxorubicin のプロドラッグを投与すると、ベシクル単体やプロドラッグ単体の投与に比べ有意に腫瘍成長が抑制された(図7 b)。また、Doxorubicin を投与したマウス群は、顕著な体重減少が見られたのに対し、ナノファクトリーシステムでは、そのような体重減少

図6 Maltopentaose-c-Poly(propylene oxide)ベシクルの細胞内での酵素反応場としての機能評価

a) β -galactosidase 内包 TAT 提示高分子ベシクルによる細胞内でのプロドラッグの活性化の模式図。

b) β -galactosidase 内包 TAT 提示高分子ベシクルによる Doxorubicin プロドラッグの活性化評価。

図7 Maltopentaose-*b*-Poly(propylene oxide)ベシクルのDDS ナノファクトリーとしての機能

a) β -galactosidase 内包高分子ベシクルによる腫瘍周囲でのドキソルビシンプロドラッグの活性化の模式図。

b) β -galactosidase 内包高分子ベシクルによるドキソルビシンプロドラッグの活性化による抗腫瘍効果。Group 2では、毒性に伴うマウスの死亡および安楽死指標まで体重が減少したことにより実験を途中で中止した。

や急性の肝臓、腎臓、心毒性などは観察されなかった。このことから、筆者らの開発した分子透過性高分子ベシクルに酵素を内包することで、腫瘍周囲で抗がん剤プロドラッグを変換し抗がん剤を放出するDDS ナノファクトリーとして機能することを明らかにした。また本手法は、従来の抗がん剤に比べ、副作用が低いことから、より安全ながん治療法としての応用が期待できる。

3-2. どのような疎水性セグメントが分子透過性を向上させるのか

上述のように糖鎖-Poly(propylene oxide)からなる両親媒性高分子は、極めて高い分子透過性を有する二分子膜を形成する。では、どのような高分子が、分子透過性を示すのであろうか。Poly(propylene oxide)では、LCST 以上であっても弱く水和しており、部分的に親水的な環境となっていたため、高い分子透過性を示したと推察している。また、R. O'reilly らは、PEG-*b*-Poly(2-hydroxypropyl

methacrylate) からなる分子透過性高分子ベシクルを報告しており、その分子透過能はPoly(hydroxypropyl methacrylate)の水和によるものと述べている^{15,16)}。上記のいずれの高分子中の疎水性セグメントも、水溶液中でLCSTを示すことが知られており、水和可能な水素結合ドナーまたはアクセプターを有する。このような背景のもと、筆者らはこれらの高分子と同様にLCSTを示す高分子が、分子透過能を高めることができるのではないかと考えた。そこで、生体適合性に優れ、水溶液中で35~40度付近にLCSTを示すPoly(*n*-propyl oxazoline)¹⁷⁾に着目し、糖鎖を親水性セグメントとする両親媒性糖鎖高分子を設計した¹⁸⁾。なお、poly(*n*-propyl oxazoline)からなる疎水性セグメントでは、LCSTが体温以上と予想されることから、ここでは、poly(*n*-propyl oxazoline)からなるセグメントに、疎水的なpoly(phenyl oxazoline)セグメントをもつ両親媒性糖鎖高分子を合成した(図8a)。

得られた両親媒性糖鎖高分子をリン酸緩衝液

図8 Maltotriose- β -Poly(2-oxazoline) の自己組織化

- a) Maltotriose- β -Poly(2-oxazoline) の化学構造式。
 b) Maltotriose- β -Poly(2-oxazoline) 分散液の TEM 像。
 c) 静置水和法により得られたジャイアントベシクルの共焦点顕微鏡像。

(pH=7.4) に分散させ、動的光散乱測定を行ったところ、流体力学的直径150 nm前後の粒子の存在が確認された。また、その溶液を電子顕微鏡により観察すると、粒径150~200 nm程度のベシクル様の集合体が存在することがわかった(図8 b)。また、高分子フィルムを純水で水和させるとマイクロメートルオーダーのジャイアントベシクルを生成した(図8 c)。

次いで、このジャイアントベシクル溶液を用いて、高分子ベシクルの分子透過能の評価を行った。種々の分子量の FITC-PEG をジャイアントベシクル溶液に添加し、ベシクル内部の FITC 由来の蛍光強度を共焦点顕微鏡にて観察した(図9)。その結果、分子量550の FITC-PEG では、添加直後から FITC 由来の蛍光が徐々にベシクル内水相で強まり、添加2時間後には、外液の半分程度の蛍光強度となった。また、FITC-PEG の分子量が大きくなるにつれて、ベシクル内部の蛍光強度は低下し、分子量2000の FITC-PEG では、ベシクル内部で蛍光は観察されなかった。このことから poly(n -propyl oxazoline) からなる二分子膜ベシクルも分子量依存的な分子透過能を示すことが明らかとなった。

この分子透過をもたらし要因を調べるために、Maltopentaose- β -Poly(propylene oxide) ベシクル、および Maltotriose- β -Poly(2-oxazoline) ベ

図9 Maltotriose- β -Poly(2-oxazoline) からなる高分子ベシクル内水相への FITC-PEG の透過挙動
 スケールバー : 10 μ m。

シクルの二分子膜中の疎水領域の極性を Pyrene の蛍光スペクトルを用いて評価を行った。その結果、透過性の高い高分子ベシクルはいずれも I_1/I_3 の値が1.3であった。一方で、透過性が低い Dipalmitoyl phosphatidyl choline/dipalmitoyl phosphatidylglycerol リポソームでは0.9~1.0程度の値をとることが報告されており¹⁹⁾、分子透過を示す高分子ベシクルは、リポソームに比べいずれも極性の高い環境にあることがわかった。Poly(propylene oxide)、Poly(n -propyl oxazoline) は、いずれも水素結合ドナーまたはアクセプターを有しているために適度に水和可能な環境が存在しえるため、比較的親水性の分子の透過が可能となったものと考えられる。

4. まとめと展望

DDS ナノファクトリーの提案時には、構築する上で最も達成困難な課題は、分子を外部から供給する機能の付与にあるといわれていた。しかし、この5年で、さまざまな分子透過能をもつコンパートメントが開発されつつある。例えば、pH に応答して膜透過性を向上させる高分子ベシクル²⁰⁾、取り扱いが困難な膜タンパク質の代わりに核酸で作成した人工チャネルを用いた系²¹⁾も報告されている。筆者らは、二分子膜の疎水領域を完全に疎水的な環境にするのではなく、水和可能な高分子を用いて、適度に

水が存在できる環境をつくることで、分子透過性を示す高分子ベシクルが設計可能であるという新しい概念を提唱した。また、この分子透過性を生かして、細胞内や腫瘍周囲といった複雑な環境下で、プロドラッグを抗がん剤へと変換しえる DDS ナノファクトリーとして機能することを見出した。このように、二分子膜の疎水領域に部分的に水和をもたらすことは、従来の低分子脂質二分子膜系では実現が難しく、両親媒性高分子ベシクルの大きな特徴である。両親媒性高分子の構造をさらに設計することで、pH、酸化還元など刺激応答的で、より選択的な分子透過を可能とする高分子ベシクルの構築も可能である。さらに、DDS ナノファクトリーに必要とされるターゲットティング能や刺激応答による分子集合体の崩壊などの要件は、これまでのさまざまな DDS キャリアの開発ですでに数多くの例が報告されている。したがって、これらのシステムを、分子透過能をもつコンパートメントに導入することで、さまざまな機能をもった DDS ナノファクトリーを構築できると考えられる。その一方で、酵素のコンパートメントへの内包効率が低いことや内包されていない酵素な

どの除去が容易ではないなどといった基礎的な課題も存在し、解決すべき点も残されている。

DDS ナノファクトリーは、プロドラッグの変換による治療のみならず、細胞内、生体内の特定の分子を変換することで、蛍光などのシグナルを出力できるシステムを構築することで、センシングやイメージングなどの応用も可能である。また、近年では、酵素の基質選択性や反応速度に匹敵する人工酵素(ナノザイム)や金属・有機触媒などの開発も進んでおり²²⁾、これらを活用することで、DDS ナノファクトリーの利用範囲は広がると予想される。実際に、DDS ナノファクトリーによる治療応用例も増えつつあり、がん治療への応用のみならず²³⁾、緑内障²⁴⁾や神経因性疼痛²⁵⁾、アルコールの解毒²⁶⁾などの治療に向けた報告がある。

DDS ナノファクトリーは、目的に応じてコンパートメントの種類と機能ならびに内包する触媒・酵素の組み合わせを変化させることで、治療からセンシング・イメージングまでさまざまな応用が可能であり、今後の新たな医療技術の開拓につながっていくことを期待している。

文献

- 1) Nishiyama, T., *et al.*, *Cancer Res.*, **45**, 1753-1761 (1985)
- 2) Walther, R., *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **118**, 65-77 (2017)
- 3) Satchi-Fainaro, R., *et al.*, *Bioconj. Chem.*, **14**, 797-804 (2003)
- 4) Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, **56**, 531-532 (1987)
- 5) Huysmans, G., *et al.*, *J. Control. Release*, **102**, 171-179 (2005)
- 6) Ranquin, A., *et al.*, *Nano Lett.*, **5**, 2220-2224 (2005)
- 7) LeDuc, P.R., *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **2**, 3-7 (2007)
- 8) Nishimura, T., *et al.*, *Adv. Sci.*, **5**, 1800801 (2018)
- 9) Koide, A., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5988-5989 (2006)
- 10) Antipov, A.A., *et al.*, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **111**, 49-61 (2004)
- 11) Discher, D.E., *et al.*, *Science*, **297**, 967-973 (2002)
- 12) Le Meins, J.F., *et al.*, *Eur. Phys. J.E. Soft matter.*, **34**, 14 (2011)
- 13) Nishimura, T., *et al.*, *Adv. Mat.*, **29**, 1702406 (2017)

- 14) Urano, Y., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4888-4894 (2005)
- 15) Blackman, L.D., *et al.*, *ACS Macro Lett.*, **6**, 1263-1267 (2017)
- 16) Blackman, L.D., *et al.*, *ACS Cent. Sci.*, **4**, 718-723 (2018)
- 17) Hoogenboom, R., *et al.*, *Chem. Commun.*, **44**, 5758-5760 (2008)
- 18) Nishimura, T., *et al.*, *Polym. Chem.*, **10**, 691-697 (2019)
- 19) Yokouchi, Y., *et al.*, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **20**, 95-103 (2001)
- 20) Mukerabigwi, J.F., *et al.*, *J. Controll. Release*, **303**, 209-222 (2019)
- 21) Messenger, L., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **55**, 11106-11109 (2016)
- 22) Huang, Y., *et al.*, *Chem. Rev.*, **119**, 4357-4412 (2019)
- 23) Li, J., *et al.*, *Nano Lett.*, **17**, 6983-6990 (2017)
- 24) Chandrawati, R., *et al.*, *Adv. Mat.*, **29**, 1604932 (2017)
- 25) Kartha, S., *et al.*, *Adv. Healthc. Mat.*, **6**, 1700500 (2017)
- 26) Liu, Y., *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **8**, 187-192 (2013)